



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios dirigidos a la ecología química de insectos plaga mediante semioquímicos

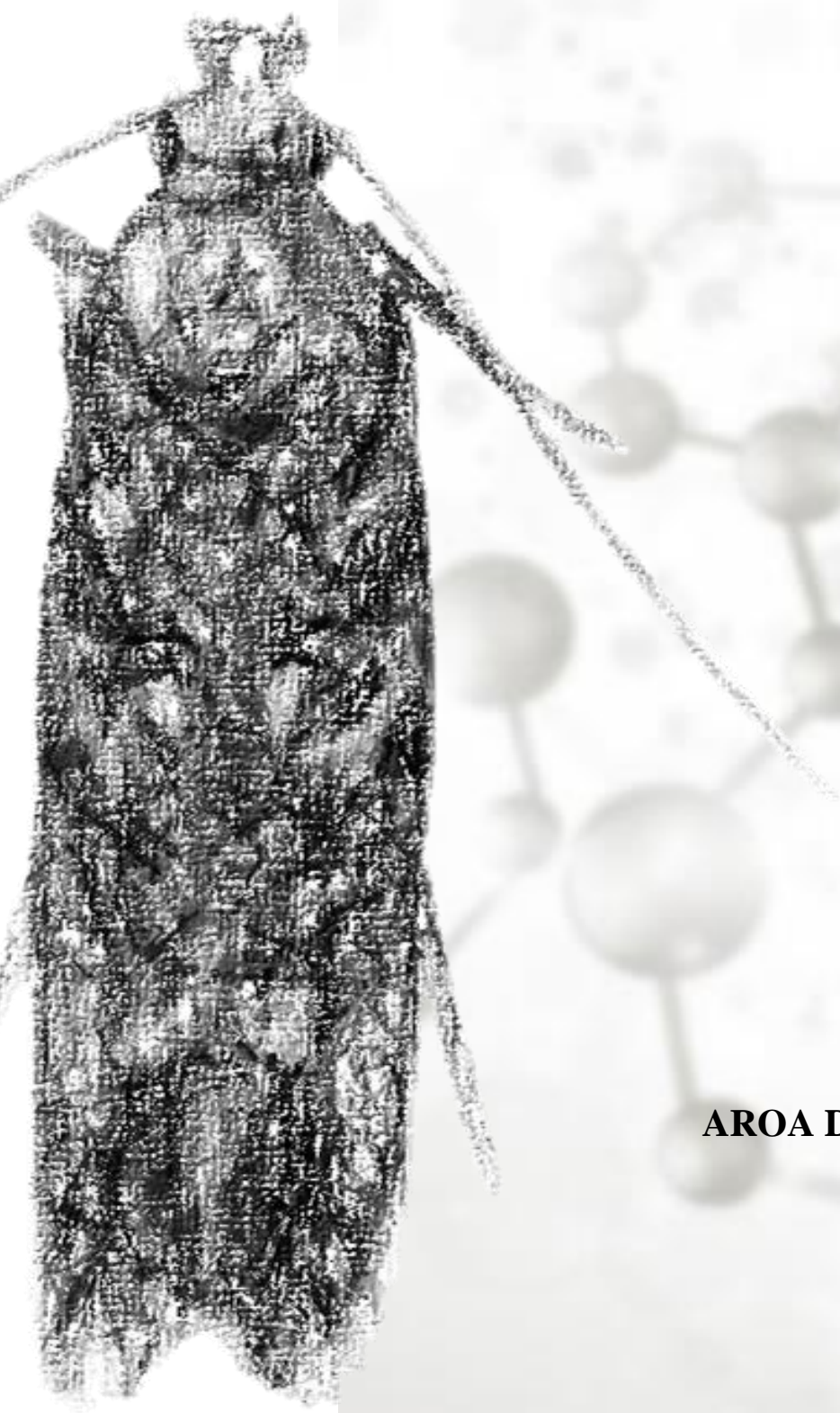
Aroa Domínguez Cuadrado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

