

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de doctorado de Fisiología
Bienio 2005-2007

**IDENTIFICACIÓN DE FEROMONAS Y PROTEÍNAS
IMPLICADAS EN LA PERCEPCIÓN FEROMONAL DE
LEPIDÓPTEROS PLAGA**

Memoria presentada por Patricia Acín Viu
para optar al título de Doctor
con mención europea

Tesis realizada en el Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular del
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC) bajo la dirección de la Dra.
Carmen Quero López y la Dra. Glòria Rosell Pellisé

Directoras

Dra. Carmen Quero López
Dept. de Química Biológica y Modelización Molecular
ICAQ
CSIC

Dra. Glòria Rosell Pellisé
Dept. de Farmacología y Química Terapéutica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

Tutora

Dra. Isabel Navarro Álvarez
Dept. de Fisiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Doctoranda

Patricia Acín Viu

**4. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN FEROMONAL DE LA
VARIEDAD DE *Spodoptera exigua* ENCONTRADA EN
ESPAÑA**

4.1. INTRODUCCIÓN

Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) (Figura 4.1) es una plaga ampliamente distribuida en numerosos cultivos alimenticios (tomate, pimiento, remolacha, calabacín, pepino, sandía, fresas, berenjena, etc), así como ornamentales, tanto en invernadero como al aire libre. Presenta una amplia distribución encontrándose en África, Sur de Europa, Asia, Australia, Estados Unidos y Canadá. Presenta entre dos y seis generaciones al año según la zona y las condiciones climáticas. En España tiene dos generaciones anuales en el centro y norte y entre dos y cuatro en Andalucía occidental y zona costera de Levante.

El ciclo biológico puede completarse a los 24 días si las condiciones son idóneas. Normalmente la hembra pone de 300-600 huevos. La puesta se efectúa en el envés de las hojas, cerca de las inflorescencias y extremo de los tallos. Las larvas (Figura 4.2) eclosionan a los 3-4 días. Pasan normalmente por cinco estadios larvarios. Los primeros estadios larvarios son gregarios; llegando a ocasionar grandes daños. Éstos consisten básicamente en agujeros en las hojas (Figura 4.3) aunque pueden llegar a dejar plantas enteras reducidas al tallo, provocar daños en los frutos y atacar las raíces. La pupación ocurre en el suelo, el tiempo que pasa en este estadio es de 6-8 días. El apareamiento ocurre poco después de haber emergido y la puesta de huevos ocurre los 2-3 días posteriores.

Los daños ocasionados por esta especie han ido incrementándose durante los últimos años, particularmente en invernaderos, posiblemente debido a la aparición de resistencia a los plaguicidas utilizados hasta el momento para su control (carbaril, triclorfon, tetraclorvinfos, etc). A esto se ha de añadir la elevada inespecificidad de los mismos que ha influido negativamente en la actividad de los enemigos naturales de esta especie.



Figuras 4.1-3. *S. exigua*. 1) Adulto sobre hoja de pimiento. 2) Larva de últimos estadios alimentándose de una hoja. 3) Daños en las hojas de una planta de pimiento.

El complejo feromonal de la plaga ha sido objeto de estudio de diversos investigadores reflejando una gran disparidad no solo en la composición feromonal sino también en la proporción relativa de los compuestos identificados. Estudios iniciales sobre extractos de la glándula feromonal identificaron el compuesto feromonal acetato de (*Z,E*)-9,12-tetradecadienilo (*Z9,E12-14:Ac*)⁸⁰. Pero la poca efectividad del mismo en pruebas de campo hizo necesaria la reinvestigación del complejo feromonal. En 1981, Persoons y colaboradores⁸¹ encontraron cinco compuestos en extractos glandulares, de los cuales, el *Z9,E12-14:Ac* y el acetato de (*Z*)-9-tetradecenilo (*Z9-14:Ac*) se hallaron como mayoritarios, además del acetato de (*Z,Z*)-9,12-tetradecadienilo (*Z9,Z12-14:Ac*), el acetato de (*Z*)-11-tetradecenilo (*Z11-14:Ac*) y el tetradecilo (*14:Ac*) como componentes minoritarios. Posteriormente, en 1990, Tumlinson y col.⁸² identificaron, además del *Z9,E12-14:Ac* y *Z9-14:Ac*, la presencia como componentes minoritarios de *Z9,Z12-14:Ac*, acetato de (*Z*)-11-hexadecenilo (*Z11-16:Ac*) y (*Z*)-9-tetradecenol (*Z9-14:OH*) en los volátiles emitidos por hembras de esta especie en una proporción 40,2:47,9:6,5:1,7:4. Estos estudios se realizaron en su mayoría con especies localizadas en diferentes partes de América del Norte. En años posteriores, se llevaron a cabo diversos análisis de la composición feromonal en otros lugares debido a la amplia distribución de la especie. Así, en 1994, Mochizuki y col.⁸³ establecieron la composición feromonal de la variedad encontrada en Japón como una mezcla de *Z9,E12-14:Ac*, *Z9-14:OH*, *Z9,E12-14:OH* y *Z9-14:Ac* en proporción 98:100:83:60 y, más recientemente, en el 2002 Dong y Du⁸⁴ en China, describieron la misma composición pero en proporción 47:18:17:18. Sin embargo, ninguna de las mezclas feromonales anteriormente citadas resultó ser significativamente efectiva en pruebas de campo. Rogers and Underhill⁸⁵ establecieron que la mezcla (*Z,E*)-9,12-14:Ac y *Z9-14:OH* en relación 1:10 era la más atrayente para los machos, sin embargo, Mitchell y col.⁸⁶ establecieron que la combinación de (*Z,E*)-9,12-14:Ac y *Z9-*

14:OH era también la mezcla más atractiva para machos aunque en proporción 10:1. Por el contrario la formulación consistente en los dos acetatos; Z9,E12-14:Ac y Z9-14:Ac era significativamente menos atractiva. La misma mezcla de acetato y alcohol (10:1) resultó ser a su vez la más efectiva en Taiwán⁸⁷, en el resto de China en proporción 9:1⁸⁴ y en Japón en una proporción 7:3⁸⁸. Estos resultados contradicen a los obtenidos por otros autores, donde la mezcla consistente en los 3 compuestos E12-14:Ac, Z11-16:Ac y Z9-14:OH en una proporción 87,2:10,3:2,5 era más efectiva en cuanto a atracción de machos⁸⁹. Igualmente se observó que la adición de Z9-14:Ac a la mezcla reducía el número de capturas y que las mezclas que carecían de Z9,E12-14:Ac y Z9-14:OH resultaban inefectivas⁸².

Dada la diversidad y disparidad de los resultados obtenidos sobre la composición de la feromona sexual de *S. exigua*, así como de una formulación óptima de atracción de los machos para el control eficiente de la plaga en la península, en el presente capítulo se ha realizado un estudio exhaustivo del complejo feromonal de esta especie para su posterior aplicación en el campo.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Material biológico

Los ensayos desarrollados en este capítulo se han realizado con insectos provenientes de una colonia mantenida en las instalaciones del CSIC de Barcelona a partir de pupas obtenidas de invernaderos de Almería. En un principio, se hicieron dos primeros intentos con pupas originarias de Murcia a fin de obtener una cría continua en nuestras condiciones de laboratorio sin éxito alguno, posiblemente debido a alguna deficiencia en la dieta administrada, ya que algunas de las larvas alcanzaban estadios avanzados sin llegar a pupar. Tras el posterior asesoramiento del Dr. Tomás Cabello (Universidad de Almería) se realizaron varios cambios en la cría de la especie, el primer paso fue la esterilización de las pupas y puestas. Este paso resultó primordial, debido a que ambos estadios pueden sufrir el ataque de varios agentes como son los hongos y los ácaros. La esterilización consistió en mantener tanto puestas como pupas 5 min en lejía al 0,05% (v/v) y a continuación se realizaron tres lavados en agua destilada durante 10 min en el caso de los huevos y unos 5 min en las pupas. Otra de las mejoras que se introdujo fue la elaboración de una nueva dieta en la que la harina de maíz fue sustituida por harina de trigo. La harina de maíz suele provenir de cultivos transgénicos y *S. exigua* es sensible a la misma. La composición de esta nueva dieta se detalla a continuación, las proporciones se encuentran en relación a 5 L de dieta:

- Harina de trigo: 250 g
- Levadura de cerveza: 250 g
- Germen de trigo: 250 g
- Ácido ascórbico: 22,5 g
- Nipagin: 9 g
- Formaldehído: 10,5 mL
- Complejo vitamínico: 125 mL
- Agar: 100 g
- Agua destilada: c.s.p 5 L

La colonia se ha renovado dos veces con pupas del mismo origen que con las que se comenzó la misma.

En cuanto al procedimiento de cría en general, una vez recortadas las puestas se depositaron en cajas de plásticos de 5,5 cm de diámetro y 3 cm de alto con trocitos

pequeños de dieta cerradas con tapas agujereadas para evitar el exceso de humedad y posterior aparición de hongos. Con el fin de impedir que las pequeñas larvas eclosionadas escaparan, se puso un trozo de papel de filtro entre la caja y la tapa. Durante los primeros estadios larvarios la dieta se cambió aproximadamente cada cuatro días, dependiendo del estado de la misma y una vez las larvas habían alcanzado un tamaño medio se separaron en cajas con un total de 4-5 larvas por caja. Esto es debido a que cuando alcanzan un tamaño considerado pueden devorarse entre ellas, especialmente cuando la disposición de comida y espacio es limitada. En estos últimos estadios la dieta se cambió cada dos días por la alta voracidad de las larvas, así como por el aumento de excrementos depositados. Cuando alcanzaron el estadio de prepupa, como ya no se alimentan, se juntaron varias en otra caja, de las mismas características que las utilizadas durante toda la cría, con algo de dieta para minimizar el riesgo de desecación de las mismas.

Una vez en estadio de pupa, se separaron por sexo y se dispusieron en una placa de Petri de 14 cm de diámetro con un papel de filtro en la base hasta la emergencia. Las placas a su vez, se introdujeron en recipientes de plástico (32 x 12 x 21 cm), en las que se depositó un tapón de plástico con algodón humedecido en una solución azucarada al 10% (w/v) y alrededor de las paredes un trozo de papel para que una vez emergidos los adultos tuvieran un lugar donde fijarse y así favorecer el estiramiento de las alas. Estos recipientes de plástico se taparon con papel de filtro sujeto con unas tapas de plástico perforadas. Ambos recipientes se pusieron en cámaras separadas donde el fotoperiodo se encontraba invertido a 16 h de luz y 8 h de oscuridad de modo que los experimentos pudieran realizarse durante el día, ya que el periodo de actividad de estos insectos acontece durante las horas de oscuridad. Las condiciones de temperatura y humedad en estas cámaras se encontraban reguladas a 24°C y 60% HR respectivamente. Los adultos permanecían en estas cámaras hasta su emergencia. Una parte de los individuos emergidos se dejó para apareamiento y consiguiente mantenimiento de la colonia y el resto para realizar los diferentes experimentos. El motivo por el cual las pupas se mantuvieron por separado fue para evitar el posible apareamiento una vez hubieran emergido, ya que esto podría influir en el comportamiento de ambos sexos en los ensayos realizados.

Los insectos utilizados para apareamiento se introdujeron en recipientes iguales a los utilizados en periodo de pupa. Las paredes de las cajas estaban forradas con papel de filtro y en el interior se metieron varios tapones de plástico con agua azucarada que servían no sólo para la alimentación de los mismos sino también para favorecer la oviposición, ya que la hembra solía poner las puestas en ellos. Normalmente se pusieron 9-10 hembras y 7 machos, ya que éstos se aparean varias veces. Los insectos se

dejaron en estos recipientes hasta que perecían, aunque las puestas se cortaron cada tres días y se siguió el proceso comentado anteriormente.

Los insectos empleados en todos los experimentos tenían entre uno y tres días de edad ya que es cuando están en un estado óptimo y se evita de esta forma una disminución de la respuesta como consecuencia de la avanzada edad de los mismos.

4.2.2. Compuestos químicos

A fin de facilitar la identificación de los compuestos feromonales sintetizados y emitidos por la hembra, se utilizaron como patrones diversos compuestos que han sido reportados como componentes feromonales de esta especie. Así mismo, dichos compuestos se utilizaron posteriormente en los diferentes experimentos de electrofisiología, EAG, GC-EAD y SSR, así como en túnel de viento.

Los productos químicos utilizados se muestran a continuación (Ver Tabla 4.1 y Figura 4.4)

Tabla 4.1. Compuestos feromonales utilizados en el presente capítulo.

Acetato de (Z,E)-9,12-tetradecadienilo ((Z,E)-9,12-14:Ac)	(1)
Acetato de (Z)-9-tetradecenilo (Z9-14:Ac)	(2)
Acetato de (Z)-11-hexadecenilo (Z11-16:Ac)	(3)
(Z,E)-9,12-tetradecadienol ((Z,E)-9,12-14:OH)	(4)
(Z)-9-tetradecenol (Z9-14:OH)	(5)
(Z)-11-hexadecenol (Z11-16:OH)	(6)
Acetato de dodecilo (12:Ac)	(7)
Acetato de (Z)-11-tetradecenilo (Z11-14:Ac)	(8)
Acetato de (Z,E)-9,11-tetradecadienilo (Z,E)-9,11-14:Ac)	(9)

Los compuestos (1, 7, 8 y 9) se obtuvieron de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), (2) de Acros-Organics (Geel, Bélgica), (3) (4) (5) y (6) de la empresa SEDQ, S.A. (Barcelona, España).

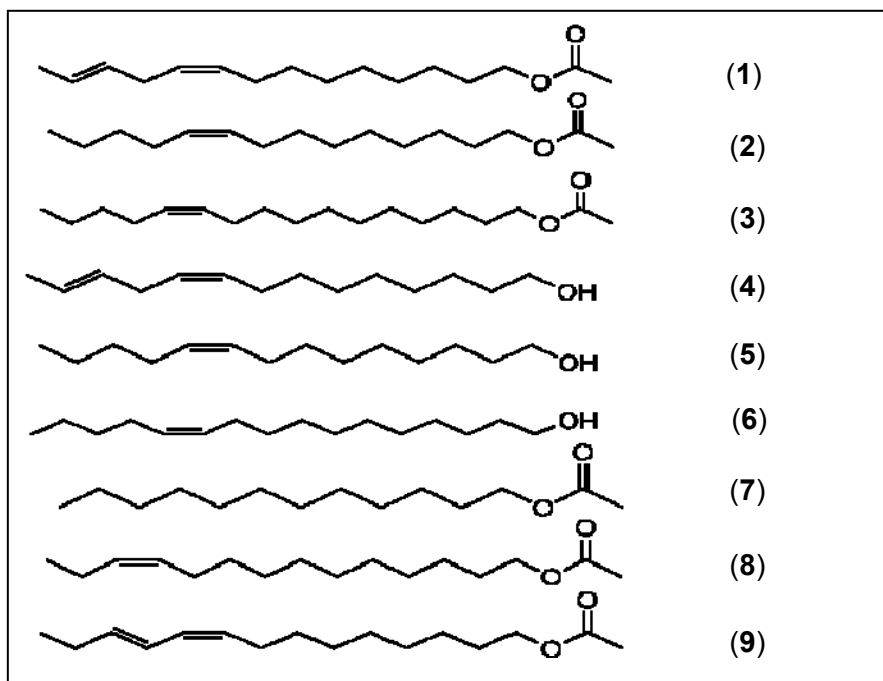


Figura 4.4. Estructura química de los compuestos feromonales utilizados en el presente capítulo.

4.2.3. Análisis de la composición feromonal

4.2.3.1. Observación del comportamiento de llamada

Se depositaron cuatro cajas de plástico en una sala en oscuridad dotada únicamente de una lámpara con una luz roja para facilitar la observación. En cada una de las cajas se colocó un mínimo de nueve hembras vírgenes de edades comprendidas entre 1^a y 5^a escotofases, separadas por caja según 1^a-2^a escotofase, 2^a-3^a escotofase, 3^a-4^a escotofase y 4^a-5^a escotofase. Todas las cajas estaban dotadas de papel de filtro alrededor para permitir que los insectos se posaran. Así mismo se aprovisionó a los insectos con agua azucarada al 10% en tapones con algodón. Una hora antes de comenzar la escotofase, las hembras eran situadas en la sala y una vez iniciada la escotofase se dejaban en oscuridad. La monitorización del comportamiento de llamada se realizó durante las ocho horas que dura la escotofase en intervalos de 30 min cada uno.

4.2.3.2. Extractos glandulares

Se realizaron 28 extractos de glándulas feromonales de hembras vírgenes durante el momento de la escotofase en el que la hembra realiza el comportamiento de llamada, para obtener así la máxima cantidad de feromona. Las hembras se anestesiaron con CO₂ y se presionó con suavidad los últimos artejos del abdomen hasta la evaginación de la glándula feromonal para proceder a su disección. Seguidamente se introdujeron en grupos de 2- 8 glándulas en viales que contenían 100 µL de hexano. Transcurrida una hora se procedió a retirar las glándulas. Los extractos se guardaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

La identificación de los compuestos feromonales hallados en las glándulas se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Previamente se añadió a cada extracto 20 ng de un patrón interno con el fin de facilitar la cuantificación de los diferentes compuestos feromonales. El patrón interno utilizado fue el 12:Ac, no encontrado en la bibliografía como compuesto feromonal de la especie y con un tiempo de retención diferente de los otros componentes hallados. Para el análisis de los extractos se utilizó un equipo de GC-MS constituido por un espectrómetro de masas MD 800 (Fisons Instruments) con un analizador tipo cuadrupolo, acoplado a un cromatógrafo de gases Fisons GC 8000 series (Fisons Instruments). El modo de ionización utilizado fue por impacto electrónico. En un principio se empleó una columna apolar HP-5 (Agilent Technologies, 30 m x 0.22 mm i.d.) para 11 de los extractos estudiados, pero debido a la poca sensibilidad observada frente a los alcoholes, se pasó a utilizar una columna polar SPB-20 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) de 30 m x 0,25 mm i.d. para los 17 extractos restantes. El programa utilizado con la columna HP-5 fue 70°C (1 min), 5°C /min hasta 120°C, 3°C/min hasta 300°C (10 min) y con la SPB-20: 100°C (1 min), 10°C/min hasta 120°C, 3°C/min hasta 250°C, 5°C/min hasta 260°C (10 min), ambos con splitless de 0,8 min. Todos los extractos se evaporaron manualmente con la ayuda de una pipeta Pasteur y una pera hasta un volumen aproximado de 1-1,5 µL, el cual se inyectó íntegramente.

Para facilitar la identificación de los compuestos feromonales encontrados en los extractos glandulares se inyectó paralelamente una mezcla de cinco compuestos feromonales **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **7** como patrón interno, a una concentración de 5 ng/ µL cada uno y posteriormente otra de estos seis componentes más **6**, **8** y **9** con el fin de observar si se encontraba algún otro compuesto que los normalmente identificados en esta especie.

4.2.3.3. Recogida de volátiles

Para observar la composición feromonal emitida por hembras, se dispusieron cinco hembras vírgenes en un vial (Supelco) de 40 mL (29 mm x 81 mm), con tres fragmentos de papel de filtro (Whatman) como superficie de sujeción para los insectos. Los insectos se dejaron en contacto con una fibra de polidimetilsiloxano de microextracción en fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) de 100 μm durante aproximadamente 16 h. Previamente, la fibra estuvo a 250°C durante una hora como mínimo hasta la completa limpieza de la misma. Pasadas las 16 h en contacto con las hembras, la fibra se inyectó en el mismo GC-MS que el utilizado en el análisis de los extractos glandulares para proceder a la consiguiente identificación de los compuestos emitidos. La columna utilizada en este caso fue la SPB-20 y el programa 80°C (5 min), incremento de 10°C/min hasta 120°C, incremento de 5°C/min hasta 280°C (10 min) con splitless de cinco minutos. Se realizó un total de ocho recolecciones de volátiles. Igualmente, se inyectó una mezcla de estándares (1-6) con una concentración de 10 ng/ μL de cada uno con el mismo programa a fin de favorecer la identificación de los compuestos emitidos.

4.2.4. Estudios electrofisiológicos

4.2.4.1. EAG

Con el fin de obtener un conocimiento general de los receptores que se encuentran en las antenas de los insectos estudiados se realizaron varios ensayos de EAG. Tanto la técnica como el equipo utilizado se encuentran detallados en los apartados 3.3.1 y 3.3.1.1 del capítulo 3 (págs. 22-24). En este caso el soporte de vidrio donde se introdujo la pipeta Pasteur con el agente estimulante era de 5 mm i.d. x 9 mm o.d., de modo que el diámetro fuera suficiente para abarcar toda la antena y de esta forma registrar la respuesta de todos los receptores de la misma. Los primeros ensayos realizados en EAG consistieron básicamente en determinar las condiciones en que los machos eran más activos para la realización de las pruebas posteriores. Así pues, se realizaron dos primeros estudios para determinar la influencia de la edad así como el fotoperiodo en la respuesta antenal. En relación a la edad, se probaron un mínimo de 10 antenas de machos distintos de 1^a-2^a escotofase, 2^a-3^a escotofase y 3^a-4^a escotofase durante la 7^a h de la fase oscura, momento en el cual se había observado que la mayoría de hembras realizaban el comportamiento de llamada. Esto se complementó con registros a diferentes horas del fotoperiodo, 3^a, 5^a, 7^a, 8^a h de la escotofase así como una y dos horas después de haber finalizado la fase oscura y una hora antes de comenzar la misma, es decir, durante la 1^a,

2^a y 15^a h de la fotofase con el fin de determinar diferente intensidad en la respuesta antenal a lo largo del fotoperiodo. Para evaluar el nivel de respuesta se utilizó como agente estimulante 100 ng del compuesto **1** debido a su elevada actividad respecto al resto de compuestos feromonales según estudios bibliográficos⁹⁰.

