



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.

***INFLUENCIA DEL TOMILLO Y OTROS
ACEITES ESENCIALES SOBRE EL
DESARROLLO DE *Tuta absoluta* Y
*Grapholita molesta****

Capítulo 6

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente en otros capítulos, *T. absoluta* y *G. molesta* constituyen dos plagas de gran importancia en nuestro país y en otros muchos, siendo la primera de ellas responsable de grandes daños en cultivos de tomate y otras solanáceas, y la segunda en frutales de hueso y de pepita. Los pesticidas sintéticos empleados en su control tienen las desventajas propias de los pesticidas químicos, como la baja o nula especificidad, desarrollo de resistencias, contaminación ambiental y acumulación en frutos, además del elevado coste económico que ellos representan. A esto hay que sumar que el control biológico de estas especies o el uso de la feromona sexual es limitado y costoso, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas herramientas con las que combatirlos.

El uso de productos naturales derivados de plantas, o insecticidas botánicos, se ha contemplado desde hace tiempo como una alternativa viable y efectiva para el control de especies plaga, debido a las muchas propiedades que presentan (Isman, 2006; Benzi et al., 2009). Los aceites esenciales son sustancias lipofílicas y altamente volátiles, por lo que pueden extraerse por destilación en corriente de vapor (Regnault-Roger et al., 2012), y formadas por mezclas complejas de hasta más de 50 sustancias orgánicas como monoterpenos, sesquiterpenos, fenoles, cetonas, aldehidos y alcoholes entre otros (Batish et al., 2008; Regnault-Roger et al., 2012), de entre los cuales los monoterpenos y sesquiterpenos son los predominantes (Ibrahim, 2001; Isman et al., 2006; Isman et al., 2011). Los aceites esenciales son generados por el metabolismo secundario de las plantas y se localizan en distintos órganos de éstas, como hojas, tallos, flores y sistema vascular (Ibrahim, 2001). Además se encuentran ampliamente distribuidos en varias familias de plantas, como coníferas, mirtáceas, rutáceas, asteráceas, y son especialmente abundantes en la familia de las labiadas y umbelíferas. Estos terpenoides están involucrados en la defensa de las plantas contra herbívoros y hongos patógenos (Langenheim, 1994), y se sabe que pueden interferir en el comportamiento de insectos: algunos muestran toxicidad mientras otros son repelentes, antialimentarios o disruptores del crecimiento, desarrollo y oviposición (Ibrahim 2001). Debido a su alta complejidad química y al efecto sinérgico entre sus componentes (Gonzalez-Coloma et al., 2006) resultan eficaces y tóxicos frente a un amplio espectro de insectos plaga, haciéndolos útiles en ambientes tanto urbanos y domésticos como agrícolas (Isman et al., 2011). Para la protección de cultivos, los aceites esenciales podrían utilizarse en rotaciones o en combinación con otros insecticidas, lo que reduciría costes y cantidades aplicadas, mitigando los efectos negativos de los pesticidas convencionales (Isman et al., 2011).

El objetivo del actual estudio es evaluar la actividad de distintos aceites esenciales sobre adultos y larvas de *T. absoluta* y *G. molesta*, así como la identificación de posibles componentes aislados activos para estas especies susceptibles de ser utilizados en estrategias de control integrado de estas plagas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. COMPUESTOS QUÍMICOS

Sobre individuos de distintas fases del desarrollo de ambas especies se ha evaluado el efecto de distintos aceites esenciales procedentes de 8 plantas distintas: cilantro (*Coriandrum sativum*), eucalipto (*Eucalyptus maculata* var. *citriodora*), jengibre (*Zingiber officinale*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), menta (*Mentha piperita*), perejil (*Petroselinum crispum*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Además, se ha probado el efecto de tres de los componentes principales presentes en el aceite esencial de tomillo: carvacrol, *p*-cimeno y timol (Figura 6.1). A excepción del timol y el *p*-cimeno que fueron adquiridos comercialmente a Alfa Aesar (Alemania), todos los productos químicos utilizados procedían de Sigma-Aldrich (EEUU) con una pureza superior al 97%. Los aceites se diluyeron en aceite de parafina para todos los ensayos realizados con ambas especies, excepto para los análisis que se llevaron a cabo por cromatografía de gases acoplada a electroantenografía (GC-EAD), para los cuales fueron disueltos en hexano. Debido a la insolubilidad del timol en aceite de parafina, en todos los estudios donde se probó la actividad de los compuestos aislados del aceite esencial de tomillo fueron diluidos en hexano.

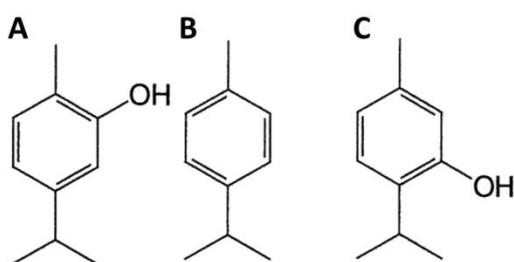


Figura 6.1. Estructura química de los tres principales componentes presentes en el aceite esencial de tomillo: carvacrol (A), *p*-cimeno (B) y timol (C).

Para los ensayos de túnel de viento llevados a cabo con machos de *G. molesta*, se utilizaron los componentes feromonales sintetizados por el Dr. Marc Puigmartí Borrell. La mezcla feromonal empleada en estos ensayos consistía 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 (Figura 6.2) (Baker et al., 1981; Varela et al., 2011).

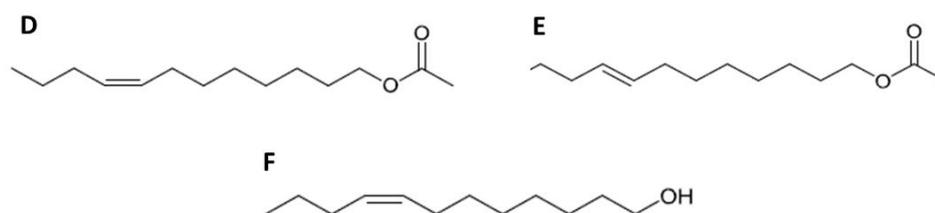


Figura 6.2. Estructura de los componentes de la feromona sexual de *G. molesta*: acetato de (Z)-8-dodecenilo (D), acetato de (E)-8-dodecenilo (E), y (Z)-8-dodecen-1-ol (F).

Para los ensayos de doble elección llevados a cabo con machos de *T. absoluta*, se prepararon varios extractos feromonales a partir de 10 glándulas de hembras de entre 1 y 2 días de edad por extracto, sumergidas durante una hora en 100 µl de hexano a temperatura ambiente. Los componentes de la feromona sexual de esta especie son el acetato de E3,Z8,Z11-tetradecatrienilo (TDTA) y el acetato de E3,Z8-tetradecadienilo (TDDA), cuya estructura aparece en el capítulo 4, apartado 2.1.

2.2. INSECTOS

Los insectos de ambas especies fueron criados y mantenidos en las instalaciones habilitadas para ello en el Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC) como ya se ha descrito en el capítulo 3, apartados 1.1 y 1.2. Una vez que las larvas alcanzaron la fase de pupa, fueron separadas por sexos y almacenadas en distintas cámaras en las condiciones estándares de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa ($60 \pm 10\%$) y fotoperiodo (16:8 luz-oscuridad) hasta que emergieron los adultos, que fueron separados diariamente y colocados en cajas que contenían un algodón impregnado con solución azucarada hasta que alcanzaron la edad óptima para cada uno de los experimentos.

