



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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.

***ANÁLISIS FUNCIONAL, ACTIVIDAD  
ELECTROFISIOLÓGICA Y PRUEBAS DE  
CAMPO DE ANTAGONISTAS FEROMONALES  
DE *Tuta absoluta* y *Grapholita molesta****

---

*Capítulo 5*



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ESPECIES DE ESTUDIO

*T. absoluta* (Meyrick) es un insecto polífago que constituye una plaga muy dañina del tomate y otras solanáceas de interés económico, como la berenjena, el pimiento y el tabaco. Actualmente está considerada como una de las mayores amenazas para los cultivos de tomate en Europa, llegando a causar una pérdida del 40-100% de los cultivos, afectando fuertemente así a las exportaciones de muchos países (Desneux et al., 2010). Las larvas son las causantes de las pérdidas, alimentándose de diferentes tejidos de la planta como hojas, tallos, ápices, flores y frutos, haciéndolos no aptos para la venta o consumo (Torres et al., 2001). Por su parte, *G. molesta* es una plaga característica de frutales con hueso (Sciaretta et al., 2006), como el melocotonero, nectarina, ciruelo, albaricoque y cerezo, pudiendo dañar también a frutales de pepita como el peral y el manzano (Pollini & Bariselli, 1993), y por tanto también de un gran interés comercial. Es originaria del noroeste de China, pero se ha extendido mundialmente y en la actualidad está presente en las mayores áreas de producción de Europa, Asia, América, África, Australia y Nueva Zelanda (Chapman & Lienk, 1971), y de nuevo son las larvas las responsables del daño, atacando brotes y frutos.

El control de *T. absoluta* se basa principalmente en el uso de tratamientos químicos, pero su eficacia es limitada debido al desarrollo del insecto en el interior de los tejidos del hospedador o en el suelo, quedando fuera del alcance de los pesticidas (Lietti et al., 2005). El número de insecticidas efectivos es limitado y los agricultores usan combinaciones de éstos para mantener la infestación por debajo del umbral económico (Lietti et al., 2005; Siqueira et al., 2001). Además del alto coste, estos tratamientos conllevan una serie de desventajas, como la eliminación de enemigos naturales, acumulación de restos del insecticida en frutos y el desarrollo de resistencias (Silva et al., 2011). Debido a esto, se utilizan estrategias de manejo de control integrado para controlar esta plaga, como la utilización de enemigos naturales y organismos entomopatógenos (Desneux et al., 2010), o el uso de su feromona, la cual ha demostrado ser muy atractiva para los machos conespecíficos en túnel de viento y campo (Attygalle et al., 1996). Aunque la disrupción sexual utilizando el componente mayoritario (E3,Z8,Z11-14:Ac o TDTA) es tan efectiva como el control químico durante al menos 4 meses (Vacas et al., 2011), la síntesis de este compuesto es muy cara y hace que su uso sea limitado. Por otro lado, para el control de *G. molesta* se utilizan principalmente combinaciones de insecticidas organofosforados y carbamatos (Atanassov et al., 2003), aunque también presentan las típicas desventajas de los plaguicidas convencionales, como la contaminación ambiental, escasa especificidad y desarrollo de resistencias. Como alternativa al control químico, se puede llevar a cabo control biológico por especies depredadoras y parásitas (Atanassov et al., 2003), aunque su acción resulta insuficiente para controlar las poblaciones (Avilla et al., 2008). Sin embargo, el uso de la confusión sexual controla esta plaga con altos niveles de eficacia, aunque cuando los niveles de infestación son muy altos sigue siendo necesario el uso de ciertos tratamientos insecticidas como refuerzo (Trimble et al., 2001,

Atanassov et al., 2002). Por estas razones, se hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas, más específicas y menos contaminantes para el control de estas especies.

## 1.2. TRIFLUOROMETILCETONAS Y METILCETONAS COMO INHIBIDORES DE ESTERASAS

Las trifluorometilcetonas (TFMKs) son moléculas que poseen la capacidad de inhibir un gran número de enzimas hidrolíticas gracias a su capacidad para formar hidratos estables en soluciones acuosas formando un aducto de geometría tetraédrica con el centro activo de la enzima (Gelb et al., 1985; Rosell et al., 1996; Wiedemann et al., 1998). Se ha comprobado la efectividad de este tipo de compuestos en la inhibición de esterasas y proteasas, como las acetilcolinesterasas y carboxilesterasas presentes en mamíferos (Gelb et al., 1985; Ashour & Hammock, 1987). Las TFMKs han resultado ser también efectivas en la inhibición de esterasas presentes en el sistema olfativo de los insectos, concretamente de las enzimas degradantes de feromonas, encargadas de mantener en el interior de las sensilas una baja concentración de moléculas de feromona, evitando que se acumulen y manteniendo así una alta sensibilidad de la antena, lo que es fundamental para la comunicación química entre sexos (Renou et al., 1997). Las cetonas fluoradas, con una estructura análoga a las feromonas sexuales por sustitución del grupo acetato por un grupo trifluoroacilo, han demostrado una notable capacidad como inhibidores de la comunicación sexual entre sexos de un gran número de especies de lepidópteros, como *Sesamia nonagriodes* (Riba et al., 2001), *Spodoptera littoralis* (Rosell et al., 1996), *Spodoptera frugiperda* (Malo et al., 2013), *Thaumetopoea pityocampa* (Parrilla & Guerrero, 1994), *Mamestra brassicae* (Renou et al., 1997), *Ostrinia nubilalis* (Solé et al., 2008a; Solé et al., 2008b), *Bombyx mori* (Pophof, 1998), *Cydia pomonella* (Giner et al., 2009) y *Zeuzera pyrina* (Muñoz et al., 2011). De la misma manera, las metilcetonas (MKs), con una estructura idéntica a las TFMKs pero sin átomos de flúor, han demostrado ser capaces también de inhibir reversiblemente la respuesta de los machos a feromonas en las especies *Heliothis virescens* (Albans et al., 1984) y *Ostrinia nubilalis* (Solé et al., 2008a).

En este capítulo se pretende establecer la actividad de nuevos antagonistas de la feromona de *T. absoluta* y *G. molesta*, con el fin de determinar su efectividad en el control de estas plagas en el marco de un control integrado de las mismas (IPM).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. COMPUESTOS QUÍMICOS

Los análogos estructurales (MKs y TFMKs) empleados en los trabajos fueron proporcionados por el Dr. Marc Puigmartí Borrell, miembro de nuestro grupo, así como los compuestos feromonales de *T. absoluta* y *G. molesta*.

ESPECIE	COMPUESTO	ESTRUCTURA
<i>T. absoluta</i>	E3,Z8,Z11-14:TFMK E3,Z8,Z11-14:MK	Compuestos análogos al compuesto mayoritario feromonal
	E3,Z8-14:TFMK E3,Z8-14:MK	Compuestos análogos al compuesto minoritario feromonal
	E3,Z11-14:TFMK E3,Z11-14:MK Z8,Z1114:TFMK Z8,Z11-14:MK	Otros análogos al compuesto minoritario feromonal
<i>G. molesta</i>	Z8-12:TFMK Z8-12:MK	Compuesto análogo al acetato feromonal mayoritario
	E8-12:TFMK E8-12:MK	Compuesto análogo al acetato feromonal minoritario

### 2.2. INSECTOS

#### 2.2.1. *T. absoluta*

Insectos recogidos en un invernadero infestado en Mataró (Barcelona, España), y mantenidos de forma continuada en las instalaciones habilitadas del IQAC en las condiciones descritas en el apartado 1.1 del capítulo 3. Tras separar y sexar las pupas, los adultos emergidos fueron separados diariamente y colocados en cajas que contenían algodón impregnado con una solución azucarada “ad libitum” hasta que alcanzaron la edad óptima para cada uno de los experimentos.

#### 2.2.2. *G. molesta*

La colonia de esta especie mantenida en las instalaciones del ETSEA (Lérida) procedía de una población cedida por el Departamento de Protección de Cultivos de la UDL-IRTA. A su vez, los insectos presentes en las instalaciones del IQAC procedían de la colonia que se había establecido previamente en Lérida. Ambas colonias fueron criadas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a  $25 \pm 2$  °C de temperatura, y humedad relativa del 40-60 %. El proceso de cría fue el mismo en ambos lugares, aunque con pequeñas variaciones. El procedimiento aparece detallado en el apartado 1.2 del capítulo 3. Las pupas fueron sexadas y se separaron los machos en cristalizadores hasta que emergieron los adultos. Machos vírgenes de entre 1 y 2 días de edad fueron usados en los experimentos. Para los ensayos de inhibición

de esterases, las antenas de machos cortadas también fueron almacenadas a -80° hasta su uso.