En función de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se realizaron las pruebas posteriores en las condiciones de edad y momento del fotoperiodo más idóneos. En un primer estudio, se analizó la actividad del extracto de una glándula feromonal sobre 13 antenas de distintos machos. Una vez determinada esta actividad, se procedió al análisis de la respuesta antenal de diversos machos frente a las mezclas feromonales halladas en extractos glandulares (**5**, **1**, **4**, **2**, **6** y **3** en una proporción 31:26:22:11:9:1) así como en los volátiles emitidos por las hembras (**2**, **1**, **5** y **3** en una proporción 22:40:34:4) y los compuestos feromonales hallados en las mismas por separado. Para este fin, se utilizaron ambas mezclas así como los seis compuestos encontrados en glándulas de manera individual (**1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **6**) a tres dosis diferentes: 10, 100 y 1000 ng. Así mismo, para determinar qué composición era más activa se probaron distintas mezclas binarias y ternarias de los compuestos encontrados en la recogida de volátiles.

4.2.4.1.1. Efecto de las mezclas binarias en la respuesta antenal

En las mezclas binarias se utilizó como componente principal de la mezcla el compuesto considerado como más activo en EAG de manera independiente, esto es, el compuesto **1** (ver resultados pág. 78) a las tres dosis empleadas previamente, 10, 100 y 1000 ng. A esta cantidad se le añadió de manera individual, cada uno de los tres compuestos encontrados en la recogida de volátiles en la proporción emitida. En total, se probaron tres combinaciones, la mezcla A formada por el compuesto **1** y **5** (60:40), la B constituida por el **1** y **2** (46:54) y la mezcla C, formada por **1** y el **3** (90:10) (Tabla 4.2). El volumen utilizado por cada combinación fue de 10 µL, con el cual se impregnó el trozo de papel de filtro (Whatman) utilizado como dispensador. El valor medio de las despolarizaciones obtenidas con cada combinación se comparó con la adquirida por el compuesto **1** a la misma dosis.

Tabla 4.2. Combinaciones binarias utilizadas en los ensayos de EAG. El volumen de mezcla utilizado fue de 10 μ L

Cantidad total de compuesto 1	MEZCLA A		MEZCLA B		MEZCLA C	
	1 (ng)	5 (ng)	1 (ng)	2 (ng)	1 (ng)	3 (ng)
1 μ g	100	66,7	100	117	100	11,1
100 ng	10	6,67	10	11,7	10	1,11
10 ng	1	0,67	1	1,17	1	0,11

4.2.4.1.2. Efecto de las mezclas ternarias en la respuesta antenal

En base a la mejor respuesta obtenida con las mezclas binarias (ver resultados, pág. 79), se realizaron nuevos ensayos con mezclas ternarias. A la composición formada por los compuestos **1** y **5** (60:40) (mezcla A) se incorporaron por un lado el compuesto **2** y el **3**, en las proporciones encontradas en los volátiles emitidos; esto es mezcla D: **1+5+2** en proporción 35:23:42 y mezcla E: **1+5+3** en proporción 56:37:7. A su vez, se examinó la despolarización inducida por una mezcla también compuesta por tres componentes y que en estudios anteriores en pruebas de campo demostró ser muy efectiva. Esta combinación se le consideró como mezcla F y estaba constituida por los compuestos **1**, **5** y **3** en una proporción 87,2: 2,5:10,3 (Tabla 4.3). Así mismo, el volumen utilizado por cada combinación fue de 10 μ L.

Tabla 4.3. Combinaciones ternarias utilizadas en los ensayos de EAG. El volumen de mezcla utilizado fue de 10 μ L

Cantidad total de compuesto	MEZCLA D			MEZCLA E			MEZCLA F		
	1 (ng)	5 (ng)	2 (ng)	1 (ng)	5 (ng)	3 (ng)	1 (ng)	5 (ng)	3 (ng)
1 μ g	100	65,7	120	100	66,1	12,5	100	2,87	11,8
100 ng	10	6,57	12,0	10	6,61	1,25	10	0,29	1,18
10 ng	1	0,65	1,20	1	0,61	0,13	1	0,03	0,12

4.2.4.2. GC-EAD

Este sistema se empleó para determinar la actividad de los compuestos hallados en los extractos glandulares.

Para los ensayos de GC-EAD se utilizó un cromatógrafo de gases Focus GC (Thermoelectron corporation) acoplado a un equipo de EAG. La descripción del sistema se encuentra detallada en el apartado 3.3.2.1 (págs. 26-27). La columna empleada fue una HP-5 (Agilent Technologies, 30 m x 0,25 mm i.d) y el programa utilizado: 70°C (1 min), incremento de 5°C/min hasta 270°C (10 min).

Se estudió la actividad de cinco extractos glandulares sobre antenas de machos 1-2 días de edad. Los extractos se realizaron utilizando de 7 a 17 glándulas. Debido a la baja sensibilidad del FID no se apreciaban bien los distintos picos que se observaban en los cromatogramas; para solventar dicho problema, se procedió a inyectar el neuropéptido activador de la biosíntesis de feromona (*Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide*, PBAN) (Bachem AG, Weil and Rhein, Alemania) en las hembras para favorecer una mayor producción de los compuestos feromonales. Para ello, se inyectó 50 pmol de PBAN en 2 μ L de medio salino de Meyers & Miller⁹¹⁻⁹³ en el abdomen de hembras vírgenes 2 h antes del inicio del comportamiento de llamada. A la 7^a hora de la escotofase, momento en el que la mayoría de las hembras evaginan la glándula feromonal, se cortaron las glándulas y se introdujeron en 100 μ L de hexano durante una hora. Tras la cual se sacaron las glándulas y los extractos se guardaron a -80°C hasta su análisis. Cada extracto utilizado se evaporó hasta aproximadamente 1 μ L de volumen, el cual se inyectó en el cromatógrafo.

Con la finalidad de facilitar la identificación de los compuestos que ejercían cierta actividad en las antenas de los machos paralelamente se inyectó una mezcla de seis compuestos feromonales (1-6) a una concentración de 100 ng/ μ L cada uno.

4.2.4.3. SSR

El equipo utilizado se encuentra descrito en el apartado 3.3.3.1 del capítulo 3 (págs. 28-29). Como fuente de estímulo se utilizaron 1 μ g y 10 μ g de cada compuesto feromonal así como hexano de blanco.

4.2.5. Túnel de viento

Los experimentos se llevaron a cabo durante la 6^a a 8^a hora de la escotofase, momento en el que las hembras realizan el comportamiento de llamada (ver resultados, pág. 68). Justo al inicio de la escotofase los machos utilizados en los diferentes ensayos se colocaron en cajas de cartón completamente tapadas de modo que se mantuvieran en oscuridad. Media hora antes del comienzo de los ensayos se dejaban en las mismas condiciones en las que se realizaban las pruebas de túnel de viento.

Se utilizó un mínimo de 40 machos vírgenes de 1-3 días de edad para cada tratamiento experimentado. Los insectos empleados por prueba fueron de uno a dos para facilitar el seguimiento de los machos, así como para impedir posibles alteraciones en el comportamiento de los mismos. Previamente al periodo de aclimatación, los insectos se situaron en placas Petri (14 cm de diámetro x 3 cm de altura) con un papel de filtro en la base. Parte del lateral inferior de la placa se seccionó para favorecer la captación de la feromona.

En todos los ensayos realizados, la sustancia atrayente se dispuso en un papel de filtro (Whatman) situado a unos 25-30 cm del suelo y separado unos 130 cm del soporte donde se colocaban los machos.

Los ensayos tuvieron una duración de 5 min cada uno, en los que se consideraban los machos que iniciaban la salida del soporte, los que llegaban a la mitad del recorrido, esto es, a 65 cm de la salida, al final del túnel, es decir, a 130 cm de la salida y finalmente de estos últimos el número de machos receptivos que establecían contacto con la fuente de atracción utilizada. Para el análisis estadístico de los resultados adquiridos se utilizó el test Chi cuadrado.

4.2.5.1. Efecto de la mezcla feromonal de glándulas y volátiles

Las primeras pruebas realizadas consistieron en comparar la capacidad de atracción de las mezclas encontradas en los extractos glandulares y en la emisión de volátiles. La cantidad de mezcla total utilizada como fuente de atracción fue de 1 µg. Como control se utilizaron cinco hembras vírgenes de 1-3 días de edad que al igual que los machos objeto de estudio, se introdujeron en cajas de cartón completamente selladas con papel de aluminio justo al entrar en escotofase. Media hora antes de iniciar los ensayos y con el fin de aclimatar las hembras, éstas se introdujeron en número de cinco en cajas metálicas (6.5 x 4 x 3 cm) en el túnel de viento y se colgaron a unos 25 cm del suelo, a la misma altura que se colocaban los machos en el soporte de salida en el momento del ensayo.

4.2.5.2. Efecto de las combinaciones binarias y ternarias

En razón a lo resultados observados en EAG, se estudió la capacidad de atracción del compuesto feromonal **1** que fue el más activo en EAG, así como las combinaciones binarias de **1** más el compuesto **2**, **3** o **5**. La mezcla A, consistente en el compuesto **1** y **5** en una proporción 60:40, la mezcla B, constituida por el **1** y **2** en proporción 46:54 y C formada por **1** y **3** en relación 90:10, la cantidad empleada de compuesto **1** tanto individualmente como en las tres combinaciones fue de 1 µg con la proporción relativa de cada uno de los otros tres compuestos (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Mezclas binarias utilizadas en las pruebas de túnel de viento. Las proporciones de cada compuesto están halladas en base a 100 ng del compuesto **1** ya que el volumen depositado en el papel de filtro utilizado como fuente de atracción fue de 10 µL de la mezcla.

Mezcla	1 (ng)	5 (ng)	3 (ng)	2 (ng)	Porcentaje
A	100	66,7	-	-	(60:40:0:0)
B	100	-	-	117,4	(46:0:0:54)
C	100	-	11,1		(90:0:10:0)

Se determinó el efecto de la proporción de los compuestos que formaron la mezcla más efectiva en túnel de viento (**1+5**). Para ello, se probaron cinco soluciones, en la que la proporción del compuesto **5** en la mezcla iba aumentando desde un 20% hasta

encontrarse al 100%, esto es, combinaciones de **1+5** en proporciones 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100. Las combinaciones utilizadas se hallan detalladas en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Combinaciones de los compuestos **1** y **5** en distintas proporciones utilizadas en las pruebas de túnel de viento. Las proporciones de cada compuesto están halladas en base a 100 ng del compuesto **1** ya que el volumen depositado en el papel de filtro utilizado como fuente de atracción fue de 10 μ L de la mezcla.

Porcentaje	1 (ng)	5 (ng)
(80:20)	100	25
(60:40)	100	66,7
(40:60)	100	150
(20:80)	100	400
(0:100)	-	100

A la combinación binaria que resultó ser la más atractiva en los ensayos anteriores, mezcla A (**1+5** (60:40)) (ver resultados, pág. 87) se le añadió cada uno de los otros dos compuestos (**2** y **3**) a fin de ver si una de las dos mezclas ternarias conseguía ser aún más efectiva. También se probó la mezcla de tres compuestos **1+5+3** en proporción 87,2:2,5:10,3, que en pruebas de campo realizadas en Murcia en años anteriores (2003) habían resultado ser muy atractivas. Esta formulación fue así mismo muy eficiente en estudios de campo anteriores realizados por Mitchell y Tumlinson en 1990⁸². La cantidad del compuesto **1** en las cuatro combinaciones (A, D, E y F) fue de 1 μ g con la proporción relativa de cada uno de los otros tres compuestos (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Mezclas ternarias utilizadas en las pruebas de túnel de viento. Las proporciones de cada compuesto están halladas en base a 100 ng del compuesto 1 ya que el volumen depositado en el papel de filtro utilizado como fuente de atracción fue de 10 µL de la mezcla.

Mezcla	1 (ng)	5 (ng)	3 (ng)	2 (ng)	Porcentaje
A	100	66,7	-	-	(60:40:0:0)
D	100	65,7	-	120	(35:23:0:42)
E	100	66,1	12,5	-	(56:37:7:0)
F	100	2,87	11,8	-	(87,2:2,5:10,3:0)

4.2.5.3. Efecto de otros compuestos

Se realizó un estudio del posible efecto en túnel de viento de los compuestos **4** y **6**, no encontrados en los volátiles emitidos por las hembras aunque sí en los extractos glandulares. Se utilizó como referencia la combinación más atractiva en ensayos anteriores, la constituida por **1** y **5** en una proporción 60:40, a los que se añadió una cantidad fija de los otros dos compuestos, un 10% respecto al compuesto **1** (100 ng), con el fin de ver si se apreciaba cierto efecto a dosis bajas, y 50% igualmente respecto al compuesto **1** (500 ng), cantidad razonable de compuesto para observar si reduce o no la capacidad de atracción de la mezcla base.

4.2.6. Pruebas de campo

Se probaron en el campo varias de las formulaciones que fueron atractivas en los ensayos de túnel de viento así como la mezcla más activa en las pruebas de campo realizadas en años anteriores (**1+5+3** en proporción 87,2:2,5:10,3). Estos ensayos se realizaron a fin de verificar los resultados obtenidos y/u optimizar la mezcla atrayente para minimizar así el número de cópulas y mantener de esta forma las poblaciones de esta especie a niveles no tan dañinos para los cultivos hospedadores.

Las distintas pruebas se realizaron en distintos puntos de la provincia de Murcia durante los años 2006 y 2008 por la empresa Kenogard S.A. de Murcia. El seguimiento se realizó desde principios del mes de julio hasta octubre aproximadamente. Las distintas mezclas feromonales se dispensaron en septums de goma suspendidos sobre trampas delta

común (Figura 4.5) con una superficie pegajosa para la consiguiente captura de los insectos. Estas trampas se colocaron de 80 a 100 cm de altura y a una distancia mayor de 10 m entre sí. Una vez finalizado el ciclo del cultivo, las trampas se trasladaron a otro tipo de plantación localizada a una distancia máxima de 100 m. Los cartones se reemplazaron semanalmente, salvo en capturas masivas donde se cambiaron con mayor frecuencia.



Figura 4.5. Imagen de una trampa delta común.

4.2.6.1. Campaña 2006

Se utilizaron tres formulaciones distintas así como un producto comercial BAW (Trécé, Adair, Oklahoma, USA) en invernaderos de dos localizaciones distintas: Ramonete, en el municipio de Lorca y Dolores de Pacheco en el municipio de Torre Pacheco. En la primera localidad, las trampas se colgaron en las afueras de un invernadero con diferentes cultivos (pimiento, sandía, judía, pepino y tomate) y en la segunda se colocaron al borde de unos campos de tomate y melón, pero posteriormente los cultivos fueron cambiados a col, brócoli y lechuga.

Los septums se dispusieron a finales de junio (28.06.06) sustituyéndolos por unos nuevos cada tres semanas hasta principios de octubre (09.10.06). El recuento de los machos capturados se llevó a cabo cada semana. Las pruebas se realizaron por duplicado para cada formulación con el fin de confirmar los resultados obtenidos. Las tres combinaciones estudiadas se encuentran detalladas a continuación (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Formulaciones utilizadas en las pruebas de campo realizadas en el 2006. F1: Formulación observada por Mitchell y col. como la más activa en Florida. F2: Hallada posteriormente por Tumlinson y col. más atrayente que la F1. F3: Composición feromonal inicial encontrada en las glándulas de la variedad española. Se dispusieron 200 µg de la mezcla total.

Formulación	1 (µg)	5 (µg)	3 (µg)	2 (µg)	4 (µg)	Porcentajes (100% total)
F1	182	18	-	-	-	(91:9:0:0:0)
F2	174	5	21	-	-	(87:2,5:10,5:0:0)
F3	62	62	-	32	44	(31:31:0:16:22)

4.2.6.2. Campaña 2008

Se utilizaron cinco formulaciones distintas más dos productos comerciales: BAW (Trécé) y Econex (Econex, Murcia, España). Todas las mezclas preparadas contenían la misma cantidad (174 µg) del compuesto **1** (componente feromonal atrayente a larga distancia según los ensayos de túnel de viento realizados, ver resultados, pág. 87) y alguno de los compuestos **2**, **3** ó **5** en distinto porcentaje. Las formulaciones aplicadas durante este año se encuentran en la tabla 4.8. Durante este año se realizaron tres ensayos, uno en Torre Pacheco y dos en Mazarrón. Los septums de la primera localidad se colocaron el 26.06.08 en cultivos con una alternancia de melón y brócoli y se cambiaron aproximadamente cada tres semanas. La recogida de insectos y cambio de trampas se realizó semanalmente hasta octubre. Por otro lado, los septums del primer ensayo realizado en Mazarrón se dispusieron el 08.07.08 en cultivos de pimiento y los del segundo ensayo una semana después en cultivos con una alternancia de pimiento y haba. Al igual que en la localidad anterior, los cambios de septums y trampas se llevaron a cabo con la misma frecuencia. En los tres ensayos realizados, las trampas se colocaron 1,2-1,5 m del nivel del suelo.

Tabla 4.8: Formulaciones utilizadas en las pruebas de campo realizadas en el 2008. La cantidad de compuesto 1 se extrapola de la mejor formulación de la campaña anterior donde se dispuso 200 µg de la mezcla total, compuesta por 174 µg de este compuesto.

Formulación	1 (µg)	5 (µg)	3 (µg)	2 (µg)	Porcentajes (100% total)
F2	174	5	21	-	(87:2,5:10,5:0)
F4	174	116	-	-	(60:40:0:0)
F5	174	43.5	-	-	(80:20:0:0)
F6	174	114	-	209	(35:23:0:42)
F7	174	115	22	-	(56:37:7:0)

Para el análisis estadístico se hizo una transformación del número de capturas mediante la raíz cuadrada del número de capturas + 0,5⁹⁴. La comparación de los datos resultantes de todas las formulaciones se realizó mediante la aplicación del test t de Student.

4.2.7. Immunohistoquímica

La immunohistoquímica consiste en la localización de antígenos en secciones de tejido mediante la utilización de anticuerpos marcados, como reactivos específicos, a través de interacciones antígeno-anticuerpo que son visualizadas por un marcador, como por ejemplo un colorante fluorescente, un enzima o un elemento radioactivo entre otros. Fue originariamente utilizada por Coons y col. en 1941⁹⁵ y desde entonces se ha convertido en una técnica crucial utilizada en investigación.

Existen dos tipos de tinción en immunohistoquímica, directa o indirecta. En la directa se utiliza un anticuerpo marcado que se une directamente al antígeno objeto de estudio, mientras que en la indirecta, se utilizan dos anticuerpos, uno primario no marcado que se une al antígeno del tejido y posteriormente otro anticuerpo secundario que reacciona con el primario. Este anticuerpo secundario lleva unido el marcador.

Con objeto de tener cierto conocimiento de la morfología de los lóbulos antenales de *S. exigua*, en especial del MGC, se procedió a hacer un estudio preliminar de los mismos en ambos sexos. Los glomérulos olfativos es donde se produce el contacto sináptico entre las células receptoras olfativas y las neuronas de primer orden. Para la tinción de los glomérulos, se siguió un procedimiento de tinción indirecto en el cual se tiñeron las sinapsinas, proteínas localizadas en los terminales neuronales mediante la utilización de

un anticuerpo capaz de unirse a las mismas, permitiendo de esta forma la tinción de los lóbulos antenales de una manera más intensa que el resto del tejido de alrededor.

4.2.7.1. Procedimiento seguido (protocolo “Whole-mount”)

Se diseccionaron aproximadamente 20 cerebros de machos y 17 de hembras y se introdujeron en medio salino tamponado con fosfato (PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrida la misma se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% (w/v) durante una hora a 8°C. Se hicieron 10 lavados en PBS durante 10 min cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la etapa de bloqueo, en la cual se introdujeron en una solución de PBS con 2% (w/v) de BSA, 0,3% (v/v) de tritón x100 y 0,05% (w/v) de acida sódica durante 30 min a 8°C. El paso siguiente consistió en poner el antígeno en contacto con un anticuerpo primario, en este caso anti-sinapsina SYNORF1 (proporcionado por el Dr. E. Buchner, Universität Würzburg, Alemania), se dejó durante 24 h a 8°C. Tras varios lavados en PBS (10 x 30 min) se procedió a poner el complejo antígeno- anticuerpo en contacto con un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo, AlexaFluor 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), durante 24 h también a 8°C. En la figura 4.6 se muestra un esquema del protocolo seguido.

