

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 148**

21 Número de solicitud: 201930831

51 Int. Cl.:

A01N 63/30 (2010.01)
A01N 27/00 (2006.01)
A01N 31/02 (2006.01)
A01N 31/06 (2006.01)
A01N 31/16 (2006.01)
A01N 43/78 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

25.09.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.03.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

22.04.2021

Fecha de concesión:

11.05.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.05.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (100.0%)
CARRETERA SAN VICENTE DEL RASPEIG, S/N
03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ LLORCA, Luis Vicente;
LÓPEZ MOYA, Federico;
LOZANO SORIA, Ana;
PICCIOTTI, Ugo y
LÓPEZ-CEPERO JIMÉNEZ, Javier**

54 Título: **USO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE HONGOS PARÁSITOS DE
INVERTEBRADOS COMO REPELENTES DEL PICUDO NEGRO DE LA PLATANERA
(COSMOPOLITES SORDIDUS)**

57 Resumen:

Uso de compuestos orgánicos volátiles de hongos parásitos de invertebrados como repelentes del picudo negro de la platanera (*Cosmopolites sordidus*). La presente invención se refiere al uso de los compuestos orgánicos volátiles de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. chlamydosporia* seleccionados de entre, alcanfor, borneol, 1,3-dimetoxibenceno, 1-octen-3-ol, 3-ciclohepten-1-ona, como repelentes de *Cosmopolites sordidus*.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 815 148 B2

DESCRIPCIÓN

USO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE HONGOS PARÁSITOS DE INVERTEBRADOS COMO REPELENTES DEL PICUDO NEGRO DE LA PLATANERA (*COSMOPOLITES SORDIDUS*)

5 Campo de la invención

La presente invención se encuadra en el campo general de la agrobiotecnología y, en particular se refiere a la acción repelente de algunos compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por tres cepas de dos hongos entomopatógenos y por una cepa de un hongo nematófago, como repelentes del picudo negro de la platanera (PNP), *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824)
 10 (Coleoptera Curculionidae).

Estado de la técnica anterior

El plátano (*Musa sp.*) es el fruto más consumido y cultivado en el mundo (Ferri D.V. *et al.* 2012. Genetic variability of *Beauveria bassiana* and a DNA marker for environmental
 15 monitoring of a highly virulent isolate against *Cosmopolites sordidus*. *Indian journal of microbiology*, 52(4), 569-574). La producción mundial ronda los 114 millones de toneladas al año (FAO, 2018).

Entre los principales organismos que afectan a los cultivos de plataneras, *Cosmopolites sordidus* es el que causa el mayor daño y las mayores pérdidas económicas en todas las áreas
 20 de producción, es decir, es la plaga clave de las plantaciones de plataneras. Las pérdidas pueden oscilar entre el 30% y el 90% (Carballo, V. 1998. Mortalidad de *Cosmopolites sordidus* con diferentes formulaciones de *Beauveria bassiana*. *Manejo Integrado de Plagas (CATIE)* (no. 48) p. 45-48; Musabyimana T. *et al.* 2001. Effects of neem seed derivatives on behavioral and physiological responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of*
 25 *economic entomology*, 94(2), 449-454; Muñoz-Ruiz, C. 2007. Fluctuación poblacional del picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) del plátano (*Musa AAB*) en San Carlos, Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 20(1), 24-41).

C. sordidus es un insecto del orden Coleoptera, perteneciente a la familia Curculionidae y a la subfamilia Dryophthorinae. El PNP es una especie nativa de la región indo-malaya (Simmonds

N.W. 1966. Bananas. 2nd ed. *Longmans, Green and Co. Ltd.*, London, pp. 512) que actualmente se extiende como plaga a todas las regiones donde se cultiva la platanera, y en España, está presente, sobre todo, en las Islas Canarias (Carnero H.A. *et al.* 2002. Métodos alternativos para el control del picudo de la platanera *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae). *Actividades del ICIA en Platanera*, p. 75).

La invasión y difusión del PNP se debe a su comportamiento de búsqueda para adquirir alimentos, pareja, oviposición y sitios de reproducción. Por otra parte, el PNP posee una baja capacidad de vuelo y es capaz de infectar tanto al cormo de las plataneras, como pseudotallo e hijuelos. En dicho proceso el PNP consigue recursos que son absolutamente esenciales para su crecimiento y desarrollo y, para asegurar la eficacia biológica de futuras generaciones. Estos eficientes mecanismos de búsqueda del PNP se basan en sus antenas que funcionan como órganos quimio- y mecanorreceptores primarios especializados. Estos precisos mecanismos de evaluación ambiental son cruciales para asegurar la supervivencia y reproducción del PNP en el medio.

Los quimiorreceptores de las antenas suelen detectar productos químicos volátiles. Estos compuestos generan alertas en el insecto sobre la presencia de posibles parejas, alimento, lugares adecuados para depositar sus huevos o peligros que deben evitar. Por lo tanto, cualquier producto químico que pudiese interrumpir y/o modificar el comportamiento del PNP y, en general, su capacidad de búsqueda del huésped (*Musa sp.*) proporcionaría una herramienta para su manejo sostenible.

Los COVs son compuestos sólidos o líquidos con una base carbonada que entran en fase gaseosa mediante vaporización a temperatura ambiente (20°C y 0,01 kPa; Pagans E. *et al.* 2006. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. *Journal of hazardous materials*, 131(1-3), 179-186).

La emisión de COVs desempeña funciones ecológicas y fisiológicas esenciales para muchos organismos, como los hongos, que liberan un amplio espectro de COVs (Splivallo R. *et al.* 2011. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 189(3), 688-699; Kramer R. and Abraham W.R. 2012. Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for?. *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 15-37). Las emisiones de COVs fúngicos pertenecen a diferentes grupos químicos, como monoterpenoides, sesquiterpenos, alcoholes,

aldehídos, compuestos aromáticos, ésteres, furanos, hidrocarburos, cetonas o lactonas (Campos V.P. *et al.* 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(3), 525-535; Kramer R. and Abraham W.R. 2012. Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for? *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 15-37).

Los hongos producen diversos compuestos orgánicos volátiles (Crespo R. *et al.* 2008. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiological research*, 163(2), 148-151; Müller A. *et al.* 2013. Volatile profiles of fungi—chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology*, 54, 25-33) a través de vías metabólicas, implicados en procesos biológicos de control o comunicación entre microorganismos y su entorno. Los COVs fúngicos derivan del metabolismo primario y secundario (Korpi A. *et al.* 2009. Microbial volatile organic compounds. *Critical reviews in Toxicology*, 39(2), 139-193), y como pueden propagarse a través de la atmósfera y el suelo, son semioquímicos ideales (Morath S.U. *et al.* 2012. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73-83) capaces de actuar como mediadores en las interacciones entre organismos. La producción de COVs fúngicos es biológicamente dinámica. El perfil de una especie o cepa particular varía según el sustrato o nutriente, el tiempo de incubación, la temperatura y otros parámetros ambientales (Nilsson A. *et al.* 2004. Microorganisms and volatile organic compounds in airborne dust from damp residences. *Indoor Air*, 14(2), 74-82; Fiedler N. *et al.* 2005. Health effects of a mixture of indoor air volatile organics, their ozone oxidation products, and stress. *Environmental health perspectives*, 113(11), 1542-1548).

Actualmente, no existe ningún plan integrado de control del PNP, únicamente el manejo de la plaga mediante trampas de feromonas para conteo y captura, controlando posibles focos y eliminando las plantas demasiado infectadas, método poco eficiente y caro. En este sentido, la patente ES2600526 describe compuestos orgánicos volátiles de *Beauveria bassiana*, para su uso como repelente específico de *Rhynchophorus ferrugineus*. Los COV descritos en dicha patente, concretamente: metilbenceno, hexametil-ciclotetrasiloxanos, 1,4-dimetil benceno, etenilbenceno, dodecametil-pentasiloxano, benzaldehído, 5-metilundecano, aldehído cáprico, 1,4-bis (1,1 -dimetil benceno), benzotiazol y 1-Decanol son específicos para *Rhynchophorus ferrugineus*, y no producen ningún efecto en *Cosmopolites sordidus*.

Es evidente la gran incidencia que tiene el PNP en los cultivos de platanera y el aumento en las restricciones nacionales y europeas en el uso de insecticidas de síntesis química para estas plagas. Existe pues la necesidad de desarrollar nuevos compuestos derivados de agentes de control biológico naturales para mitigar los daños producidos por *Cosmopolites sordidus*, y para eliminar los daños provocados en el ambiente cuando se utilizan insecticidas frente a dicho insecto.

Explicación de la invención

La presente invención resuelve los problemas descritos anteriormente, ya que proporciona nuevos COVs con actividad repelente derivados del metabolismo de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) y nematófagos (*Pochonia chlamydosporia*).

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto orgánico volátil de un hongo entomopatógeno y/o nematófago (de aquí en adelante compuesto orgánico volátil de la presente invención), seleccionado de entre, alcanfor, borneol, 1,3-dimetoxibenceno, 1-octen-3-ol, 3-ciclohepten-1-ona como repelente de *Cosmopolites sordidus*.

En la presente invención por “compuesto orgánico volátil” se refiere a una sustancia química carbonada sólida y/o líquida que aparece como producto intermedio o final de las vías metabólicas de los hongos mencionados anteriormente.

En una realización particular, los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención pertenecen a diferentes familias químicas y se producen en diferentes tiempos de incubación por los diferentes hongos utilizados.