### **2.3. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS**

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos, el primero de ellos para determinar la actividad intrínseca de los compuestos análogos a la feromona, y el segundo tipo para evaluar el efecto inhibitorio de los mismos sobre la respuesta antenal.

El electroantenograma utilizado se adquirió comercialmente de Syntech (Alemania) y aparece descrito en el capítulo 3 (apartado 2.1). Sobre preparaciones de antenas preparadas tal como se describe en el capítulo 3, se hizo pasar un flujo de aire continuo humidificado (200 ml/min) por un tubo de cristal (7 cm de largo x 0,5 mm de diámetro). Se estimuló la antena con insufladas de aire (240 ml/min) durante 100 ms a través de una pipeta Pasteur que contenía un fragmento de papel de filtro (2 x 1 cm) sobre el que se habían depositado distintas cantidades de antagonistas diluídas en hexano. Antes de la utilización de las pipetas, se permitió que se evaporara el disolvente.

#### **2.3.1. ACTIVIDAD INTRÍNSECA**

Para los ensayos de actividad intrínseca, se realizaron dos pulsos de aire (puffs) de 1, 10 y 100 µg de cada compuesto que se hicieron incidir sobre la antena de 8-10 insectos a intervalos de 60 s. Entre las distintas dosis se intercalaron dos insufladas de hexano (blanco). La respuesta de la antena para cada una de las dosis de los distintos análogos fue determinada por diferencia del valor medio de las despolarizaciones de las dos insufladas realizadas con cada agente estimulante menos la media obtenida de los blancos realizados inmediatamente antes y después de cada una de las insufladas con el posible inhibidor. Para los estudios estadísticos, los valores de las respuestas a una misma dosis fueron transformados en  $\ln(x+0.1)$  y sometidos a un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para detectar diferencias entre los distintos análogos, seguidos del test de Tukey para hallar diferencias dos a dos ( $P<0.05$ ). Cuando los datos obtenidos no cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas tras su transformación en logaritmo neperiano, se llevó a cabo el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Kolmogorof-Smirnov para las comparaciones dos a dos ( $P<0.05$ ).

#### **2.3.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN**

Se evaluó el efecto de 10 y 100 µg de cada uno de los posibles inhibidores sobre antenas de machos vírgenes. En este caso, el procedimiento empleado para evaluar este efecto en ambas especies fue diferente, debido a la distinta autoría de las pruebas (véase más abajo).

### **2.3.2.1. T. absoluta**

Se hizo pasar un flujo de aire continuo a través de una pipeta Pasteur que contenía un papel de filtro con las distintas cantidades de inhibidor sobre cada una de las antenas durante 5 min. Se registró la respuesta de la antena en EAG a 1 µg del compuesto feromonal mayoritario antes, durante, y a los 6, 15 y 24 min después de la exposición al flujo. Se estudió la respuesta en 8-10 antenas para cada análogo feromonal, y se determinó el valor de la respuesta igual que en el apartado anterior. El porcentaje de inhibición fue calculado en base a la amplitud de la despolarización inducida por 1 µg de TDTA mientras una corriente continua de inhibidor pasaba sobre la antena y a diferentes tiempos después de que el tratamiento hubiera finalizado, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(R_{\text{control}} - R_{\text{tratamiento}}) / R_{\text{control}}] \times 100$$

Donde  $R_{\text{control}}$  es el valor medio de la respuesta a la feromona antes del tratamiento, y  $R_{\text{tratamiento}}$  el valor medio obtenido a los distintos tiempos durante y después del tratamiento. Para saber si existían diferencias significativas de las respuestas a los distintos tiempos se utilizó el test de Friedman para datos apareados. No obstante, y puesto que este test no especifica entre qué pares hay diferencias, posteriormente se llevó a cabo el test de Wilcoxon ( $P < 0.05$ ).

### **2.3.2.2. G. molesta**

Los ensayos sobre esta especie fueron desarrollados por Luis González Nieto en su Trabajo de Fin de Máster, dirigido por los Drs. Albert Sans Badia y Magí Riba Viladot en las instalaciones del ETSEA (Lérida).

En este caso se utilizó un total de 96 machos para estudiar la respuesta antenal de cada compuesto, 48 por cada dosis (10 y 100 µg), de los cuales la mitad fueron controles. Los insectos permanecieron en grupos de 10 durante 2 h en placas de Petri en cuyo interior se había colocado un papel de filtro (2 x 2 cm) sobre el que se había aplicado el correspondiente compuesto a cada una de las dosis a ensayar o hexano (control, 100 µl previamente evaporado). Tras este periodo se cortó una de las antenas de cada macho, se le eliminó un par de antenómeros de la zona distal y se colocó entre dos electrodos para evaluar la respuesta en el EAG. Cada antena fue sometida a tres repeticiones de una secuencia de 2 "puffs" de hexano seguidos de otros 5 "puffs" de 0,1 µg de feromona, separados por intervalos de 30 s. La mezcla feromonal empleada consistió en una mezcla de acetato de (Z)-8-dodecenilo (Z8-12:Ac), acetato de (E)-8-dodecenilo (E8-12:Ac), y (Z)-8-dodecen-1-ol (Z8-12:OH) en proporción 100:6:10, respectivamente (Baker et al., 1981).

Para calcular las diferencias de respuesta electroantenográfica, a la media de las despolarizaciones provocadas por la feromona se restó la obtenida con los controles. Se



compararon las respuestas de los insectos tratados con los potenciales inhibidores con los insectos no tratados, seguido de un análisis de la varianza (ANOVA) y del test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

#### 2.4. INHIBICIÓN DE ESTERASAS ANTENALES

Los extractos de esterasas antenales fueron obtenidos a partir de homogenizados de lotes de 50-70 antenas suspendidas en 2,5-3,5 ml de tampón fosfato sódico (100 mM, pH 7). Las antenas se sonicaron en una sonda de ultrasonidos SFX 150 digital (Branson, España) 3 veces a potencia media durante 10 s, y se centrifugaron a 12000 rcf durante 10 min a 8°C en una centrífuga 5810 R (Eppendorf, Alemania).

Previamente, para ambas especies se realizaron una serie de pruebas preliminares para poner de manifiesto la actividad esterásica de las enzimas presentes en las antenas de machos y establecer las condiciones más adecuadas para los posteriores ensayos con inhibidores. Para cada uno de los compuestos análogos a los acetatos feromonales, se colocaron 100  $\mu$ l de un homogenizado equivalente a 2 antenas en el caso de *T. absoluta* y 3 antenas en el de *G. molesta* en tubos de borosilicato, y se añadieron 2  $\mu$ l de distintas disoluciones del correspondiente inhibidor (50-300 ng/ $\mu$ l en etanol). Las mezclas se agitaron en un vortex Genius 3 (IKA, Alemania) y se pre-incubaron en un baño termostático Multitemp III (GE Healthcare, Reino Unido) durante 15 min a 25°C en el caso de *T. absoluta* y a 28°C con *G. molesta*. Posteriormente, se añadieron 2  $\mu$ l de una solución de 50 ng/ $\mu$ l del correspondiente componente mayoritario de la feromona de ambos insectos en etanol, y se incubó durante 45 min más en el caso de *T. absoluta*, y 30 min más en el caso de *G. molesta*. Finalmente, se interrumpió el proceso de hidrólisis de las esterasas añadiendo 180  $\mu$ l de hexano, se agitó fuertemente la mezcla y se separó la fase orgánica de la solución tamponada cuidadosamente con una pipeta Pasteur. La fase orgánica se dispuso en un vial cónico y se concentró hasta un volumen final de unos 2-3  $\mu$ l justo antes de proceder a su análisis por cromatografía de gases. Se realizaron tres réplicas para cada ensayo, y se llevaron a cabo controles simultáneos en cada prueba en los cuales no se añadió inhibidor. La potencia de inhibición de los compuestos fue calculada como el porcentaje relativo de descenso de hidrólisis de la feromona en presencia del inhibidor respecto al valor medio de hidrólisis obtenido en el ensayo control. Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Trace 2000, equipado con un detector FID y una columna capilar de sílice HP-5 de 25 m x 0.2 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m (Agilent Technologies, España). Las condiciones del programa cromatográfico empleado para *T. absoluta* fueron las siguientes: inyección a 60°C durante 1 min, 3°C/min hasta los 180°C y 5°C/min hasta alcanzar los 280°C que se mantuvieron durante 10 min más. En estas condiciones, el compuesto feromonal mayoritario y su correspondiente alcohol muestran unos tiempos de retención de 25,4 y 21,1 min, respectivamente. Para *G. molesta* el programa de temperatura fue: inyección a 60°C durante un 1 min, 3°C/min hasta los 180°C y 10°C/min hasta los 280°C que se mantuvieron durante 10 min. En estas condiciones, el compuesto

feromonal mayoritario y su correspondiente alcohol muestran unos tiempos de retención de 30,16 y 25,06 min, respectivamente.