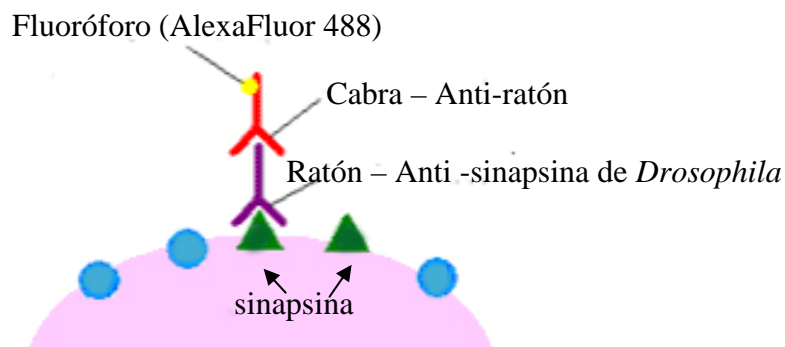


Figura 4.6. Esquema del procedimiento utilizado para la tinción de los lóbulos antenales de *S. exigua*.

Finalmente, una vez realizados los lavados correspondientes en PBS, 10 x 30 min, se colocaron en un portaobjetos cubierto de un cubreobjetos fijado con un gel de montaje GelMount® (Sigma) y se analizaron mediante microscopía confocal.

4.2.7.2. Microscopía confocal

La microscopía confocal es una mejora de las técnicas clásicas de microscopía óptica, mediante la cual se obtienen imágenes de mayor nitidez y contraste así como de mayor resolución permitiendo el estudio tridimensional de las imágenes. El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera del foco.

El equipo de microscopía utilizado para el análisis de las diferentes muestras de cerebro fue un Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Alemania). Para el registro y análisis posterior de las imágenes obtenidas se utilizó el programa Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss Microimaging GmbH).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Comportamiento de llamada

Las hembras observadas comenzaban el comportamiento de llamada hacia el final de la escotofase. Se observaron diferencias en el comienzo de este comportamiento según la edad. De 1ª a 3ª escotofase las hembras comenzaban a adoptar la postura de llamada durante la 6ª hora de la fase oscura, aumentando el número de hembras progresivamente hasta el final de esta etapa donde se alcanzaba el máximo de hembras llamando. Durante la 3ª-4ª escotofase el nivel óptimo de hembras llamando, se alcanzaba durante la 7ª hora, manteniéndose constante hasta el final y en hembras de mayor edad, el número de hembras que mostraron este comportamiento fue mayor a la 6ª hora disminuyendo hacia el final de la escotofase (Figura 4.7). Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas en una variedad china. El mayor porcentaje de hembras en postura de llamada se alcanzaba hacia la mitad final de la escotofase manteniéndose estable hasta el final de la fase oscura. Así mismo, el número de hembras entre 3-7 días de edad en comportamiento de llamada se mantenía estable antes, en este caso alrededor de la 5ª hora⁹⁶.

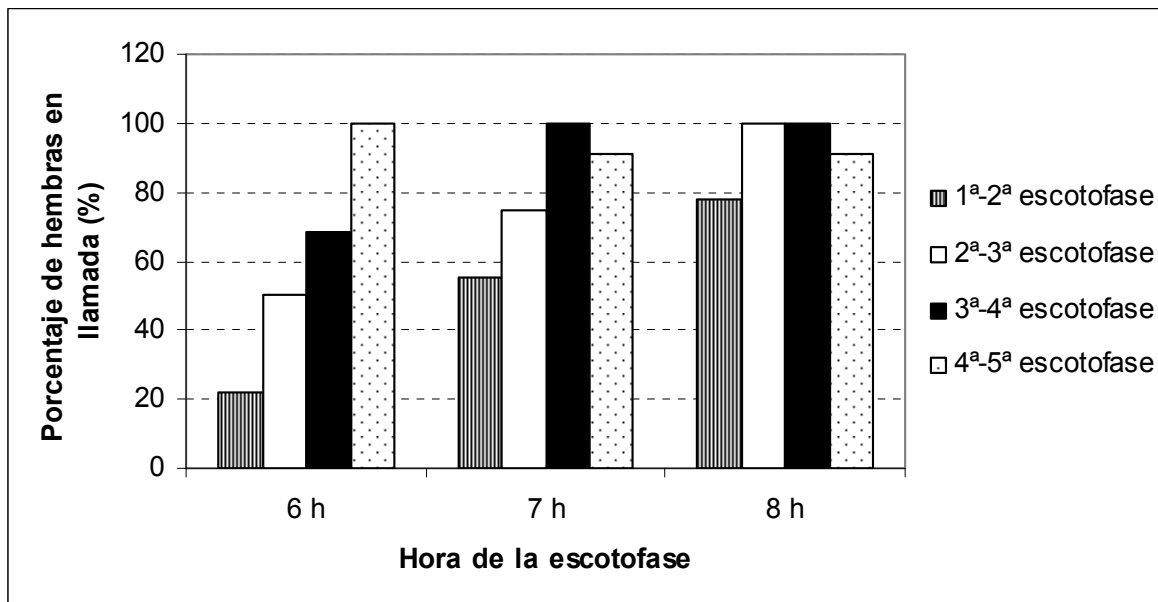


Figura 4.7. Porcentaje de hembras de *S. exigua* de 1ª-5ª escotofase en comportamiento de llamada durante las últimas horas de la escotofase. Los valores mostrados corresponden a dos observaciones de 9-16 hembras de diferente edad.

4.3.2. Análisis de la composición feromona

4.3.2.1. Extractos glandulares

En la mayoría de los 28 extractos de glándulas feromonales analizados en GC-MS, se apreciaron cinco picos con el mismo tiempo de retención que los estándares de la mezcla patrón utilizada (Figura 4.8). Mediante la comparación de los espectros de masas se vio que efectivamente se trataban de dichos compuestos, es decir, del **1**, **2**, **3**, **4** y **5**. Posteriormente se analizaron cada uno de los otros picos observados en los cromatogramas, de los cuales, el pico cuyo tiempo de retención era a los 26,2 min presentaba un espectro de masas similar al compuesto Z11-16:OH (**6**).

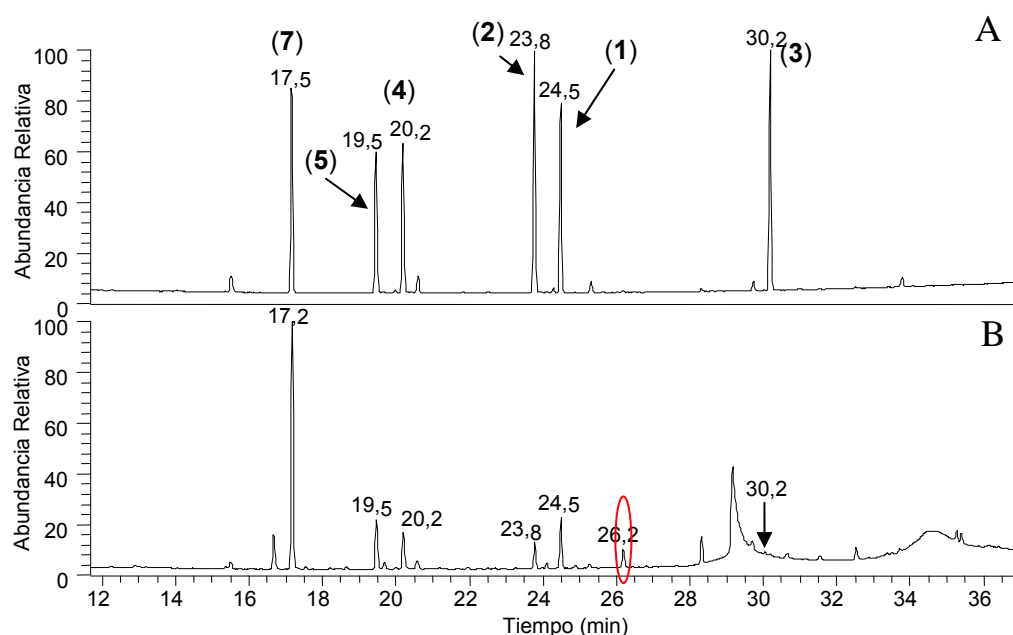


Figura 4.8. A) Cromatograma correspondiente a la mezcla de cinco compuestos feromonales sintéticos Z9,E12-14:Ac (**1**), Z9-14:Ac (**2**), Z11-16:Ac (**3**), Z9,E12-14:OH (**4**), Z9-14:OH (**5**) y el patrón interno 12:Ac (**7**). B) Cromatograma de un extracto de 4 glándulas de *S.exigua* donde aparecen señalados los compuestos feromonales identificados. Con una elipse roja se indica el compuesto identificado como Z11-16:OH (**6**).

Con el fin de verificar dicha observación, se reanalizaron tres extractos de 4 glándulas feromonales, los cuales se compararon con una mezcla de nueve patrones conteniendo los seis compuestos utilizados con anterioridad (**1-5** y **7**), más los estándares **6**, **8** y **9**. Los

cromatogramas resultantes mostraron la presencia de dos picos de pequeño tamaño coincidentes con el compuesto **6** y **8** (Figura 4.9), pero tras la recomprobación de los espectros de masas, el correspondiente al Z11-14:Ac (**8**) no correspondía a dicho compuesto, tratándose sin embargo de una contaminación. En las figuras 4.10 y 4.11 se muestran los espectros de masas correspondientes a los seis compuestos feromonales hallados en los extractos glandulares.

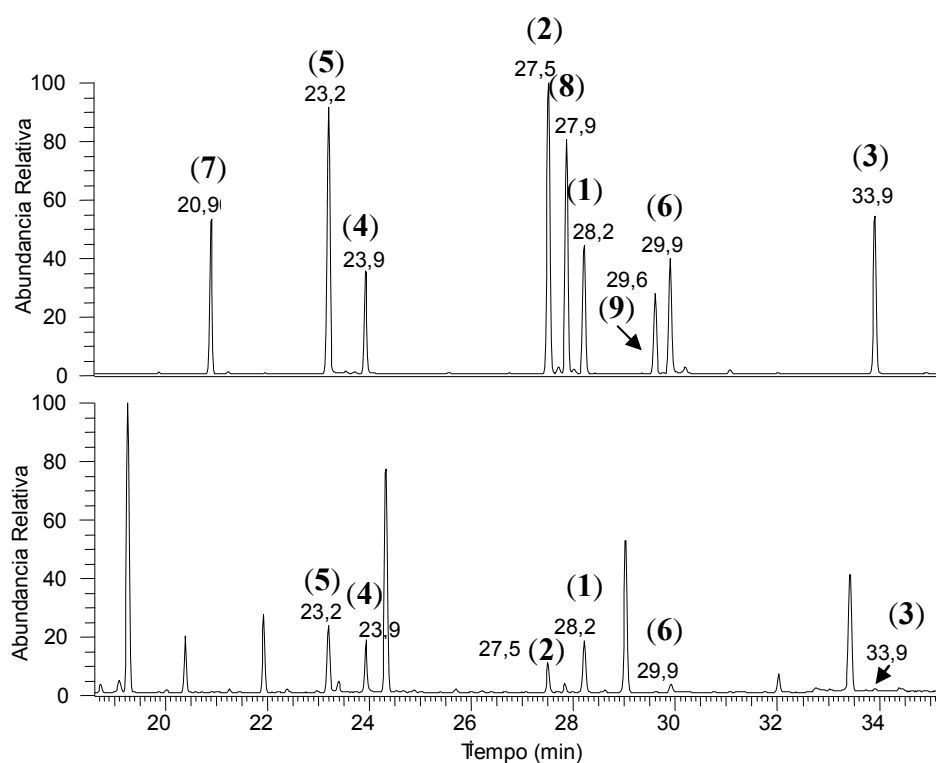


Figura 4.9. El cromatograma superior representa una mezcla de estándares **1-9**. Z9,E12-14:Ac (**1**), Z9-14:Ac (**2**), Z11-16:Ac (**3**), Z9,E12-14:OH (**4**), Z9-14:OH (**5**), Z11-16:OH (**6**), 12:Ac (**7**), Z11-14:Ac (**8**) y Z9,E11-14:Ac (**9**). El inferior pertenece al cromatograma de un extracto de cuatro glándulas de *S. exigua* analizado mediante GC-MS

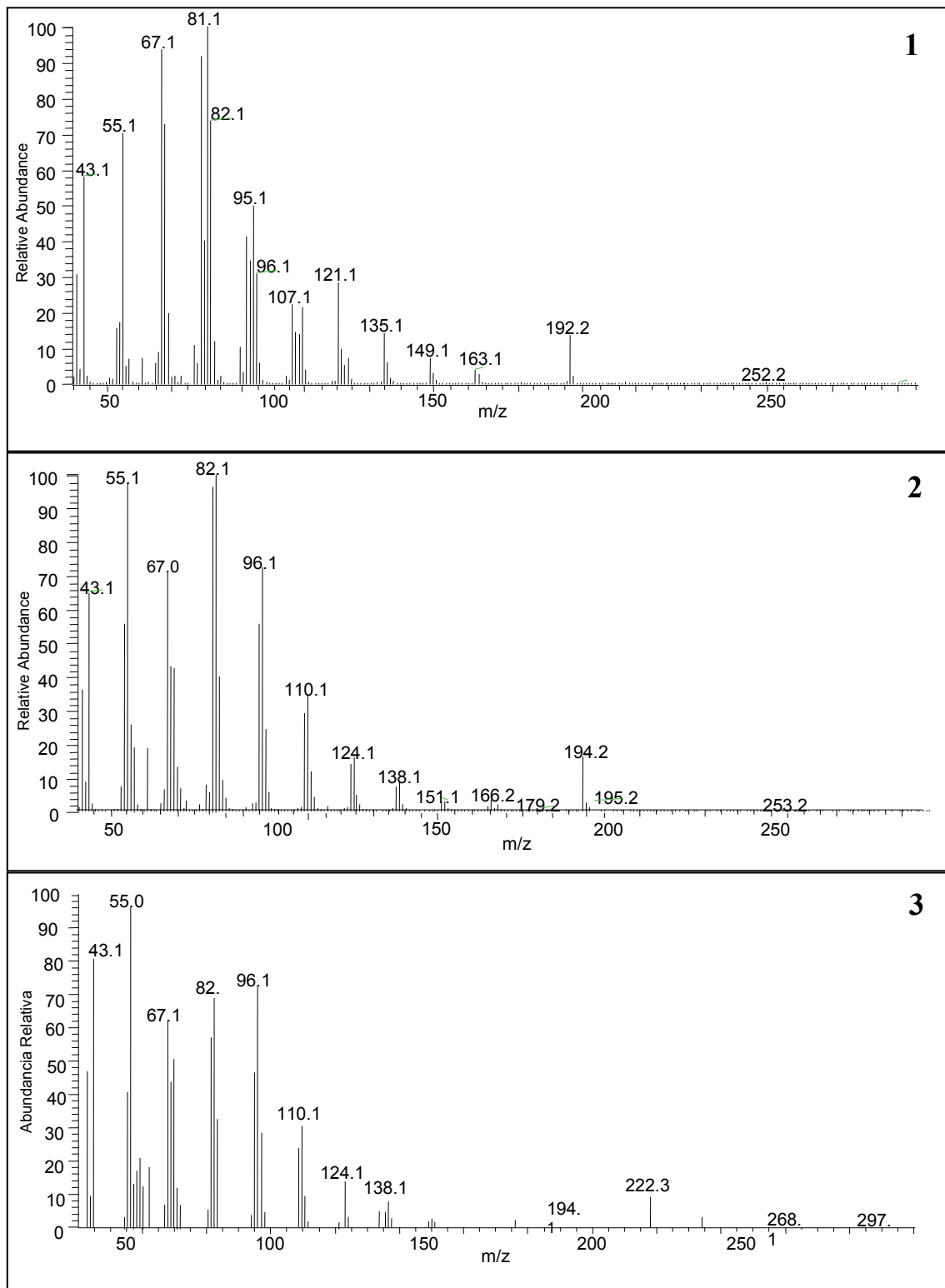


Figura 4.10. Espectros de masas de los componentes feromonales 1) Z9,E12-14:Ac; 2) Z9-14:Ac y 3) Z11-16:Ac.

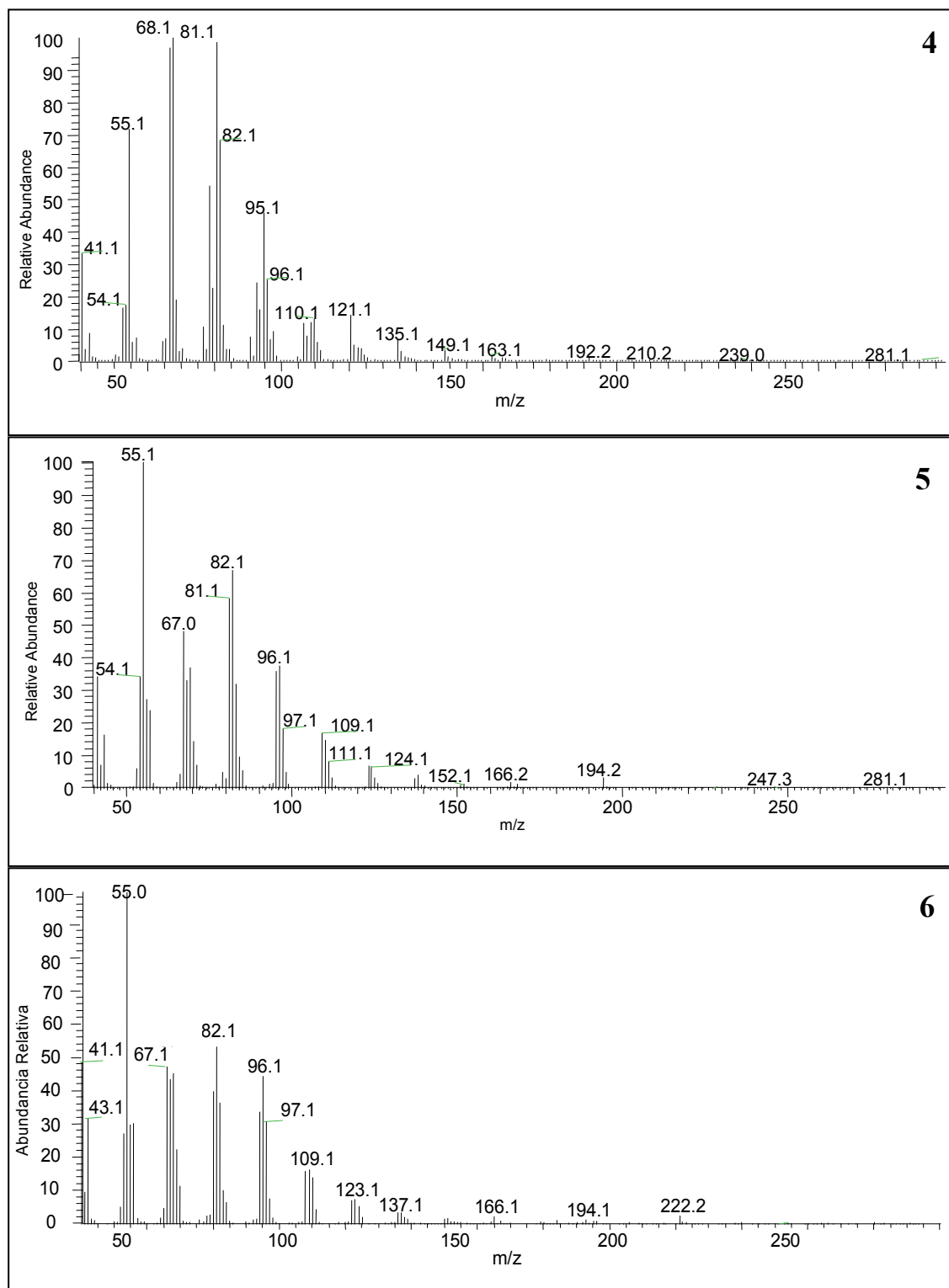


Figura 4.11. Espectros de masas de los componentes feromonaes 4) *Z*9,*E*12-14:OH, 5) *Z*9-14:OH y 6) *Z*11-16:OH.

Una vez confirmada la presencia de los seis compuestos en los extractos glandulares, se procedió a su cuantificación respecto al patrón interno. La mezcla feromonal sintetizada en las glándulas presentaba el componente **5** como compuesto mayoritario, seguido en

proporciones similares de los dos dienos de 14 carbonos (**1** y **4**), y como componentes minoritarios los compuestos **2**, **6** y **3**, éste último se hallaba en un 1%; así pues, los compuestos de la mezcla feromonal hallada en las glándulas fueron **5:1:4:2:6:3** en una proporción 31:26:22:11:9:1 (Figura 4.12).