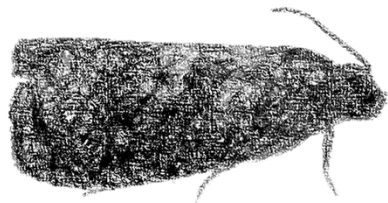
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIOS DIRIGIDOS A LA ECOLOGÍA QUÍMICA DE INSECTOS PLAGA MEDIANTE SEMIOQUÍMICOS



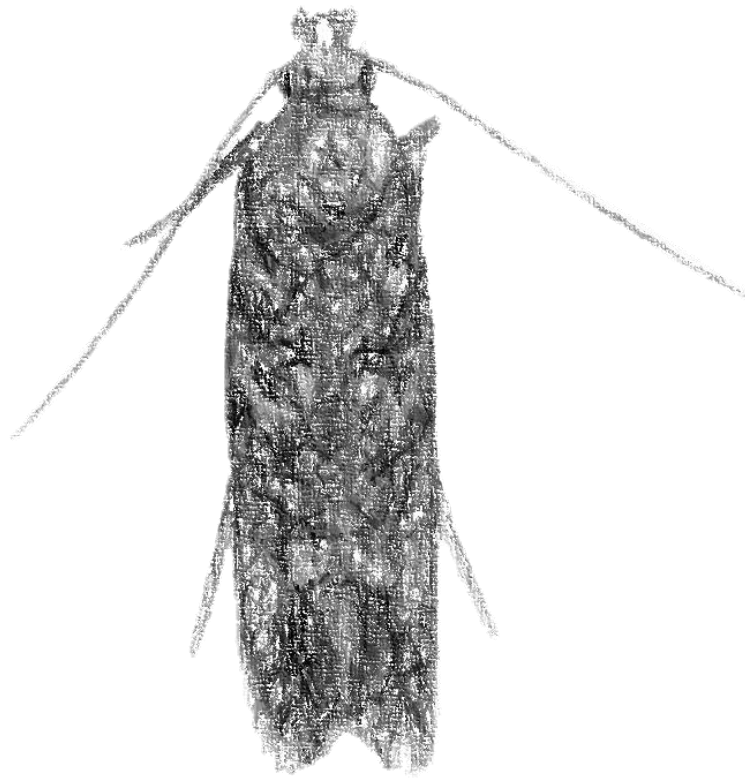
AROA DOMÍNGUEZ CUADRADO

BARCELONA, 2018



ESTUDIOS DIRIGIDOS A LA ECOLOGÍA QUÍMICA DE INSECTOS PLAGA MEDIANTE SEMIOQUÍMICOS

Aroa Domínguez Cuadrado



Tesis doctoral

Barcelona, 2018

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EVOLUTIVA, ECOLOGÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES

FACULTAD DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de doctorado de Biodiversidad

Trienio 2014-2017

ESTUDIOS DIRIGIDOS A LA ECOLOGÍA QUÍMICA DE INSECTOS PLAGA MEDIANTE SEMIOQUÍMICOS

Memoria presentada por **Aroa Domínguez Cuadrado** para optar al título de Doctor por la
Universidad de Barcelona

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

Directores

Dr. Ángel Guerrero Pérez

Dept. de Química Biológica y Modelización Molecular
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (CSIC)

Dra. Carmen Quero López

Dept. de Química Biológica y Modelización Molecular
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (CSIC)

Tutora

Dra. Marina Blas Esteban

Dept. de Biología Animal
Facultad de Biología (UB)

Doctoranda

Aroa Domínguez Cuadrado

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Ángel Guerrero y la Dra. Carmen Quero, la oportunidad de formar parte de este equipo y su supervisión a lo largo de estos años. A la Dra. Marina Blas por aceptar ser mi tutora durante este tiempo.