## **2.5. PRUEBAS DE CAMPO**

### **2.5.1. *T. absoluta***

Las pruebas de campo para esta especie fueron llevadas a cabo por el Dr. Antonio Ortiz (Universidad de Jaén) en una plantación de tomate de 2 ha en el municipio de Baeza, provincia de Jaén, durante 3 años consecutivos. Los ensayos tuvieron lugar del 7 de septiembre al 1 de octubre de 2013, del 3 de junio al 21 de septiembre de 2014, y del 16 de abril al 17 de junio en 2015.

Esta plantación fue dividida en tres bloques con una separación de al menos 100 m entre ellos. En cada bloque se colocaron tres trampas Delta con láminas pegajosas (Semiotrap, España) a una altura de 0,5 m y separadas unas de otras al menos 30 m. Se distribuyeron de manera aleatoria y una vez a la semana se rotaron y cambiaron las láminas para contar el número de insectos capturados. Cada trampa contenía un septum con una formulación específica, los cuales se cambiaron cada 5 semanas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los análogos feromonales que se probaron en campo fueron E3,Z8,Z11-14:TFMK; E3,Z8,Z11-14:MK; E3,Z8-14:TFMK y E3,Z8-14:MK.

Como control se utilizaron trampas cebadas con 500 µg/vial de una mezcla 90:10 de los componentes feromonales a la que se había añadido la misma cantidad de antioxidante (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol, BHT) disuelto en hexano para evitar su degradación en campo. Las trampas con inhibidor contenían mezclas de 500 µg de la mezcla feromonal junto a 500 µg y 5 mg del correspondiente compuesto inhibidor. Estas mezclas fueron introducidas en viales de polietileno de baja densidad (LDPE) de 2 ml (32 mm o.d. x 6 mm largo, 1 mm de espesor, Semiotrap, España). En todos los casos el disolvente fue evaporado justo antes de cada ensayo.

Para el estudio estadístico, se realizó el test no paramétrico de rangos de Kruskal-Wallis para hallar diferencias en el número de capturas, seguido de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para las comparaciones dos a dos ( $P < 0.05$ ).

### **2.5.2. *G. molesta***

Los ensayos de campo fueron realizados por el grupo de investigación de los Drs. Magí Riba y Albert Sans (ETSEA, Universidad de Lérida) en una parcela comercial de Alcarràs (Lérida) donde se cultivaba melocotón y nectarina. Los ensayos tuvieron lugar a finales de septiembre de 2013, del 8 de abril hasta el 9 de mayo del 2014, y del 18 de marzo al 17 de abril de 2015.

En este caso, la parcela se dividió en 4 bloques, cada uno de los cuales se correspondía con una hilera de árboles en la que se colocaron aleatoriamente 5 trampas con 5 tratamientos distintos. Cada trampa contenía un difusor tipo séptum donde se depositaba el tratamiento correspondiente. La distancia entre las trampas del mismo bloque era de unos 20 m, con una

separación lateral de 3 m entre las distintas filas de árboles. El conteo de los machos capturados se realizó 2 veces por semana, momento en el que se rotaban las trampas.

Cada uno de los 5 tratamientos fue replicado 4 veces (una por bloque). Como control, se utilizaron trampas cebadas con 100 µg de la mezcla feromonal preparada como se especificó en el apartado de electroantenografía. Los otros 4 tratamientos consistían en mezclas binarias de feromona junto con cada uno de los potenciales inhibidores en proporción 1:10 (100 µg de feromona + 1000 µg de Z8-12:TFMK; 100 µg de feromona + 1000 µg de Z8-12:MK; 100 µg de feromona + 1000 µg de E8-12:TFMK y 100 µg de feromona + 1000 µg de E8-12:MK).

El estudio estadístico varió según los años del estudio. Para los datos del año 2014, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias dos a dos con el test LSD ( $P < 0,05$ ). Para hallar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el control se transformaron los datos en  $\log(x+1)$ , mientras que en la campaña de 2015 fue necesario transformarlos en  $\sqrt{x+1}$  para aplicar una ANOVA seguida posteriormente del test de rango múltiple de Duncan ( $P < 0.05$ ).

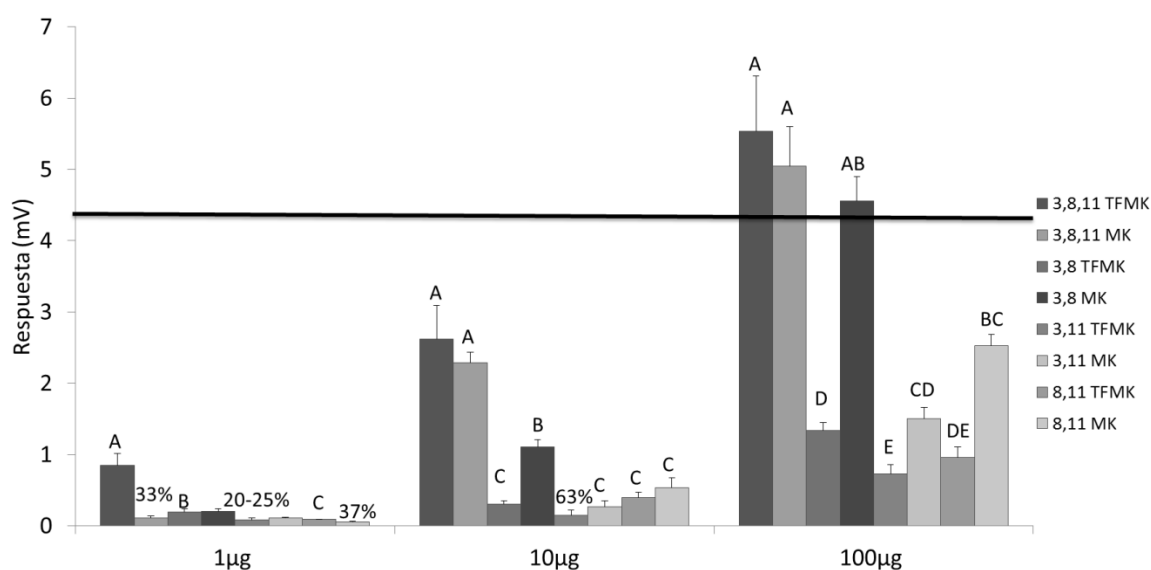
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. *T. absoluta*

##### 3.1.1. ELECTROANTENOGRAFÍA

##### 3.1.1.1. ACTIVIDAD INTRÍNSECA

Todos los análogos mostraron actividad electrofisiológica sobre las antenas de machos con un efecto dosis dependiente (Figura 5.1). A la dosis de 1  $\mu\text{g}$ , sólo el compuesto E3,Z8,Z11-14:TFMK mostró cierta actividad ( $0,9 \pm 0,2$  mV), aunque notablemente menor que la generada por la misma dosis del componente mayoritario de la feromona ( $4,4 \pm 0,2$  mV) (ANOVA,  $df=21$ ,  $F=30,971$ ,  $P=0,001$ ). A la dosis de 10  $\mu\text{g}$ , la actividad de los análogos del trieno alcanzó valores de 2,6 (TFMK) y 2,3 mV (MK), significativamente mayores que la de los correspondientes dienos ( $0,3 \pm 0,04$  mV para E3,Z8-14:TFMK,  $1,1 \pm 0,1$  mV para E3,Z8-14:MK) (Kolmogorof-Smirnov,  $P<0.05$ ). A la dosis de 100  $\mu\text{g}$  no se aprecia aún saturación de los receptores, y las respuestas aumentan hasta  $5,5 \pm 0,8$  mV para el E3,Z8,Z11-14:TFMK. Los compuestos más activos son los análogos triénicos, seguido del dieno E3,Z8-14:MK. El resto de compuestos diénicos apenas muestran actividad a las dosis de 1 y 10  $\mu\text{g}$ , y sólo a la dosis de 100  $\mu\text{g}$  muestran valores comprendidos entre  $0,7 \pm 0,1$  y  $2,5 \pm 0,2$  mV (Anexo, Tabla 4).