En una realización particular, los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención son seleccionados de entre:

Alcanfor (C₁₀H₁₆O) (también denominado en la presente invención como compuesto C3), es una cetona cíclica también seleccionada por Bb1TS11. Este compuesto, a diferencia de los otros, se detectó durante las pruebas preliminares realizadas para el desarrollo del protocolo apropiado, con muestras de Bb1TS11. Dada la conocida acción repelente que esta sustancia tiene sobre otros insectos, como mosquitos (Diptera Culicidae) (Nerio L.S. *et al.* 2010. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, 101(1), 372-378), fue

seleccionada como candidato repelente, a pesar de no ser un compuesto mayoritario.

Borneol ($C_{10}H_{18}O$) (también denominado en la presente invención como compuesto C4), es un terpeno identificado por el perfil metabólico de *Bb1TS11*.

5 1,3-dimetoxibenceno ($C_6H_4(OCH_3)_2$) (también denominado en la presente invención como compuesto C5), es un compuesto aromático identificado por *Pc123* y *Ma4TS04*.

1-octen-3-ol ($CH_3(CH_2)_4CHCH=CH_2$) (también denominado en la presente invención como compuesto C6), es un alcohol secundario seleccionado de los perfiles metabólicos de *Ma4TS04* y *Pc123*.

10 3-ciclohepten-1-ona ($C_7H_{10}O$) (también denominado en la presente invención como compuesto C7), es una cetona cíclica identificada por los perfiles metabólicos de *Bb1TS11*, *Ma4TS04* y *Pc123* (Figura 1).

En una realización más en particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es de un hongo entomopatógeno seleccionado de entre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

15 En otra realización más en particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*.

En otra realización particular de la presente invención, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y el compuesto el compuesto orgánico volátil de la presente invención es seleccionado de entre alcanfor
20 ($C_{10}H_{16}O$) y borneol.

En otra realización particular de la presente invención, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* y el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es seleccionado de entre 1,3-dimetoxibenceno ($C_6H_4(OCH_3)_2$), 1-octen-3-ol ($CH_3(CH_2)_4CHCH=CH_2$), 3-ciclohepten-1-ona ($C_7H_{10}O$).

25 En otra realización particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es del hongo *Pochonia chlamydosporia* y el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es seleccionado de entre 1,3-dimetoxibenceno ($C_6H_4(OCH_3)_2$), 1-octen-3-ol ($CH_3(CH_2)_4CHCH=CH_2$), 3-ciclohepten-1-ona ($C_7H_{10}O$), para su uso como repelente de *Cosmopolites sordidus*.

En otra realización particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, es obtenido por síntesis química.

En otra realización particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, está en forma sólida.

- 5 En otra realización particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, está en forma líquida. En una realización más en particular, la formulación líquida está impregnada en una matriz.

En otra realización particular, el compuesto orgánico volátil de la presente invención, está en forma gel.

- 10 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende al menos un compuesto orgánico volátil de la presente invención, como repelente de *Cosmopolites sordidus*.

Los compuestos orgánicos volátiles de la presente invención se han identificado como metabolitos de una cepa de *B. bassiana* (*Bb1TS11*), una cepa de *M. anisopliae* (*Ma4TS04*) y
15 una cepa de *P. chlamydosporia* (*Pc123*).

Bb1TS11 (CECT 21121; NCBI MK156717) y *Ma4TS04* (CECT 21126; NCBI MK156715) se aislaron de muestras de suelo de la rizosfera de las plantaciones de platanera ubicadas en Canarias; por lo tanto, se supone que esas cepas han interactuado con la población canaria de PNP. Mientras que *Pc123* se aisló de huevos de *Heterodera avenae*, en Sevilla (ATCC No.
20 MYA-4875; CECT No. 20929).

Breve descripción de las figuras

- Figura 1. Diagrama de Venn que representa los COVs identificados por GC/MS-SPME en las
25 muestras.

Figura 2. Análisis de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GCMS) mediante SPME para *B. bassiana* 1TS11 de 20 días de incubación.

Figura 3. Análisis de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GCMS) mediante

SPME para *B. bassiana* 1TS11 de 30 días de incubación.

Figura 4. Análisis de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GCMS) mediante SPME para *M. anisopliae* 4TS04 de 10 días de incubación.

Figura 5. Análisis de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GCMS) mediante SPME para *P. chlamydosporia* 123 de 10 días de incubación

Figura 6. Esquema de los estímulos colocados en un olfactómetro. *E1* representa a los individuos que han elegido los atrayentes; *E2* representa a todos los individuos que han acudido al repelente de los candidatos evaluados o, alternativamente, a la ausencia de estímulos; *EC* indica individuos que han elegido no moverse.

Figura 7. Resultados de la prueba de Tukey en las PCFAs. SL-Ha (Adultos de PNP en condiciones sin luz y con hambre), SL-SHa (Adultos de PNP en condiciones sin luz y sin hambre), L-Ha (Adultos de PNP en condiciones con luz y con hambre), L-SHa (Adultos de PNP en condiciones con luz y sin hambre)

Figura 8. Resultados de la prueba de Tukey en las PRs, en condiciones óptimas para su movimiento (SL-Ha). COVs: C1 (estireno); C2 (benzotiazol); C3 (alcanfor); C4 (borneol); C5 (1,3-dimetoxibenceno); C6 (1-octen-3-ol); C7 (3-ciclohepten-1-ona).

Exposición detallada de modos de realización

Insectos y cormo/pseudotallo de platanera utilizados en los bioensayos

Los adultos de PNP se recogieron en la Isla de Tenerife (Canarias, España) mediante trampas de feromonas cebadas con ECOSordidina60 (ecobertura[®], ref.: 019-FACS60), basado en sordidina. Los insectos se mantuvieron en cajas a 28±0,5°C en la oscuridad. Las cajas de plástico (40x30x21 cm) contenían un papel de filtro y un pequeño recipiente perforado con agua destilada, para mantener los niveles de humedad en torno al 80±5%. Se seleccionaron al azar 20 individuos (sin distinguir entre machos y hembras) sanos de PNP de la población stock para los experimentos con bioensayos en olfactómetro de dos vías.

Se recogieron trozos de cormo y pseudotallo de platanera (*Musa sp.*) de los invernaderos de la Universidad de Alicante, de plantas procedentes de las Islas Canarias (CULTESA). Se utilizaron 15,6 g de cormo/pseudotallo para los experimentos de bioensayo en olfactómetro de

dos vías.

Hongos

Se han utilizado dos especies de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) y una especie de hongo nematófago (*Pochonia chlamydosporia*).

- 5 Utilizamos una cepa de *B. bassiana* Bb1TS11. Bb1TS11 (CECT 21121; NCBI MK156717) aislada de muestras de suelo de la rizosfera de cultivos de plataneras ubicadas en las Islas Canarias, en concreto de Tenerife; por lo tanto, se supone que esta cepa ha interactuado directamente con la población canaria de PNP. En lo que respecta a *M. anisopliae*, la cepa Ma4TS04 (CECT 21126; NCBI MK156715), como la comentada anteriormente, ha sido
10 aislada de suelo canario. El hongo *P. chlamydosporia* cepa 123, Pc123 se aisló de huevos de *Heterodera avenae*, en Sevilla (ATCC No. MYA-4875; CECT No. 20929). Los hongos se mantuvieron en oscuridad a 4°C en agar harina de maíz (CMA; BBL Sparks, MD).

Para el uso de los hongos en los análisis de GC/MS-SPME se prepararon formulaciones sólidas de los mismos a partir de sustrato de arroz (*Oryza sativa*) según Güerri-Agulló B. *et al.* (2011).

- 15 Se utilizaron matraces de 250 mL a los que se agregaron como sustrato 75 g de arroz.

Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por los hongos parásitos de invertebrados

- La técnica GC/MS (Cromatografía de gases-Espectrometría de masas) utilizada fue la MicroExtracción en Fase Sólida (SPME). En ella, se utiliza una fibra de sílice fundida
20 (aproximadamente 1 cm de largo y 0,110 mm) cubierta con una pequeña cantidad de fase de extracción, colocada en una jeringa modificada llamada habitualmente “holder”.

- Se prepararon cuatro muestras para analizar los COVs, una para cada cepa de hongos, más una muestra de arroz no inoculada por ningún hongo (esterilizada), utilizada como control. Para cada muestra se tomaron 5 g de arroz de los matraces de cultivo y se colocaron en un vial (HS, crimb, FB, 20 ml, clr, cert, 100 PK, Agilent Technologies) tapado herméticamente con un tapón
25 de presión con una membrana de plástico. Las muestras se incubaron individualmente en un baño termostático, con una temperatura fija de 60°C. Para C3 se realizaron ensayos hasta 100°C.

La absorción de los COVs liberados se produjo al colocar la fibra del “holder” expuesta en el interior del vial sin tocar la muestra de arroz, durante 15 minutos. Después de esta operación,

el “holder” se insertó en el inyector de GC donde se expuso a la desorción durante cuatro minutos a 150°C con el modo “splitless”. El equipo utilizado es un espectrómetro de masas Agilent 5973 Network junto con un cromatógrafo de gases, modelo 6890N de Agilent.