2.3. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los adultos utilizados, tanto hembras como machos, eran vírgenes y tenían una edad comprendida entre 1 y 4 días. La preparación de la muestra y los equipos utilizados aparecen descritos detalladamente en los apartados 2.1 y 2.2 del capítulo 3. Brevemente, para estos ensayos, se utilizó una de las antenas unida a la cabeza del insecto. La cabeza se colocó sobre el electrodo de referencia, y la antena, a la que se le habían cortado un par de antenómeros de la zona distal, sobre el electrodo de medida. Sobre los electrodos se había aplicado previamente una pequeña cantidad de gel conductor Spectra 360 (Parker Laboratories Inc., EEUU).

2.3.1. ELECTROANTENOGRAMA

Se realizó un primer estudio para conocer qué aceites esenciales de todos los seleccionados eran activos y ser utilizados posteriormente en ensayos comportamentales. Se estableció una curva dosis-respuesta para cada uno de ellos sobre 8-10 antenas tanto de hembras como de machos de cada una de las especies. Sobre cada antena se probaron 5 dosis distintas de un mismo aceite esencial comprendidas entre 1 µg y 10 mg. Se hizo pasar un flujo de aire continuo y humidificado de 650 ml/min sobre la antena para evitar su desecación a través del principal brazo de un tubo de vidrio (7 cm de largo x 5 mm de diámetro), mientras que los compuestos sometidos a estudio se aplicaron sobre la antena a través de una tubuladura lateral mediante insufladas de aire (200 ml/min) durante 0,2 s a través de una pipeta Pasteur que contenía un papel de filtro (2 x 1 cm) sobre el que se había depositado la cantidad de aceite esencial que se quería probar. Las insufladas o “puffs” sobre las antenas se realizaron cada 60 s, y seguían siempre la misma secuencia: dos “puffs” con cada una de las dosis en orden ascendente, precedidas y seguidas por otras dos de aceite de parafina (blanco). Para los cálculos, a la media de las dos despolarizaciones provocadas por el aceite esencial se le restó la media de la respuesta obtenida con el blanco.

Para los análisis estadísticos, se utilizó el software IBM SPSS Statistic, versión 23. Las respuestas (mV) de cada uno de los aceites fueron tratados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para hallar diferencias entre cada una de las dosis utilizadas. Cuando estas diferencias fueron significativas las medias fueron comparadas usando el test de Tukey ($P < 0.05$). Anterior al análisis, se comprobó que los datos cumplían los requisitos para llevar a cabo la ANOVA; en caso de ser necesario, los datos fueron transformados en $\ln(x+0,1)$. Cuando los datos no cumplían estos requisitos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la U de Mann-Whitney para hallar diferencias significativas entre dosis ($P < 0.05$).

2.3.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A DETECCIÓN ANTENOGRAFICA

Para estos ensayos, se utilizó un cromatógrafo de gases 7820A (Agilent Technologies, España) acoplado al equipo de EAG. La columna utilizada fue una HP-5 (Agilent Technologies, España, 30 m x 0,25 mm i.d.) y el programa de temperatura empleado fue: inyección a 50°C (1 min), incremento de 3°C/min hasta 150°C, posteriormente de 5°C/min hasta 200°C, seguido de 10°C/min hasta los 300°C, que se mantuvo durante 5 min.

Esta técnica se utilizó para conocer qué componentes de los que forman parte de los aceites estudiados eran activos. Se estudió la actividad sobre antenas de machos y hembras vírgenes de 1-4 días. Se probaron 4 antenas por sexo y especie para cada uno de los aceites esenciales a la dosis de 100 µg, aumentando el número de antenas para aquéllos en los que se observaron despolarizaciones reproducibles.

En caso de ser necesario, se identificaron los compuestos que provocaron despolarizaciones en las antenas mediante GC-MS, inyectando 1 µg del aceite esencial correspondiente en un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 a una concentración de 100 ng/µl con el mismo programa de temperatura reseñado anteriormente.

2.4. BIOENSAYOS

Se evaluó el posible efecto de los distintos aceites esenciales sobre larvas y adultos de ambas especies mediante distintos ensayos, cuya descripción aparece en el capítulo 2, apartado 3.1 y 3.2.

2.4.1. EFECTO ANTIALIMENTARIO SOBRE LARVAS

Se han llevado a cabo bioensayos de atracción hacia la fuente de alimentación con larvas de tercer y cuarto estadio para *T. absoluta* y *G. molesta*, respectivamente. Previamente a su uso, las larvas fueron mantenidas en ayuno durante 6 h. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de Petri de 10 cm de diámetro en las que se delimitó un área central donde se liberaron las larvas, y en un lateral de la placa se situó la fuente de alimento (fragmento de hoja de tomate de unos 4 cm² para *T. absoluta*, o un cubo de dieta de 1 cm³ para *G. molesta*) en ausencia (control) y presencia (tratamiento) de 10 y 100 µg de los distintos aceites esenciales. Se observó el comportamiento de un total de 50 larvas para cada concentración del aceite esencial cada 5 min durante un total de 20. Las larvas eran liberadas en grupos de 5, y se realizaron 10 réplicas por aceite y dosis. Los ensayos fueron rodeados externamente por un cilindro de papel para que los movimientos de las larvas no fueran influidos por estímulos externos (reflejos, movimientos de personas,...).

El porcentaje de inhibición para cada uno de los aceites esenciales fue calculado aplicando la fórmula:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = [1 - (\text{Control} - \text{Tratamiento}) / \text{Control}] \times 100$$

Para el estudio estadístico, se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Chi Cuadrado (P<0.05) para hallar diferencias significativas entre el control y los distintos tratamientos.

2.4.2. EFECTO SOBRE ADULTOS

2.4.2.1. INHIBICIÓN DE LA OVIPOSICIÓN

Se colocaron 3 machos y 2 hembras vírgenes recién emergidos en contenedores de plástico transparente (400 ml) cubiertos con una malla en la parte superior de la que colgaba un papel de filtro Whatman sobre el que se aplicó el aceite esencial a probar. Se evaluó el efecto disuasorio de la oviposición de 2 dosis para cada aceite esencial (100 µg y 1 mg) y se realizaron un total de 15 réplicas por aceite y dosis. En los ensayos con *T. absoluta*, se proporcionó a los insectos una rama de planta de tomate como soporte para la oviposición. Puesto que estas especies depositan los huevos de forma individual sin formar agregados, se contabilizó el número de huevos presentes en las paredes del recipiente y sobre la rama de tomate, en el caso de que estuviera presente, al cabo de 72 h. Para mantener hidratados a los adultos durante este tiempo, se les proporcionó un algodón impregnado con una solución de agua y azúcar al 10% durante el tiempo que se prolongó el ensayo.

Para detectar diferencias significativas en el número de huevos depositados por las hembras en los distintos tratamientos, se realizó el test no paramétrico de U de Mann Whitney-Wilcoxon. Este test también fue utilizado para validar las diferencias entre las distintas dosis de cada uno de los tratamientos.

2.4.2.2. EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE MACHOS

Se ha evaluado el efecto de los aceites esenciales sobre el comportamiento de machos vírgenes de entre 1 y 4 días de edad utilizando distintos ensayos para cada especie. La capacidad para interrumpir la comunicación química entre sexos de *G. molesta* se estudió en túnel de viento, mientras que el efecto que estos aceites esenciales ejercían sobre machos de *T. absoluta* se determinó mediante ensayos de doble elección ante la dificultad para realizarlos en el túnel.

2.4.2.2.1. ENSAYOS DE DOBLE ELECCIÓN SOBRE MACHOS DE *T. absoluta*

Para evaluar el efecto que los aceites esenciales ejercían sobre los machos de esta especie, se utilizaron ejemplares vírgenes que eran liberados en grupos de 10 en ensayos de doble elección y se determinó la atracción a la feromona natural cuando se presentó sola o en combinación con los distintos aceites.