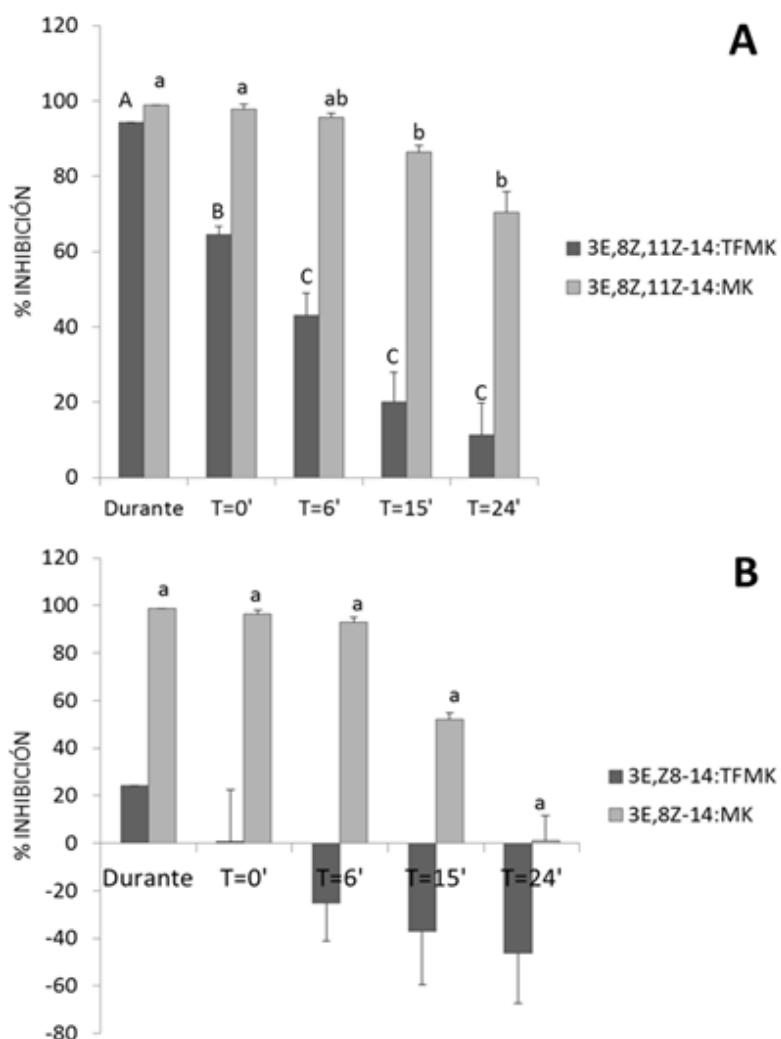


**Figura 5.1.** Actividad intrínseca en EAG de los diferentes inhibidores (N=8-10) en comparación con la feromona. La respuesta media a 1  $\mu\text{g}$  del componente feromonal mayoritario aparece representado como una línea horizontal ( $4,37 \pm 1,75$  mV). Las respuestas a 1 y 100  $\mu\text{g}$  de los diferentes análogos fueron sometidas a un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido del test de Tukey para las comparaciones por pares ( $P<0.05$ ). Para la dosis de 10  $\mu\text{g}$ , se llevó a cabo el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba Kolmogorof-Smirnov para las comparaciones dos a dos ( $P<0.05$ ). Los números entre paréntesis sobre las barras indican el porcentaje de antenas que respondieron para cada tratamiento; en el caso de estar ausentes, este porcentaje fue del 100%. Para una misma dosis, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.

### **3.1.1.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN**

A la dosis de 10 µg solo el compuesto E3,Z8,Z11-14:MK fue capaz de disminuir moderadamente la respuesta en EAG a la feromona durante la exposición de la antena al inhibidor (46% de inhibición), reduciéndose hasta el 23% inmediatamente después de retirar el tratamiento, y recuperándose la actividad normal de la antena pocos minutos más tarde (t=6') (Anexo, Figura 1). La disminución de la respuesta, sin embargo, no fue significativa.

A la dosis de 100 µg, sólo los análogos triénicos y el compuesto diénico E3,Z8-14:MK consiguieron reducir la respuesta de la antena al componente feromonal en un 93-98% durante el tratamiento (0,03 ± 0,01 mV para E3,Z8,Z11-14:MK, 0,15 ± 0,1 mV para E3,Z8,Z11-14:TFMK y 0,04 ± 0,02 para E3,Z8-14:MK)(Figuras 5.2, A y B). El mayor efecto inhibitor fue causado por la metilcetona análoga al trieno feromonal, seguida de la metilcetona análoga al dieno, y finalmente por la TFMK triénica. La inhibición fue totalmente reversible en el caso de la E3,Z8-14:MK (3,1 ± 0,8 mV al cabo de 24 min después del tratamiento frente a los 3,1 ± 0,4 mV antes del tratamiento) y parcialmente reversible para la E3,Z8,Z11-14:TFMK (2,4 ± 0,3 mV después del tratamiento frente a los 2,7 ± 0,4 antes de él). La 3E,Z8,Z11-14:MK provocó una fuerte inhibición de la respuesta antenal (70,5% de inhibición 24 min después del tratamiento) con una recuperación muy baja a lo largo del tiempo (2,8 ± 0,7 mV antes y 0,8 ± 0,3 mV después del tratamiento) (Figuras 5.2, A y B). Estos resultados muestran que el efecto inhibitor de las MKs es superior al de las TFMKs, y su acción más duradera.



**Figuras 5.2.** Porcentaje de inhibición (media  $\pm$  EE) de la respuesta en EAG inducida por 1  $\mu$ g del componente mayoritario de la feromona al pasar una corriente de aire cargado con 100  $\mu$ g de los compuestos E3,Z8,Z11-14:TFMK, E3,Z8,Z11-14:MK, E3,Z8-14:TFMK ó E3,Z8-14:MK. Barras correspondientes al mismo tratamiento con las mismas letras indican que no existen diferencias significativas (test de rangos de Wilcoxon,  $P < 0.05$ ).

Los otros compuestos ensayados no provocaron descenso alguno en la respuesta en EAG ni durante el tratamiento ni a ninguno de los tiempos observados tras el mismo, a excepción de los compuestos E3,Z8-14:TFMK y Z8,Z11-14:MK, que produjeron una reducción momentánea de la respuesta del 24,3% y del 88,4% durante la exposición al inhibidor. Para estos compuestos y el resto de dienos análogos sintetizados se observó un aumento en la magnitud de la respuesta a la feromona a lo largo del tiempo después del tratamiento (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Valores promedio de respuesta en EAG a un 1 µg del componente mayoritario de la feromona (media ± EE) expresada en mV antes, durante y a distintos tiempos (T=0', 6', 15' y 24') después de una dosis de 100 µg de los distintos análogos y porcentaje de inhibición correspondiente.

INHIBIDOR	ANTES	DURANTE	T=0'	T=6'	T=15'	T=24'
<b>E3,Z8,Z11-14:TFMK</b>	2,65 ± 0,41	0,15 ± 0,07 94,3%	0,94 ± 0,18 64,5%	1,51 ± 0,22 43,0%	2,12 ± 0,33 20,0%	2,35 ± 0,29 11,3%
<b>E3,Z8,Z11-14:MK</b>	2,81 ± 0,65	0,03 ± 0,01 98,9%	0,06 ± 0,02 97,8%	0,12 ± 0,05 95,7%	0,38 ± 0,14 86,5%	0,83 ± 0,27 70,5%
<b>E3,Z8-14:TFMK</b>	3,41 ± 0,45	2,58 ± 0,50 24,3%	3,39 ± 0,52 0,6%	4,27 ± 0,78 -25,2%	4,67 ± 1,03 -36,9%	4,95 ± 0,89 -46,1%
<b>E3,Z8-14:MK</b>	3,14 ± 0,44	0,04 ± 0,02 98,7%	0,11 ± 0,07 96,5%	0,22 ± 0,07 93,0%	1,50 ± 0,33 52,2%	3,11 ± 0,74 0,9%
<b>E3,Z11-14:TFMK</b>	3,71 ± 0,48	4,67 ± 0,49 -25,9%	5,29 ± 0,64 -42,9%	5,9 ± 0,66 -59,6%	6,11 ± 0,51 -64,8%	6,56 ± 0,36 -76,9%
<b>E3,Z11-14:MK</b>	3,08 ± 0,31	4,31 ± 0,53 -39,9%	5,25 ± 0,78 -70,5%	5,89 ± 0,85 -91,0%	6,60 ± 0,72 -114,1%	6,72 ± 0,49 -117,9%
<b>Z8,Z11-14:TFMK</b>	3,22 ± 0,23	3,53 ± 0,35 -9,5%	4,72 ± 0,52 -46,5%	5,67 ± 0,46 -76,1%	6,44 ± 0,56 -99,7%	6,09 ± 0,02 -88,9%
<b>Z8,Z11-14:MK</b>	3,73 ± 0,43	0,43 ± 0,07 88,4%	1,71 ± 0,27 54,1%	4,23 ± 0,84 -13,5%	5,00 ± 0,88 -34,1%	5,33 ± 0,72 -42,9%