El programa de temperatura utilizado para la cromatografía fue: temperatura inicial de 35°C durante 5 min y a 3°C/min a 150°C durante 1 min. Posteriormente a 5°C/min a 250°C hasta el final del análisis. El análisis cromatográfico duró 38 minutos. La columna utilizada es un DB624 de J&W Scientific de 30 m, 0,25 mm ID y 1,4 µm. La fuente de ionización para impacto electrónico a 70eV y 230°C. Se utilizó un simple cuadrupolo como detector, y su temperatura fue de 150°C. Wiley275 es la biblioteca utilizada para identificar detalles de los COVs.

Los perfiles metabólicos de los hongos involucrados en el estudio se revisaron sin los COVs identificados en el perfil control, la fibra sin muestra y los perfiles metabólicos del sustrato control, arroz autoclavado sin inóculo de hongo. Además, de los COVs Totales (T-COVs) característicos de cada hongo, se seleccionaron dos categorías de COVs: los COVs mayoritarios (M-COVs) y los COVs minoritarios (m-COV). Los M-COVs están representados por todas aquellas sustancias que han presentado una coincidencia $\geq 50\%$ con compuestos de la biblioteca y una abundancia máxima > 100000 ppm. Los m-COVs están, por otra parte, representados por todos los compuestos detectados que presentaron una concordancia de $\geq 50\%$ y una abundancia máxima entre 20000 ppm y 100000 ppm.

Bb1TS11 presentó 49 T-COVs diferentes, característicos de su perfil metabólico (Tabla 1; Figura 2 y 3). De éstos, solo tres compuestos, que representan el 6,1% del total, se encontraron pertenecientes a la categoría M-COVs; mientras que, se encontró que 12 compuestos diferentes pertenecían a la categoría de m-COVs y representan el 24,5% del total. De los M-COVs, se encontró 3-ciclohepten-1-ona (C7) en las seis mediciones realizadas durante los 60 días de crecimiento de hongos; mientras que, la N-etil-bencenamina se detectó solo en las mediciones realizadas a los 30 y 40 días después de la inoculación del sustrato. Finalmente, el 1,3-octadieno es el tercer M-COVs y se identificó solo en la medición realizada 50 días después de la inoculación del sustrato. Entre los m-COVs solo se detectó borneol (C4) a los 10, 20, 40 y 50 días a partir del inóculo. Los otros m-COVs de *Bb1TS11* se detallan en la Tabla 1. También se detectó benzothiazol (C2).

Tabla 1. COVs detectados en el hongo *Bb1TS11* a los 10-60 días

Nº	Compuesto	T. ret. (min)	Alt. pico 10d	Alt. pico 20d	Alt. pico 30d	Alt. pico 40d	Alt. pico 50d	Alt. pico 60d
2	Acetaldehído	1,25-2,45	1559104	50002	NA	NA	NA	NA
3	5-metoxi-1-aza-6-oxabicyclo(3.1.0)-hexano	1,29	22714	NA	NA	NA	NA	NA
6	Metil-silano	2,10	1757290	NA	NA	NA	NA	NA
24	Cis-1-butyl-2-metilciclopropano	13,49	NA	NA	16304	NA	NA	NA
25	1-octeno	13,50	NA	16066	NA	NA	NA	NA
26	1,3-octadieno	15,20	NA	NA	NA	NA	450258	NA
27 (C7)	3-ciclohepten-1-ona	15,20	50086	475717	306136	120587	NA	233415
28	Metil-1,4-dioxidopirazina	15,24	48477	NA	NA	NA	NA	NA
48	2,2,4,6,6-pentametilheptano	21,31	NA	NA	14184	NA	NA	NA
53	Metilciclohexano	21,68	40351	NA	NA	NA	NA	NA
54	4,4-dimetil-2-penteno	21,69	NA	NA	21528	NA	NA	NA
57	4-butyl-1-oxidopiridina	21,87	42548	NA	NA	NA	NA	NA
58	dietoximetiloctadecilsilano	21,88	NA	NA	NA	NA	NA	95632
63	9-aminofenantreno	22,01	NA	27694	NA	NA	NA	NA
67	dihidro-2(3H)-furanona	22,30	NA	NA	14115	NA	NA	NA
72	2-metil-2-borneno	22,71	21125	NA	NA	NA	NA	NA
73	3-bromoheptano	22,71	NA	NA	13693	NA	NA	NA
78	2-(2-etoxietoxi)-etanol	23,60	NA	NA	20657	NA	NA	NA
79	2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano	24,26	38943	NA	NA	NA	NA	NA
82	2,3-dimetil-1-penteno	24,30	NA	NA	25468	NA	NA	NA
87	2,2,4-trimetilpentanol	24,77-32,99	NA	NA	16370	NA	NA	NA
88	3-etilheptano	24,77	NA	NA	50802	29098	NA	NA

97	1-metil-1H-1,2,4-triazol	25,58	33619	NA	NA	NA	NA	NA
100	2-metil-3,4-dihidro-2H-pirano	25,70	NA	NA	18525	NA	NA	NA
111	N-acetil-3,4-dimetoxifenilpropilamina	26,49	NA	NA	NA	NA	47442	38741
113	Biciclooctilo	26,86	NA	NA	NA	NA	17823	NA
115	(-)-lavandulol	26,87	NA	NA	49139	NA	NA	NA
117	1-etil-1,3-dimetilciclohexano	26,87	NA	NA	NA	39845	NA	NA
124	1-metilalil(ciclooctatetraeno)titanio	27,22	NA	NA	NA	NA	18328	NA
125	4-metil-1-deceno	27,41	NA	NA	12049	NA	NA	NA
128	3,5,5-trimetilciclohexeno	27,90	NA	45584	NA	NA	204997	NA
130	N-etilbencenamina	27,90	NA	NA	736530	500115	NA	176141
141 (C4)	Borneol	29,30	96273	24965	NA	31486	20551	NA
142	2,3,3-trimetil-1,4-pentadieno	29,36	NA	NA	45469	NA	NA	NA
143	Exo-fencho	29,44	28786	NA	NA	NA	NA	NA
150	2-cloro-4-(4-metoxifenil)-6-(4-nitrofenil)-pirimidina	30,54-31,5	NA	NA	32886	NA	NA	NA
154 (C2)	Benzotiazol	31,00	NA	NA	23152	NA	NA	NA
157	1,3-dimetil-1,3-difenilurea	31,48	NA	NA	NA	NA	30205	NA
166	5-etil-3-hidroxi-4-metil-2(5H)-furanona	33,21	NA	NA	20868	NA	NA	NA
170	Ácido decanedioico didecil éster	33,47	NA	NA	13343	NA	NA	NA
174	2-hexil-1-octanol	34,71	NA	NA	14817	NA	NA	NA
176	Fytol	34,90	NA	NA	NA	16500	NA	NA
179	Hexil-ciclopentenona	34,98	NA	NA	19465	NA	NA	NA
183	2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-formato-(E)-1-buten-1-ol	36,27	NA	NA	17549	NA	NA	NA
189	(+)-gimnomitreno	37,10	NA	NA	11441	NA	NA	20992

Nº = Número, T. ret. = Tiempo de retención, Alt. pico = Altura del pico, NA = No aparece; d = días

Ma4TS04 mostró 49 T-COVs diferentes característicos de su perfil metabólico (Tabla 2; Figura 4). De estos, solo seis compuestos, que representan el 12.2% del total, se encontraron pertenecientes a la categoría de M-COVs; mientras que, se encontró que 11 compuestos diferentes pertenecían a la categoría de m-COVs y representaban el 22.4% del total. De los M-COVs, se encontró 3-ciclohepten-1-ona (C7) de 10 a 30 días después del inóculo; mientras que 1-octen-3-ol (C6) se detectó como M-VOC solo en las mediciones realizadas a los 20 y 30 días desde la inoculación del sustrato. El 4-fluoro-1,4-xileno se detectó en las mediciones realizadas los 20 y 60 días de la inoculación del sustrato. También, el 1,2-dipentil-ciclopropeno se detectó en las mediciones realizadas los 10 y 50 días después de la inoculación. También se detectó 1,3-dimetoxibenceno (C5). Los otros M-COVs de *Ma4TS04* se detallan en la tabla. Entre los m-COVs, el (+ -)-gymnomitrene se detectó a los 10, 20 y 40 días desde el inóculo. También, se encontró 1-octen-3-ol (C6) como m-COVs solo a los 10 y 40 días desde el inóculo. Los otros m-COVs de *Ma4TS04* se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. COVs detectados en el hongo *Ma4TS04* a los 10-60 días

Nº	Compuesto	T. ret. (min)	Alt. pico 10d	Alt. pico 20d	Alt. pico 30d	Alt. pico 40d	Alt. pico 50d	Alt. pico 60d
1	Oxirano	1,24 - 2,03	NA	52843	NA	NA	NA	NA
2	Acetaldehído	1,25-2,45	NA	1545998	NA	NA	NA	NA
11	Metanamina	3,08	NA	NA	1706876	NA	NA	NA
20	3-metil-1-butanol	13,28	NA	NA	10542	NA	NA	NA
21	2-clorooctano	13,45	NA	NA	11851	NA	NA	NA
26	1,3-octadieno	15,20	NA	NA	NA	64942	NA	NA
27 (C7)	3-ciclohepten-1-ona	15,20	274698	246124	103529	NA	NA	NA
45	3,5-dimetil-2-propiltiofeno	20,61	NA	NA	NA	NA	37336	NA
47	1-β-pineno	21,24	NA	NA	NA	NA	NA	41207
49	Triclorociclohexilano	21,40	NA	NA	17034	NA	NA	NA
52	2,3,3-trimetil-1-buteno	21,68-25,58	NA	18503	NA	NA	NA	NA
64	octahidro-2,2,4,4,7,7-hexametil-trans-1H-indeno	22,01	NA	23193	NA	NA	NA	NA
68 (C6)	1-octen-3-ol	22,36	26983	385375	141833	28896	NA	NA
70	3-metoxibencenamina	22,56	NA	NA	NA	NA	18640	NA
76	1-metil-4- (1-metiletil)-benceno	23,18	NA	NA	28806	NA	NA	NA
78	2-(2-etoxietoxi)-etanol	23,60	NA	NA	11435	15463	NA	NA
83	4-piridincarbonitrilo	24,30	NA	NA	NA	29028	NA	NA
89	6-metil-(E)-3-undeceno	24,77	NA	NA	NA	NA	23053	NA
90	Tert-butil-isopropilidenociclopropil-éter	24,77	NA	NA	14598	NA	NA	NA
96	(2-metil-1-propenil)-benceno	25,57	NA	NA	10315	NA	NA	NA
99	2,2-dimetilpropanal	25,63	NA	NA	NA	NA	18633	NA
107	2-amino-3,5-dibromo-6-metilpiridina	26,49	NA	NA	NA	NA	23956	NA