A la Dra. Glòria Rosell, por su paciencia con ensayos in vitro que nunca salían a la primera. A la Dras. Montserrat Carrascal y Vanessa Casas, por su colaboración en la parte de proteómica. A los Drs. Magí Riba, Albert Sans y Antonio Ortiz por la colaboración y comunicación para poder completar este proyecto. Al Dr. Josep Coll por sus consejos durante los seminarios de grupo. Al personal del Servei de Camps Experimentals de la UB, por suministrarme el material necesario para mantener mi humilde colonia.

A mis compañeros del grupo de Ecología Química. A Marc, Elena y Enrico con los que he compartido laboratorio, a M^a Carmen, con la que he pasado tantas horas en el insectario. Gracias por vuestro compañerismo, confianzas y risas tanto dentro como fuera del centro. En definitiva, por hacer que los días fueran más agradables. Merece una mención especial Sergio, para el que no tengo suficientes palabras para agradecerle tanto: por tus consejos, por solucionar cualquier problema que pudiera presentarse, por repetirme mil veces como funcionaba el nuevo equipo de masas sin desesperarte, por hacer que la electroantenografía no tuviera secretos para mí, por ayudarme a cuidar mi pequeño imperio de insectos cuando se me iba de las manos, por los cafés, por aguantar mis “subidas de azúcar” y mis bajadas de ánimos. Por todo lo que me quedo en el tintero, muchísimas gracias.

De manera más personal, quiero dar las gracias a todos los amigos por haber estado siempre ahí: a los que estaban lejos por escribir, por llamar, por venir a verme durante estos años y por intentar cuadrar agendas imposibles cuando iba a casa; en definitiva por no olvidarse de mí con la distancia. A los que estaban cerca por los buenos recuerdos que hacéis que me lleve de Barcelona, sobre todo a Cristina y Nieves, el teneros aquí ha sido como tener un pedacito de nuestra tierra. Por último, pero no menos importante, a mi familia, por creer en mí y tenerme siempre presente, en especial a mis padres y hermanas, por recorrer mil veces los casi mil kilómetros que nos separaban, por estar siempre al otro lado del teléfono, por animarme, apoyarme y por ser mi red de seguridad. Especialmente a vosotros, muchas gracias.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Control de insectos plaga	3
1.1. Uso de semioquímicos	4
1.2. Productos derivados de plantas	6
2. Sistema olfativo en insectos	7
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	11
CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES	15
1. Especies de estudio	17
1.1. <i>Tuta absoluta</i> . Cría en el laboratorio	17
1.2. <i>Grapholita molesta</i> . Cría en el laboratorio	18
1.3. <i>Dociostaurus maroccanus</i> . Mantenimiento en el laboratorio	19
2. Estudios de la respuesta antenal: Electrofisiología	21
2.1. Electroantenograma	21
2.2. Cromatografía de gases acoplada a electroantenografía	23
3. Ensayos de comportamiento	24
3.1. Olfactómetros	24
3.2. Túnel de viento	26
4. Análisis e identificación de compuestos en muestras biológicas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	27
5. Técnicas proteómicas	28
5.1. Recogida de muestras	28
5.2. Extracción de proteínas	29
5.3. Cuantificación de proteínas presentes en los extractos	30
5.4. Identificación de proteínas separadas mediante electroforesis bidimensional	30
5.4.1. Primera dimensión o isoelectroenfoque	31
5.4.2. Segunda dimensión o SDS-PAGE	32
5.4.3. Tinción y análisis de imagen	32
5.5. Identificación de proteínas a partir de péptidos digeridos en solución	33
5.5.1. Digestión FASP	33
5.5.2. Cuantificación y secuenciación de péptidos mediante LC-MS	35
CAPÍTULO 4: PRODUCCIÓN Y PERCEPCIÓN FEROMONAL DE <i>Tuta absoluta</i>	39
1. Introducción	41
1.1. Feromona y comportamiento reproductor	41
1.2. Percepción de sustancias químicas volátiles, producción de feromona y oviposición: influencia del estado fisiológico y de la presencia de la planta hospedadora	42
2. Material y métodos	44
2.1. Compuestos químicos	44
2.2. Insectos	45
2.3. Estudios electrofisiológicos	45
2.3.1. Respuesta de machos y hembras a los compuestos feromonales	45
2.3.2. Respuesta de hembras a volátiles de hojas de tomate	46