Los insectos se liberaron en una pieza de vidrio con forma de T de 9 cm de alto el brazo vertical y 20 cm de largo el brazo horizontal y 9 cm de diámetro en ambos brazos que unía dos jaulas BugDorm (30 x 30 cm, Megaview Science, Taiwan) situadas en el interior del túnel de viento utilizado en el apartado 2.4.2.2.2 del presente capítulo. En el interior de una de las jaulas, se colgaba un difusor de poliuretano de tipo septum en el que se depositaba una cantidad de extracto feromonal equivalente a dos glándulas de hembras que podía presentarse solo (control) o en combinación con 1 mg de aceite esencial (tratamiento). Los controles y distintos tratamientos fueron evaluados frente a 20 µl de hexano (blanco) aplicados en un septum en el interior de la segunda jaula. Los machos, de entre 1-4 días de edad emergidos en fotoperiodo natural 16:8 (luz-oscuridad), fueron aislados en grupos de 10 durante 8 h antes de su uso, periodo en el que se les proporcionó una solución azucarada para que estuvieran hidratados. Los ensayos comenzaron 2 h antes del inicio de la escotofase y se retiraron una vez transcurrida la primera hora de la fotofase siguiente. Pasado este tiempo, se contabilizó el número de machos que habían sido atraídos por los distintos tratamientos y aquéllos que no habían realizado ninguna elección. Se llevaron a cabo 5 réplicas, variando la posición de los tratamientos para evitar una posible direccionalidad.

Para el estudio estadístico, se realizó un test Chi-cuadrado para hallar aquellos tratamientos que mostraban diferencias significativas con respecto al control. En los cálculos estadísticos se descartaron los insectos que no eligieron ninguna de las jaulas.

2.4.2.2.2. ENSAYOS DE TÚNEL DE VIENTO SOBRE MACHOS DE *G. molesta*

El túnel de viento utilizado aparece descrito en el capítulo 3 (apartado 3.2). La velocidad del flujo de aire en su interior fue de 0,3 m/s y en la parte lateral superior se colocó una fuente de luz blanca de 100 lux. Una hora antes del final de la fotofase, los machos fueron aislados individualmente en placas de Petri de 35 mm de diámetro (Corning®, BioCoat™, EEUU) y aclimatados en el laboratorio del ensayo durante 1 h antes del inicio de la prueba. Los vuelos tuvieron lugar dentro de las 2 primeras horas de la escotofase. La temperatura de la sala fue

de 22 ± 4 °C y la humedad relativa del $30 \pm 10\%$. Como fuente de emisión, se utilizaron difusores de tipo septum de poliuretano cargados con 5 µg de la mezcla feromonal como control. Se probaron 3 dosis para cada aceite esencial (5, 50 y 100 µg), aplicadas sobre un papel de filtro Whatman colocado junto al septum con feromona. Se realizaron un total de 30 vuelos por aceite y dosis. El tiempo de vuelo permitido para cada insecto fue de 2 min y se evaluaron los siguientes parámetros: activación e inicio del vuelo (take-off), vuelo orientado en dirección al difusor (half way), aproximación a la fuente (approach) y contacto con el difusor (landing). Transcurrido este tiempo, si el insecto permanecía inmóvil se le forzaba a volar para comprobar si su estado era óptimo, de no ser así, se desechaba.

Para el estudio estadístico, se realizó el test Chi-cuadrado para hallar diferencias estadísticamente significativas entre el control y las distintas dosis de los aceites esenciales ($P < 0.05$).

2.5. ACTIVIDAD DE DISTINTOS COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO SOBRE LARVAS Y ADULTOS DE *T. absoluta* Y *G. molesta*

Se han evaluado también los efectos de los compuestos timol, *p*-cimeno y carvacrol, presentes en el aceite esencial de tomillo, sobre larvas y adultos de ambas especies, de manera aislada y en todas las posibles combinaciones. Los ensayos realizados son análogos a los llevados a cabo con los aceites esenciales, aunque las cantidades empleadas con cada uno de ellos son diferentes.

En EAG se han realizado curvas dosis-respuesta con 5 dosis comprendidas entre 1 µg y 10 mg de cada uno de los aceites, evaluando la respuesta provocada en 8-10 antenas tanto de hembras como de machos de cada una de las dos especies. El procedimiento y las condiciones son las mismas que las citadas en el apartado 2.3.1.

En los bioensayos de atracción realizados con larvas, cada uno de los compuestos fue probado en las cantidades en las que se encontraban en 100 µg del aceite esencial de tomillo: 45 µg de timol, 32 µg de *p*-cimeno y 300 ng de carvacrol (Bagamboula et al., 2004), así como todas las combinaciones binarias posibles y la mezcla ternaria de todos ellos.

En los bioensayos realizados con adultos de ambas especies, se evaluó el efecto sobre la oviposición de 450 µg de timol, 320 µg de *p*-cimeno y 3 µg de carvacrol, cantidades que se encuentran presentes en 1 mg de aceite de tomillo. En las pruebas de túnel de viento con adultos machos de *G. molesta* se evaluó el efecto de 23 µg de timol, 16 µg de *p*-cimeno y 150 ng de carvacrol, dosis presentes en 50 µg de aceite de tomillo. En estos experimentos, se siguió la metodología descrita en los apartados 2.4.2.1 y 2.4.2.2, respectivamente. Además, en este tipo de ensayos se evaluó no sólo el efecto de estos compuestos de manera aislada, sino también de todas las combinaciones binarias posibles y la mezcla ternaria de todos ellos.

3. RESULTADOS

3.1. ACTIVIDAD DE LOS DISTINTOS ACEITES ESENCIALES SOBRE *T. absoluta*

3.1.1. ESTUDIOS ELECTROANTENOGRÁFICOS

Se ha evaluado la actividad electrofisiológica de cada uno de los aceites esenciales seleccionados sobre antenas de hembras y machos a las dosis de 1, 10 y 100 μg , y 1 y 10mg. Todos los aceites esenciales mostraron un efecto dosis dependiente en individuos de ambos sexos con un incremento de la respuesta a medida que aumentaba la dosis. Tanto en hembras como en machos, el aceite esencial más activo fue el eucalipto, provocando despolarizaciones de $1,8 \pm 0,4$ y $1,7 \pm 0,3$ mV en hembras y machos, respectivamente, a la dosis de 10 mg. Por otro lado, el aceite esencial de romero desencadenó las despolarizaciones de menor magnitud en el caso de las hembras ($0,5 \pm 0,1$ mV a 10 mg), y el perejil en el de los machos ($0,9 \pm 0,2$ mV) (Figura 6.3).

En el caso del tomillo se observó un efecto sorprendente en el patrón de la respuesta, ya que las dosis de 1 y 10 mg provocaron un descenso acusado en la magnitud de las despolarizaciones respecto a la obtenida a dosis menores tanto en hembras como en machos (Figura 6.4). A estas dosis (1 y 10 mg), se produjo una pequeña despolarización seguida de una hiperpolarización (Figura 6.4, C y D). Al evaluar la respuesta en EAG de tres compuestos presentes en este aceite esencial (timol, *p*-cimeno y carvacrol), se observó que timol y carvacrol provocaron a las dosis de 1 y 10 mg un descenso en la respuesta antenal de hembras y machos con respecto a dosis inferiores (Figura 6.4). Destaca el nulo efecto del carvacrol sobre las antenas de los machos y solo las tres dosis inferiores generaron respuestas en el 30-60% de las antenas de hembras; mientras que el timol solo fue capaz de desencadenar respuesta en el 70-100% de las antenas de ambos sexos a las dosis de 10 y 100 μg (Tabla 6.1). Por otro lado, con el *p*-cimeno se obtuvo una curva dosis-respuesta típica, en la que aumentó la respuesta a medida que lo hacía la dosis (Figura 6.4).