### 3.1.2. INHIBICIÓN DE ESTERASAS

Para optimizar el proceso de inhibición de las esterasas antenales de machos de *T. absoluta*, se probaron diferentes condiciones de temperatura (20, 25, 28 y 32°C) y tiempo de incubación (15, 30, 45 y 60 min). Se determinó que las condiciones idóneas deberían ser 25°C y 45 min de incubación, con los cuales se obtuvo un porcentaje de hidrólisis del 68% (Anexo, Figura 2.A). Sin embargo, se observó que los potenciales antagonistas no eran buenos inhibidores, ya que diferentes concentraciones de todos los compuestos no inhibían en absoluto la actividad esterásica, ni siquiera a la mayor dosis ensayada. Solo uno de los potenciales inhibidores, el E3,Z8,Z11-14: TFMK, mostró una capacidad inhibidora modesta (28% de inhibición a 50 ng/µl,

40% a 100 ng/μl, y 38% ng/μl), que disminuyó al incrementar la concentración (23% a 200 ng/μl y prácticamente cero a 250 ng/μl).

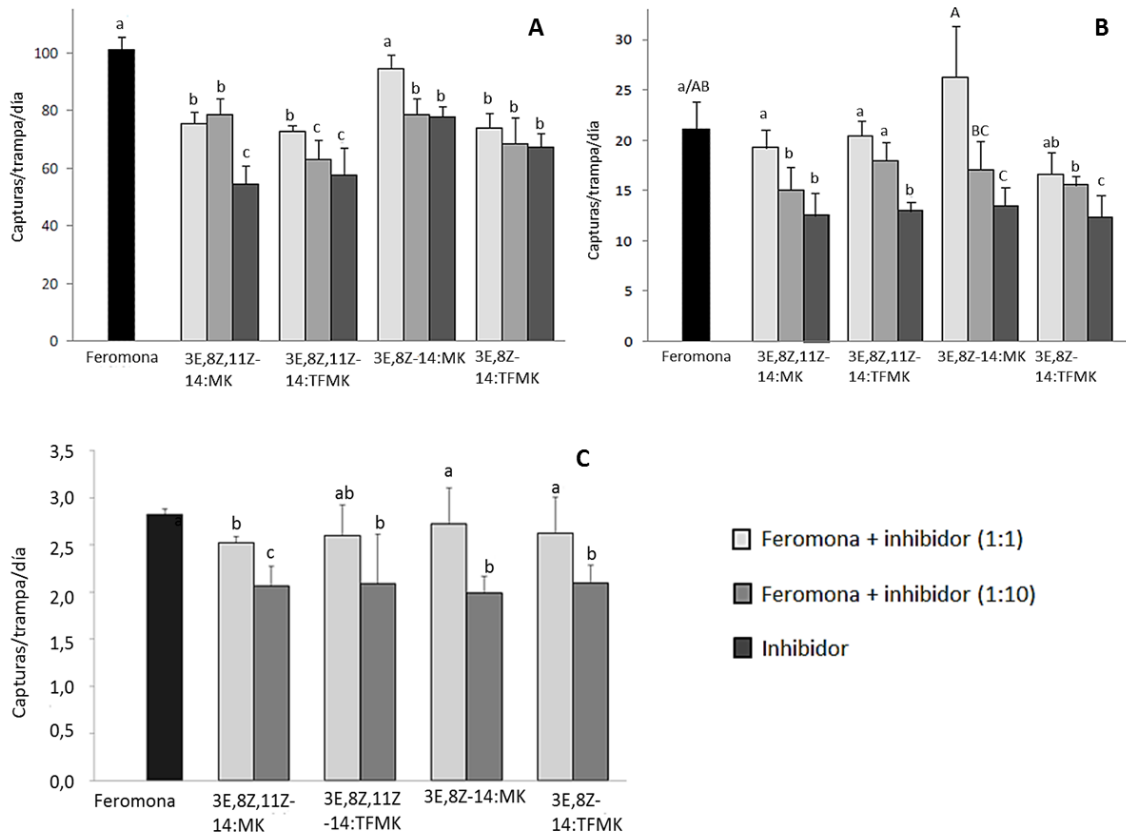
### **3.1.3. PRUEBAS DE CAMPO**

En el año 2013 se dieron unos niveles de infestación muy altos en la parcela donde se llevaron a cabo los ensayos, capturándose una media de  $101,1 \pm 4,5$  machos por trampa de feromona (control) y día. Las trampas que contenían los compuestos E3,Z8,Z11-14:TFMK, E3,Z8,Z11-14:MK y E3,Z8-14:MK mezclados con la feromona en proporción 1:1 ejercieron una atracción significativamente menor que la feromona sola (aproximadamente un 20% menos), mientras que el dieno E3,Z8-14:MK resultó ser inactivo. Todas las mezclas feromona-análogos en proporción 1:10 mostraron un número de capturas significativamente menor que el control, pero no mostraron diferencias significativas con la dosis 1:1, a excepción del compuesto E3,Z8,Z11-14:TFMK. Sorprendentemente, todos los compuestos resultaron ser atractivos por sí mismos para los machos adultos de esta especie, sobre todo los análogos diénicos con porcentajes del 66,4 % (TFMK) y 77% (MK) en relación a la feromona (Figura 5.3.A) (Domínguez et al., 2016).

En 2014, los niveles de infestación fueron mucho más moderados y la media de machos capturados por trampa de feromona y día fue de  $21,1 \pm 2,8$ . Durante esta campaña, ninguno de los compuestos mostró un efecto antagonista significativo cuando se mezclaron con la feromona en proporción 1:1. En las mezclas 1:10 sólo las que contenían los análogos E3,Z8,Z11-14:MK y E3,Z8-14:TFMK mostraron un número de capturas significativamente inferior a las obtenidas con las trampas control. De nuevo, todos los compuestos presentaron actividad intrínseca moderada cuando se probaron de manera aislada (Figura 5.3.B) (Domínguez et al., 2016).

En la campaña del 2015, los niveles de infestación fueron incluso menores que los del año anterior ( $2,82 \pm 0,06$  machos/trampa de feromona/día), y sólo el compuesto E3,Z8,Z11-14:MK indujo una disminución del número de capturas cuando se combinó con la feromona en proporción 1:1. En proporción 1:10 todos los compuestos indujeron una reducción parcial pero significativa del efecto atrayente de la feromona. En esta campaña los antagonistas no se probaron de manera aislada (Figura 5.3.C) (Domínguez et al., 2016).