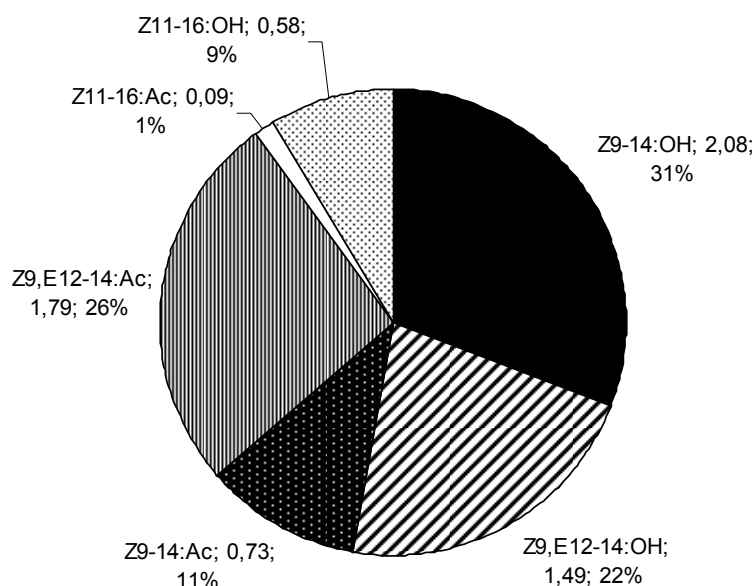


Figura 4.12. Cantidad (ng/glándula) y porcentaje de los compuestos feromonaes encontrados en los extractos glandulares de hembras de *S. exigua*.

4.3.2.2. Recogida de volátiles

En los análisis de volátiles emitidos por hembras vírgenes se identificaron cuatro de los seis compuestos feromonaes hallados en los extractos glandulares: **1**, **2**, **5** y en menor porcentaje el **3** en una proporción 34:40:22:4 (Figura 4.13). Los otros dos compuestos, **4** y **6**, encontrados en los extractos glandulares no se observaron en la mezcla feromonal emitida por las hembras. Aunque uno de los picos del cromatograma correspondiente a los volátiles emitidos salía con el mismo tiempo de retención que el compuesto **6**, los espectros de masas eran completamente diferentes.

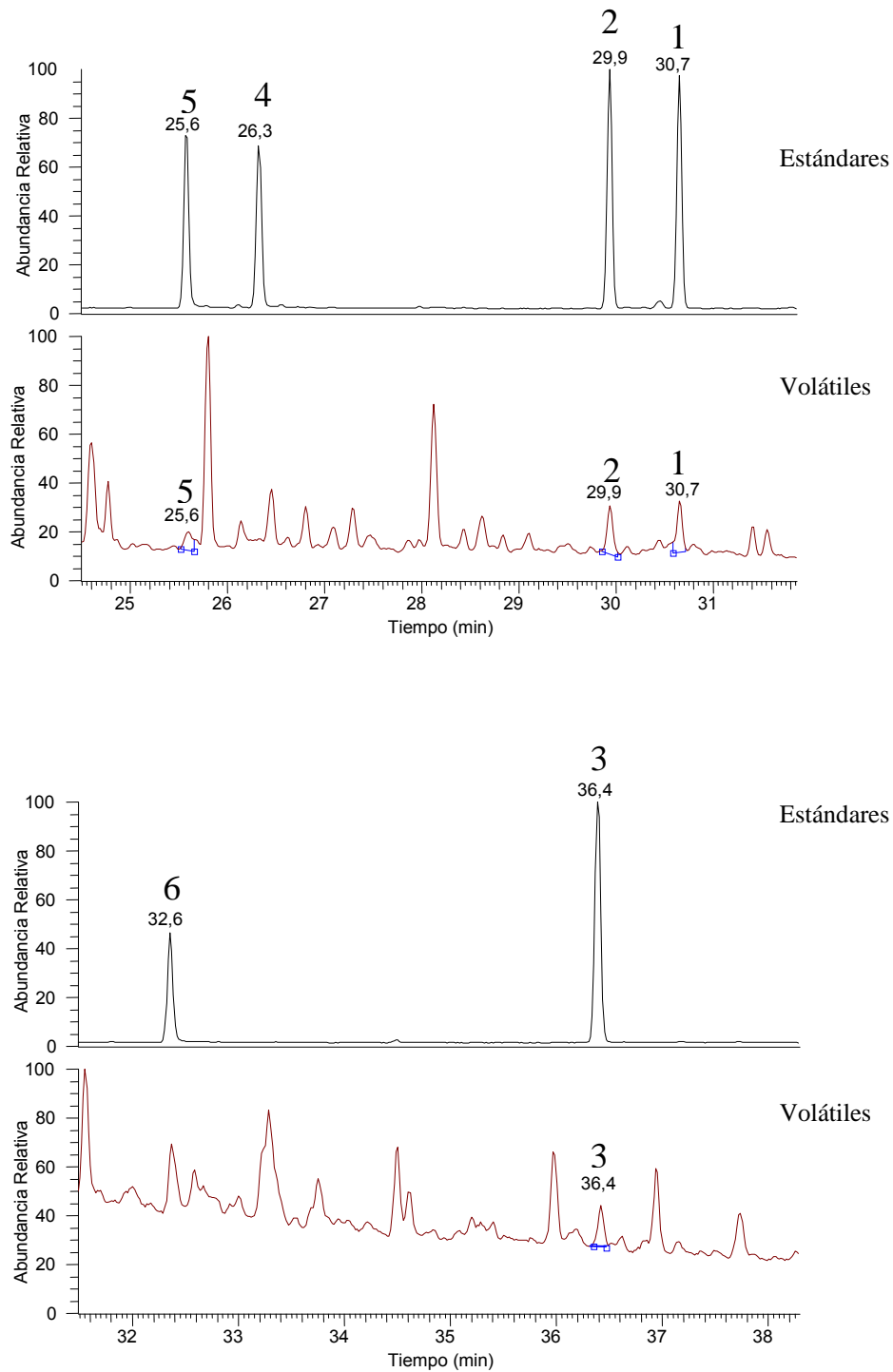


Figura 4.13. Cromatogramas de los volátiles extraídos de cinco hembras de *S. exigua* durante 16 h en donde se observan cuatro de los seis compuestos hallados en los extractos glandulares, arriba se aprecian los compuestos Z9,E12-14:Ac (1), Z9-14:Ac (2) y Z9-14:OH (5) y abajo el Z11-16:Ac (3).

4.3.3. Estudio de la respuesta antenal de machos mediante técnicas electrofisiológicas

4.3.3.1. EAG

En relación a la edad, la mayor respuesta antenal observada en EAG se encontró en machos de 1^a-2^a escotofase, disminuyendo la misma en los días posteriores (Figura 4.14). En función de estos resultados se analizó la actividad antenal de machos de 1^a-2^a escotofase a lo largo del fotoperiodo. Los resultados obtenidos reflejan el ligero pero progresivo aumento de la actividad antenal a lo largo de la fase oscura, siendo máxima a la 8^a hora, momento en que se observó que la mayoría de las hembras de 1^a-4^a escotofase muestran el comportamiento de llamada. Así mismo, la respuesta antenal disminuye relativamente antes y después de la escotofase (Figura 4.15).

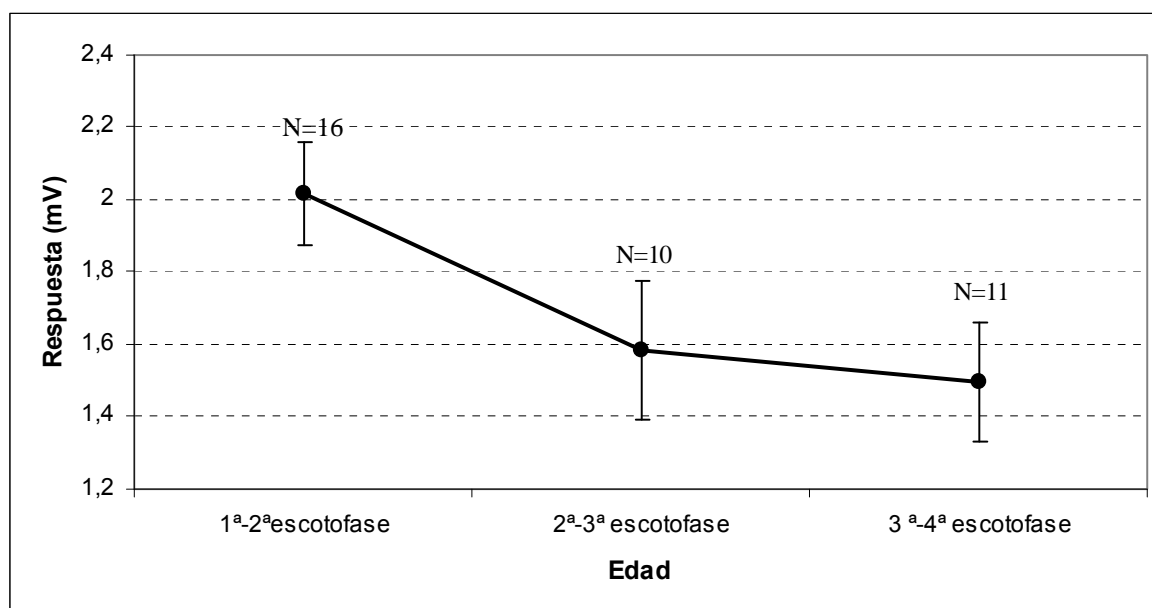


Figura 4.14. Respuesta en EAG de machos de *S. exigua* de diferente edad a 100 ng de Z9,E12-14:Ac. Las barras de error corresponden al error típico.

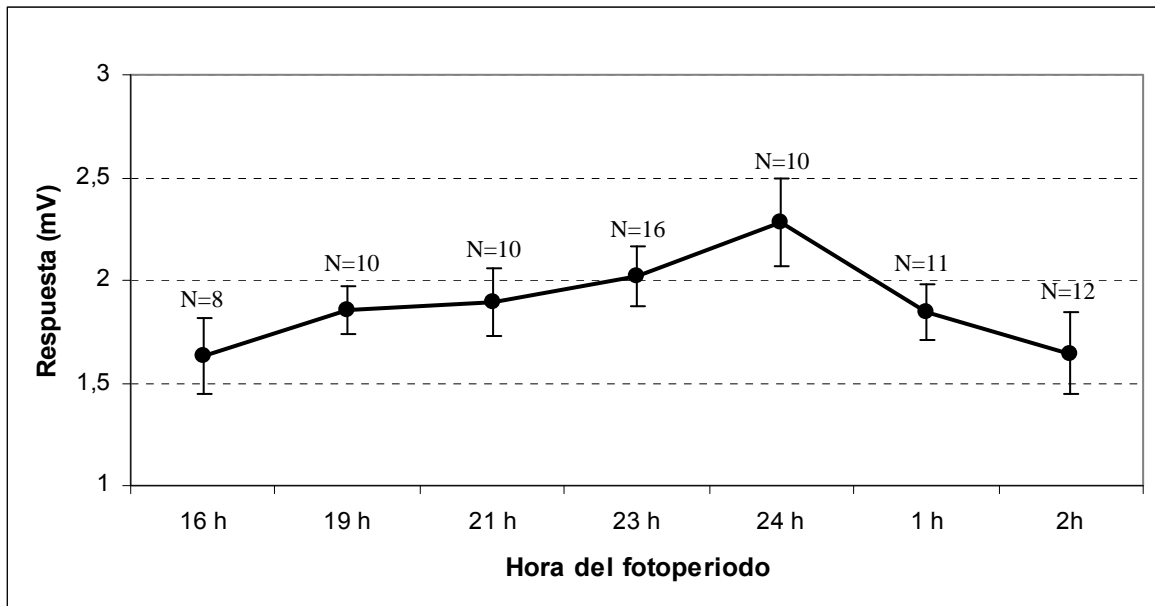


Figura 4.15. Respuesta en EAG de machos de *S. exigua* de 1ª-2ª escotofase a diferentes horas del fotoperíodo. El periodo de tiempo comprendido entre las 17-24 h corresponde a la escotofase. Las barras de error corresponden al error típico.

Los ensayos realizados a continuación se realizaron con machos de uno a dos días de edad y durante la 7ª-8ª hora de la escotofase, de manera que los resultados obtenidos con posterioridad fueran lo más óptimo y reproducible posibles.

4.3.3.1.1. Actividad de las mezclas encontrada en glándulas y en volátiles

Una vez determinada la actividad del extracto de una glándula en 13 antenas de diferentes machos con una respuesta de $1,1 \pm 0,1$ mV, se procedió a estudiar la respuesta antenal de machos frente a dos mezclas sintéticas correspondientes a la encontrada en las glándulas y la de los volátiles emitidos, con el fin de observar cual de las dos incitaba una mayor respuesta. Como se muestra en la figura 4.16 la mayor despolarización se obtuvo frente a una dosis de $1 \mu\text{g}$ de ambas mezclas, pero si se compara la respuesta desencadenada por cada una de las dos composiciones, hay que destacar que la obtenida por la mezcla correspondiente a los compuestos encontrados en los volátiles emitidos es significativamente superior a la hallada en los extractos glandulares, salvo a la dosis de $1 \mu\text{g}$, que aunque es mayor cuando se estimula con la de los volátiles, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas ($P < 0,05$).

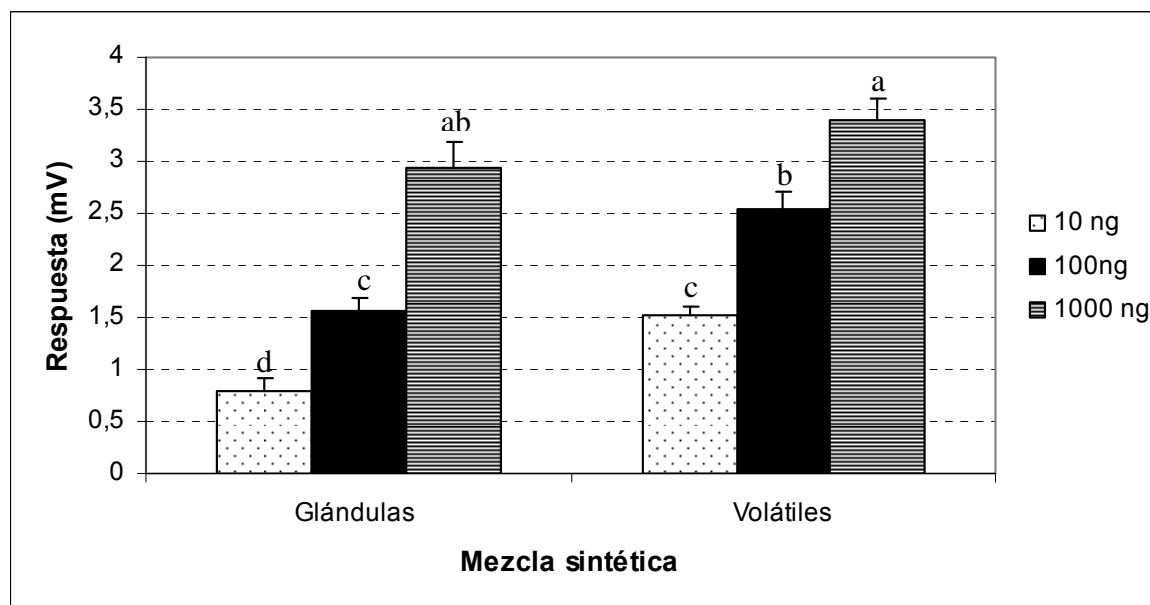


Figura 4.16. Respuesta en EAG de 10-12 antenas de diferentes machos de *S. exigua* frente a las mezclas feromonales sintéticas encontrada en extractos glandulares y volátiles emitidos. Las barras de error corresponden al error típico. Letras iguales sobre columnas indican que no hay diferencias significativas (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

4.3.3.1.2. Actividad de los compuestos feromonales por separado

Los resultados muestran una gran variación de respuesta antenal frente a los distintos compuestos (Figura 4.17). La mayor respuesta antenal se observó frente al compuesto **1** a todas las dosis ensayadas, siendo máxima a una dosis de 100 ng, puesto que a pesar de que se aprecia un leve incremento en la respuesta con 1 μg de producto, no existen diferencias significativas. Pruebas posteriores con 1 y 50 ng de este producto mostraron que pequeñas cantidades de compuesto son suficientes para activar los receptores antenales (Figura 4.18), siendo 50 ng de producto cantidad suficiente para saturar la antena, es decir, la respuesta antenal aumenta conforme se incrementa la dosis de compuesto **1** hasta que llega a una cantidad máxima en la que se estabiliza. Esto indica que la antena del macho de *S. exigua* está dotada en su mayoría de células receptoras que responden al compuesto **1** siendo suficiente una mínima cantidad del mismo para activar dichas células.

En relación al resto de componentes feromonales, en general, se apreció una respuesta baja frente a todos ellos con 10 ng de producto, pero va aumentando conforme se incrementa la dosis, siendo la máxima respuesta a 1 μg . De los cinco compuestos, se vio que el **2** y **4** eran más activos que el resto, mientras que los dos minoritarios, **3** y **6** eran los que provocaban una menor respuesta, deduciendo así que el número de sensilas dotadas de alguna célula receptora frente a cualquiera de estos dos últimos compuestos es reducido.

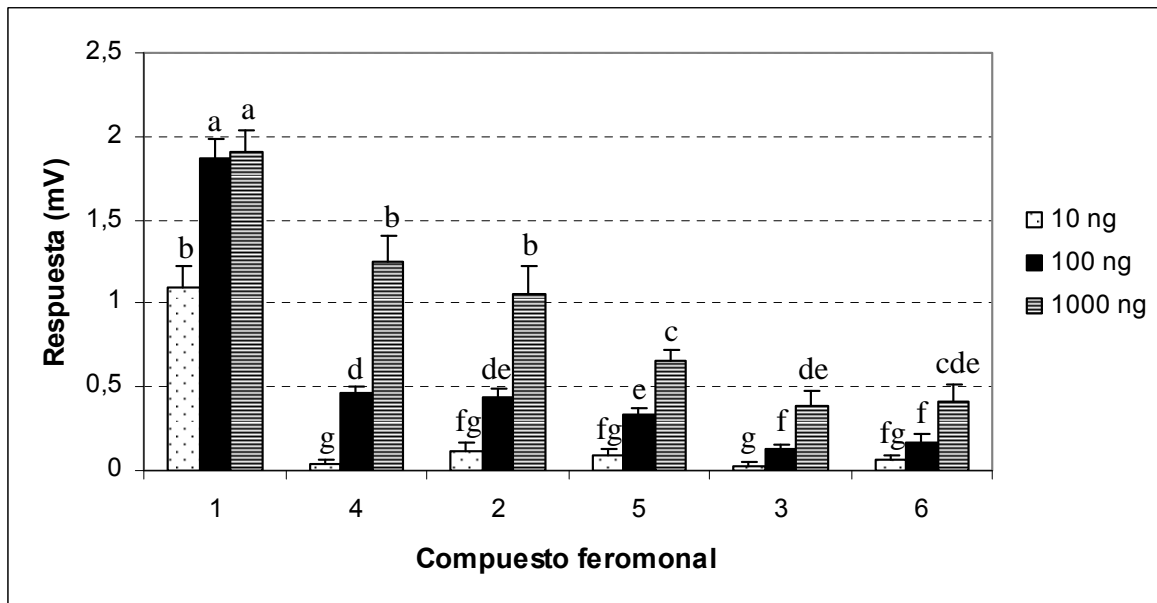


Figura 4.17. Respuesta en EAG de 10 antenas de diferentes machos de *S. exigua* frente a los seis compuestos feromonales encontrados en los extractos glandulares a tres dosis diferentes. Z9, E12-14:Ac (1), Z9-14:Ac (2), Z11-16:Ac (3), Z9,E12-14:OH (4), Z9-14:OH (5), Z11-16:OH (6). Las barras de error corresponden al error típico. Letras iguales sobre columnas indican que no hay diferencias significativas (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

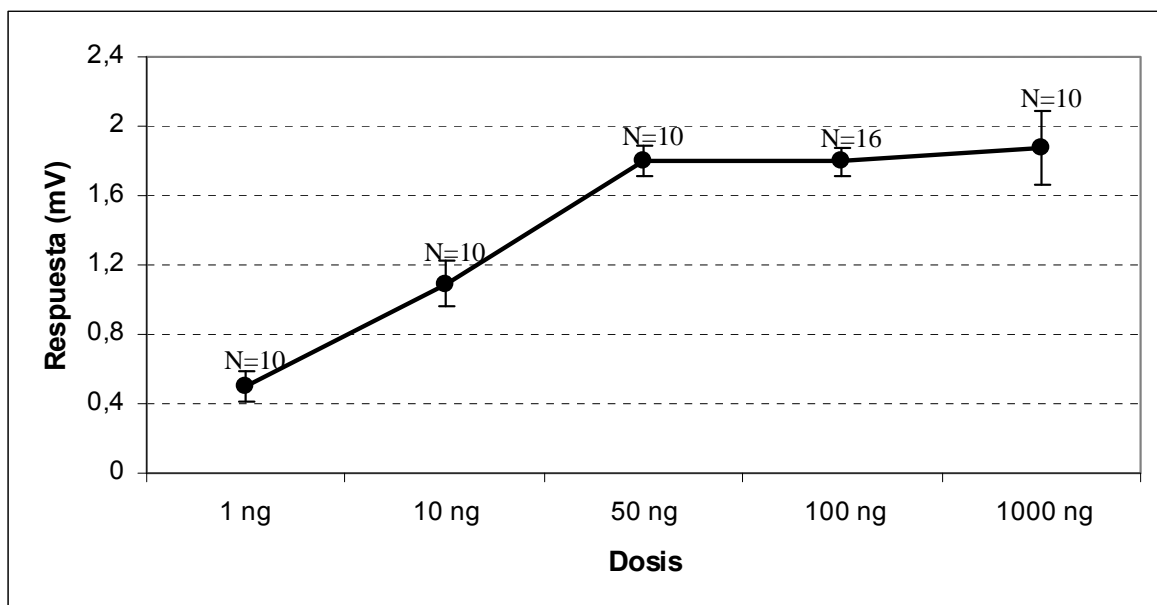


Figura 4.18. Respuesta en EAG de machos de *S. exigua* frente al Z9,E12-14:Ac a cinco dosis diferentes. Las barras de error corresponden al error típico.