Tabla 6.1. Porcentaje de antenas de machos y hembras de *T. absoluta* que responden en EAG a cada una de las dosis de aceite esencial de tomillo y de cada uno de sus compuestos por separado: timol, carvacrol y *p*-cimeno.

Dosis	<i>Tuta absoluta</i>									
	♀♀					♂♂				
	1 μg	10 μg	100 μg	1 mg	10 mg	1 μg	10 μg	100 μg	1 mg	10 mg
Tomillo	36	64	100	50	64	30	50	100	50	40
Timol	50	75	100	0	0	50	80	100	60	64
Carvacrol	36	27	64	0	0	0	0	0	0	0
<i>p</i> -cimeno	50	75	100	100	100	25	25	100	100	100

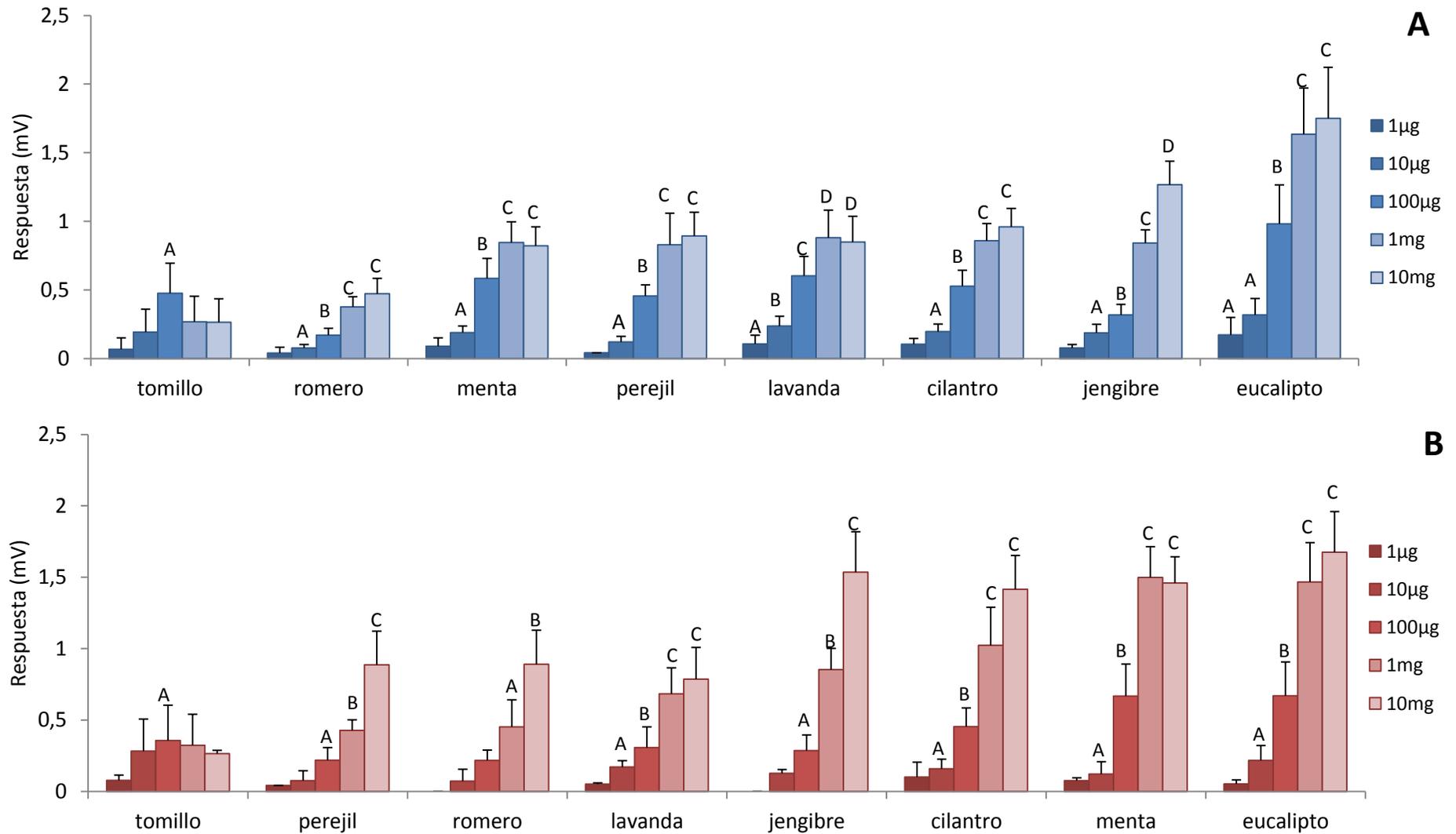


Figura 6.3. Curvas dosis-respuesta en EAG de los aceites esenciales de cilantro, eucalipto, jengibre, lavanda, menta, perejil, romero y tomillo en antenas de hembras (A) y machos (B) de *T. absoluta*. Para cada aceite, letras diferentes sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas entre las distintas dosis (test de Tukey, $P < 0.05$). En las dosis sin letras el porcentaje de antenas que respondió fue inferior al 70 %, y no fueron tenidas en cuenta para el estudio estadístico.