109	Ácido 4-hidroximandélico etil-éster di-TMS	26,49	NA	NA	NA	NA	NA	17357
111	N-acetil-3,4-dimetoxifenilpropilamina	26,49	NA	NA	NA	45725	NA	NA
117	1-etil-1,3-dimetilciclohexano	26,87	NA	NA	NA	43936	32380	NA
118	2,6-dimetil-2-trans-6-octadieno	26,87	NA	NA	16844	NA	NA	NA
119	4-etil-2,3-dimetil-2-hexeno	26,87	NA	27777	NA	NA	NA	NA
126	4-octen-3-ol	27,55	NA	NA	NA	NA	86926	NA
127	1,2-dipentilciclopropeno	27,90	372252	NA	NA	NA	372048	NA
128	3,5,5-trimetilciclohexeno	27,90	NA	NA	NA	535507	NA	NA
129	4-fluoro-1,2-xileno	27,90	NA	564055	NA	NA	NA	212795
130	N-etil-bencenamina	27,90	NA	NA	276097	NA	NA	NA
136 (C5)	1,3-dimetoxibenceno	28,75	263989	NA	NA	NA	NA	NA
137	1,5-diisopropil-2,3-dimetilciclohexano	28,77	NA	NA	NA	NA	NA	20923
151	9H-pirrolol[3',4':3,4]pirrolo [2,1-a]ftalazina-9,11(10H)-diona,10-etil-8-fenil	30,54	NA	NA	15606	NA	NA	NA
152	1-(2-furanil)-3-buten-1,2-diol	30,96	NA	NA	NA	13738	NA	NA
153	2,4-bis (1,1-dimetiletil)-fenol	31,00	NA	27688	NA	NA	NA	NA
159	5-oxoisoboldina	31,48	NA	NA	NA	NA	23875	NA
176	Fitol	34,90	NA	NA	NA	22565	NA	NA
189	(+)-gimnomitreno	37,10	27698	22167	NA	35769	NA	NA
190	1,4-bis(metileno)-ciclohexano	37,10	NA	NA	37375	NA	NA	NA

Nº = Número, T. ret. = Tiempo de retención, Alt. pico = Altura del pico, NA = No aparece; d = días

Pc123 mostró 111 T-COVs diferentes característicos de su perfil metabólico (Tabla 3; Figura 5). De estos, solo 14 compuestos, que representan el 12.6% del total, se encontraron pertenecientes a la categoría de M-COVs; mientras que, se encontró que 43 compuestos diferentes pertenecían a la categoría de m-COVs y representan el 38,7% del total. De los M-COVs, se encontró 1,3-dimetoxibenceno (C5) en las seis mediciones realizadas durante el crecimiento del hongo; mientras que 1-octen-3-ol (C6) ha sido detectado como M-COVs solo en mediciones realizadas a los 10, 20, 30 y 60 días desde la inoculación del sustrato. A los 20, 40 y 50 días de la inoculación, se identificó la 3-octanona; mientras que 3-ciclohepten-1-ona (C7) se encontró solo a los 10 y 20 días desde el inóculo. Entre los m-COVs, se detectó 2-(2-etoxietoxi)-etanol a los 30 y 40 días desde el inóculo. Propionoin, 2-butanona y 2-dodecanona se detectaron a los 40 y 50 días desde el inóculo. También, 16-oxosalutaridina y 3-metil-butanal se detectaron, pero a los 50 y 60 días. Los otros m-COVs de *Pc123* se detallan en la Tabla 3.

15

Tabla 3. COVs detectados en el hongo *Pc123* a los 10-60 días.

Nº	Compuesto	T. ret. (min)	Alt. pico 10d	Alt. pico 20d	Alt. pico 30d	Alt. pico 40d	Alt. pico 50d	Alt. pico 60d
1	Oxirano	1,24 - 2,03	850458	39543	NA	NA	NA	NA
2	Acetaldehído	1,25-2,45	1643945	NA	NA	NA	NA	NA
5	Ácido sal monoamonio carbámico	1,69	NA	NA	NA	711891	NA	NA
6	Metil-silano	2,10	NA	1193006	NA	NA	NA	NA
9	2-amino,1-propanol	2,42	NA	NA	1715223	NA	NA	NA
12	2-butanona	6,95	NA	NA	NA	86293	48305	NA
13	Metil etil, 2-butanona	6,99	NA	NA	19455	NA	NA	NA
14	3-metilbutanal	9,10	NA	NA	53579	NA	20264	24319
15	Hexano	9,41	NA	NA	NA	NA	NA	18917
16	2-metilbutanal	9,43	NA	NA	56948	NA	NA	NA
17	Dimetildisulfuro	12,60	NA	NA	NA	652744	120316	NA
18	3-hidroxi-2-butanona	12,76	NA	36450	NA	NA	NA	NA
19	4-metil-2-pentanona	13,04	NA	NA	9583	NA	NA	NA
22	3-metil-heptano	13,45	NA	NA	NA	NA	27769	NA
23	3-metil-2-pentanona	13,46	NA	NA	NA	190442	NA	NA
27 (C7)	3-ciclohepten-1-ona	15,20	714704	1027453	NA	NA	NA	NA
29	(1-metiletetil)-ciclopropeno	15,31	NA	NA	22283	NA	NA	NA
30	3-hidroxi-2-pentanona	16,41	NA	NA	NA	NA	15454	NA
31	Dietilamina-D1	16,41	NA	NA	NA	19677	NA	NA
32	2,4-octadieno	16,64	NA	20369	NA	NA	NA	NA
33	4-metil-3-hexanona	16,90	NA	NA	16601	30611	NA	NA
34	Nonano	17,17	21416	NA	NA	NA	NA	NA
35	3-metil-3-penten-2-ona	17,18	NA	NA	12427	NA	NA	NA
36	5-metil-2-hexanona	17,83	NA	NA	NA	60436	NA	NA
37	α -pineno	19,40	NA	NA	18225	NA	NA	NA

38	2-butoxi-etanol	19,79	NA	NA	NA	25455	NA	NA
39	Anisol	19,80	36292	NA	NA	NA	16902	NA
40	Metoxibenceno	19,82	NA	NA	18160	NA	NA	NA
41	Propionoína	20,01	NA	NA	NA	38713	23007	NA
42	2,4-dimetil-3-hexeno	20,54	NA	NA	NA	83694	NA	NA
43	3,4-dimetil-2-hexeno	20,55	NA	NA	NA	NA	31252	NA
44	Trans-3,4-dimetil-2-hexeno	20,55	NA	NA	83798	NA	NA	NA
46	β -pineno	21,20	NA	NA	NA	NA	NA	65861
50	2-isopropil-5-oxohexanal	21,42	NA	NA	NA	NA	43464	NA
51	6-metil-2-heptanona	21,42-25,13	NA	NA	NA	44853	NA	NA
55	Propil-ciclohexano	21,69	NA	NA	NA	NA	NA	321717
56	Trisulfuro de dimetilo	21,79	NA	NA	NA	NA	1664062	NA
59	Etenilpentametil-disiloxano	21,88	NA	NA	528567	NA	NA	NA
66	2-metil-propanamida	22,14	NA	13114	NA	NA	NA	NA
68 (C6)	1-octen-3-ol	22,36	123365	108363	557934	NA	NA	308377
69	3-octanona	22,40	NA	127465	NA	1553146	1027078	NA
71	Trimetil-pirazina	22,70	NA	NA	NA	NA	84154	NA
72	2-metil-2-borneno	22,71	46734	NA	NA	NA	NA	NA
74	Ácido 2,4-dimetil-metil éster-hexanoico	22,95	NA	34740	NA	NA	NA	NA
76	1-metil-4-(1-metiletil)-benceno	23,18	NA	NA	NA	50055	16588	NA
77	Isociano-benceno	23,58	NA	NA	NA	NA	23748	NA
78	2-(2-etoxietoxi)-etanol	23,60	NA	NA	24002	29742	NA	NA
80	1-cloro-3-metil-2-butenio	24,30	NA	NA	NA	52096	NA	NA
84	3,3-dimetil-1-penteno	24,31	NA	NA	26963	NA	NA	NA
85	2,4-dimetilfurano	24,41	NA	NA	NA	NA	NA	23645
87	2,2,4-trimetil-pentanol	24,77-32,99	NA	NA	NA	NA	NA	20166
89	6-metil-(E)-3-undeceno	24,77	NA	NA	42811	NA	NA	NA
91	2-dodecanona	24,9-34,28	NA	NA	NA	50080	74332	NA
92	4-metil-nonano	24,99	NA	NA	14087	NA	NA	NA