4.3.3.1.3. Actividad de las mezclas binarias

Al comparar las despolarizaciones ocasionadas por el compuesto **1** como agente estimulante con las provocadas por las diferentes combinaciones de **1** con los compuestos feromonales **2**, **3** y **5**, se apreciaron pocas diferencias. Tal y como se observa en la figura 4.19, la respuesta antenal fue en general mayor cuando al compuesto **1** en una dosis de 100 ng se le añadió cualquiera de los otros tres componentes, observándose diferencias significativas respecto al control (**1**) cuando la antena se estimuló con la mezcla A, obtenida por la combinación de los compuestos **1** y **5**.

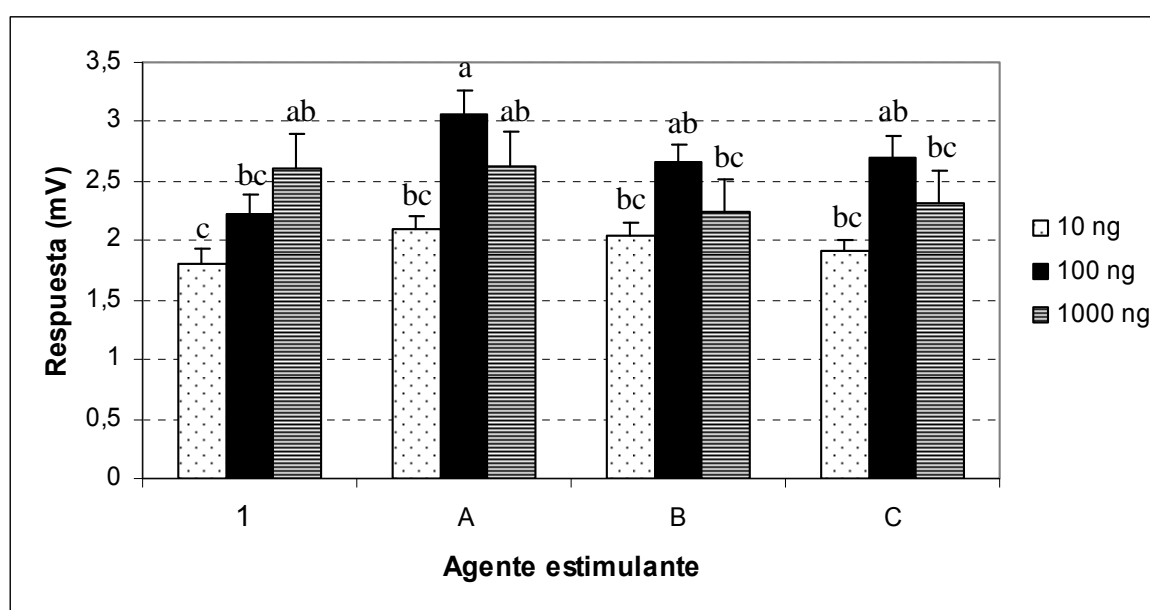


Figura 4.19. Respuesta en EAG de 10 antenas de diferentes machos de *S. exigua* al compuesto Z9,E12-14:Ac (**1**) y combinaciones binarias del mismo con los compuestos feromonales Z9-14:OH (**5**), Z11-16:Ac (**3**) y Z9-14:Ac (**2**). A: **1**+**5** (60:40), B: **1**+**2** (46:54), C: **1**+**3** (90:10). Las barras de error corresponden al error típico. Letras iguales sobre columnas indican que no hay diferencias significativas (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

4.3.3.1.4. Actividad de las mezclas ternarias

Se determinó la actividad de las mezclas ternarias D, E y F compuestas por la combinación A: (**1**+**5** en una proporción 60:40) y los compuestos **2** ó **3**. Los resultados obtenidos se compararon con la despolarización provocada por la combinación A que fue la más activa en las mezclas binarias. Tal como se aprecia en la figura 4.20 todas las combinaciones a la misma dosis desencadenaron respuestas de intensidad similar, no destacando ninguna de ellas por su elevada actividad. Así mismo, al igual que pasaba con las combinaciones binarias, las mayores despolarizaciones en EAG, se obtuvieron

con la dosis de 100 ng de agente estimulante, habiendo una ligera disminución en la respuesta con dosis superiores (1 μ g), aunque significativamente mayor que la ocasionada con 10 ng, salvo con la combinación D, donde al igual que en la mezcla A no se apreciaron diferencias cuando la dosis utilizada fue de 10 ng.

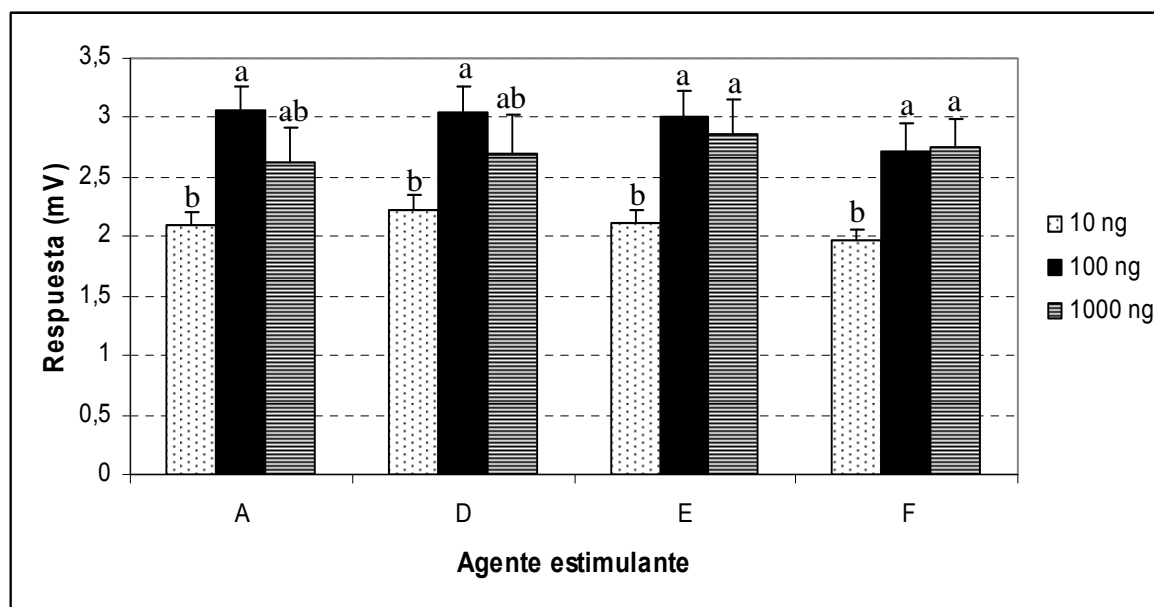


Figura 4.20. Respuesta en EAG de 10 antenas de diferentes machos de *S. exigua* a diferentes combinaciones. A: **1+5** (60:40), D: **1+5+2** (35:23:42), E: **1+5+3** (56:37:7), F: **1+5+3** (87.,2:2,5:10,3). Z9,E12-14:Ac (**1**), Z9-14:Ac (**2**), Z11.16:Ac (**3**), Z9-14:OH (**5**). Las barras de error corresponden al error típico. Letras iguales sobre columnas indican que no hay diferencias significativas (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

4.3.3.2. GC-EAD

En los ensayos de GC-EAD, se pudo comprobar que la antenas de los machos de esta especie responde a los seis compuestos hallados en los extractos glandulares, a pesar de que dos de ellos, **4** y **6** no se emitan (Figura 4.21). De los seis compuestos, el **1** fue el que desencadenó una respuesta de mayor magnitud. Esta observación coincide con los resultados obtenidos en EAG. Del resto de compuestos, los tres constituidos por 14 carbonos provocaron así mismo, despolarizaciones apreciables, siendo algo mayor las correspondientes a los dos alcoholes **4** y **5**. Respecto a los dos componentes minoritarios, se aprecia cierta respuesta al compuesto **6** y con mucha menor intensidad al **3**, apenas perceptible en el cromatograma debido al bajo porcentaje en el que se halla en la mezcla feromonal.

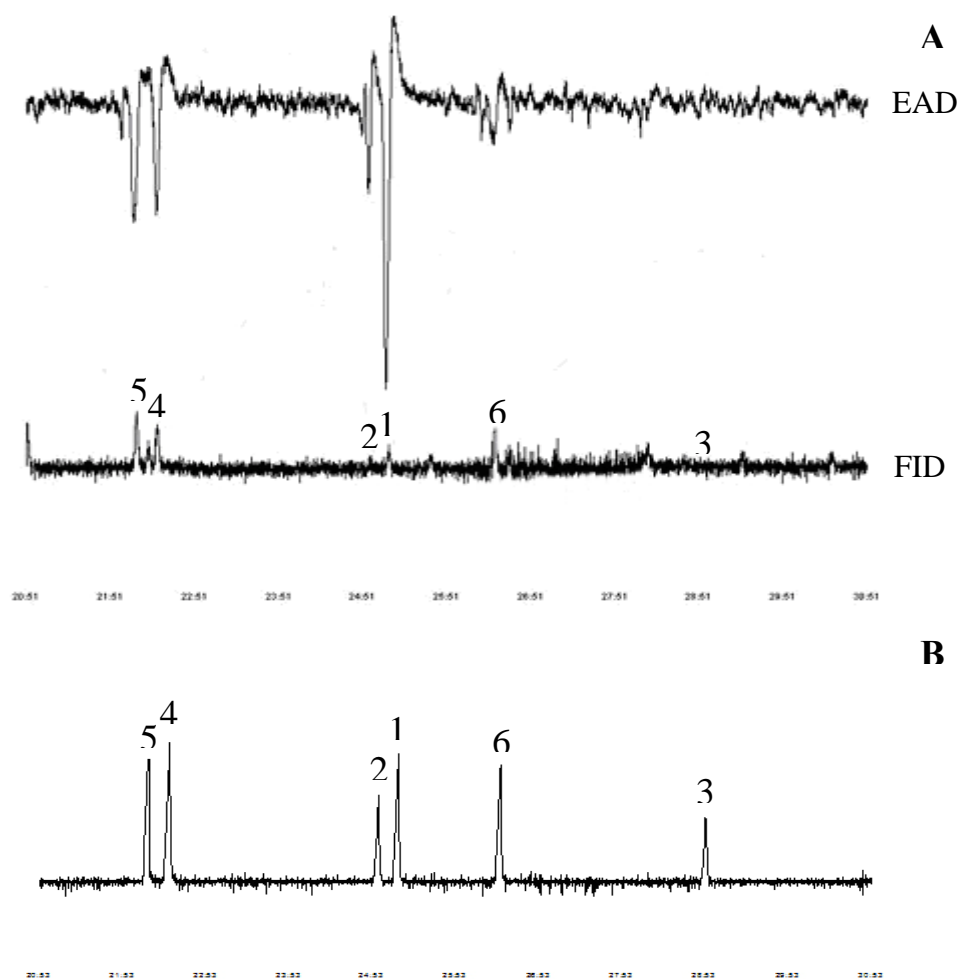


Figura 4.21. A) Respuesta en GC-EAD de un macho de *S. exigua* a un extracto de 15 glándulas feromonales. B) Cromatograma correspondiente a una mezcla de seis estándares en una concentración de 100 ng cada uno. Z₉,E₁₂-14:Ac (1), Z₉-14:Ac (2), Z₁₁-16:Ac (3), Z₉,E₁₂-14:OH (4), Z₉-14:OH (5), Z₁₁-16:OH (6).

4.3.3.3. SSR

Se registraron un total de 70 sensilas en SSR, de las cuales, según la respuesta observada se establecieron seis tipos. En el tipo de sensila más abundante, presente en un 47%, (tipo I) se apreciaron dos neuronas según la longitud de las despolarizaciones registradas, una presentó despolarizaciones de gran tamaño y la otra de pequeña magnitud. A pequeñas dosis de los compuestos ensayados (10 y 100 ng), no se observó respuesta de ninguna de las dos neuronas, aunque cuando se estimuló con 1 µg de compuesto, la neurona que ofrecía despolarizaciones de gran tamaño presentó una cierta respuesta al Z₉,E₁₂-14:Ac, siendo mayor a la dosis de 10 µg. Con esta misma cantidad, se observó que la misma neurona era capaz de responder al Z₉-14:Ac aunque con menor intensidad. Así mismo, la neurona con despolarizaciones de pequeño tamaño, con una dosis de 10 µg presentó respuesta a dos compuestos feromonales, el Z₉-14:OH y

Z9,E12-14:OH, con una menor intensidad (Figura 4.22). Un 26% (tipo II) de las sensilas registradas presentaron un patrón muy similar, es decir, dos neuronas con diferente tamaño de despolarización, el de mayor tamaño respondía al Z9,E12-14:Ac a las dosis de 1 y 10 µg, y el de menor tamaño al Z9-14:OH con 10 µg de compuesto (Figura 4.23). De los otros tres tipos de sensilas, un 13% (tipo III) presentaba una neurona con respuesta únicamente al Z9,E12-14:Ac, presentando despolarizaciones de gran tamaño, un 9% (tipo IV) también con una neurona con despolarizaciones de gran magnitud, respondía no sólo al Z9,E12-14:Ac sino también al Z9-14:Ac. Un 4% (tipo V) presentó respuesta no sólo a los acetatos 1 y 2 sino además a un tercero, el Z11-16:Ac (Figura 4.24). Finalmente un 1% (tipo VI) presentó una neurona con respuesta de pequeño tamaño al Z9-14:OH y al Z9,E12-14:OH (Tabla 4.9).

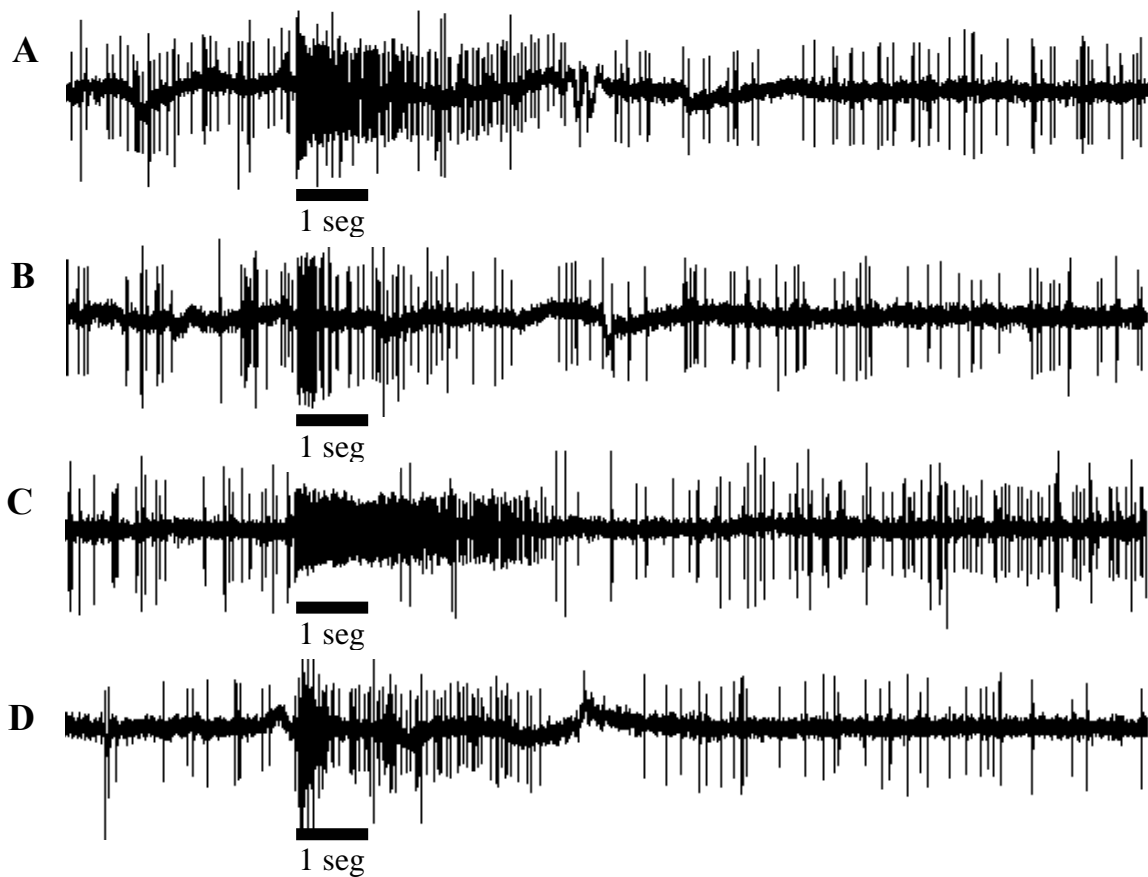


Figura 4.22. Esquema de una sensila de tipo I. A) Respuesta de una célula con despolarizaciones largas a 10 µg de Z9,E12-14:Ac (1). B) Respuesta de una célula con despolarizaciones largas a 10 µg de Z9-14:Ac (2). C) Respuesta de una célula con despolarizaciones cortas a 10 µg de Z9-14:OH (5). D) Respuesta de una célula con despolarizaciones cortas a 10 µg de Z9,E12-14:OH (4).

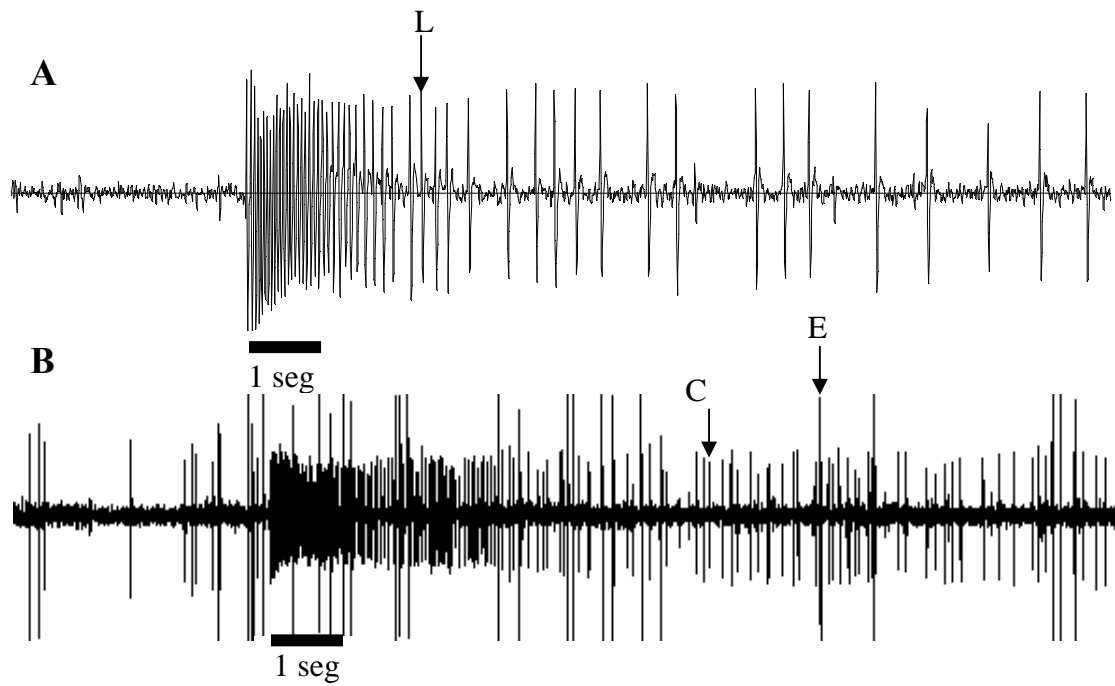


Figura 4.23. Esquema de una sensila de tipo II. A) Respuesta de una célula con despolarizaciones largas a $10\ \mu\text{g}$ de $Z9,E12-14:\text{Ac}$ (1). B) Respuesta de una célula con despolarizaciones cortas a $10\ \mu\text{g}$ de $Z9-14:\text{OH}$ (5). L: Despolarización larga, C: Despolarización corta, E: Despolarización espontánea.