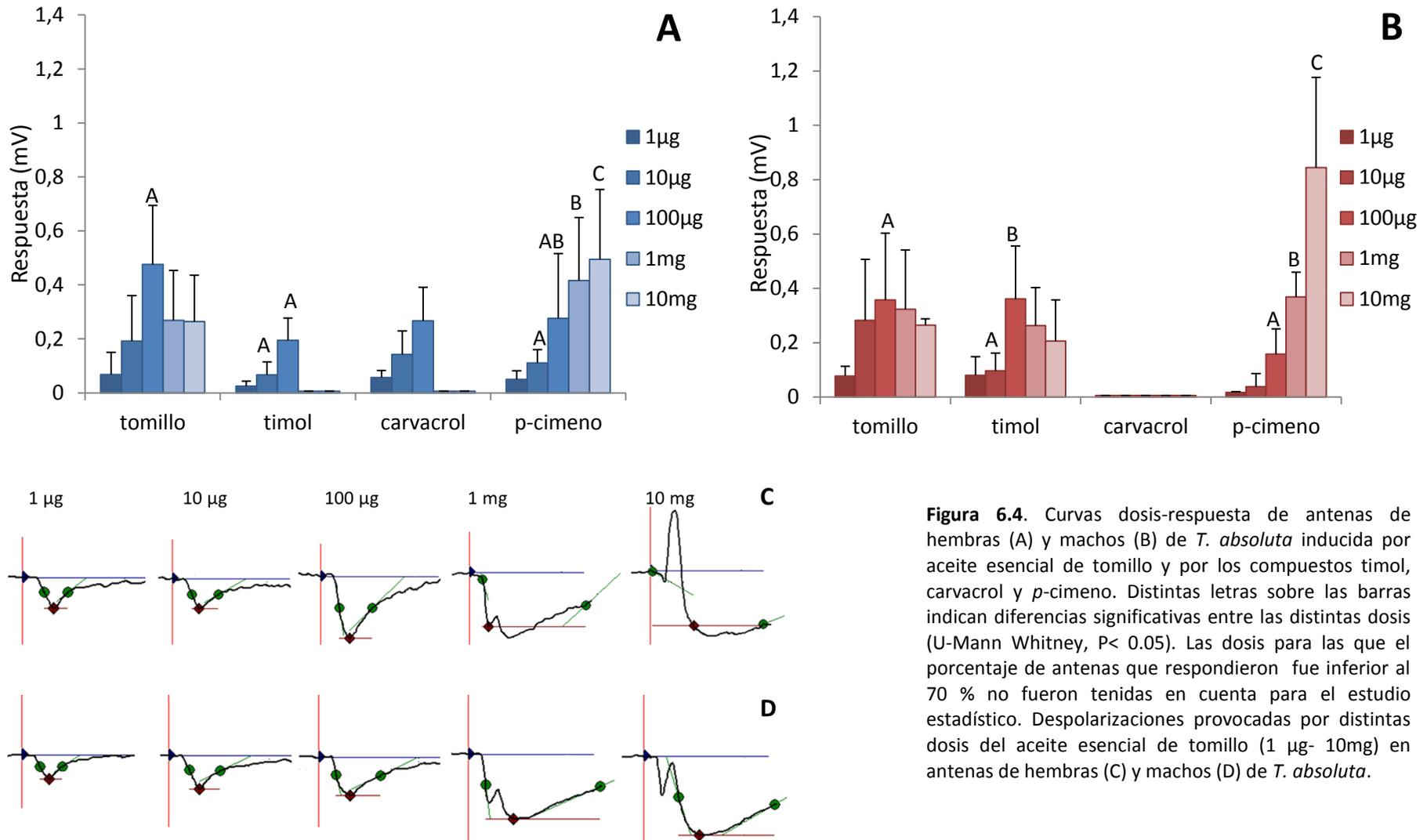


Figura 6.4. Curvas dosis-respuesta de antenas de hembras (A) y machos (B) de *T. absoluta* inducida por aceite esencial de tomillo y por los compuestos timol, carvacrol y *p*-cimeno. Distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas entre las distintas dosis (U-Mann Whitney, $P < 0.05$). Las dosis para las que el porcentaje de antenas que respondieron fue inferior al 70 % no fueron tenidas en cuenta para el estudio estadístico. Despolarizaciones provocadas por distintas dosis del aceite esencial de tomillo (1 µg- 10mg) en antenas de hembras (C) y machos (D) de *T. absoluta*.

En los ensayos de GC-EAD se evaluó la respuesta de más de 65 antenas a 100 µg de cada aceite esencial, dosis a la cual la totalidad de las antenas respondieron siempre en EAG. Se comprobó que ni en antenas de machos ni de hembras de esta especie se obtuvo una señal antenal que fuera consistente y diferenciable del ruido.

3.1.2. INHIBICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN DE LARVAS

La movilidad hacia la fuente de alimento fue siempre significativamente menor en presencia de todos los aceites esenciales a las dos dosis ensayadas (test Chi-cuadrado, $P < 0.05$). A la dosis de 10 µg, el aceite esencial más activo fue el perejil, con un porcentaje de reducción en el número de contactos del 53% con respecto al control ($P < 0.001$), seguido por el de cilantro, lavanda y menta, siendo todos ellos capaces de producir un descenso en el número de contactos del 47% ($P < 0.001$). Cuando se aplicó sobre la fuente de alimento la cantidad de 100 µg, los aceites esenciales que produjeron una mayor disminución del número de larvas que llegaron a la hoja de tomate fueron el tomillo y el jengibre (68% inhibición, $P < 0.001$) (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Efecto inhibitor (expresado como porcentaje de inhibición respecto al control) sobre larvas de *T. absoluta* a diferentes dosis de cada aceite esencial (N=50). Los porcentajes significativos respecto al control son indicados con un asterisco (Chi-cuadrado, $P < 0.05$).

	10 µg	100 µg
Cilantro	47 *	38 *
Eucalipto	29 *	50 *
Jengibre	32 *	68 *
Lavanda	47 *	62 *
Menta	47 *	56 *
Perejil	53 *	50 *
Romero	32 *	35 *
Tomillo	35 *	68 *

Puesto que el aceite esencial de tomillo fue uno de los más activos a la dosis mayor, y debido a los resultados observados anteriormente en EAG, se evaluó también sobre larvas el efecto inhibitor de contacto con la fuente de alimento que podían tener los compuestos presentes en este aceite esencial que habían sido seleccionados con anterioridad y todas las combinaciones posibles de éstos. Las cantidades probadas fueron las correspondientes a las que se encontraban en 100 µg, puesto que fue la dosis más efectiva. Como se muestra en la tabla 6.3, de nuevo todos los tratamientos redujeron de forma significativa los contactos con la fuente de alimento (Chi-cuadrado, $P < 0.05$). La mezcla ternaria consiguió el porcentaje de inhibición más elevado (48%, $P < 0.001$), pero no superó el efecto inhibitor del aceite esencial completo (68%). Cabe destacar el alto porcentaje de inhibición alcanzado con solo 3 µg de carvacrol, por lo que se decidió determinar su poder inhibitor de la alimentación con 50 µg del compuesto. Se observó que a esta dosis el porcentaje de inhibición en larvas de *T. absoluta* es superior no solo a la mezcla ternaria y al aceite de tomillo, sino también al resto de los aceites esenciales (83%, $P < 0.001$).

Tabla 6.3. Efecto inhibitorio (expresado como porcentaje de inhibición respecto al control) de timol, *p*-cimeno y carvacrol en cantidades correspondientes a las que se encuentran en 100 µg de aceite esencial de tomillo sobre larvas de *T. absoluta* (N=50). Los porcentajes significativos respecto al control son indicados con un asterisco (Chi-cuadrado, P< 0.05).

Tratamiento	% inhibición
45 µg timol	43*
32 µg <i>p</i> -cimeno	33*
3 µg carvacrol	33*
45 µg timol + 32 µg <i>p</i> -cimeno	44*
45 µg timol + 3 µg carvacrol	47*
32 µg <i>p</i> -cimeno + 3 µg carvacrol	30*
Mezcla ternaria	48*
50 µg carvacrol	83*

3.1.3. EFECTO DISUASORIO DE OVIPOSICIÓN

Se observó una reducción significativa del número medio de huevos contabilizado por ensayo con respecto al control (51 ± 14) en presencia de todos los aceites y a las dos dosis ensayadas (Tabla 6.4), a excepción de 100 µg de cilantro (U-Mann Whitney, $Z=-1,668$, $P=0.099$). Para un mismo aceite, no se encontraron diferencias significativas entre las dosis, a excepción del tomillo, menta y cilantro, para los cuales la dosis de 1 mg fue significativamente más efectiva (U-Mann Whitney, $P<0.05$) (no reflejado en la tabla 6.4). Los aceites esenciales de tomillo y menta fueron los que resultaron más activos, reduciendo el número de puestas (media \pm DE) a 11 ± 19 huevos/ensayo con 1 mg de tomillo y 4 ± 10 en el caso de la menta.

Tabla 6.4. Número medio (\pm DE) de huevos contabilizado en cada ensayo por dosis y aceite esencial. Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (U-Mann Whitney, $P<0.05$).

Tratamiento	100 µg	1 mg
Cilantro	43 ± 24	$15 \pm 15^*$
Eucalipto	$16 \pm 19^*$	$26 \pm 30^*$
Jengibre	$22 \pm 21^*$	$27 \pm 29^*$
Lavanda	$23 \pm 18^*$	$21 \pm 23^*$
Menta	$22 \pm 17^*$	$4 \pm 10^*$
Perejil	$16 \pm 17^*$	$31 \pm 22^*$
Romero	$21 \pm 24^*$	$16 \pm 18^*$
Tomillo	$34 \pm 27^*$	$11 \pm 19^*$
Control	51 ± 14	

Al evaluar por separado los compuestos del tomillo en la proporción en que se encuentran en 1 mg de dicho aceite (450 µg de timol, 320 µg de *p*-cimeno y 30 µg de carvacrol), dosis a la cual había resultado más efectivo, y todas las combinaciones posibles, se observó que únicamente el timol era capaz de reducir significativamente el número de huevos depositado por ensayo con respecto al control cuando los compuestos se probaron de manera aislada (53 ± 28 vs $3 \pm$

3, $Z=-3,967$, $P<0,001$) (Tabla 6.5). El carvacrol y el *p*-cimeno sólo resultaron efectivos cuando se combinaron con el timol y también fueron capaces de reducir significativamente el número de huevos depositados por las hembras (U-Mann Whitney, $P<0.05$).