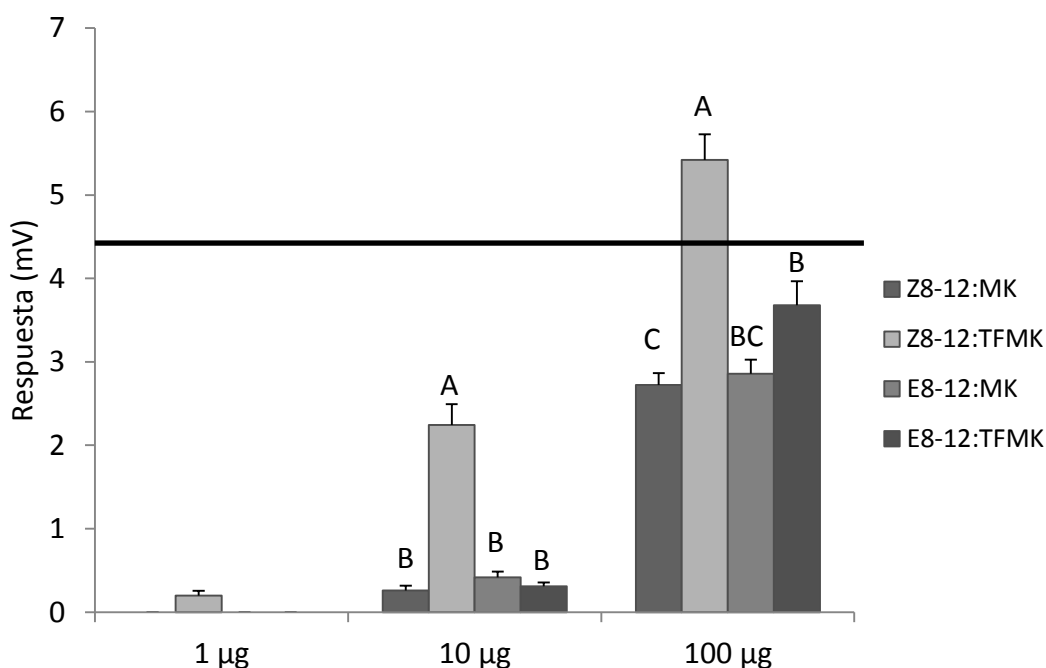
**Figura 5.3.** Número de capturas por trampa y día (media  $\pm$  DE) de machos de *T. absoluta* por la feromona (control), mezclas de feromona-inhibidor en proporción 1:1 y 1:10, e inhibidor solo durante los años 2013 (A), 2014 (B) y 2015 (C). Para cada compuesto, barras con letras diferentes indican diferencias significativas en el número de capturas con respecto al control (test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon,  $P < 0.05$ ). En la campaña del 2014 (B) se obtuvo para la mezcla feromona: E3,Z8-14:MK una captura media superior a la conseguida con la propia feromona sola, y por ello las letras de significación se han escrito en mayúscula. En el año 2015 no se probaron los inhibidores de manera aislada.

### 3.2. *G. molesta*

#### 3.2.1. ELECTROANTENOGRAFÍA

##### 3.2.1.1. ACTIVIDAD INTRÍNSECA

La respuesta intrínseca de los compuestos fue dosis dependiente, observándose una respuesta muy inferior a la generada por 1 µg del acetato mayoritario en la mayoría de los casos. A la menor dosis probada ninguno de los análogos fue capaz de estimular los receptores de la antena, a excepción del compuesto Z8-12:TFMK, al cual respondían la totalidad de las antenas, con una respuesta media a 1 µg de  $0,2 \pm 0,05$  mV. A la dosis de 10 µg, las cetonas E8-12:MK, E8-12:TFMK y Z8-12:MK provocaron una respuesta moderada, comprendida entre 0,2 y 0,4 mV pero significativamente inferior a la desencadenada por el Z8-12:TFMK que alcanzaba los  $2,2 \pm 0,2$  mV ( $F=34,142$ ;  $P<0,0001$ ). A la dosis de 100 µg las respuestas originadas alcanzaron unos valores medios desde 3,7 hasta 4,2 mV. De nuevo, la despolarización provocada por la trifluorometilcetona Z8-12:TFMK fue significativamente mayor a la inducida por el resto de compuestos (Figura 5.4; Anexo, Tabla 4).

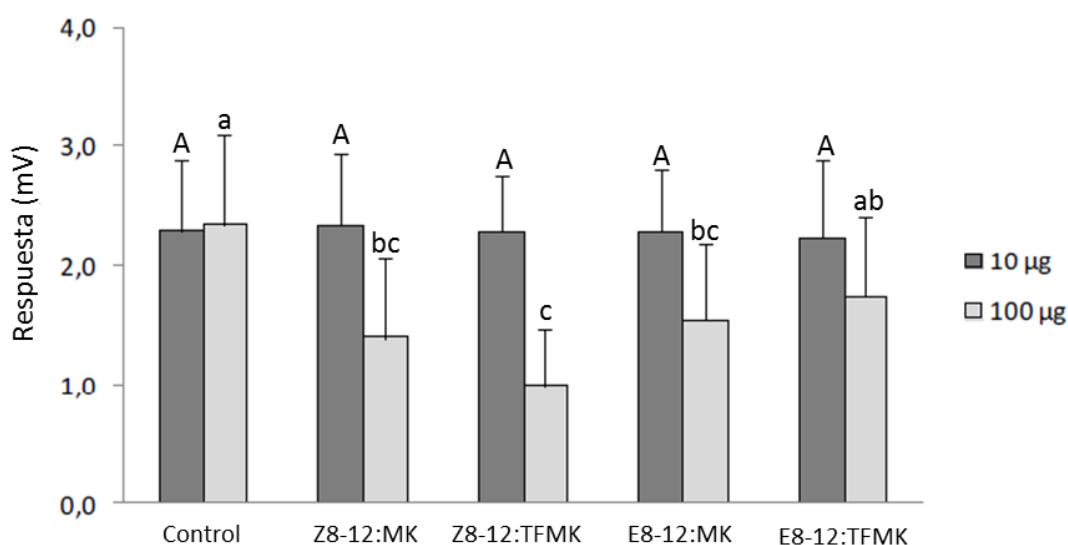


**Figura 5.4.** Actividad intrínseca en EAG (N=8-10) de los diferentes inhibidores en comparación con la feromona. La respuesta media a 1 µg del componente feromonal mayoritario aparece representado como una línea horizontal ( $4,30 \pm 0,14$  mV). Las respuestas a 10 y 100 µg de los diferentes análogos fueron sometidas a un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido del test de Tukey para las comparaciones por pares ( $P<0.05$ ). %. Para una misma dosis, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.

### 3.2.1.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN

Los insectos que habían sido tratados con 10  $\mu\text{g}$  de los inhibidores sometidos a estudio no mostraron diferencias significativas a la feromona respecto a los insectos del grupo control (ANOVA,  $F=0,1611$ ;  $P=0,9576$ ), siendo la respuesta al atrayente natural similar para los cuatro análogos con unos valores promedio de despolarización en torno a 2,3 mV para 100 ng de feromona.

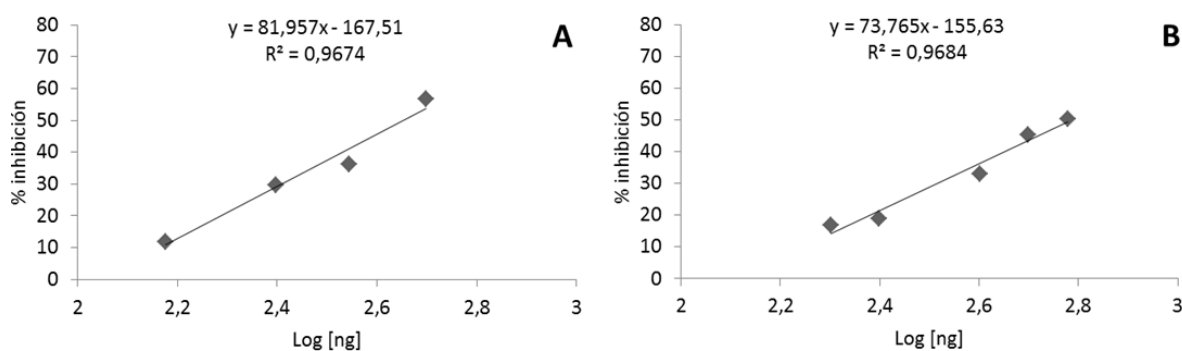
Sin embargo, la respuesta registrada en EAG de las antenas de los insectos que habían permanecido en atmósfera saturada con 100  $\mu\text{g}$  de los diferentes compuestos sí mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los insectos que no habían sido tratados previamente (ANOVA,  $F=9,2408$ ,  $P<0,0001$ ). La Z8-12:TFMK, análoga al componente mayoritario de la feromona, presentó el mayor efecto inhibitor disminuyendo la respuesta antenal hasta 1 mV de respuesta promedio, lo cual supone un 60,8 % de inhibición. Los demás compuestos inhibidores presentaron una respuesta media de 1,7, 1,6 y 1,5 mV para E8-12:MK, E8-12:TFMK y Z8-12:MK, respectivamente, lo cual supone un descenso del 31%, 33,4% y del 38,1% de la respuesta feromonal (Figura 5.5). No se aprecian diferencias significativas entre las respuestas de los diferentes tratamientos entre sí.