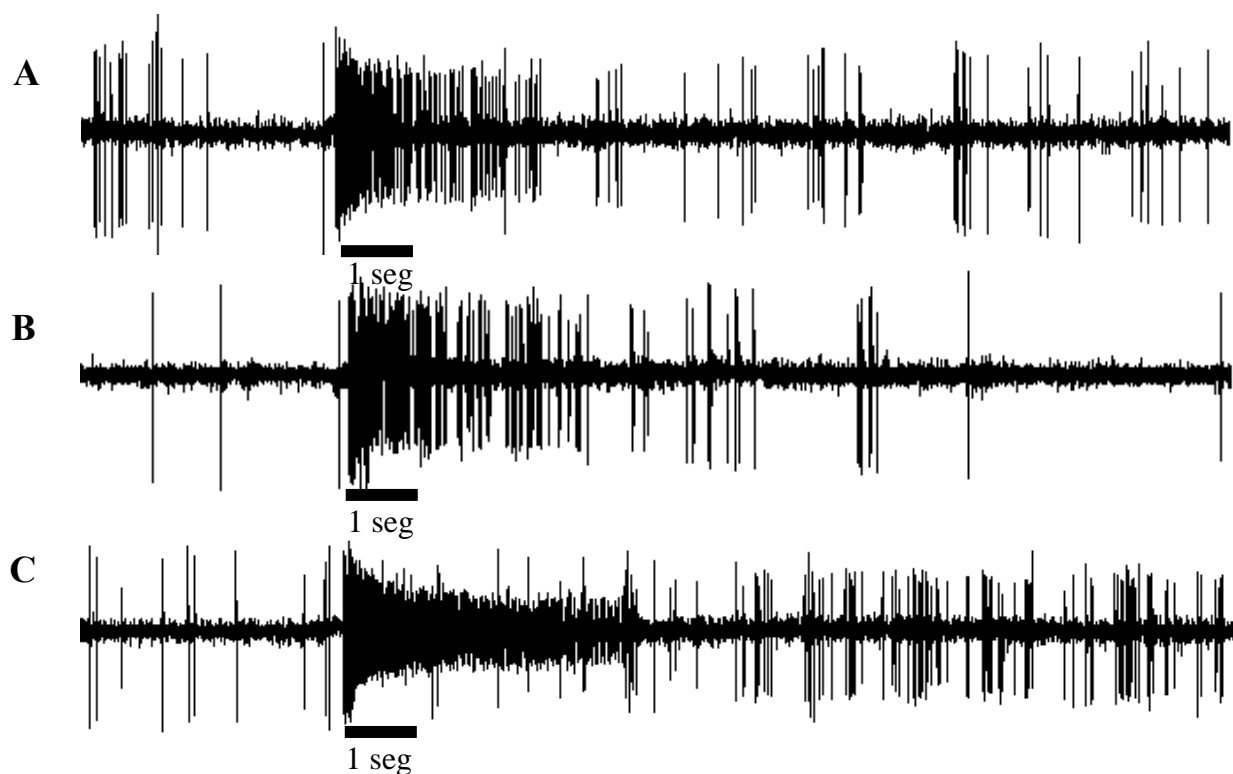


Figura 4.24. Esquema de una sensila de tipo V. A) Respuesta de una célula con despolarizaciones largas a 10 μg de Z9,E12-14:Ac (1). B) Respuesta de una célula con despolarizaciones largas a 10 μg de Z9-14:Ac (2). C) Respuesta de una célula con despolarizaciones largas a 10 μg de Z11-16:Ac (3).

Tabla 4.9. Tipos de sensilas encontradas en la antena de un macho de *S. exigua*. L: Despolarización larga, C: Despolarización corta.

Tipo	%	Tamaño despolarización	1	2	3	4	5
I	47	L	X	X	-	-	-
		C	-	-	-	X	X
II	26	L	X	-	-	-	-
		C	-	-	-	-	X
III	13	L	X	-	-	-	-
IV	9	L	X	X	-	-	-
V	4	L	X	X	X	-	-
VI	1	C	-	-	-	X	X

4.3.4. Estudios de comportamiento en túnel de viento

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, según los estudios de campo realizados, existe una gran diversidad en relación a la mezcla feromonal más atractiva en las diferentes razas de *S. exigua*, por lo que era necesario evaluar la capacidad de atracción de las diferentes mezclas feromonales.

4.3.4.1. Mezclas halladas en glándulas y volátiles

Cuando se utilizaron las dos mezclas feromonales encontrada en extractos glandulares y volátiles emitidos, así como de cinco hembras vírgenes en comportamiento de llamada, no se apreciaron diferencias significativas respecto al número de machos que llegaron a las tres primeras etapas (Figura 4. 25), pero sí la cantidad que intentaron copular con la fuente, siendo las cinco hembras vírgenes más atractivas que cualquiera de las dos mezclas, aunque no significativamente. En relación a estas dos combinaciones, la consistente en los compuestos encontrados en la recogida de volátiles resultó ser ligeramente más atractiva a corta distancia que la encontrada en glándulas.

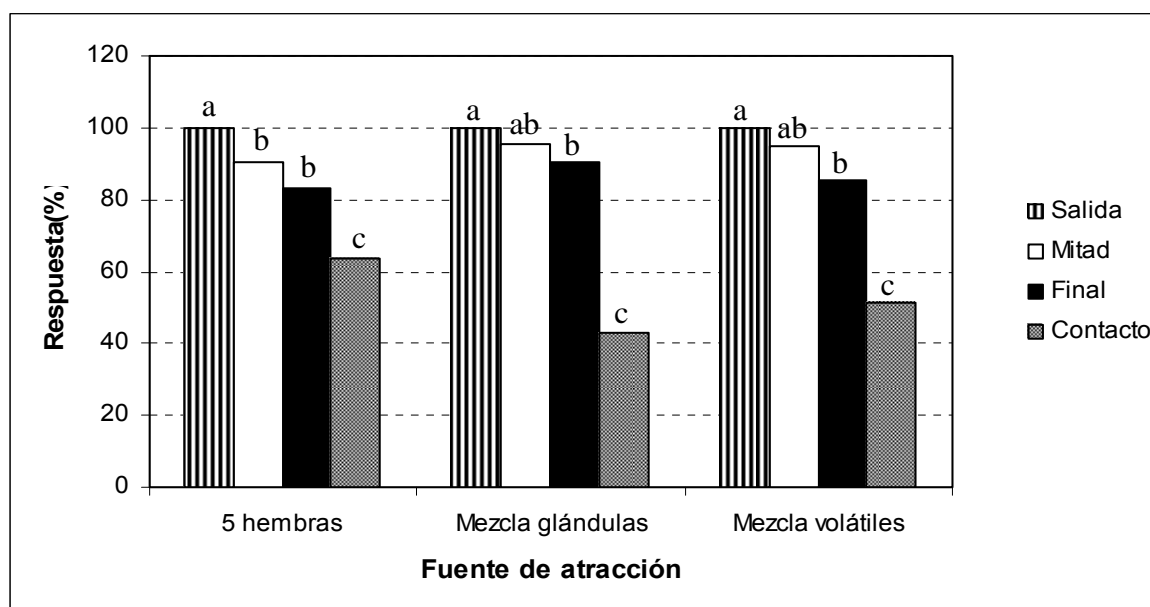


Figura 4.25. Porcentaje de respuesta de 41-42 machos de *S. exigua* en túnel de viento frente a cinco hembras vírgenes y a las dos mezclas sintéticas de los compuestos encontrados en glándulas y volátiles. La cantidad utilizada de cada mezcla fue 1 µg. Letras iguales sobre barras correspondientes al mismo comportamiento no son significativamente diferentes (Chi cuadrado, test de homogeneidad, $P < 0,05$).

4.3.4.2. Combinaciones binarias

De los ensayos realizados se pudo comprobar como el compuesto **1** en solitario tiene capacidad de atracción a larga distancia, consiguiendo que el 71% de los machos experimentados llegaran al final del recorrido. Sin embargo este compuesto por sí solo no es reconocido como fuente feromonal, esto se deduce de la ausencia de contactos cuando se utiliza el atrayente en solitario. Igualmente, ensayos de campo realizados en 1976 por Mitchell y Doolittle observaron que este compuesto por sí solo era inefectivo⁹⁷. Así pues, el Z9,E12-14:Ac atrae a los machos coespecíficos a distancia pero para el reconocimiento de la fuente de emisión a corta distancia es necesaria la presencia conjunta de otros compuestos. A partir de los resultados obtenidos se puede deducir que se trata del Z9-14:OH, puesto que cuando el mismo no se encuentra presente se reduce el número de insectos que llegan a las distintas etapas del recorrido, no produciéndose ningún intento de cópula en ausencia de este compuesto (Figura 4.26). En resumen, el compuesto **1** en combinación con cualquiera de los otros dos compuestos emitidos por las hembras, es decir, el **2** ó el **3**, estimulan a algunos machos a emprender el vuelo, aunque el número de insectos que consiguen llegar al resto de etapas del túnel disminuye gradualmente hasta observarse una ausencia de los mismos al final del recorrido, así pues, ninguno de estos dos compuestos son suficientes para el seguimiento de la pluma feromonal hasta la fuente de emisión; para tal reconocimiento se requiere la presencia del compuesto **5**.

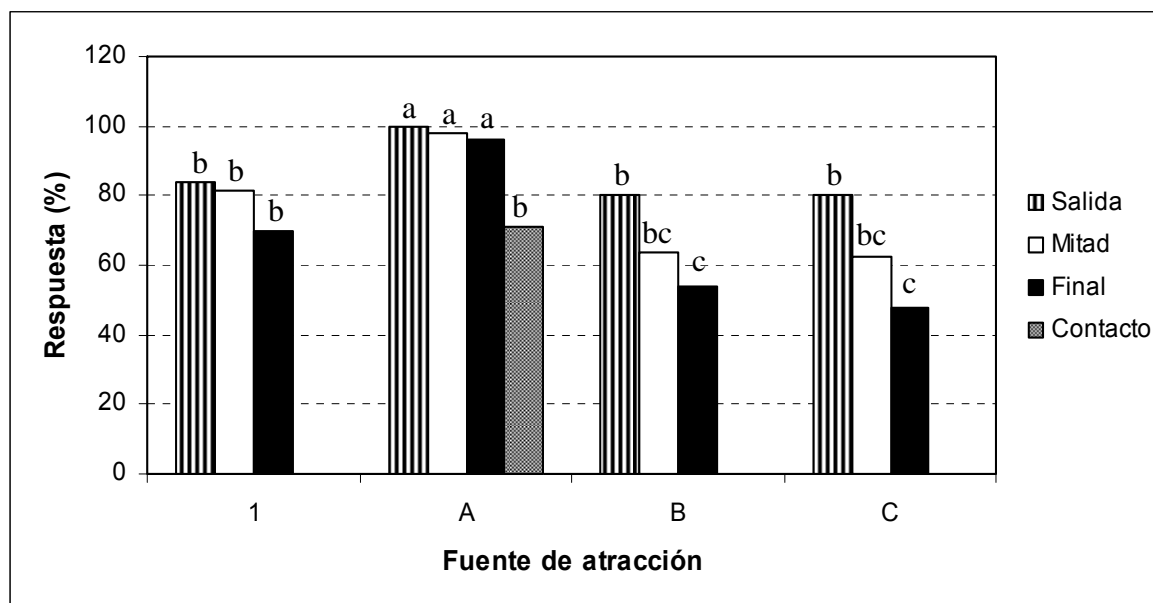


Figura 4.26. Porcentaje de respuesta de 40-48 machos de *S. exigua* frente a 1 µg del compuesto feromonal más activo en EAG Z9,E12-14:Ac (1) y a las combinaciones de la misma cantidad de éste más la proporción relativa de los otros tres compuestos encontrados en volátiles en túnel de viento. A: 1+5 (60:40), B: 1+2 (46:54), C: 1+3 (90:10). Z9-14:Ac (2), Z11-6:Ac (3), Z9-14:OH (5). Letras iguales sobre barras correspondientes al mismo comportamiento no son significativamente diferentes (Chi cuadrado, test de homogeneidad, $P < 0,05$).

4.3.4.3. Combinaciones ternarias

Se compararon los resultados obtenidos con la combinación binaria más atractiva (mezcla A: 1+5 en proporción 60:40) con las mezclas ternarias que contenían la mezcla A más Z9-14:Ac (mezcla D: 1+5+2 en proporción 35:23:42) y Z11-16:Ac (mezclas E: 1+5+3 en proporción 56:37:7 y F: 1+5+3 en proporción 87,2:2,5:10,3). Los datos mostrados en la figura 4.27 muestran la capacidad de todas las muestras utilizadas de incitar el vuelo de los machos ensayados, sin embargo el número de insectos que llegan al resto de etapas disminuye considerablemente con la mezcla F, utilizada en pruebas de campo y de gran efectividad en las mismas, reduciéndose el número de machos receptivos que llegan a la fuente de emisión. Por otro lado, entre las otras tres mezclas, la D y E apenas muestran diferencias entre ellas, aunque comparadas con la A, se observa un menor número de intentos de cópula obtenido con las mezclas ternarias, que a pesar de no observarse diferencias significativas, la combinación binaria A resulta ser la más atractiva, en relación a los machos que establecen contacto con la fuente feromonal.

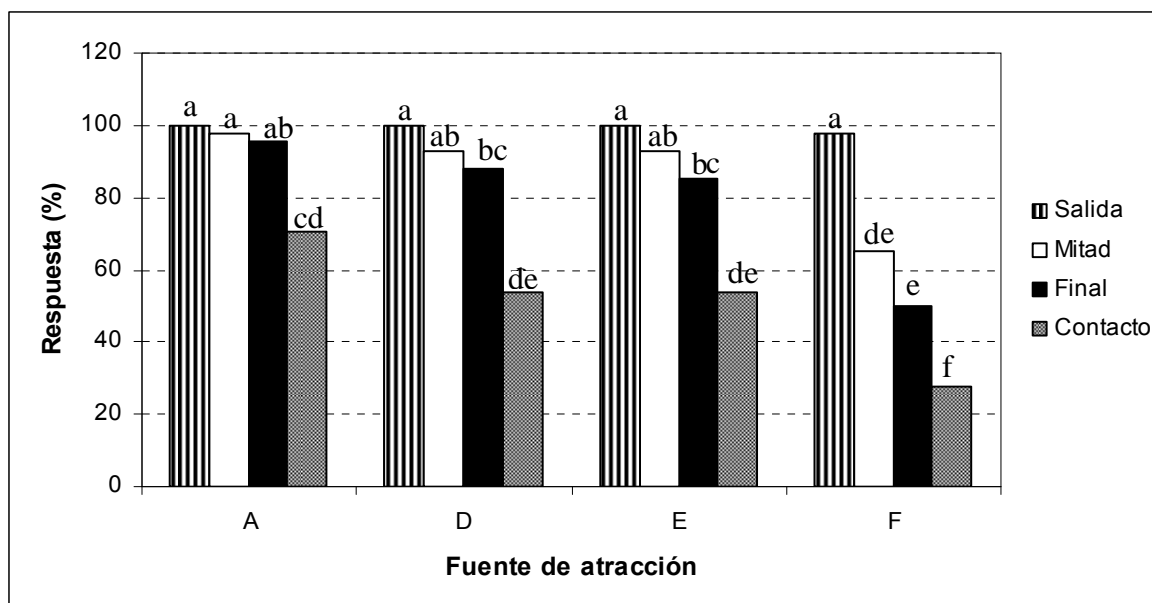


Figura 4.27. Porcentaje de respuesta de 40-48 machos de *S. exigua* frente a la mezcla binaria más atractiva en túnel de viento (A) y a las combinaciones ternarias de ésta con uno de los otros dos compuestos encontrados en volátiles así como la mezcla más atractiva en pruebas de campo. A: 1+5 (60:40), D: 1+5+2 (35:23:42), E: 1+5+3 (56:37:7), F: 1+5+3 (87,2:2,5:10,3). Z9,E12-14:Ac (1), Z9-14:Ac (2), Z11-16:Ac (3), Z9-14:OH (5). Letras iguales sobre barras correspondientes al mismo comportamiento no son significativamente diferentes (Chi cuadrado, test de homogeneidad, $P < 0,05$).

4.3.4.4. Efecto de los compuestos no encontrados en volátiles

Se estudió el efecto de dos componentes encontrados en los extractos glandulares de hembras pero que no habían sido identificados en volátiles. En la figura 4.28, se aprecia como el compuesto 4 no tiene un efecto patente en los ensayos realizados. La adición del mismo a la mezcla A no ocasiona una disminución o aumento del número de machos atraídos a la fuente de atracción. Sin embargo, la presencia del compuesto 6 sí parece afectar la capacidad de atracción de la mezcla feromonal, disminuyendo la cantidad de insectos que llegan a las distintas partes del recorrido, siendo evidente la reducción del número de machos capaces de establecer contacto con la fuente feromonal conforme aumenta el porcentaje del mismo en la mezcla.

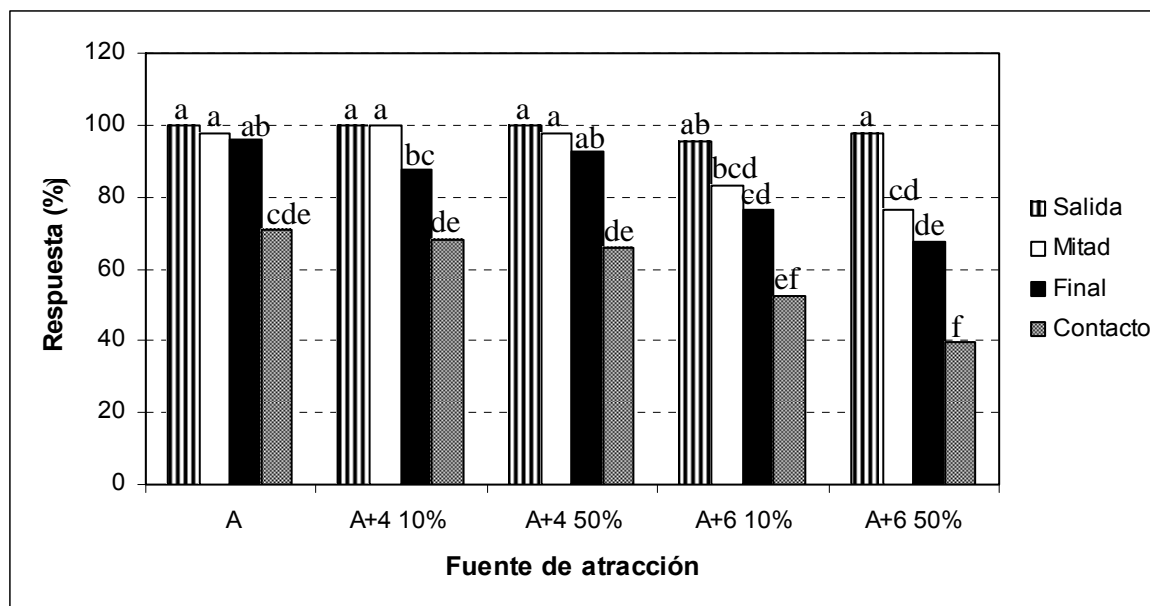


Figura 4.28. Respuesta de 41-48 machos de *S. exigua* a distintas combinaciones de la mezcla binaria A: 1+5 (60:40) y frente a combinaciones de la misma con distintos porcentajes de los compuestos no emitidos por las hembras en túnel de viento; Z9,E12-14:Ac (1), Z9,E12-14:OH (4), Z9-14:OH (5), Z11-16:OH (6). Letras iguales sobre barras correspondientes al mismo comportamiento no son significativamente diferentes (Chi cuadrado, test de homogeneidad, $P < 0,05$).

4.3.4.5. Estudio de la proporción más atractiva

Los resultados de los bioensayos realizados con la combinación binaria más atractiva no muestran diferencias en el porcentaje de machos que llegan a las tres primeras partes del recorrido en las diferentes proporciones utilizadas, 80:20, 60:40 y 40:60 (Figura 4.29), sin embargo existe una disminución en el número de machos que llegan a cada una de las fases del recorrido conforme aumenta la proporción del compuesto 5 en la mezcla, siendo patente una ausencia de intentos de cópula con la fuente, en ausencia del compuesto 1. Es en esta observación donde se recalca la necesidad de la presencia de ambos compuestos para la efectividad de la mezcla. Así pues, considerando el total de las combinaciones, la consistente en 1 y 5 en una proporción 60:40, sigue siendo en general, la más atractiva.

El comportamiento de los machos utilizados en las diferentes pruebas de túnel de viento realizadas se encuentra indicado en el anexo 9.2.

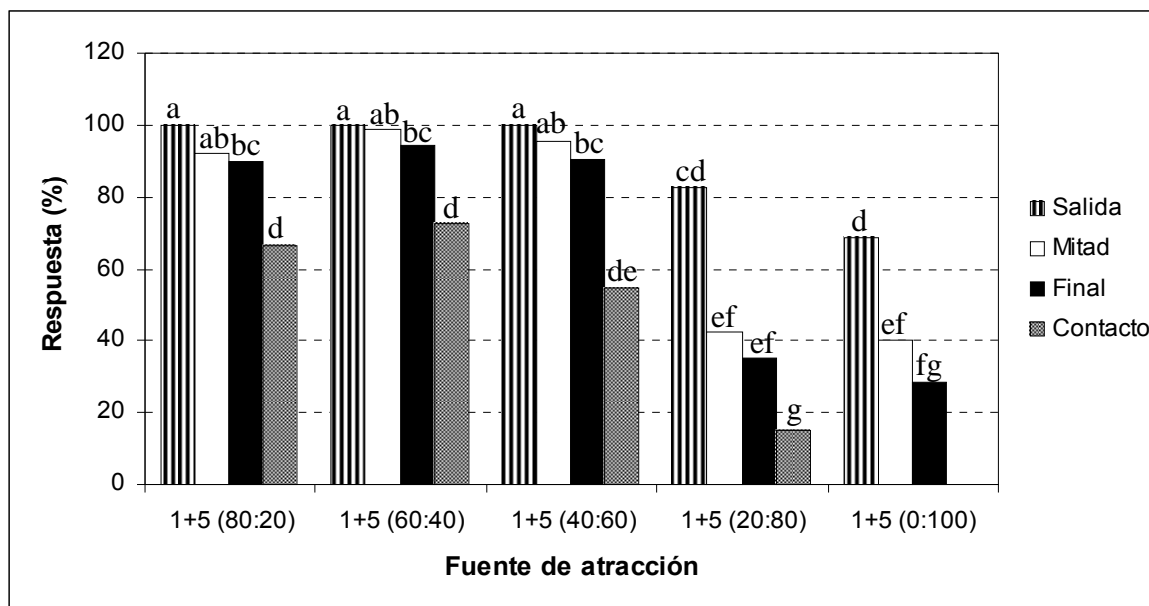


Figura 4.29. Respuesta de 35-69 machos de *S. exigua* a distintas proporciones de la mezcla binaria A (1+5 60:40); Z9,E12-14:Ac (1), Z9-14:OH (5). La cantidad utilizada de compuesto 1 fue 1 µg al que se le añadió el porcentaje relativo del compuesto 5. Letras iguales sobre barras correspondientes al mismo comportamiento no son significativamente diferentes (Chi cuadrado, test de homogeneidad, $P < 0,05$).