Tabla 6.5. Número medio (\pm DE) de huevos contabilizado en ensayos de timol, carvacrol y *p*-cimeno de manera aislada y en todas las combinaciones posibles. Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (U-Mann Whitney, $P<0.05$).

Tratamiento	Nº de huevos medio por ensayo
450 μ g timol	3 \pm 3*
320 μ g <i>p</i> -cimeno	47 \pm 14
30 μ g carvacrol	54 \pm 17
450 μ g timol + 320 μ g <i>p</i> -cimeno	3 \pm 3*
450 μ g timol + 30 μ g carvacrol	7 \pm 12*
320 μ g <i>p</i> -cimeno + 30 μ g carvacrol	50 \pm 14
Mezcla ternaria	11 \pm 11*
Control	53 \pm 28

3.1.4. EFECTO REPELENTE SOBRE MACHOS

En los ensayos de doble elección sobre machos de *T. absoluta* que se realizaron para determinar un posible efecto repelente de estos aceites se observó que el número de individuos atraídos por la feromona en combinación con 1 mg de los aceites esenciales de menta, jengibre y eucalipto era significativamente menor que el observado en presencia de la feromona sola (Chi-cuadrado, $P<0.05$) (Figura 6.5). Cabe destacar que en los ensayos en los que se combinó la feromona con los aceites esenciales el número de machos que no realizaron elección alguna fue generalmente superior que en los controles, a excepción del cilantro, perejil y lavanda, en los que estas proporciones se mantuvieron prácticamente idénticas.

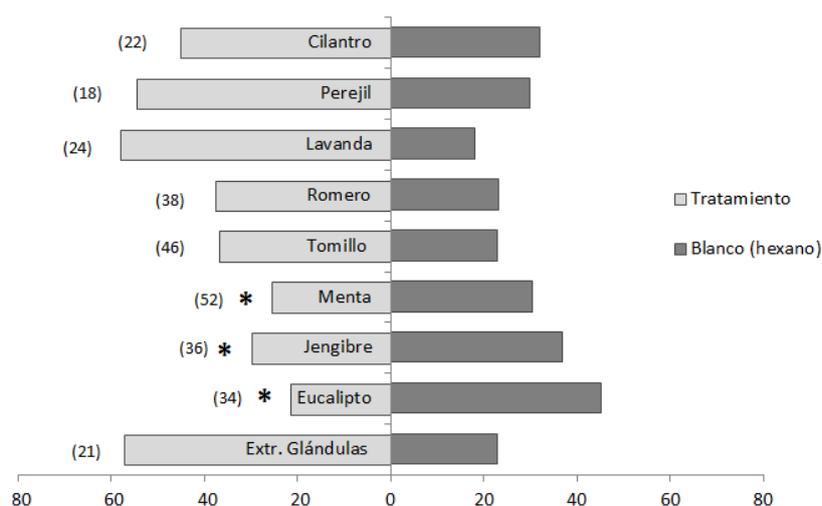


Figura 6.5. Respuesta de machos de *T. absoluta* a diferentes mezclas de feromona y 1 mg de distintos aceites esenciales en bioensayos de doble elección. Un asterisco al lado de la barra indica diferencias significativas respecto al control (Chi-cuadrado, $P<0.05$). El número entre paréntesis al lado de la barra representa el porcentaje de individuos que no realizaron elección alguna.

3.2. ACTIVIDAD DE LOS DISTINTOS ACEITES ESENCIALES SOBRE *G. molesta*

3.2.1. ESTUDIOS ELECTROANTENOGRÁFICOS

Se ha estudiado el efecto de los ocho aceites esenciales sobre antenas de adultos de ambos sexos de *G. molesta* a distintas dosis (1 μg – 10 mg). Al igual que en la anterior especie, todos los aceites mostraron un efecto dosis dependiente, aumentando la respuesta en EAG a medida que se incrementó la dosis, excepto el tomillo, el cual provocó en machos un descenso en la actividad de la antena a las dosis más altas (1 y 10 mg), provocando despolarizaciones seguidas de rápidas repolarizaciones como se había observado en *T. absoluta* (Figura 6.6).

En este caso, el aceite que provocó la mayor respuesta a la dosis más elevada fue el aceite esencial de jengibre en las hembras ($4,9 \pm 1,0$ mV) y el de menta en los machos ($4,2 \pm 0,4$ mV); mientras que el aceite esencial que desencadenó las despolarizaciones de menor magnitud fue el perejil en hembras ($0,4 \pm 0,1$ mV a 10 mg) y el tomillo en machos ($0,5 \pm 0,3$ mV) (Figura 6.6).