93	N-(1-metilheptil)-2-octanamina	25,13	NA	NA	NA	NA	19895	NA
95	Bencenometanol	25,49	NA	NA	NA	NA	21457	NA
101	4-T-butilciclohexanona	25,70	NA	NA	NA	32817	NA	NA
103	2-nonanona	26,08-29,09	NA	NA	NA	38059	152649	NA
105	6,7-dimetoxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano	26,41	24845	NA	NA	NA	NA	NA
108	Ácido 3-hidroximandélico etil éster di-TMS	26,49	NA	30385	NA	NA	87134	NA
109	Ácido 4-hidroximandélico etil éster di-TMS	26,49	NA	NA	NA	NA	NA	44896
110	4-trimetilsilil-9,9-dimetil-9-silafluoreno	26,49	41815	NA	NA	NA	NA	NA
116	(1-metilpropil)-ciclooctano	26,87	NA	NA	NA	105359	NA	NA
120	cis-2,6-dimetil-2,6-octadieno	26,87	20703	NA	NA	NA	NA	NA
123	Etil-ciclooctano	26,87	NA	NA	55671	NA	NA	NA
124	1-metilalil(ciclooctatetraeno)titanio	27,22	NA	NA	NA	NA	134606	NA
127	1,2-dipentilciclopropeno	27,90	NA	170644	NA	NA	NA	NA
128	3,5,5-trimetil-ciclohexeno	27,90	NA	NA	703953	NA	NA	NA
130	N-etil-bencenamina	27,90	NA	NA	NA	1282631	NA	345619
134	6-metil-biciclo[4.1.0]heptan-2-ona	27,93	NA	NA	NA	NA	608125	NA
135	1-fenil-2-propanona	28,22	NA	NA	NA	672379	495083	NA
136 (C5)	1,3-dimetoxibenceno	28,75	7233098	509769	3583189	3807170	3046943	308330
139	2-amino-4-metilpirimidina	29,14	NA	50671	NA	NA	NA	NA
140	Ácido biciclo [2.2.1]heptano-2-carboxílico	29,14	45509	NA	NA	NA	NA	NA
145	3-metil-silaciclopent-3-eno	30,20	NA	NA	51365	60183	NA	20685
146	2-metil-tiofeno	30,21	NA	NA	NA	NA	85115	NA
150	2-cloro-4-(4-metoxifenil)-6-(4-nitrofenil)pirimidina	30,54-31,5	NA	NA	43086	NA	NA	NA
153	2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol	31,00	35545	NA	NA	NA	NA	NA
155	2-undecanona	31,15-32,18	NA	NA	NA	NA	54235	NA
158	16-oxosalutaridina	31,48	NA	NA	NA	NA	66214	40033
160	(E)-2-[(N-hidroxi-n-fenil)-amida	26,06-31,49	NA	NA	17510	NA	NA	NA
162	Ácido cis-crisantémico	31,80	NA	NA	NA	NA	21985	NA

163	2-octanona	32,19	NA	NA	20918	NA	NA
164	3,5-dimetil-octano	32,98	NA	NA	19633	NA	NA
165	1-etil-2-metil-ciclohexano	33,21	NA	NA	22609	NA	NA
167	(2R, 6S)-2-tert-butil-6-etil-6-metil-1,3-dioxan-4-ona	33,22	NA	15548	NA	NA	NA
168	2,6-dimetil-ciclohexanona	33,40	NA	12143	NA	NA	NA
169	3-etil-3-metilheptano	33,44	NA	NA	17805	NA	NA
171	5-acetil-2-hidrazino-4-metilpiridina	33,70	NA	16684	25068	NA	NA
172	Bis (2,4-dimetilamino) pirimidina	33,76	NA	NA	NA	16629	NA
173	β -elemeno	34,61	NA	NA	NA	NA	107746
175	2-metoxi-3,8-dioxocetotax-1-eno	34,86	NA	16671	NA	NA	NA
177	Di-amilciclohexanol	34,97	NA	NA	NA	18490	NA
178	Isojasmon	34,97	NA	NA	38429	NA	NA
182	(Z) -3-Isopropil-3,6-dimetil-4,6-heptadien-2-ona	36,27	NA	NA	23284	NA	NA
184	Ciclotetradecano	36,68	NA	NA	29215	NA	NA
186	Dodecametil-pentasiloxano	36,88	NA	18438	NA	NA	NA
188	3-(bromometil)-1,8-dimetoxi-9,10-antracenodiona	36,90	NA	21429	NA	NA	NA
191	2-tridecanona	37,60	NA	NA	NA	15281	NA
192	trans- β -farneseno	37,94	NA	42068	NA	NA	NA
193	β -mirceno	37,94	14446	NA	NA	NA	NA

Nº = Número, T. ret. = Tiempo de retención, Alt. pico = Altura del pico, NA = No aparece; d = días

Descripción del olfactómetro de dos vías o tubo en “Y”

Se construyeron olfactómetros de dos vías (tubo en “Y”) (Rhodes *et al.* 2012. The role of olfactory cues in the sequential radiation of a gall-boring beetle, *Mordellistena convicta*. *Ecological Entomology*. 37(6): 500-507.) para los bioensayos de laboratorio para comprobar la respuesta de los individuos adultos de PNP a estímulos con los mencionados compuestos orgánicos volátiles. El olfactómetro se construyó en su totalidad a partir de secciones de tubo de vidrio resistente al calor conectadas cada una por un cono hermético (5 mm). Los tubos de vidrio poseían un diámetro interno de 30 mm, la rama principal medía 200 mm y los brazos de la unión en “Y” 150 mm de longitud. El ángulo entre cada brazo y el cuerpo principal fue de 75°. El extremo de cada brazo se unió a un contenedor de vidrio (60 mm de longitud, 25 mm de diámetro) en el que se colocan las cámaras de olor (Bazzocchi G.G. and Maini S. 2000. Ruolo dei semiochimici volatili nella ricerca dell’ospite da parte del parassitoide *Diglyphus isaea* (Hymenoptera Eulophidae). Prove olfattometriche. *Bollettino dell’Istituto di Entomologia “G. Grandi” Università di Bologna*, 54, 143-154) en los cuales se insertaron los estímulos olfativos que se analizaron. El aire en el interior de cada brazo del olfactómetro se mantuvo constante para todos los experimentos con el flujo de aire natural. Los tubos se cubrieron para evitar el escape de los insectos. Al cambiar las sustancias de los ensayos, los frascos se lavaron con alcohol etílico (Benito Parraga, S. L.), agua y con n-hexano (PanReac AppliChem) para eliminar todos los restos de los volátiles de muestras anteriores.

Bioensayos de comportamiento (olfactómetro de dos vías) utilizando los COVs propuestos

El olfactómetro de dos vías se utilizó para evaluar el comportamiento del PNP sometido a la acción de diferentes estímulos olfativos (atrayentes y repelentes). Refiriéndose a los estudios realizados por J. Jalinas (2016) en PRP (Picudo Rojo de las Palmeras, *Rhynchophorus ferrugineus*), todos se realizaron colocando un individuo de PNP en el centro del brazo recto. Los insectos en prueba tienen 10 minutos para moverse y elegir o no un estímulo. En total se realizaron 10 bioensayos diferentes, con un total de 120 individuos de PNP para cada uno. Cada prueba consta de seis réplicas, cada una con 20 individuos.

Los ensayos se agruparon en dos grupos diferentes: Pruebas de Condiciones Fisio-Ambientales (PCFAs) y Pruebas de Repelentes (PRs).

En el primer grupo, llamado Pruebas de Condiciones Fisio-Ambientales (PCFAs), se realizaron

cuatro pruebas en las que se probó la actividad atractiva del cormo/pseudotallo. De los dos cámaras de olor, el atractivo natural se colocó en uno (a la derecha o a la izquierda se eligió al azar) mientras que, en la otra cámara de olor, no se colocaron atrayentes ni repelentes, solo aire ambiental. Con esta estimulación olfativa, se probaron dos condiciones fisio-ambientales diferentes. En estas pruebas, quisimos evaluar la incidencia de una condición ambiental, es decir, se evaluó la incidencia que la presencia de luz (L) o su ausencia (SL) tiene en el movimiento del PNP. Se sabe que el PNP tiene un hábito predominantemente nocturno (Gold C.S., Pena J.E., Karamura E.B. (2001). Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). *Integrated Pest Management Reviews*, 6(2), 79-155).

Además, se probó el movimiento del PNP con una condición fisiológica como es el hambre. Se probaron dos subpoblaciones de PNP: la primera consistió en individuos con un arreglo de comida (*Musa sp.*) *ad libitum* (SHa), mientras que otro estaba compuesto de individuos con al menos una semana de inanición (Ha). De esta manera, fue posible definir el dominio de las condiciones fisio-ambientales en las que *C. sordidus* tiene la mayor tasa de movimiento.

En el segundo grupo, llamado Pruebas de Repelentes (PRs), se realizaron siete pruebas con PNP en condiciones SL-Ha.