**Figura 5.5.** Respuesta electrofisiológica media ( $\pm$  DE) a la feromona sexual después de la exposición de machos de *G. molesta* a vapores de 10 y 100  $\mu\text{g}$  de los distintos análogos. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey,  $P<0,05$ ). Fuente: Adaptado de Marc Puigmartí Borrell (Tesis doctoral).

### 3.2.2. INHIBICIÓN DE ESTERASAS

En el caso de *G. molesta* las condiciones de incubación evaluadas fueron 25º y 28ºC de temperatura y 30, 45 y 60 min de duración. Los parámetros óptimos de trabajo fueron de 28ºC y 30 min de incubación a los que el porcentaje de hidrólisis ascendió al 77,8% (Anexo, Figura 2B). En estas condiciones las MKs E8-12:MK y Z8-12:MK presentaron un efecto inhibitor del 0 y 5%, respectivamente, a la mayor dosis probada (250 ng/µl), y por tanto no resultaron efectivos en la disrupción de la comunicación química de esta especie. Por otro lado, las TFMKs E8-12:TFMK y Z8-12:TFMK resultaron más potentes y así se pudo elaborar una recta log concentración-% inhibición con cuatro puntos en el caso del isómero E8 y de cinco para el Z8 (Figura 5.6). Estas rectas permitieron calcular el IC<sub>50</sub> de cada uno de los inhibidores, siendo de 210 µM en el caso de la Z8-12:TFMK y 158 µM de la E8-12:TFMK (Figura 5.6).



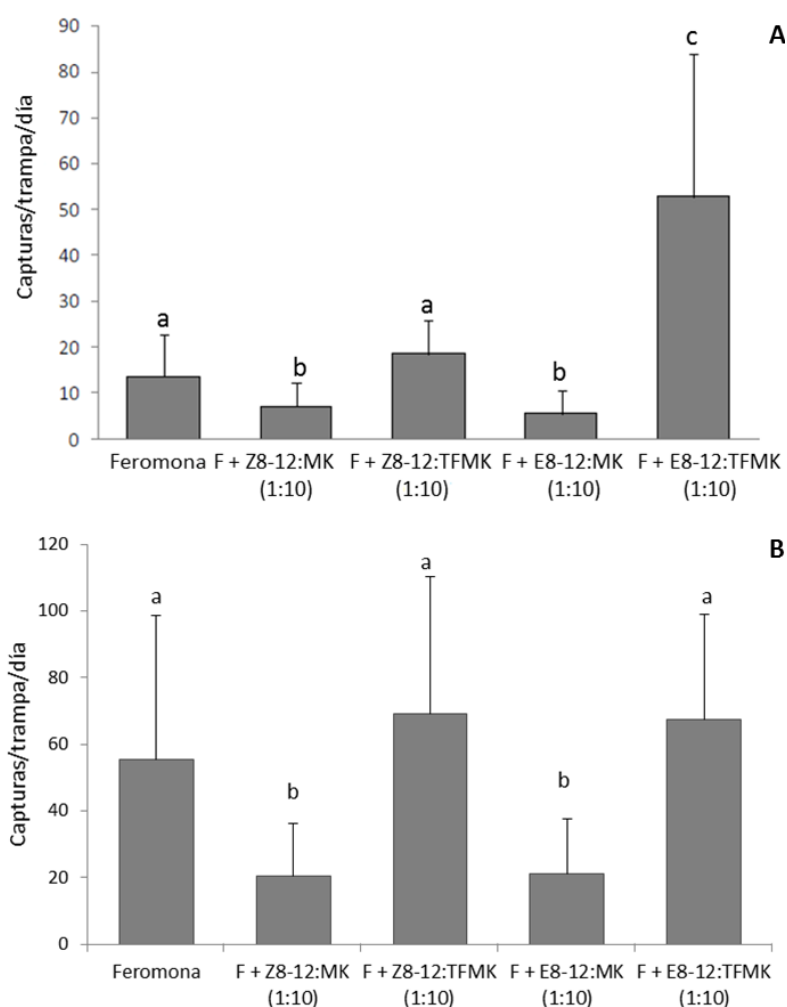
**Figura 5.6.** Inhibición de estererasas antenales de machos de *G. molesta* por los análogos Z8-12:TFMK (A) y E8-12:TFMK (B).

### 3.2.3. PRUEBAS DE CAMPO

Durante la campaña de 2013, los ensayos se realizaron a finales de septiembre, coincidiendo con la quinta generación de adultos. Los niveles de infestación fueron muy bajos y no se capturaron apenas machos en las trampas de feromona (control), por lo que no se pudieron llevar a cabo los experimentos como se había previsto.

En el año 2014, los ensayos se llevaron a cabo a lo largo de 5 semanas entre los meses de abril y mayo coincidiendo con la primera generación. En esta ocasión, se encontraron diferencias significativas en el número de capturas entre el control y los distintos tratamientos feromona-inhibidor cuando la proporción era 1:10 (ANOVA,  $F=24,475$ ,  $P=0,0001$ ), siendo los análogos de tipo MKs más eficaces que las TFMKs (Figura 5.7.A). Así, el número medio de capturas por trampa y día fue significativamente menor en las trampas que contenían los análogos Z8-12:MK (7 machos/trampa) y E8-12:MK (6 machos/trampa) que en las trampas control (14 machos/trampa). Por otro lado los análogos Z8-12:TFMK y E8-12:MK, no mostraron efecto inhibitor alguno. Para el primero de ellos, el número de capturas fue similar al de las trampas con feromona (20 machos/trampa), mientras que el segundo mostró, sorprendentemente, un efecto sinérgico sobre la atracción feromonal con una media de 53 machos/trampa.

En el año 2015, los ensayos se llevaron a cabo durante 5 semanas a lo largo de los meses de marzo y abril. Aquí también se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en comparación con los controles (ANOVA,  $P < 0.05$ ), y de nuevo los análogos del tipo MKs demostraron ser mejores inhibidores en campo que las TFMKs (Figura 5.7.B). El número medio de capturas con mezclas feromona:inhibidor fue de 20,5 machos/trampa/día para la mezcla feromona + Z8-12:MK y 21,3 machos/trampa/día para la combinación feromona + E8-12:MK, valores significativamente menores que el número de insectos capturados en las trampas control (55,5 machos/trampa/día). Por otro lado, ambas TFMKs capturaron un número ligeramente superior de machos que la propia feromona (69 machos/trampa para Z8-12:TFMK y 67,5 machos/trampa para E8-12:TFMK) pero no estadísticamente significativo (Figura 5.7.B).



**Figura 5.7.** Número de machos de *G. molesta* capturados (media  $\pm$  DE) con trampas cebadas con feromona (control) y con mezclas de feromona con los diferentes análogos estructurales Z8-12:TFMK, E8-12:TFMK, Z8-12:MK y E8-12:MK en proporción 1:10 durante 2014 (A) y 2015 (B). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos (test LSD en 2014 y test de Duncan en 2015,  $P < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSIÓN

Los compuestos orgánicos volátiles, concretamente las feromonas, una vez reconocidos por los receptores antenales, son degradados por enzimas degradantes de olores, manteniendo bajos los niveles de estas moléculas en el interior de la antena y permitiendo el reconocimiento de nuevas moléculas odoríferas (Renou et al., 1997; Renou & Guerrero, 2000; Guerrero & Rosell, 2005; Rosell et al., 2008). La inhibición de estas enzimas puede interrumpir la comunicación química entre insectos, por lo que el uso de análogos estructurales de las feromonas puede ser una herramienta potencial para el control de plagas (Renou & Guerrero, 2000; Plettner, 2002; Reddy & Guerrero, 2010), ya que interactúan con el centro activo de estas enzimas antenales (Roelofs & Comeau, 1971; Duran et al., 1993; Rosell et al., 1996). Además, se ha demostrado la baja toxicidad de estas moléculas debido a su mecanismo de acción reversible (Ashour & Hammock, 1987; Renou & Guerrero, 2000). Los análogos estructurales de los compuestos feromonales sintetizados en el laboratorio para *T. absoluta* y *G. molesta* se obtienen por sustitución del grupo acetato de sus componentes feromonales por un grupo acilo en el caso de las MKs, o trifluoroacilo en las TFMKs. Se han sintetizado compuestos de este tipo para una gran variedad de especies, p.e. *S. nonagrioides*, *O. nubilalis*, *S. littoralis*, *C. pomonella*, *Spodoptera frugiperda* y *Zeuzera pyrina*, entre otras, y se ha probado su efectividad como disruptores en la comunicación química de insectos.