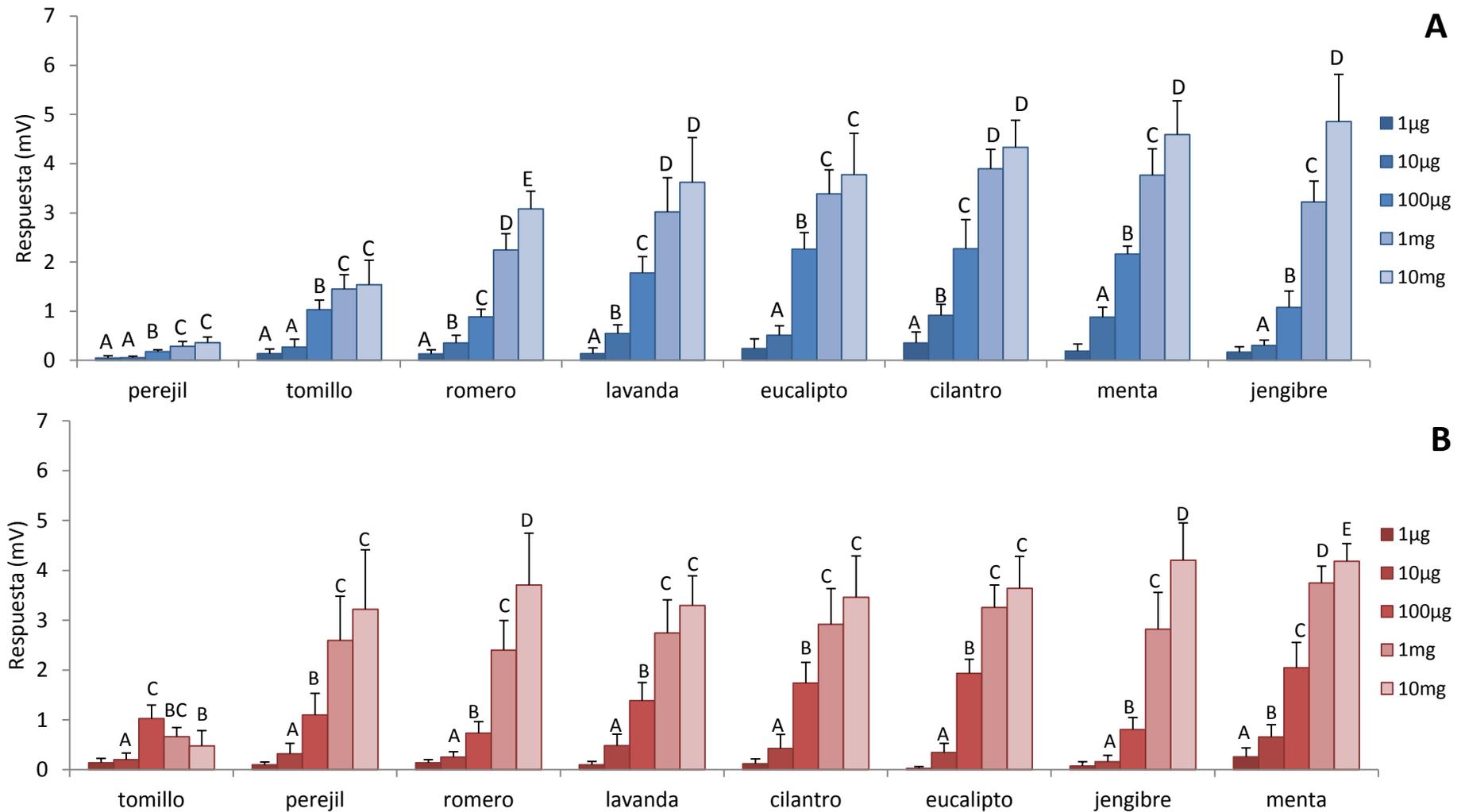


Figura 6.6. Curvas dosis-respuesta en EAG de los aceites de cilantro, eucalipto, jengibre, lavanda, menta, perejil, romero y tomillo en antenas de hembras (A) y machos (B) de *G. molesta*. Para cada aceite, letras diferentes sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas entre las distintas dosis (test de Tukey, $P < 0.05$). En las dosis sobre las que no aparecen letras el porcentaje de antenas que respondió fue inferior al 70 %, y no fueron tenidas en cuenta para el estudio estadístico.

Cuando se probaron sobre antenas de machos los compuestos presentes en el aceite de tomillo se observó el mismo patrón de respuesta que el que se había visualizado en *T. absoluta*, no generándose respuesta a las dosis de 1 y 10 mg de timol y carvacrol (Figura 6.7. B). En el caso concreto del timol, el porcentaje de antenas que respondieron siempre fue inferior al 55% para todas de las dosis (Tabla 6.6). Al evaluar la respuesta en EAG de estos tres compuestos presentes en este aceite esencial en antenas de hembras, a pesar de que en este sexo se obtuvo también una curva dosis-respuesta típica, se observó de nuevo un descenso en la respuesta a las dosis de 1 y 10 mg de timol, mientras que a 100 μ g de carvacrol se alcanzó el valor máximo de respuesta y manteniéndose constante a 1 y 10 mg (Figura 6.7.A). Por otro lado, con el *p*-cimeno se obtuvo una curva dosis-respuesta típica, en la que en ambos sexos aumentó la respuesta a medida que lo hacía la dosis (Figura 6.7).

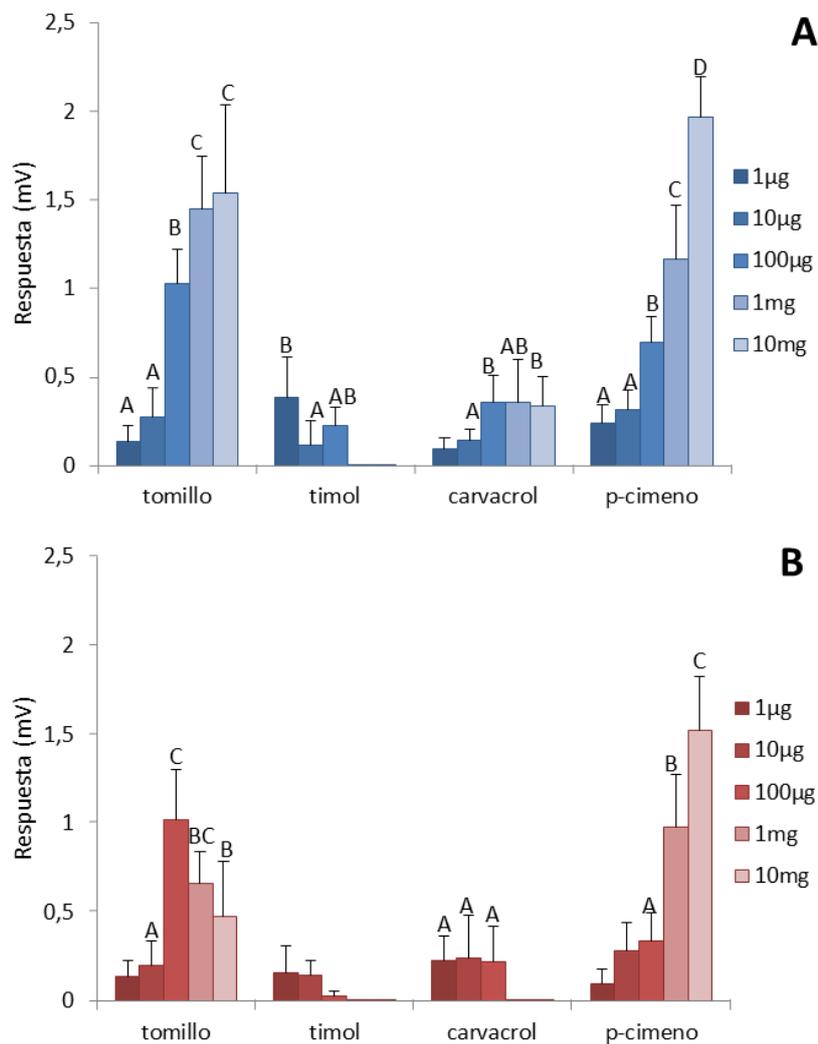


Figura 6.7. Curva dosis-respuesta en antenas de hembras (A) y machos (B) de *T. absoluta* del aceite esencial de tomillo y de los compuestos timol, carvacrol y *p*-cimeno. Distintas letras sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas entre las distintas dosis (U-Mann Whitney, $P < 0.05$). Las dosis para las que el porcentaje de antenas que respondieron fue inferior al 70 % no fueron tenidas en cuenta para el estudio estadístico.

Tabla 6.6. Porcentaje de respuesta de las antenas de machos y hembras de *G. molesta* en EAG a diferentes dosis de aceite esencial de tomillo y de cada uno de sus compuestos por separado: timol, carvacrol y *p*-cimeno.

Dosis	<i>Grapholita molesta</i>									
	♀♀					♂♂				
	1 µg	10 µg	100 µg	1 mg	10 mg	1µg	10µg	100µg	1mg	10mg
Tomillo	100	100	100	100	100	67	90	90	90	90
Timol	100	70	70	0	0	44	55	22	0	0
Carvacrol	60	100	100	90	80	90	90	80	0	0
<i>p</i> -cimeno	100	100	100	100	100	33	67	78	78	78

En los ensayos de GC-EAD se constató que ni en las antenas de machos ni en las de hembras de se obtuvieron señales que fueran consistentes y diferenciables del ruido en las más de 65 antenas probadas con 100 µg de los distintos aceites esenciales.

3.2.2. INHIBICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN EN LARVAS

En bioensayos de inhibición de la alimentación sobre larvas de cuarto estadio de *G. molesta* con 10 y 100 µg de extracto de los distintos aceites esenciales, únicamente los de jengibre y menta redujeron significativamente el porcentaje de contacto con la dieta a la menor dosis con respecto al control, siendo los porcentajes de inhibición del 41% ($P < 0.001$) y del 23% ($P = 0.015$), respectivamente. A la dosis mayor (100 µg), todos los aceites produjeron una reducción significativa en el número de contactos con la dieta, siendo los más efectivos los aceites de menta, tomillo y jengibre (Tabla 6.7) excepto el de perejil que no fue capaz de reducir el contacto con la fuente de alimento a ninguna de las dosis ensayadas.