Las pruebas se realizaron con siete compuestos potencialmente repelentes (C1-C7), se utilizaron muestras comerciales de dichos compuestos (Sigma-Aldrich). En estas pruebas, en las cámaras de olor, se colocaron en uno cormo/pseudotallo frescos y en el otro un dispensador de 0,5 ml (C1, C2, C5, C6 y C7) o 0,5 g (C3 y C4) del repelente puro a ensayar. Los dispensadores utilizados se construyeron en el laboratorio utilizando sobres de miracloth (Merck KGaA) (3,5 cm x 2,5 cm) que contenían 2 g de gel de sílice 60A (70-200 μ , Carlo Erba) en su interior. El volumen de compuesto se añadió directamente a la sílice.

Los datos etológicos mostrados por los PNP, en las pruebas del olfactómetro de dos vías, se recopilaron en una hoja de cálculo de Excel. Como se muestra en la figura 6, los individuos de *C. sordidus* respondieron a la prueba de tres maneras diferentes: algunos fueron los estímulos E1, que siempre incluían los atrayentes (cormo/pseudotallo y feromonas). Otros individuos han recurrido al estímulo E2; en esta cámara de olor, todos los compuestos ensayados se colocaron individualmente (un compuesto/ensayo) o no se colocó ningún tipo de estímulo. Sin embargo,

otros han preferido no elegir, deteniéndose en lo que hemos llamado "casa" (EC).

Esta triple expresión etológica se evaluó primero con índices de movimiento contruidos *ad hoc*, para tener una medida rápida y explicativa de las pruebas únicas realizadas en los olfactómetros de dos vías. Además, los datos fueron probados a través de la prueba estadística de chi-cuadrado, con el software estadístico Rstudio.

Los índices de movimiento nacen de la necesidad de tener una herramienta rápida y fácilmente explicativa y, al mismo tiempo, útil para resumir la situación etológica mostrada por los PNP en las pruebas.

Se supuso que una población de PNP, puesta en el olfactómetro de dos vías y la ausencia de algún estímulo se distribuiría de manera uniforme en las tres opciones posibles mientras se mantenía una relación 1: 1: 1 ($n_{E1} = n_{E2} = n_{EC}$). También se consideró que los individuos que permanecen en la EC son aquellos que no respondieron al estímulo atractivo (en el caso en que no se colocó ningún estímulo en E2) o que fueron rechazados por la sustancia probada (en el caso en que E2 era colocado un candidato repelente). Por lo tanto, se construyeron tres índices que tomaron en consideración la relación entre los individuos en EC, E1 y E2 y el número total de individuos evaluados (N). Los tres índices son los siguientes:

$$I_{E1} = \frac{n_{E1}}{N}$$

$$I_{E2} = \frac{n_{E2}}{N}$$

$$I_{EC} = \frac{n_{EC}}{N}$$

donde: n_{E1} = número de individuos que han elegido E1, n_{E2} = número de individuos que han elegido E2, n_{EC} = número de individuos que permanecen en la EC, N = número total de individuos analizados.

Finalmente, para obtener un índice que tome en consideración todas estas relaciones entre grupos de individuos, los índices I_{E1} , I_{E2} e I_{EC} se han resumido en un solo índice: IM (Índice de Movimiento):

$$IM = \frac{(I_{E1} + I_{E2})}{I_{EC}} = \frac{n_{E1} + n_{E2}}{n_{EC}}$$

donde: $0 < IM < +\infty$. Cuanto más cerca está de cero el IM , más significativa es la porción de la población que ha permanecido inmóvil, sin reaccionar o capturar el estímulo atractivo.

- 5 El IM se calculó para cada uno de los seis ensayos ($N = 20$ PNP), generando una serie de datos para cada prueba. Luego, con el software estadístico R, se realizaron pruebas ANOVA en PCFAs, PRs.

Las condiciones fisio-ambientales en realidad interfieren con la movilidad de las PNP ($\chi^2 = 17.952$; $df = 6$; $p\text{-valor} = 0.006352$). A partir del análisis de ANOVA realizado en los IM s de las réplicas individuales, hubo una diferencia significativa entre las condiciones ($F\text{-valor} = 3.305$; $p\text{-valor} = 0.0413$). En la prueba de Tukey (Figura 7) podemos ver cómo las condiciones de sin luz (SL) y sin hambre (SHa) SL-SHa ($IM = 0.53$) son aquellas en las que el estímulo alimentario atrae más a los PNPs. El hábito nocturno de el PNP hace que el insecto, en ausencia de luz (SL), sea más móvil; además, la condición de inanición (Ha) estimula aún más los PNPs en la búsqueda de alimentos y, por lo tanto, le da mayor movilidad. La actitud nocturna del PNP es evidente ya que las pruebas realizadas en condiciones de SL, es decir, SL-Ha y SL-SHa ($IM = 0,48$), muestran una mayor movilidad de los PNP con respecto a las condiciones con luz (L), o L-Ha (luz-hambre) ($IM = 0.36$) y L-SHa ($IM = 0.22$). Por estas razones, la condición SL-Ha se usó como condición experimental para las PRs.

20 Del análisis de los datos relativos a las PRs más el control (SL-Ha), resultó que hay una significación ($\chi^2 = 34.142$; $df = 7$; $p\text{-valor} = 1.62e^{-5}$) y que, por lo tanto, el fenómeno observado sigue un patrón que no es accidental. A partir del análisis de ANOVA de los IM s, surgió que hay diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas bajo examen ($F\text{-valor} = 2.798$; $p\text{-valor} = 0.0181$). De la prueba de Tukey (Figura 8) está claro que todos los COVs probados tienen una acción repelente hacia el PNP, disminuyendo su movilidad con respecto al control. El compuesto C7 resulta ser el que tiene la mayor acción repelente, registrando el valor de IM más bajo. No parece haber una diferencia significativa entre C1 y C6 con respecto a la tasa de repelencia. Por lo tanto, según los valores de los IM s, los diferentes COVs muestran el siguiente

gradiente de repelencia: C7 ($IM = 0,11$), C5 ($IM = 0,18$), C2 ($IM = 0,26$), C1 ($IM = 0,28$), C4 ($IM = 0,28$), C3 ($IM = 0.45$) y C6 ($IM = 0.47$).

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil de un hongo entomopatógeno y/o nematófago, seleccionado de entre alcanfor, borneol, 1,3-dimetoxibenceno, 1-octen-3-ol, 3-ciclohepten-1-ona como repelente de *Cosmopolites sordidus*.
2. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil de un hongo entomopatógeno y/o nematófago
5 según la reivindicación 1, donde el hongo entomopatógeno es seleccionado de entre *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
3. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil de un hongo entomopatógeno y/o nematófago según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el hongo nematófago es *Pochonia chlamydosporia*.
- 10 4. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil de un hongo entomopatógeno y/o nematófago según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el hongo es *Beauveria bassiana* y el compuesto orgánico volátil es seleccionado de entre alcanfor ($C_{10}H_{16}O$) y borneol.
5. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil de un hongo entomopatógeno y/o nematófago según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el hongo es *Metarhizium anisopliae*
15 y el compuesto orgánico volátil es seleccionado de entre 1,3-dimetoxibenceno ($C_6H_4(OCH_3)_2$), 1-octen-3-ol ($CH_3(CH_2)_4CHCH=CH_2$), 3-ciclohepten-1-ona ($C_7H_{10}O$).
6. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil de un hongo entomopatógeno y/o nematófago según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el hongo es *Pochonia chlamydosporia* y el compuesto orgánico volátil es seleccionado de entre 1,3-dimetoxibenceno
20 ($C_6H_4(OCH_3)_2$), 1-octen-3-ol ($CH_3(CH_2)_4CHCH=CH_2$), 3-ciclohepten-1-ona ($C_7H_{10}O$), para su uso como repelente de *Cosmopolites sordidus*.
7. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto orgánico volátil es obtenido por síntesis química.
8. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-
25 7, donde el compuesto orgánico volátil está en forma sólida.
9. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el compuesto orgánico volátil está en forma líquida.
10. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil según la reivindicación 9, donde la

formulación líquida está impregnada en una matriz.

11. Uso de al menos un compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el compuesto orgánico volátil está en forma gel.

5

12. Uso de una composición que comprende al menos un compuesto orgánico volátil según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, como repelente de *Cosmopolites sordidus*.