4.3.5. Pruebas de campo

4.3.5.1. Campaña 2006

En las pruebas realizadas en la localidad de Torre Pacheco no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de machos capturados en las trampas con las tres formulaciones, F1, F2 o F3 (Las formulaciones se hayan indicadas en la pág. 64), aunque la segunda mezcla fue ligeramente más atractiva. La formulación con peores resultados resultó ser la comercial (BAW) (Figura 4.30).

Sin embargo las pruebas realizadas en la localidad de Ramonete (Lorca) mostraron un mayor número de machos capturados en las trampas donde se dispuso como atrayente la formulación F2, sobresaliendo significativamente frente al porcentaje de machos atraídos por las otras tres mezclas, incluyendo la comercial (BAW) (Figura 4.31).

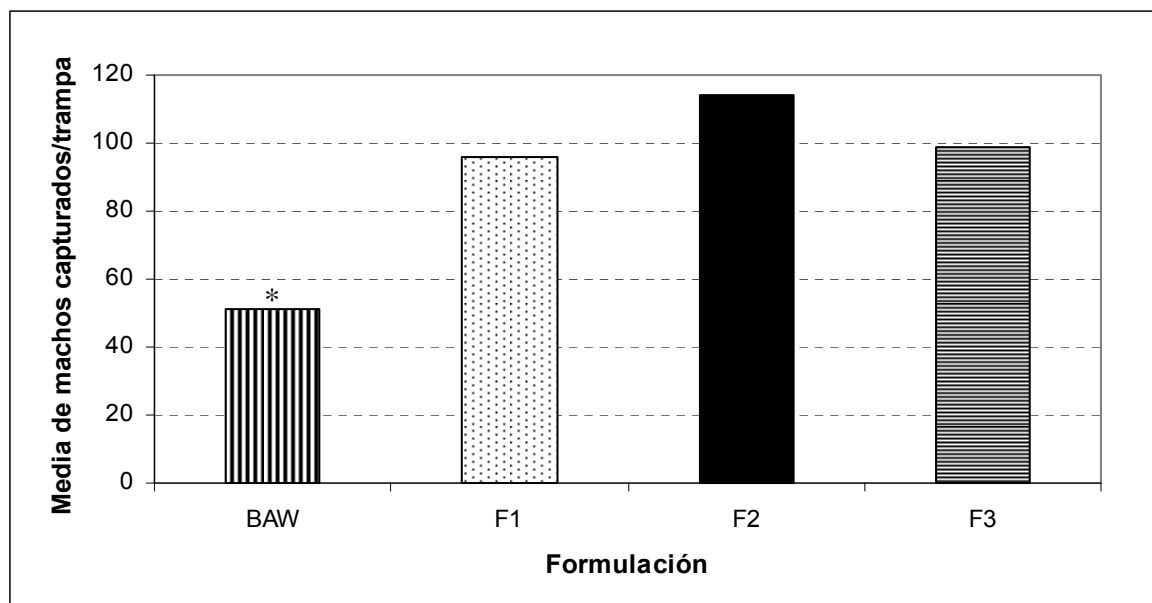


Figura 4.30. Media del número de machos de *S. exigua* capturados en trampas con distintas formulaciones feromonales en la localidad de Torre Pacheco (Murcia). La cantidad de mezcla feromonal fue de 200 μ g. BAW: atrayente comercial, F1: **1+5** (10:1); F2: **1+5+3** (87,2:2,5:10,3); F3: **1+5+2+4** (31:31:16:22). Z9,E12-14:Ac (1), Z9-14:Ac (2), Z11-16:Ac (3), Z9,E12-14:OH (4), Z9-14:OH (5). El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa entre medias. (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

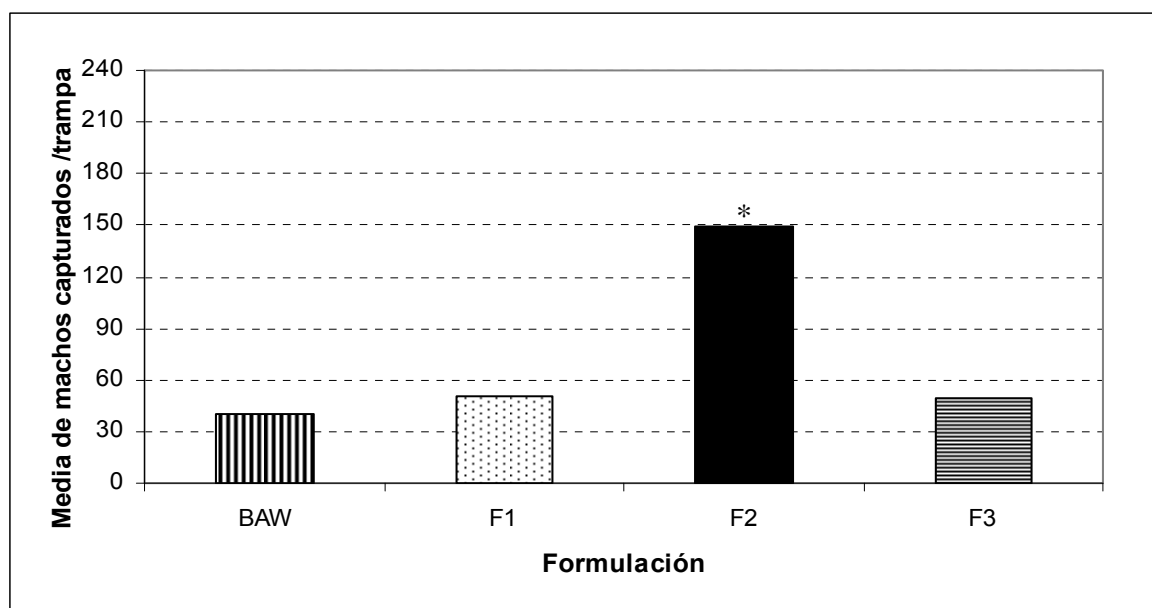


Figura 4.31. Media del número de machos de *S. exigua* capturados en trampas con distintas formulaciones feromonales en la localidad de Lorca (Murcia). La cantidad de mezcla feromonal fue de 200 μ g. BAW: atrayente comercial, F1: **1+5** (10:1); F2: **1+5+3** (87,2:2,5:10,3); F3: **1+5+2+4** (31:31:16:22). Z9,E12-14:Ac (1), Z9-14:Ac (2), Z11-6:Ac (3), Z9,E12-14:OH (4), Z9-14:OH (5). El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa entre medias. (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

4.3.5.2. Campaña 2008

De las siete formulaciones empleadas en las pruebas realizadas en la localidad de Torre Pacheco, las dos formulaciones que consiguieron atraer mayor porcentaje de machos fueron la F2, mezcla más efectiva en las pruebas realizadas en el 2006 y la F7, compuesta por los mismos componentes feromonales que la F2, pero en distinta proporción (Las formulaciones se hayan indicadas en la pág. 65). Fue precisamente esta última formulación la que resultó ser significativamente más atrayente que el resto. Al comparar estos resultados con los obtenidos en túnel de viento, la mezcla con la que se consiguió un mayor índice de contactos en túnel de viento (F4) no resultó ser tan efectiva en las pruebas realizadas, capturando más machos la misma combinación (F5) pero en proporción 80:20 (Figura 4.32).

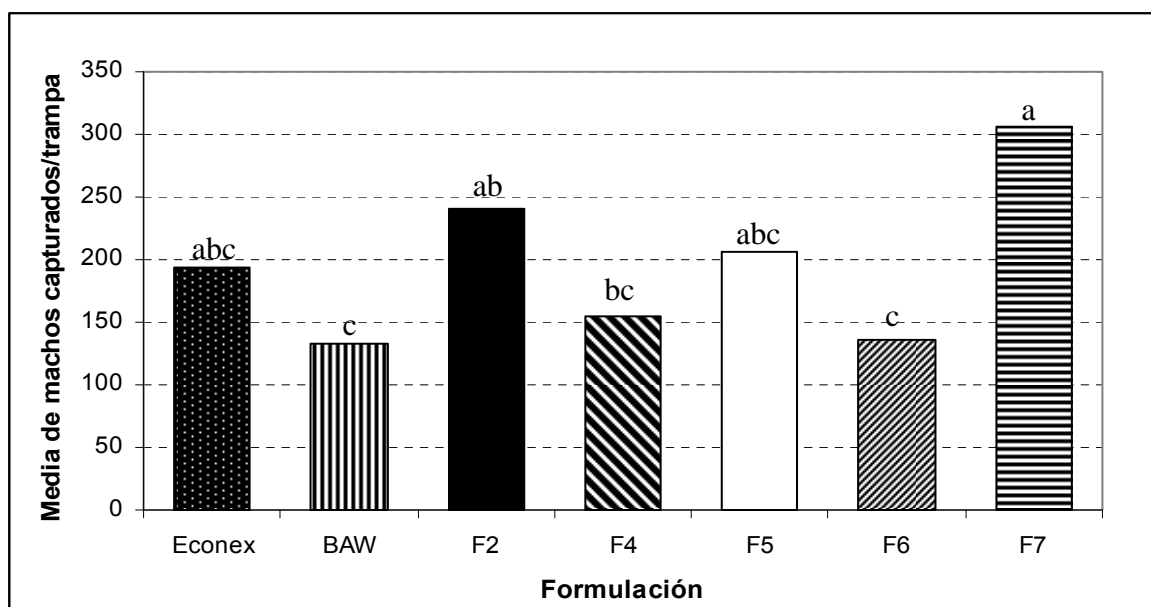


Figura 4.32. Media del número de machos de *S. exigua* capturados en trampas con distintas formulaciones feromonales en la localidad de Torre Pacheco. La cantidad de mezcla feromonal fue de 200 µg. Econex y BAW: atrayentes comerciales; F2: 1+5+3 (87,2:2,5:10,3); F4: 1+5 (60:40); F5: 1+5 (80:20); F6: 1+5+2 (35:23:42); F7: 1+5+3 (56:37:7). Z9,E12-14:Ac (1), Z9-14:Ac (2), Z11-16:Ac (3), Z9-14:OH (5). Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa entre medias. (ANOVA, t de Student, P < 0,05).

En las pruebas realizadas en Mazarrón se observaron ciertas similitudes en los resultados obtenidos en Torre Pacheco, aunque con algunas discrepancias. En el primer ensayo realizado en esta localidad se apreció igualmente un mayor número de capturas cuando las formulaciones utilizadas eran la F2 y la F7, siendo éstas superiores con la F7. En este caso, el producto sintético BAW consiguió atraer más machos que otras formulaciones objeto de estudio (F4, F5 y F6), de las cuales, la que peores resultados

presentó fue la F6, así mismo, la formulación F4 tampoco sobresalió frente al resto (Figura 4.33).

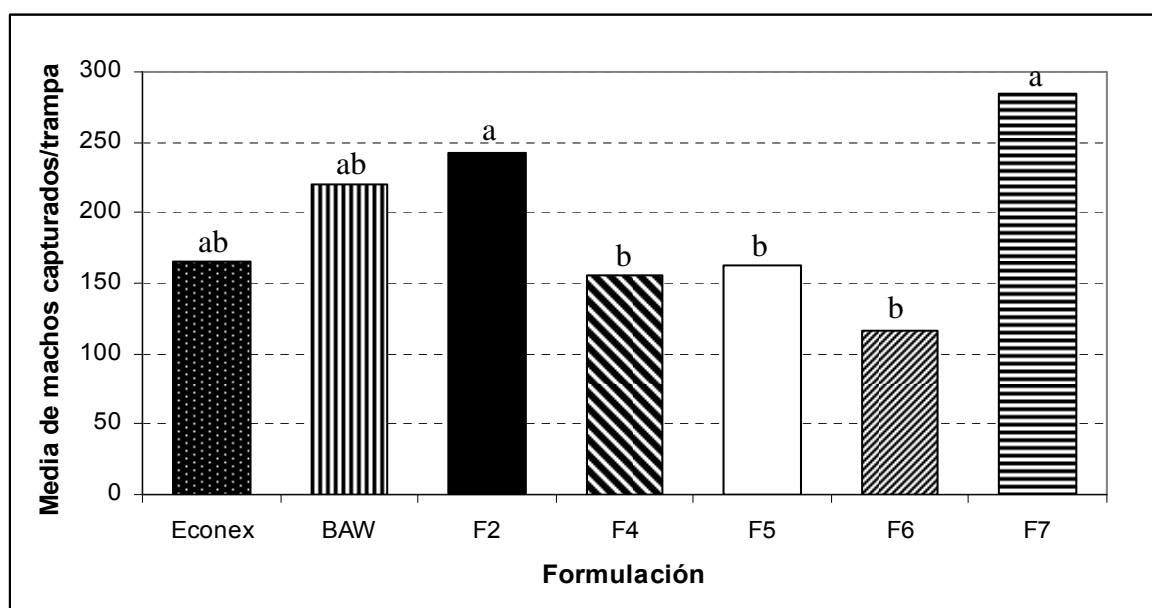


Figura 4.33. Media del número de machos de *S. exigua* capturados en trampas con distintas formulaciones feromonales en el primer ensayo realizado en la localidad de Mazarrón. La cantidad de mezcla feromonal fue de 200 μ g. Econex y BAW: atrayentes comerciales; F2: **1+5+3** (87,2:2,5:10,3); F4: **1+5** (60:40); F5: **1+5** (80:20); F6: **1+5+2** (35:23:42); F7: **1+5+3** (56:37:7). Z9,E12-14:Ac (**1**), Z9-14:Ac (**2**), Z11-16:Ac (**3**), Z9-14:OH (**5**). Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa entre medias. (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

En el segundo ensayo realizado en esta misma localidad, las dos formulaciones con las que se consiguió capturar más machos fueron así mismo la F2 y F7, esta última con un mayor índice de capturas. La menos efectiva en este caso resultó ser también la formulación F6 (Figura 4.34), por lo que se observa cómo la adición del compuesto **2** a la mezcla compuesta por **1+5** disminuye en cierta medida la capacidad de atracción de la misma.

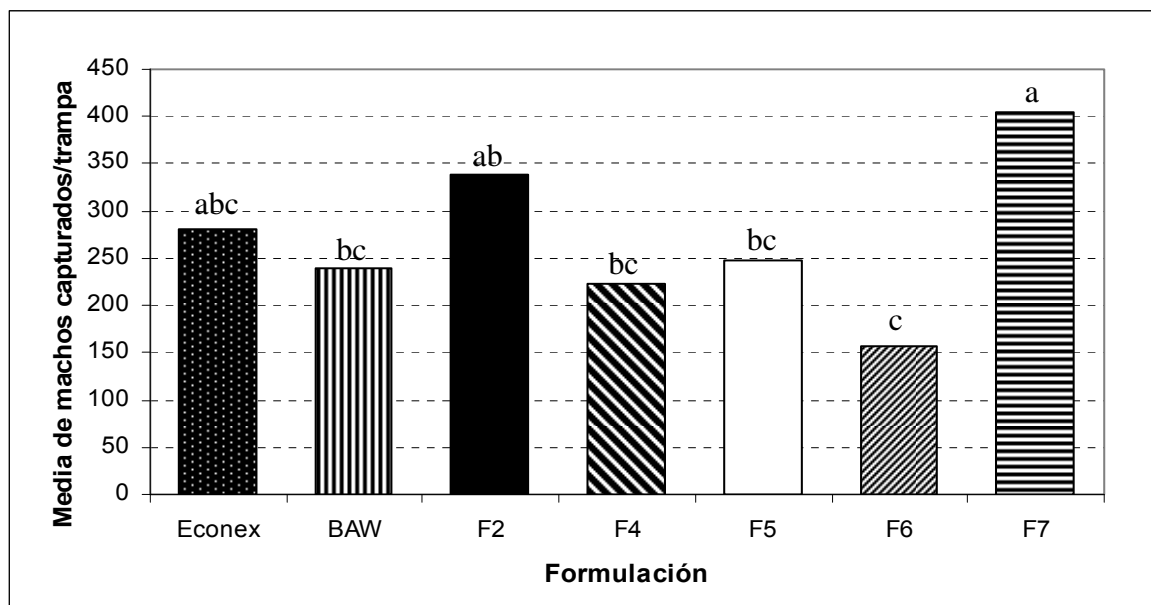


Figura 4.34. Media del número de machos de *S. exigua* capturados en trampas con distintas formulaciones feromonales en el segundo ensayo realizado en la localidad de Mazarrón. La cantidad de mezcla feromonal fue de 200 μ g. Econex y BAW: atrayentes comerciales; F2: **1+5+3** (87,2:2,5:10,3); F4: **1+5** (60:40); F5: **1+5** (80:20); F6: **1+5+2** (35:23:42); F7: **1+5+3** (56:37:7). Z9,E12-14:Ac (**1**), Z9-14:Ac (**2**), Z11-16:Ac (**3**), Z9-14:OH (**5**). Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa entre medias. (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

4.3.6. Estudio de los lóbulos antenales-Immunohistoquímica

La tinción empleada para este estudio preliminar, permitió una visualización del tejido nervioso, obteniendo así una idea global de la estructuración del cerebro en esta especie. En la parte dorsal se observaron los lóbulos antenales, parte más sobresaliente del deutocerebro, así como el centro motor y mecanosensorial de la antena, los lóbulos ópticos y el ganglio subesofágico (Figura 4.35 A). Así mismo, con esta técnica en la parte ventral, se pudieron apreciar las estructuras del protocerebro, los cálices de los cuerpos seta y las estructuras internas de los lóbulos ópticos (Figura 4.35 B). Sin embargo, no se consiguieron visualizar los nervios antenales o cualquier trayectoria nerviosa.