2.4. Composición feromonal	46
2.5. Análisis de proteínas glandulares	47
2.5.1. Preparación de la muestra y cuantificación de proteínas	47
2.5.2. Digestión FASP	48
2.5.3. Análisis por LC-MS y búsqueda en bases de datos	48
2.6. Ensayos de oviposición	49
3. Resultados	50
3.1. Respuesta electroantenográfica	50
3.1.1. Respuesta a los compuestos feromonales	50
3.1.1.1. Respuesta en machos de <i>T. absoluta</i>	51
3.1.1.2. Respuesta en hembras de <i>T. absoluta</i>	52
3.1.2. Respuesta de hembras a volátiles de hojas de tomate	53
3.2. Identificación de compuestos feromonales	55
3.3. Composición feromonal	55
3.4. Proteínas glandulares	56
3.4.1. Cuantificación e identificación de proteínas glandulares	56
3.4.2. Proteínas implicadas en la síntesis de compuestos feromonales	57
3.4.3. Proteínas diferenciales	59
3.5. Ensayos de oviposición	61
4. Discusión	62
4.1. El efecto del estado fisiológico sobre la percepción de compuestos volátiles en adultos de <i>T. absoluta</i>	62
4.2. Producción de feromona en hembras de <i>T. absoluta</i>	66
CAPÍTULO 5: ANÁLISIS FUNCIONAL, ACTIVIDAD ELECTROFISIOLÓGICA Y PRUEBAS DE CAMPO DE ANTAGONISTAS FEROMONALES DE <i>T. absoluta</i> Y <i>G. molesta</i>	69
1. Introducción	71
1.1. Especies de estudio	71
1.2. Trifluorometilcetonas y metilcetonas como inhibidores de esterasas	72
2. Material y métodos	73
2.1. Compuestos químicos	73
2.2. Insectos	73
2.2.1. <i>T. absoluta</i>	73
2.2.2. <i>G. molesta</i>	73
2.3. Estudios electrofisiológicos	74
2.3.1. Actividad intrínseca	74
2.3.2. Ensayos de inhibición	74
2.3.2.1. <i>T. absoluta</i>	75
2.3.2.2. <i>G. molesta</i>	75
2.4. Inhibición de esterasas	76
2.5. Pruebas de campo	77
2.5.1. <i>T. absoluta</i>	77
2.5.2. <i>G. molesta</i>	77
3. Resultados	79
3.1. <i>T. absoluta</i>	79