FIG. 1

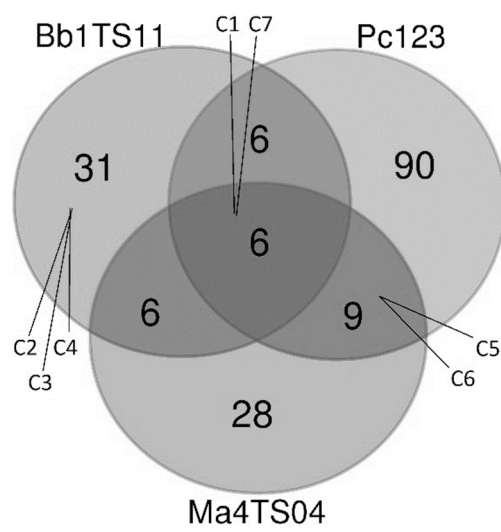


FIG. 2

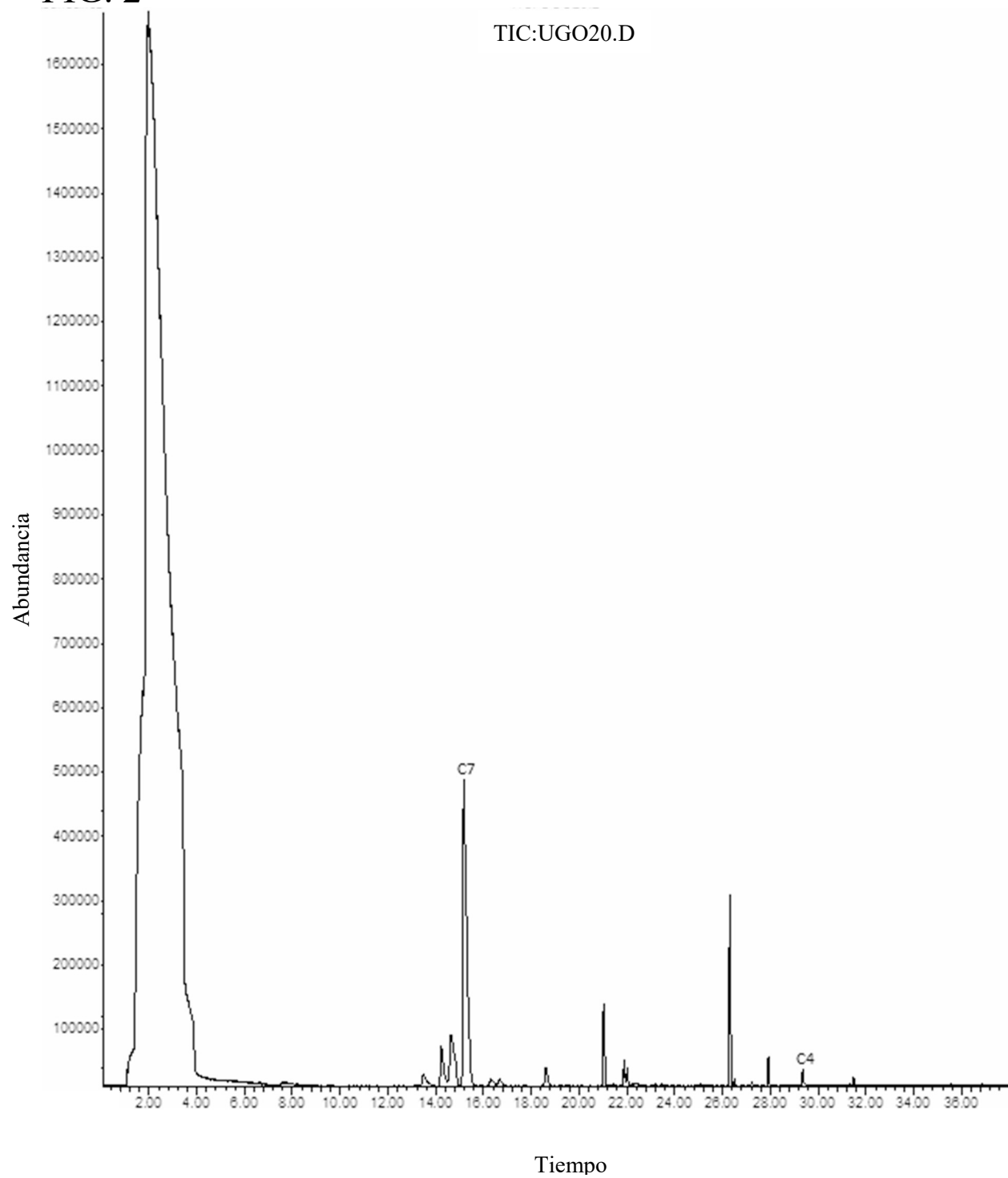


FIG. 3

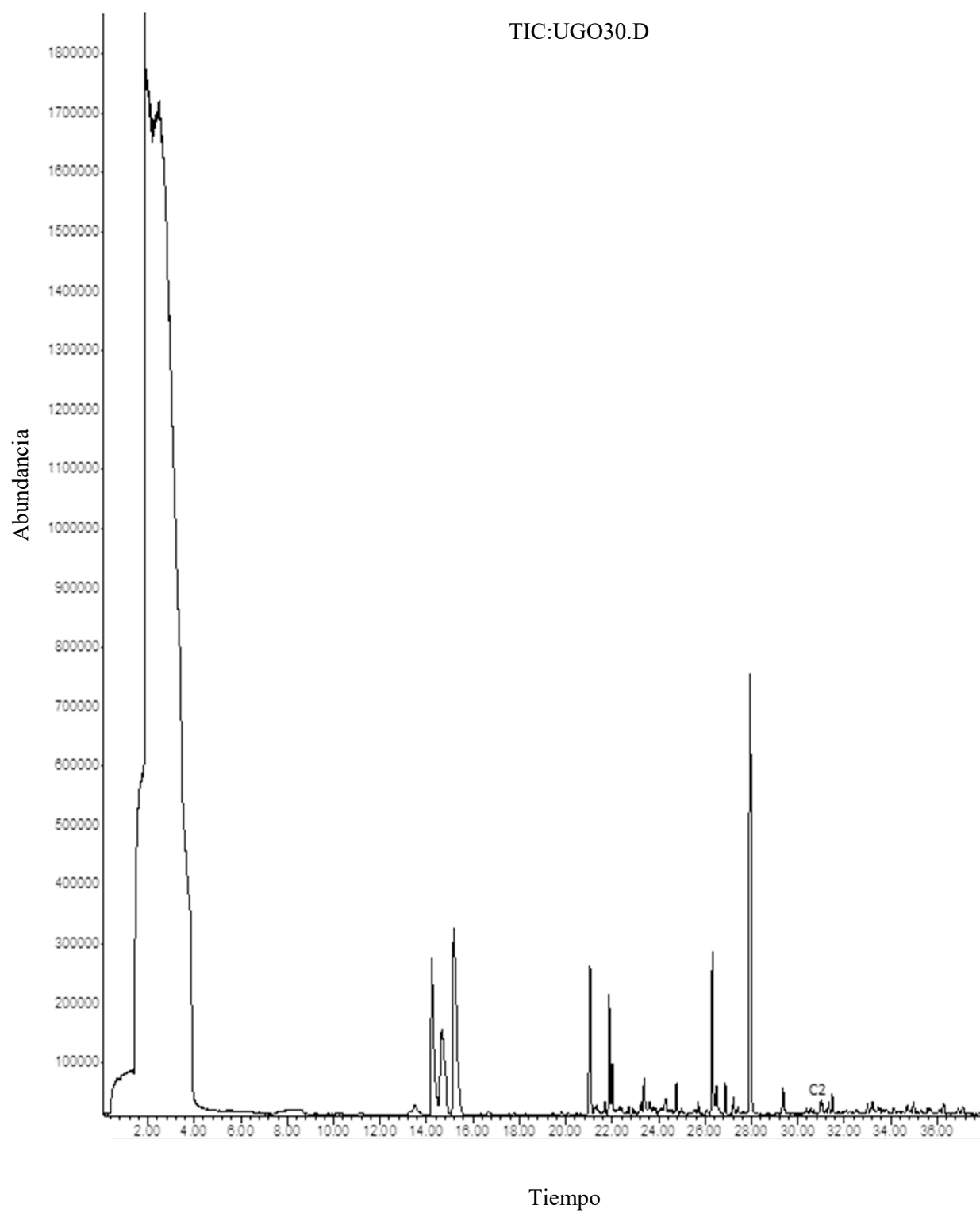


FIG. 4