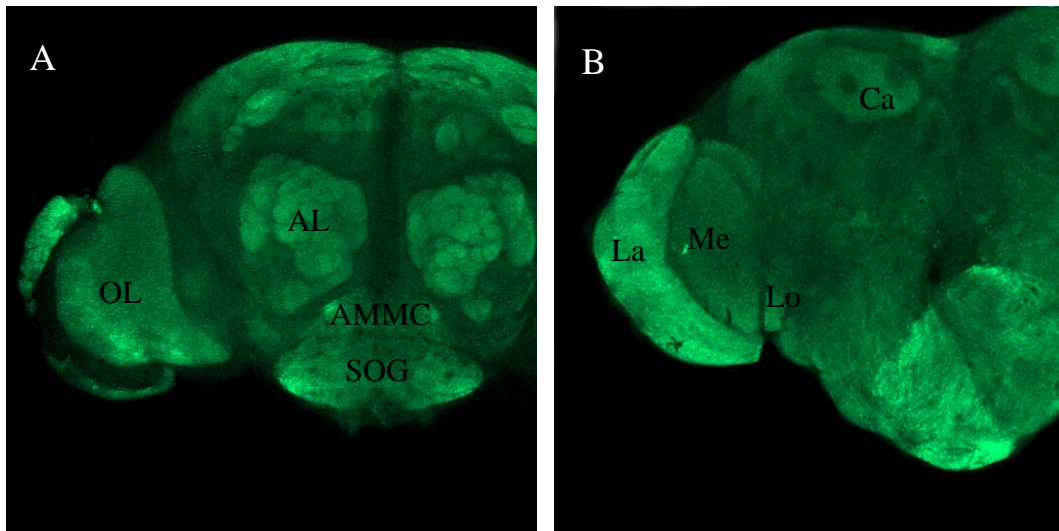
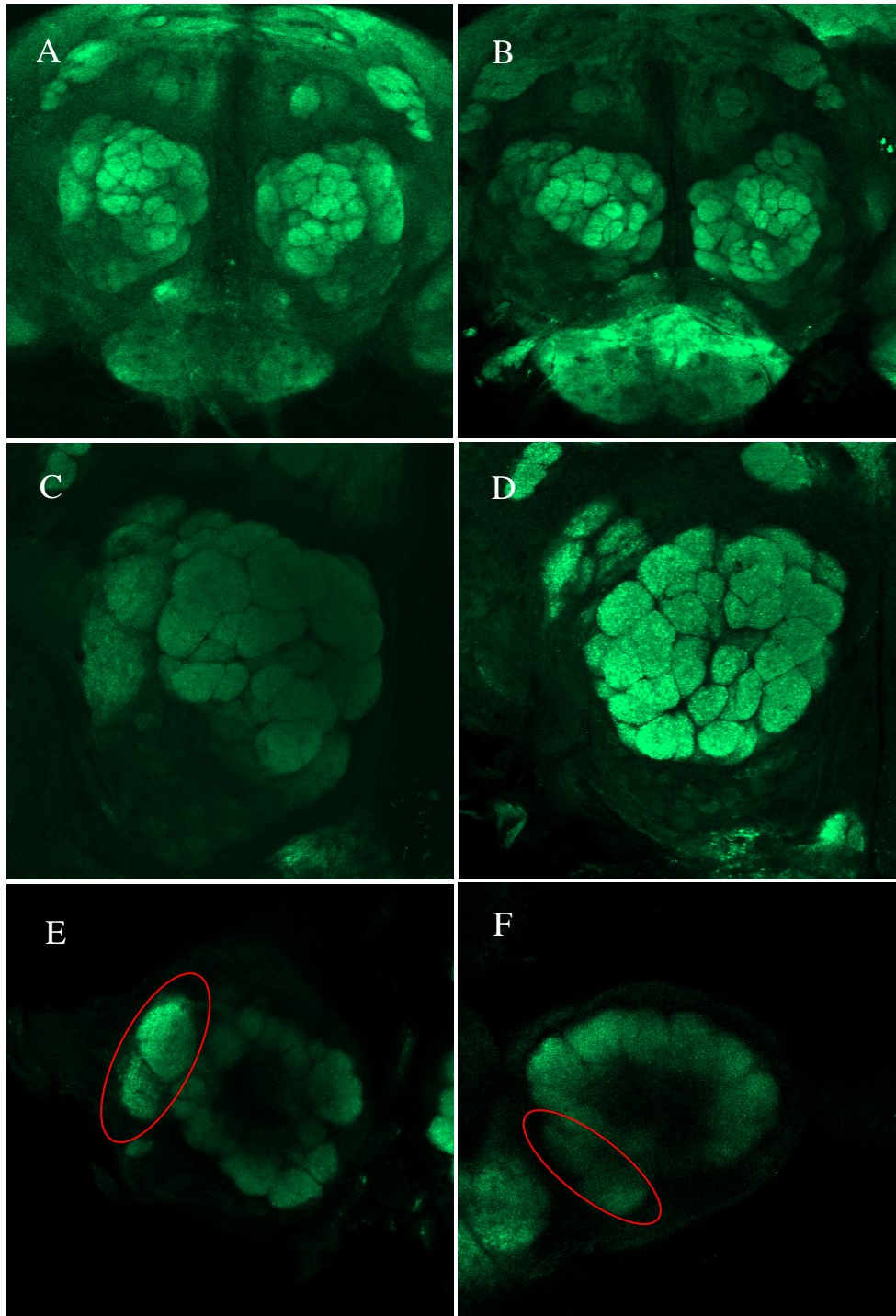


Figura 4.35. A) Vista frontal izquierda del cerebro de un macho de *S. exigua*. Se observan el lóbulo óptico (OL), los lóbulos antenales (AL), el centro motor y mecanosensorial de la antena (AMMC) y el ganglio subesofágico (SOG). B) Vista ventral izquierda del cerebro. Se muestran los cálices de los cuerpos seta (Ca) así como las distintas partes internas del lóbulo óptico: la lámina (La), médula (Me) y lóbulo (Lo).

Comparando los lóbulos antenales de ambos sexos, se observó en la parte central de cada lóbulo una serie de glomérulos morfológicamente similares presentes en machos y hembras (Figura 4.36 A- B) constituyendo los glomérulos ordinarios. Igualmente, se distinguieron dos glomérulos de mayor tamaño únicamente presentes en machos (Figura 4.36 C-D) lo que se podría denominar como el complejo macroglomerular. En la figura 4.36 E-F se pueden apreciar dos cortes histológicos de dos lóbulos antenales pertenecientes a dos machos distintos, en los que se observan los dos glomérulos presentes únicamente en machos.



Figuras 4.36. Imágenes de distintas partes del cerebro de machos y hembras de *S. exigua*. A) Vista dorsal del cerebro de un macho. B) Vista dorsal del cerebro de una hembra. C) Lóbulo antenal izquierdo del cerebro de un macho. D) Lóbulo antenal izquierdo del cerebro de una hembra. E) Vista dorsal de un corte de un lóbulo antenal de un macho. F) Vista dorsal de un corte de un lóbulo antenal de un segundo macho. Con una elipse roja se muestran los dos glomérulos que forman parte del MGC en machos.

4.4. DISCUSIÓN

La composición feromonal encontrada en los extractos glandulares de la variedad española de la especie *S. exigua* está compuesta por Z9-14:OH, Z9,E12-14:Ac, Z9,E12-14:OH, Z9-14:Ac, Z11-16:OH y Z11-16:Ac en una proporción 31:26:22:11:9:1 y aunque es similar en varios componentes feromonales, difiere de la hallada por diversos autores en variedades de otros países. De entre todos ellos el Z9,E12-14:Ac, primer compuesto hallado⁸⁰, aparece en todas los extractos glandulares estudiados y es el más abundante en las hembras de *S. exigua* de algunos países como China⁸⁴. Aunque en la variedad española es el segundo compuesto en abundancia, ya que el mayoritario es el Z9-14:OH. De los otros 4 compuestos, tan sólo el Z9-14:Ac y el Z9,E12-14:OH se han hallado en los extractos glandulares de especies estudiadas de China, Japón y Estados Unidos^{83-84, 98}, pero no así los otros dos compuestos de 16 carbonos, Z11-16:OH y Z11-16:Ac, este último hallado sólo en los volátiles analizados en una variedad americana⁸².

Los volátiles de las mezclas feromonales emitidas por varias especies de lepidópteros varían de las halladas en los extractos glandulares no sólo en la proporción de los compuestos sino también en la composición de la misma mezcla⁹⁹; sin embargo, los extractos glandulares pueden contener compuestos estrechamente relacionados con los compuestos feromonales emitidos¹⁰⁰.

Efectivamente, la composición feromonal emitida por la variedad española difiere de la encontrada en las glándulas en la ausencia de los dos alcoholes Z9,E12-14:OH y Z11-16:OH y en la proporción de los otros cuatro compuestos emitidos. Estos resultados difieren ligeramente de los encontrados por Tumlinson y col. en 1990⁸², quienes hallaron una mezcla compuesta por los cuatro componentes observados en la variedad española, a los que hay que añadir la presencia de un quinto compuesto; Z9,Z12-14:Ac, no apreciable en los volátiles analizados. Así mismo, la proporción de los cuatro compuestos encontrados en las hembras de las dos variedades difiere entre ellas⁸².

La ausencia de ambos alcoholes en la mezcla feromonal emitida, podría estar relacionada con la función de los mismos como precursores de los respectivos acetatos, es decir, el Z11-16:Ac podría sintetizarse a partir del Z11-16:OH, siendo el acetato el compuesto emitido y el Z9,E12-14:Ac a partir del Z9,E12-14:OH. Existen datos bibliográficos de otras especies del mismo género en las que también se aprecia esta observación, tal es el caso de *Spodoptera eridania*, en la que el compuesto Z9-14:OH aparece en los extractos glandulares pero no se observa su presencia en los volátiles emitidos⁸⁹. Así mismo, en otras especies de la familia noctuidae como *Heliothis subflexa*,

se ha observado que la mezcla feromonal está compuesta básicamente de acetatos y aldehídos pero mantienen los correspondientes alcoholes en la glándula feromonal, igualmente en *Heliothis micaceae* se ha demostrado cómo los alcoholes son convertidos en los respectivos acetatos por una acetil transferasa¹⁰¹. Esto explicaría la abundancia relativa de ambos alcoholes en las glándulas, siendo proporcional a la cantidad del correspondiente acetato encontrada en los volátiles.

Por lo general, los compuestos no hallados en los volátiles emitidos pero presentes en los extractos glandulares, suelen carecer de función comportamental aunque, en ocasiones se ha mostrado un efecto inhibitor en el comportamiento del macho. En la especie *H. subflexa*, la incorporación de alcoholes a la fuente de atracción, ocasionaba la reducción del número de machos capturados en las trampas feromonales¹⁰². En los ensayos de electrofisiología realizados se ha comprobado que ambos alcoholes desencadenan cierta respuesta antenal en machos, aumentando la intensidad de la misma proporcionalmente a la dosis utilizada. El Z9,E12-14:OH es más activo tanto en EAG como en GC-EAD que el Z11-16:OH, así mismo se ha observado que es capaz de estimular la misma célula receptora que el Z9-14:OH, aunque con menor intensidad, observación realizada igualmente por Mochizuki y col. en la variedad encontrada en Japón⁸³, lo cual podría implicar una función similar a la del compuesto Z9-14:OH. En pruebas de campo realizadas en Japón utilizando como fuente de atracción una mezcla compuesta de Z9,E12-14:Ac y Z9,E12-14:OH en diferentes proporciones, capturaron varios machos cuando ambos compuestos estaban presentes pero ninguno de manera individual, obteniendo el máximo número de capturas en una proporción acetato: alcohol de 70:30, aunque en menor cantidad que la mezcla compuesta por Z9,E12-14:Ac y Z9-14:OH en las mismas proporciones¹⁰³. En los experimentos realizados se ha visto cómo la adición progresiva del compuesto Z9,E12-14:OH a la mezcla binaria más atractiva en túnel de viento, es decir, al Z9,E12-14:Ac+Z9-14:OH en relación 60:40, no afecta el porcentaje de machos que llegan a las distintas fases del recorrido. Esta observación junto a la ausencia del mismo en los volátiles emitidos hace que, aunque en cierta medida sea activo se le haya considerado irrelevante. Por otro lado, el Z11-16:OH presenta una cierta actividad en las antenas de los machos ensayados tanto en EAG como en GC-EAD, pero el aumento progresivo del mismo en la mezcla binaria con mayor grado de atracción en túnel de viento, ocasiona la disminución del número de machos que llegan a las distintas partes del recorrido, en especial los que llegan hasta la fuente de estímulo, esto parece indicar que el compuesto Z11-16:OH presenta un papel inhibitor.

Aunque no es estadísticamente significativo, el porcentaje de machos que llegan hasta la fuente de atracción es mayor cuando se utiliza la mezcla sintética de los volátiles emitidos por la hembra que la encontrada en los extractos glandulares. Existen datos que proponen una mayor sensibilidad de los machos en cuanto a comportamiento se refiere, a la mezcla compuesta por todos los compuestos feromonales que a las mezclas parciales o compuestos individuales¹⁰⁴. En ensayos de túnel de viento y pruebas de campo llevadas a cabo en varias especies como *Argyrotaenia velutinana*, *Grapholita molesta* y *Trichoplusia ni*, se observó que el inicio del vuelo así como la localización de la fuente de atracción se desencadenaban con la mezcla feromonal completa a dosis de 10 a 100 veces menores que en mezclas parciales¹⁰⁵, igualmente el comportamiento de vibración de las alas que se origina de manera previa al vuelo, se producía a una distancia mayor de la fuente de atracción a la misma dosis que la utilizada con mezclas incompletas¹⁰⁶. No obstante, los diferentes compuestos de una mezcla feromonal no siempre son necesarios para atraer a un macho coespecífico, en las composiciones constituidas por varios compuestos, sólo unos pocos de ellos son suficientes para ocasionar la atracción de un macho o provocar la secuencia completa del comportamiento sexual del mismo¹⁰⁷. En el caso de *S. exigua* el Z9,E12-14:Ac, es el compuesto más activo según los resultados de las pruebas de electrofisiología, además de ser necesario para el inicio de vuelo en machos conforme a los ensayos de túnel de viento, sin embargo la presencia única de este compuesto es insuficiente para la localización de la fuente de atracción. La magnitud del EAG se considera una medida relativa del número de aceptores de un determinado estímulo oloroso que responden frente al mismo^{108, 109}; así pues, la mayor actividad del Z9,E12-14:Ac, está relacionada con el alto número de células receptoras capaces de ser estimuladas por este compuesto incluso a dosis menores que el resto de compuestos que provocan respuesta en las mismas células. Esto supone un rango de atracción mayor, actuando así a largas distancias, lo que explicaría el alto porcentaje de insectos macho que inician el vuelo y llegan hasta las diferentes etapas del recorrido del túnel de viento aunque sin realizarse ningún contacto con la fuente de atracción. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores, los cuales observaron la ineficacia del uso de trampas con este compuesto sólo o en combinación con el compuesto feromonal Z9-14:Ac^{97, 110}, aunque existen datos bibliográficos contradictorios, Persoons y col. en 1981 observaron en pruebas de campo que la mezcla compuesta por estos dos compuestos, Z9,E12-14:Ac y Z9-14:Ac en proporción 6:3 era igual de atractiva que dos hembras vírgenes, así como que el Z9-14:OH no era esencial en la mezcla feromonal de esta especie⁸¹. En los diferentes ensayos realizados en túnel de viento, la cantidad de machos que establecieron contacto con la fuente de atracción fue mayor cuando se utilizó la

combinación binaria Z9,E12-14:Ac + Z9-14:OH que cuando se utilizó la mezcla sintética completa de los volátiles emitidos por las hembras como atrayente o incluso cuando se utilizaron cinco hembras vírgenes como fuente de atracción. Así mismo las combinaciones compuestas por el Z9,E12-14:Ac con alguno de los otros dos compuestos, Z9-14:Ac o Z11-16:Ac, en ausencia de Z9-14:OH resultaron ser insuficientes para atraer a los machos ensayados hasta la fuente. La misma combinación aunque en diferentes proporciones se ha encontrado igualmente efectiva en otros países, en Estados Unidos, concretamente en Florida¹¹¹ y Taiwán⁸⁷ en una proporción 10:1 y en Japón y Korea^{88, 112} 70:30. Así mismo Tumlinson y col. comprobaron que las mezclas que no contenían ambos compuestos feromonales eran inefectivas en pruebas de campo⁸². El Z9-14:OH, aunque no es muy activo en EAG, la presencia del mismo es esencial para la localización de las hembras, aumentando la respuesta de los receptores antenales frente al mismo conforme se incrementa la dosis. Estos resultados indican una actuación a corta distancia, siendo el acetato el compuesto captado en primer lugar por el macho y conforme la distancia a la fuente de atracción es menor se incrementa la percepción del alcohol. En los ensayos de túnel de viento la proporción de los dos compuestos más efectiva en relación al porcentaje de machos atraídos a la fuente feromonal es de 60:40, disminuyendo el número de insectos que llegan a la etapa final conforme aumenta la cantidad de alcohol en la mezcla hasta obtener una ausencia de machos con la utilización de este compuesto de manera única, lo cual concuerda a lo observado por otros autores⁸⁶.

La adición de uno de los otros dos acetatos encontrados en los volátiles, Z9-14:Ac o Z11-16:Ac, a la combinación binaria más atractiva, ocasionó una disminución del número de machos capaces de contactar con la fuente de atracción en túnel de viento, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. En diversas pruebas de campo realizadas por Tumlinson y col. observaron que la eliminación del Z9-14:Ac de la mezcla de 5 compuestos encontrada en volátiles (Z9-14:Ac, Z9,E12-14:Ac, Z9;Z12-14:Ac, Z9-14:OH y Z11-16:Ac en proporción 47,9:40,2:6,5:4:1,7) y de la constituida por únicamente los tres compuestos Z9,E12-14:Ac + Z9-14:OH y Z11-16:Ac, provocaba un aumento consecutivo del número de machos capturados en las trampas de feromona⁸², precisamente la combinación formada por estos tres compuestos Z9,E12-14:Ac, Z9-14:OH y Z11-16:Ac en una proporción 87,2:2,5:10,3 era considerada óptima para la captura de machos. Igualmente la misma composición en proporción 7:3:1 y 7:3:5 fueron las más atractivas en pruebas de campo llevadas a cabo en Korea¹¹². Sin embargo, en los ensayos de túnel de viento realizados con esta misma combinación en la proporción 56:37:7 no supuso un aumento en el porcentaje de machos que llegaban a la fuente de atracción respecto al

número de contactos obtenidos con la combinación Z9,E12-14:Ac + Z9-14:OH 60:40, así mismo la mezcla feromonal identificada por Tumlinson y col. como la más efectiva en campo ocasionó una disminución en la cantidad de adultos receptivos llegados a las distintas fases del recorrido del túnel.

Estos resultados contradicen a los obtenidos en las pruebas de campo realizadas en distintas localidades de Murcia, donde precisamente las dos formulaciones compuestas por estos tres componentes feromonales resultaron ser las más atractivas, en especial la combinación ternaria en proporción 56:37:7. Esta discrepancia entre los resultados observados en túnel de viento y los obtenidos en pruebas de campo, podría deberse a las características del túnel, el cual no representa en su totalidad las dimensiones de la pluma, las bajas concentraciones y las grandes distancias que se dan en el campo^{113, 114}, siendo en ocasiones insuficientes para la percepción de compuestos feromonales que requieren de cierta distancia para poder ser captados. En este caso los receptores antenales de los machos ensayados podrían captar los dos compuestos más activos, esto es el Z9,E12-14:Ac a larga distancia y Z9-14:OH una vez próximos a la fuente feromonal, pero siendo insuficiente la distancia para la percepción del minoritario Z11-16:Ac.

Los ensayos de SSR han demostrado la presencia de una gran proporción de sensilas dotadas de dos células receptoras, una estimulada por el compuesto Z9,E12-14:Ac y otra por el Z9-14:OH. A su vez, cada una de estas neuronas responde al Z9-14:Ac y Z9,E12-14:OH respectivamente. Estos resultados concuerdan con los observados por Mochizuki y col., los cuales dividieron las sensilas tricoideas registradas en dos tipos según las características morfológicas las correspondientes al tipo I que eran de un tamaño largo, mostraban la presencia de dos neuronas receptoras, una, considerada como A, presentaba despolarizaciones grandes y ofrecía una respuesta hacia el compuesto Z9,E12-14:Ac y la otra neurona, B, con despolarizaciones pequeños, respondía frente al Z9-14:OH⁹⁰, este tipo también fue observado por Dickens y col.¹¹⁵. Las sensilas de tipo II, eran más cortas y electrofisiológicamente sólo presentaban una neurona receptora que respondía o al Z9,E12-14:Ac o al Z9-14:OH¹¹⁶. Así mismo, en ensayos posteriores, observaron como a veces, cada una de las neuronas de las sensilas de tipo I mostraba a su vez, respuesta frente a otro compuesto feromonal, la célula que respondía al Z9,E12-14:Ac, a dosis mayores del Z9-14:OAc también ofrecía respuesta, por otro lado, la célula B, respondía no sólo al Z9-14:OH sino también al Z9,E12-14:OH aunque a dosis similares⁸³. En la variedad estudiada se ha observado otro tipo de sensila con respuesta frente al Z9,E12-14:Ac, Z9-14:Ac y Z11-16:Ac en una proporción muy baja (3%) lo cual explicaría la baja respuesta obtenida tanto en EAG como en GC-EAD frente al compuesto

Z11-16:Ac. Este mismo tipo sensilar se ha encontrado igualmente en tan baja proporción por Dickens y col.¹¹⁵.

Las neuronas receptoras implicadas en la recepción de los distintos compuestos feromonales emitidos por las hembras conespecíficas, así como por otras especies simpátricas, proyectan sus arborizaciones axonales en el MGC. Existen diferentes patrones de proyecciones neuronales según la especie. En algunos casos, cada célula receptora específica de un compuesto feromonal proyecta en un determinado glomérulo del complejo macrogglomerular, el cual no recibe proyecciones de ninguna otra célula receptora. Sin embargo en otras especies, un mismo glomérulo del MGC, puede tener ramificaciones axonales de varias neuronas receptoras estimuladas por diferentes compuestos feromonales⁴⁷. En *S. exigua* se ha observado la presencia de dos glomérulos de gran tamaño, localizados cerca de la entrada del nervio antenal no apreciables en los lóbulos antenales de las hembras. Tras las diversas pruebas realizadas a lo largo de este trabajo se ha observado la importancia de dos compuestos feromonales, Z9,E12-14:Ac y Z9-14:OH para la consiguiente localización de la hembra, lo cual es posible que los axones de las neuronas estimuladas por estos compuestos proyecten cada una a uno de estos dos glomérulos. Sin embargo, la mezcla feromonal está constituida a su vez por otros dos compuestos, Z9-14:Ac y Z11-16:Ac, capaces de desencadenar una respuesta de cierta actividad en algunas células receptoras, que posiblemente proyectan hacia los mismos glomérulos, a otro no visualizado mediante la técnica de tinción utilizada o tal vez a algún otro glomérulo localizado fuera del MGC, como es el caso de *S. littoralis*, donde cada uno de los axones de las células receptoras proyecta en un glomérulo distinto⁴⁶, salvo una que lo hace en un glomérulo situado en el conjunto de glomérulos ordinarios⁴⁷. Cabría utilizar una técnica para la visualización de las proyecciones neuronales de las diferentes neuronas receptoras, así como la aplicación de otro método de tinción del MGC que permitiera estudiar con más exactitud la morfología de los lóbulos antenales, dada las limitaciones en ocasiones de la técnica de tinción utilizada de penetrar en profundidad en el tejido nervioso.