3.1.1. Electroantenografía	79
3.1.1.1. Actividad intrínseca	79
3.1.1.2. Ensayos de inhibición	80
3.1.2. Inhibición de esterasas	82
3.1.3. Pruebas de campo	83
3.2. <i>G. molesta</i>	85
3.2.1. Electroantenografía	85
3.2.1.1. Actividad intrínseca	85
3.2.1.2. Ensayos de inhibición	86
3.2.2. Inhibición de esterasas	87
3.2.3. Pruebas de campo	87
4. Discusión	89
4.1. <i>T. absoluta</i>	89
4.2. <i>G. molesta</i>	90
CAPÍTULO 6: INFLUENCIA DEL TOMILLO Y OTROS ACEITES ESENCIALES SOBRE EL DESARROLLO DE <i>T. absoluta</i> y <i>G. molesta</i>	93
1. Introducción	95
2. Material y métodos	96
2.1. Compuestos químicos	96
2.2. Insectos	97
2.3. Estudios electrofisiológicos	97
2.3.1. Electroantograma	97
2.3.2. Cromatografía de gases acoplada a detección electroantegráfica	98
2.4. Bioensayos	98
2.4.1. Efecto antialimentario sobre larvas	99
2.4.2. Efecto sobre adultos	99
2.4.2.1. Inhibición de la oviposición	99
2.4.2.2. Efecto de los aceites esenciales sobre el comportamiento de machos	
2.4.2.2.1. Ensayos de doble elección sobre machos de <i>T. absoluta</i>	100
2.4.2.2.2. Ensayos de túnel de viento sobre machos de <i>G. molesta</i>	100
2.5. Actividad de distintos compuestos del aceite esencial de tomillo sobre larvas y adultos de <i>T. absoluta</i> y <i>G. molesta</i>	101
3. Resultados	102
3.1. Actividad de distintos aceites esenciales sobre <i>T. absoluta</i>	102
3.1.1. Estudios electroantegráficos	102
3.1.2. Inhibición de la alimentación de larvas	105
3.1.3. Efecto disuasorio de la oviposición	106
3.1.4. Efecto repelente sobre machos	107
3.2. Actividad de los distintos aceites esenciales sobre <i>G. molesta</i>	108
3.2.1. Estudios electroantegráficos	108
3.2.2. Inhibición de la alimentación en larvas	111
3.2.3. Efecto disuasorio de la oviposición	112
3.2.4. Interrupción de la comunicación química entre sexos	113
4. Discusión	115

4.1. Actividad de diferentes aceites esenciales sobre <i>T. absoluta</i>	115
4.2. Actividad de diferentes aceites esenciales sobre <i>G. molesta</i>	117
4.3. El caso particular del tomillo	118
CAPÍTULO 7: PROTEÍNAS ANTENALES DE DOS MICROLEPIDÓPTEROS PLAGA	121
1. Introducción	123
1.1. Olfacción en lepidópteros	123
1.1.1. OBPs y CSPs	123
1.1.2. ORs	124
1.1.3. ODEs	125
1.2. Proteómica: una herramienta más en el control de plagas	126
2. Material y métodos	127
2.1. Insectos	127
2.2. Análisis general de las proteínas antenales	127
2.2.1. Separación de proteínas en gel	127
2.2.1.1. Preparación de extractos y cuantificación de proteínas	127
2.2.1.2. Electroforesis bidimensional	127
2.2.1.3. Tinción de geles	128
2.2.2. Separación de proteínas en solución	128
2.2.2.1. Preparación de extractos y cuantificación de proteínas	128
2.2.2.2. Digestión FASP	128
2.2.2.3. Análisis por LC-MS/MS	129
2.2.2.4. Búsqueda en bases de datos	129
3. Resultados	131
3.1. Cuantificación de proteínas	131
3.2. Análisis de las proteínas antenales	131
3.2.1. Electroforesis bidimensional	131
3.2.2. Digestión FASP	132
3.2.2.1. Proteínas antenales de <i>G. molesta</i>	132
3.2.2.2. Proteínas antenales de <i>T. absoluta</i>	134
4. Discusión	136
CAPÍTULO 8: COMUNICACIÓN QUÍMICA INTRAESPECÍFICA EN <i>D. maroccanus</i>	141
1. Introducción	143
2. Material y métodos	144
2.1. Compuestos químicos	144
2.2. Insectos	144
2.3. Realización de extractos	144
2.4. Ensayos de electroantenografía	145
2.5. Bioensayos	146
3. Resultados	148
3.1. Extractos	148
3.2. Evaluación de la actividad de distintos esteroisómeros de fital sobre machos y hembras de <i>D. maroccanus</i>	149

3.2.1. Respuesta en EAG	149
3.2.2. Bioensayos	150
4. Discusión	152
CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXOS	189