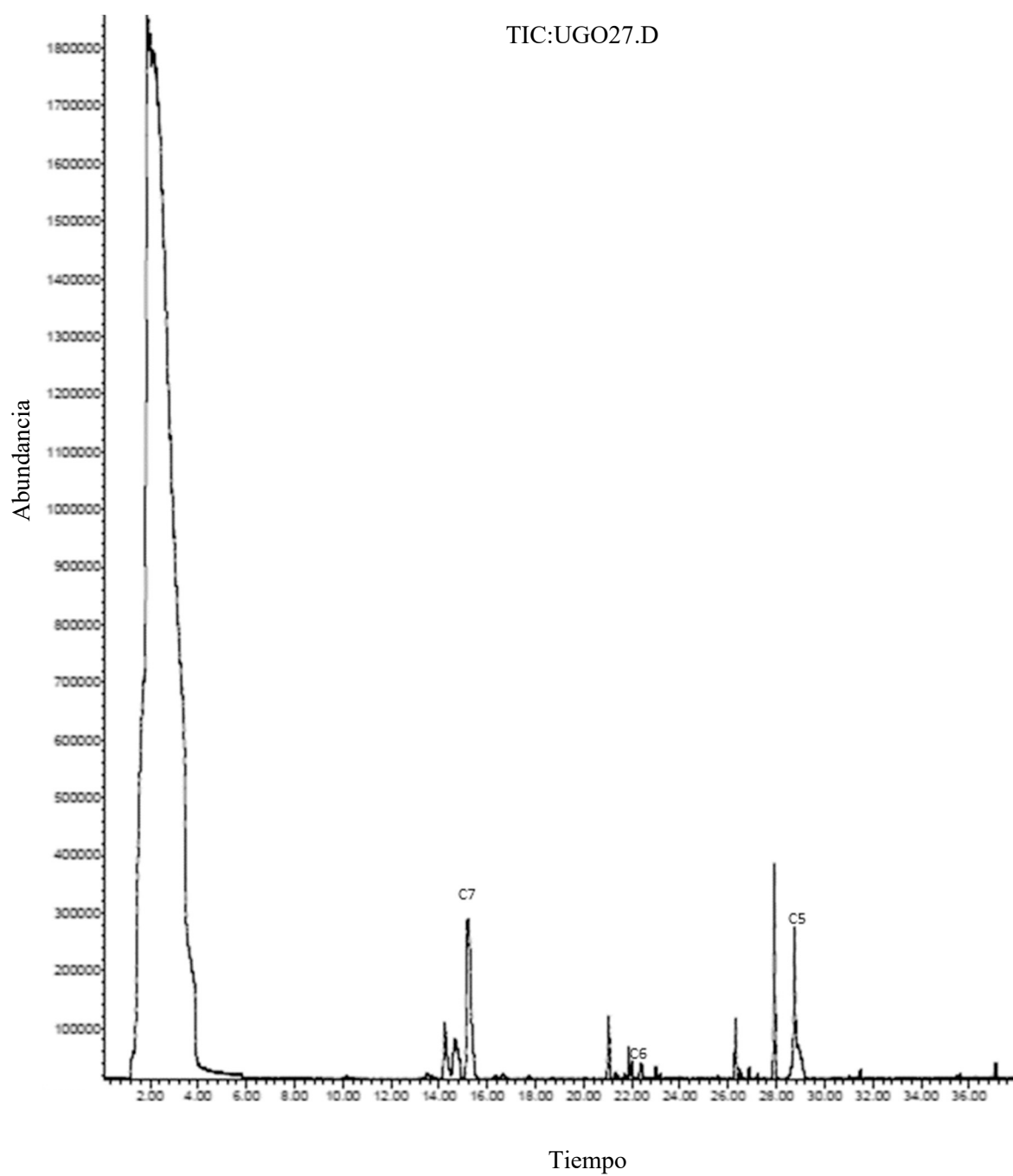


FIG. 5

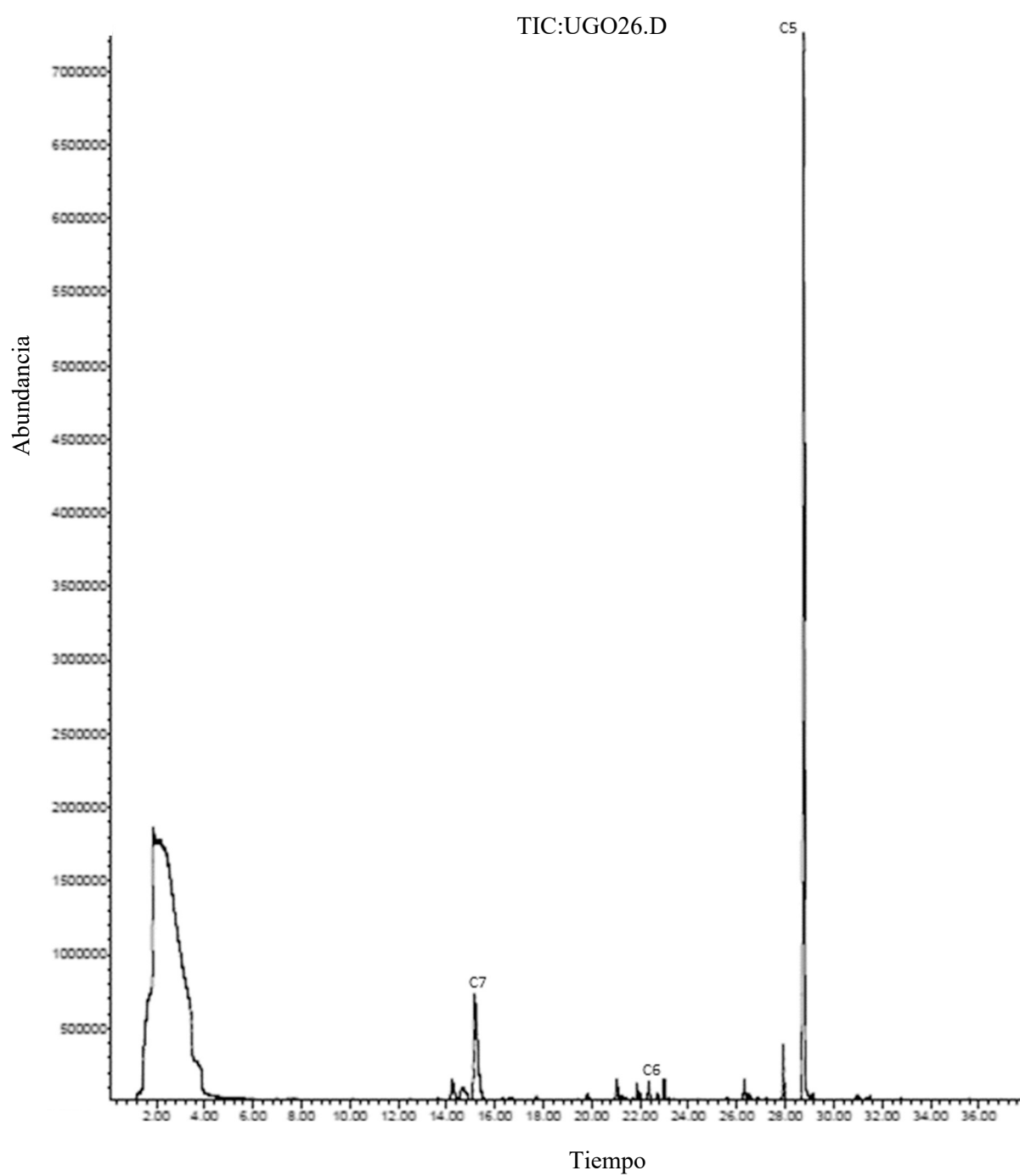


FIG. 6

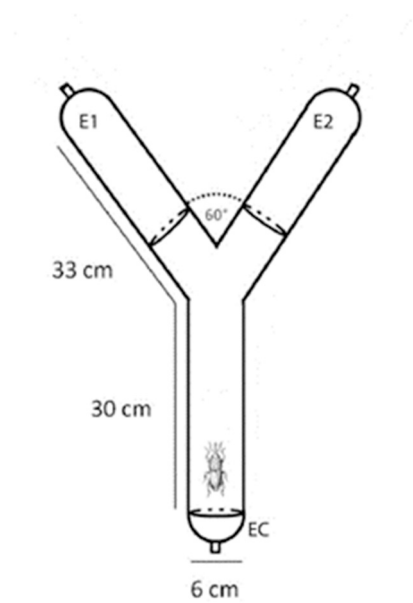


FIG. 7

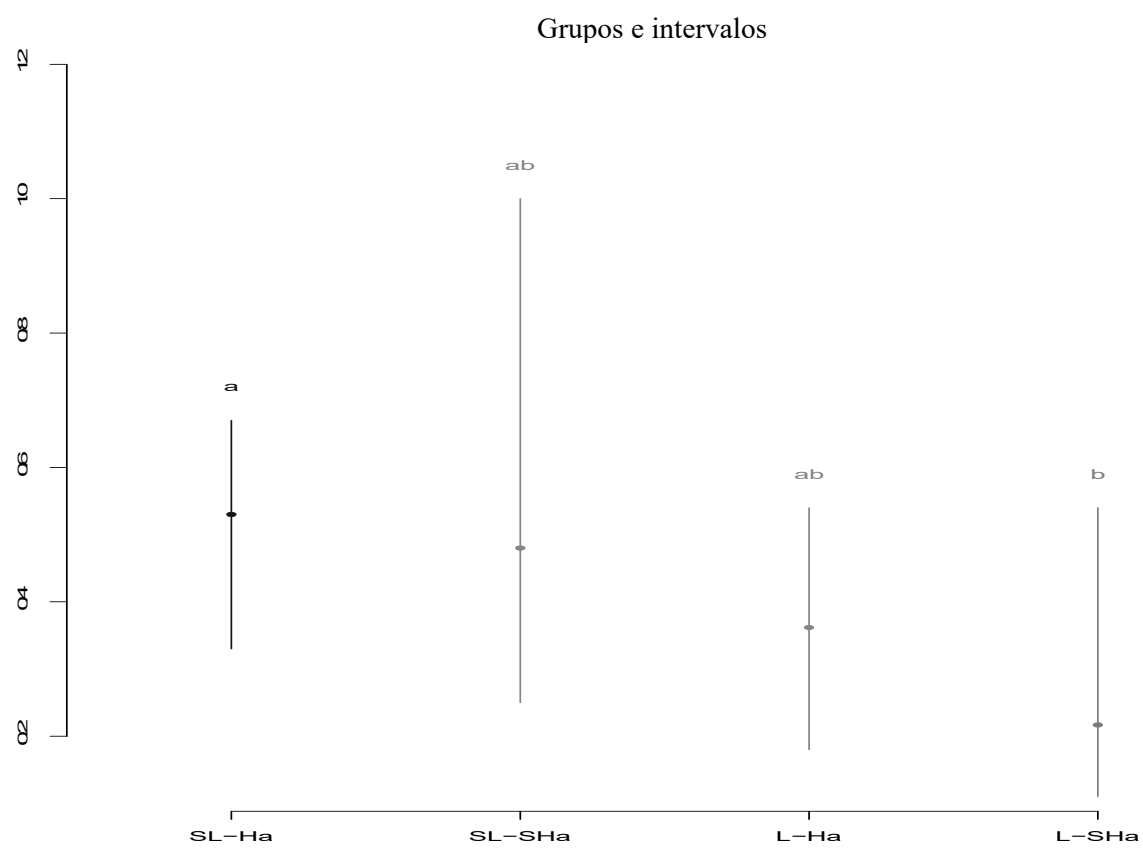


FIG. 8