##### 4.1. *T. absoluta*

En el caso de *T. absoluta*, todos los inhibidores fueron capaces de estimular la antena, pero sólo 100 µg de los compuestos E3,Z8,Z11-14:MK, E3,Z8,Z11-14:TFMK y E3,Z8-14:MK fueron capaces de generar una despolarización mayor a la provocada por 1 µg del componente principal de la feromona. Estos tres análogos fueron los únicos capaces de inducir una disminución de la respuesta a la feromona en EAG, prácticamente completa y relativamente duradera en el tiempo. La inhibición producida por los compuestos E3,Z8,Z11-14:TFMK y E3,Z8-14:MK fue reversible, mostrando una recuperación en la respuesta del EAG a la feromona del 88,7% y prácticamente completa, respectivamente (Domínguez et al., 2016). La metilcetona análoga al trieno mostró el efecto inhibitor más potente y duradero (70,5% de inhibición después de 24 min del cese del tratamiento). Este efecto reversible también se ha observado en inhibidores empleados en otras especies (Reddy & Guerrero, 2010), como la deciltiotrifluoropropan-2-ona, la cual bloqueaba la respuesta de dos receptores neuronales de la feromona de *A. polyphemus* (Pophof, 1998); la Z11-16:TFMK que inhibía reversiblemente la respuesta en EAG al componente feromonal mayoritario de *M. brassicae* (Renou et al., 2002); la 3-octiltio- 1,1,1-trifluoropropan-2-ona (OTFP) y la Z9-14:TFMK en *S. frugiperda* (Luis et al., 2010; Malo et al., 2013) o la OTFP sobre *S. littoralis* y *M. brassicae* (Renou et al., 1997). En los ensayos con los compuestos E3,Z8-14:TFMK y Z8,Z11-14:MK también se produjo una reducción de la respuesta que se limitaba únicamente al tiempo que duró el tratamiento, recuperándose los valores normales de respuesta inmediatamente después, e incluso aumentando con el tiempo tras el tratamiento. En el resto de análogos (compuestos E3,Z11-14:MK, E3,Z11-14:TFMK, Z8,Z11-14:MK y Z8,Z11-14:TFMK) también pudo observarse este aumento de la respuesta de la antena con el tiempo. Este fenómeno se debe a un aumento en la

sensibilización de los receptores olfativos con el tiempo, a lo cual se hace referencia en el anterior capítulo, coincidiendo con lo que ocurre en los machos de *S. littoralis*, en los cuales también se registró un aumento de la sensibilidad tras una breve exposición al componente mayoritario de su feromona (Quero et al., 2014, López et al., 2017). La baja o nula actividad inhibitoria de estos compuestos durante el tratamiento hace que sea fácil superar este efecto por el aumento de la sensibilidad de las neuronas que conectan con los receptores olfativos; sin embargo, la mayor capacidad de inhibición de las otras tres sustancias químicas probadas impidió que este fenómeno se produjera (Domínguez et al., 2016).

A nivel de esterasas, sólo la E3,Z8,Z11-14:TFMK muestra una modesta actividad inhibitoria (Domínguez et al., 2016). Es interesante la ausencia de actividad del dieno E3,Z8-14:TFMK a pesar de su similitud estructural con el componente feromonal, lo cual podría deberse a la existencia de distintos tipos de esterasas en el interior de la antena de *T. absoluta* que se encargarían del reconocimiento y la aparente degradación de solo uno de los dos componentes de la feromona (Domínguez et al., 2016), aunque esta hipótesis contrasta con la falta de especificidad mostrada por otros compuestos fluorados en otros insectos (Rosell et al., 1996, Quero et al., 2003; Quero et al., 2004). Se necesita llevar a cabo otro tipo de estudios para profundizar en esta cuestión y confirmar o no esta hipótesis.

En pruebas de campo, se ha demostrado la capacidad de la MK triénica para reducir el número de capturas a las dosis feromona:inhibidor 1:1 y 1:10, así como la de la TFMK diénica en la mezcla 1:10. Para los otros dos análogos probados en campo los datos varían en función de los niveles de población, pero podemos afirmar que se necesita una dosis mínima de feromona:inhibidor 1:10 para provocar una disminución sensible de capturas. Este descenso es debido a que estas sustancias son estructuralmente análogas a las feromonas naturales y pueden competir con la feromona sobre los propios receptores feromonales, inhibiendo de esta forma la comunicación entre sexos. En este sentido, se han encontrado disruptores de la comunicación sexual más potentes que las propias feromonas en determinadas condiciones (McDonough, et al., 1996). Como se ha dicho anteriormente, nuestro grupo ha demostrado previamente la efectividad de las TFMKs como antagonistas de feromonas de varias especies de insectos plaga en campo, entre otras *C. pomonella* (McDonough et al., 1996; Giner et al., 2009), *S. nonagrioides* y *O. nubilalis* (Riba et al., 2001; Riba et al., 2005, Solé et al. 2008b).

#### **4.2. *G. molesta***

Los resultados han demostrado que todos los análogos estructurales de esta especie poseen un efecto inhibitorio de la respuesta a la feromona en EAG a la dosis de 100 µg, obteniéndose valores de inhibición del 60,8 % en el caso de la Z8-12:TFMK, 38,1 % para la correspondiente MK, y del 33,4 % y 31 % para los compuestos E8-12:TFMK y E8-12:MK, respectivamente. La mayoría de estos análogos no muestran actividad en EAG o en todo caso muy baja, como los de tipo TFMK sintetizados para las especies *Plutella xylostella*, *S. nonagrioides* y *M. brassicae* (Prestwich et al., 1988; Riba et al., 1994; Renou et al., 2002). Solo el compuesto Z8-12:TFMK fue capaz de estimular todas las antenas a la menor dosis generando una respuesta moderada por sí mismo. Los antagonistas sintetizados para *O. nubilalis* (Solé et al., 2008a), *C. pomonella*

(Giner et al., 2009) y *S. frugiperda* (Malo et al., 2013) también mostraron una respuesta moderada en EAG. Al igual que en *T. absoluta*, en el caso de *G. molesta* los mejores inhibidores resultaron ser aquellos compuestos que mostraron una mayor actividad intrínseca. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios de este tipo realizados sobre *O. nubilalis* (Solé et al., 2008a) en los que las TFMKs provocaban una inhibición de la respuesta electrofisiológica mayor que las correspondientes MKs.

La mayor actividad inhibitoria de las TFMKs también se observa en las pruebas *in vitro* sobre esterasas antennales, en las que las MKs apenas superan el 5% de inhibición, mientras que las TFMKs alcanzan valores considerablemente más altos a las mismas dosis, obteniéndose una  $IC_{50}$  de 210  $\mu$ M en el caso de la Z8-12:TFMK y 158  $\mu$ M de la E8-12:TFMK. Estos inhibidores no resultaron muy potentes si se comparan con algunos de los inhibidores sintetizados para *O. nubilalis*, como los compuestos Z11-14:TFMK y Z10-13:TFMK, cuyas  $IC_{50}$  fueron de 0,28 y 7,5  $\mu$ M respectivamente (Riba et al., 2005), o la Z11-16:TFMK, con una  $IC_{50}$  de 70 nM (Solé et al. 2008a), o la Z9,E11-14:TFMK sobre *S. littoralis* y *S. nonagriodes*, con una  $IC_{50}$  de 64,5 y 54,5  $\mu$ M, respectivamente (Quero et al., 2003).

En pruebas de campo los mejores antagonistas fueron los compuestos de tipo MK, que redujeron significativamente las capturas cuando se mezclaron con la feromona en proporción 10:1, como se obtuvo con los análogos de *C. pomonella* (Sans et al., 2013). Por otro lado, las TFMKs no demostraron tener efecto inhibitorio alguno, ni siquiera cuando se mezclaron con la feromona en proporción 10:1. A reseñar que durante la campaña de 2014 se capturó un mayor número de individuos cuando el compuesto Z8-12:TFMK se combinó con la feromona en proporción 10:1 con respecto a las trampas control. Este sinergismo es un resultado atípico e inesperado y se conocen pocos análogos que provoquen un efecto similar (McDonough et al., 1996; Reddy & Guerrero, 2010), por lo que sería necesario llevar a cabo más ensayos para verificar este efecto. Hay que mencionar que los ensayos de ese año se llevaron a cabo en una parcela comercial en la que se realizaron tratamientos fitosanitarios cuando se alcanzaban ciertos niveles de infestación, por lo que el nivel de capturas con la feromona (control) fueron bastante bajos y por tanto los resultados deben tomarse con precaución.