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AL	Lóbulo antenal (Antennal Lobe)
APS	Persulfato de amonio (Ammonium persulfate)
BHT	Di-tert.butil-4-metilfenol
BSA	Albúmina de suero bovino
CHAPS	Sulfonato de 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano
Da	Dalton
2DE	Electroforesis bidimensional (Two Dimensional Electrophoresis)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DTT	Ditiotreitol
EAG	Electroantenograma
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ESI	Ionización por electrospray (Electrospray Ionization)
FASP	Preparación de la muestra mediada por filtros (Filter Aided Sample Preparation)
FDR	False Discovery Rate
FID	Detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector)
GC	Cromatografía de gases (Gas Chromatography)
GC-EAD	Cromatografía de gases acoplada a detección electroantenográfica (Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry)
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry)
GOBP	Proteína de unión a moléculas de olor generales (General Odorant Binding Protein)
HR	Humedad relativa
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry)
IAA	Iodoacetamida
i.d.	Diámetro interior
IPG	Gradiente de pH inmovilizado (Immobilized pH Gradient)
IPM	Control Integrado de Plagas (Integrated Pest Management)

IR	Receptor ionotrópico (Ionotropic receptor)
MGC	Complejo macroglomerular
mM	Milimolar
MK	Metilcetona
Mr	Masa molecular relativa
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem (Tandem Mass Spectrometry)
mV	Milivoltio
m/z	relación masa/carga
OBP	Proteína de unión a moléculas odoríferas (Odorant Binding Protein)
ODE	Enzima degradadora de olor (Odorant Degrading Enzyme)
OR	Receptor odorífero
PBAN	Neuropéptido activador de la biosíntesis de feromona (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide)
PBP	Proteína de unión a feromona (Pheromone Binding Protein)
pI	Punto isoeléctrico
PSM	Coincidencia del espectro peptídico (Peptide Spectrum Matches)
rcf	Fuerza centrífuga relativa o g-fuerza
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis)
TEAB	Bicarbonato de trietilamonio
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TFMK	Trifluorometilcetona
V	voltio
v/v	volumen/volumen
W	Vatio
w/v	Peso/volumen (Weight/Volume)

Compuestos utilizados:

12:Ac	Acetato de dodecilo
Carvacrol	5-isopropil-2-metilfenol
E3,Z8-14: MK	(E3,Z8)-tetradeca-3,8-dienilmetilcetona
E3,Z8-14: TFMK	(E3,Z8)-tetradeca-3,8-dieniltrifluorometilcetona
E3,Z8,Z11-14: MK	(E3,Z8,Z11)-tetradeca-3,8,11-trienilmetilcetona
E3,Z8,Z11-14: TFMK	(E3,Z8,Z11)-tetradeca-3,8,11-trieniltrifluorometilcetona
E3,Z11-14: MK	(E3,Z11)-tetradeca-3,11-dienilmetilcetona
E3,Z11-14: TFMK	(E3,11Z)-tetradeca-3,11-dieniltrifluorometilcetona
E8-12:AC	Acetato de (E)-8-dodecenilo
E8-12:MK	(E)-8-dodecenilmetilcetona
E8-12:TFMK	(E)-8-dodeceniltrifluorometilcetona
Fital	3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-enal
<i>p</i> -cimeno	1-metil-4-isopropilbenceno
TDTA	Acetato de (3E,8Z,11Z)-tetradeca-3,8,11-trienilo
TDDA	Acetato de (3E,8Z)-tetradeca-3,8-dienilo
Timol	2-isopropil-5-metilfenol
Z8-12:Ac	Acetato de (Z)-8-dodecenilo
Z8-12:MK	(Z)-8-dodecenilometilcetona
Z8-12:OH	(Z)-8-dodecenol
Z8-12:TFMK	(Z)-8-dodeceniltrifluorometilcetona
Z8,Z11-14: MK	(Z8,Z11)-tetradeca-8,11-trienilmetilcetona
Z8,Z11-14: TFMK	(Z8,Z11)-tetradeca-8,11-trieniltrifluorometilcetona