Tabla 6.7. Efecto inhibitor (expresado como porcentaje de inhibición respecto al control) de la alimentación sobre larvas de *G. molesta* a diferentes dosis de cada aceite esencial. Los porcentajes significativos respecto al control son indicados con un asterisco (Chi-cuadrado, $P < 0.05$).

	10 µg	100 µg
Cilantro	9	32*
Eucalipto	14	47*
Jengibre	41*	50*
Lavanda	6	23*
Menta	23*	53*
Perejil	0	0
Romero	0	29*
Tomillo	17	53*

De nuevo, al ser el aceite esencial de tomillo uno de los más efectivos, sobre todo a la dosis de 100 µg, se evaluó también el efecto del carvacrol, *p*-cimeno y timol, así como todas las combinaciones posibles de éstos. En este caso, el *p*-cimeno y la mezcla *p*-cimeno + carvacrol fueron los únicos tratamientos que no mostraron una reducción significativa con respecto al control sobre larvas de *G. molesta* (Tabla 6.8). De nuevo, la mezcla ternaria consiguió un porcentaje de inhibición más elevado que el resto de combinaciones, pero no superó el efecto

inhibidor del aceite esencial completo (36 vs 53%, respectivamente). Igualmente, 3 µg de carvacrol mostró un efecto importante a pesar de la pequeña cantidad en la que fue probado, por lo que se determinó su poder repelente con 50 µg. Aunque en este caso el resultado no fue tan notable como en *T. absoluta* (48% de inhibición respecto al control), hay que destacar que fue superior al obtenido con la mezcla ternaria (36%) y similar al aceite esencial completo (53%) (Tabla 6.8.).

Tabla 6.8. Efecto inhibitorio de la alimentación sobre larvas de *G. molesta* (expresado como porcentaje de inhibición respecto al control) inducido por timol, *p*-cimeno y carvacrol en las cantidades correspondientes a la que se encuentran en 100 µg de aceite de tomillo (N=50). Los porcentajes significativos respecto al control son indicados con un asterisco (Chi-cuadrado, P< 0.05).

Tratamiento	% inhibición
45 µg timol	33*
32 µg <i>p</i> -cimeno	13
3 µg carvacrol	27*
45 µg timol + 32 µg <i>p</i> -cimeno	32*
45 µg timol + 3 µg carvacrol	30*
32 µg <i>p</i> -cimeno + 3 µg carvacrol	10
Mezcla ternaria	36*
50 µg carvacrol	48*

3.2.3. EFECTO DISUASORIO DE LA OVIPOSICIÓN

Se observó una reducción significativa del número medio de huevos depositados por hembras de *G. molesta* con respecto al control (108 ± 33) en presencia de todos los aceites y a las dos dosis ensayadas (Tabla 6.9), a excepción de 100 µg de tomillo (U-Mann Whitney, $Z=-1,567$, $P=0.122$) y 1 mg de jengibre (U-Mann Whitney, $Z=-1,101$, $P=0.283$). Para un mismo aceite, no se encontraron diferencias significativas entre las dosis, a excepción del tomillo y eucalipto, para los cuales la dosis de 1 mg fue significativamente más efectiva (U-Mann Whitney, $P<0.05$) (no se refleja en la tabla 6.9). El aceite esencial de cilantro resultó ser el más efectivo a la dosis de 100 µg, reduciendo el número medio de huevos/ensayo hasta 15 ± 18 , siendo menos efectivo a la dosis de 1 mg (35 ± 43). El más efectivo a esta dosis fue el tomillo que redujo el número de huevos hasta 17 ± 9 huevos/ensayo.

Tabla 6.9. Número medio (\pm DE) de huevos contabilizado en cada ensayo por dosis y aceite esencial. Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (U-Mann Whitney, $P<0.05$).

Tratamiento	100 µg	1 mg
Cilantro	$15 \pm 18^*$	$35 \pm 43^*$
Eucalipto	$81 \pm 39^*$	$36 \pm 33^*$
Jengibre	$86 \pm 29^*$	92 ± 40
Lavanda	$51 \pm 32^*$	$37 \pm 28^*$
Menta	$71 \pm 50^*$	$43 \pm 38^*$
Perejil	$38 \pm 34^*$	$64 \pm 46^*$
Romero	$74 \pm 51^*$	$71 \pm 36^*$
Tomillo	81 ± 63	$17 \pm 9^*$
Control	108 ± 33	

Al evaluar por separado los compuestos del tomillo en la proporción en que se encuentran en 1 mg de dicho aceite (450 µg de timol, 320 µg de *p*-cimeno y 30 µg de carvacrol), se observó la misma tendencia que en *T. absoluta*. De nuevo, sólo el timol redujo significativamente el número de huevos promedio depositado por ensayo con respecto al control (40 ± 39 , $Z=-2,317$, $P=0,02$). El carvacrol y el *p*-cimeno por separado solo resultaron efectivos cuando se combinaron con el timol tanto en combinaciones binarias como en la mezcla ternaria (U-Mann Whitney, $P<0.05$) (Tabla 6.10).

Tabla 6.10. Número medio (\pm DE) de huevos contabilizado en ensayos de oviposición en presencia de timol, carvacrol y *p*-cimeno de manera aislada y de todas las combinaciones posibles de éstos. Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (U-Mann Whitney, $P<0.05$).

Tratamiento	Nº de huevos medio por ensayo
450 µg timol	40 \pm 39*
320 µg <i>p</i> -cimeno	80 \pm 43
30 µg carvacrol	103 \pm 43
450 µg timol + 320 µg <i>p</i> -cimeno	25 \pm 33*
450 µg timol + 30 µg carvacrol	36 \pm 31*
320 µg <i>p</i> -cimeno + 30 µg carvacrol	88 \pm 34
Mezcla ternaria	16 \pm 15*
Control	92 \pm 53

3.2.4. INTERRUPCIÓN DE LA COMUNICACIÓN QUÍMICA ENTRE SEXOS

En ensayos de túnel de viento en las condiciones descritas en el apartado 2.4.2.2.2, la feromona (control) inujo un porcentaje de contacto con la fuente del 93%. Cuando se ensayaron los aceites esenciales en una proporción feromona:aceite 1:1 únicamente el eucalipto y el romero produjeron una reducción significativa del número de contactos del 70 y 71%, respectivamente (Tabla 6.11). En proporción feromona:aceite 1:10 y 1:20 todos los aceites esenciales fueron capaces de reducir significativamente el número de contactos respecto a la feromona, a excepción del jengibre en proporción 1:10 (Tabla 6.11).

Tabla 6.11. Porcentaje de machos de *G. molesta* que contactan con la fuente en túnel de viento en una proporción por mezclas de feromona y aceite esencial en proporción 1:1, 1:10 y 1:20. Un asterisco indica la existencia de diferencia significativa con respecto al control (5 µg de feromona) (Chi-cuadrado, $P<0.05$).

Aceite esencial	1:1	1:10	1:20
Cilantro	83	64*	58*
Eucalipto	70*	70*	51*
Jengibre	81	76	47*
Lavanda	82	66*	44*
Menta	74	51*	35*
Perejil	74	71*	61*
Romero	71*	55*	51*
Tomillo	83	73*	69*

Se evaluó también el efecto de cada uno de los componentes del tomillo a una dosis igual a la que están presentes en 50 μg del aceite esencial (22,5 μg de timol, 16 μg de *p*-cimeno y 1,5 μg de carvacrol). Como se aprecia en la Figura 6.8, únicamente el timol redujo significativamente el contacto con la fuente emisora el timol cuando se presentó de manera aislada, siendo más efectivo que las combinaciones con el *p*-cimeno y el carvacrol.

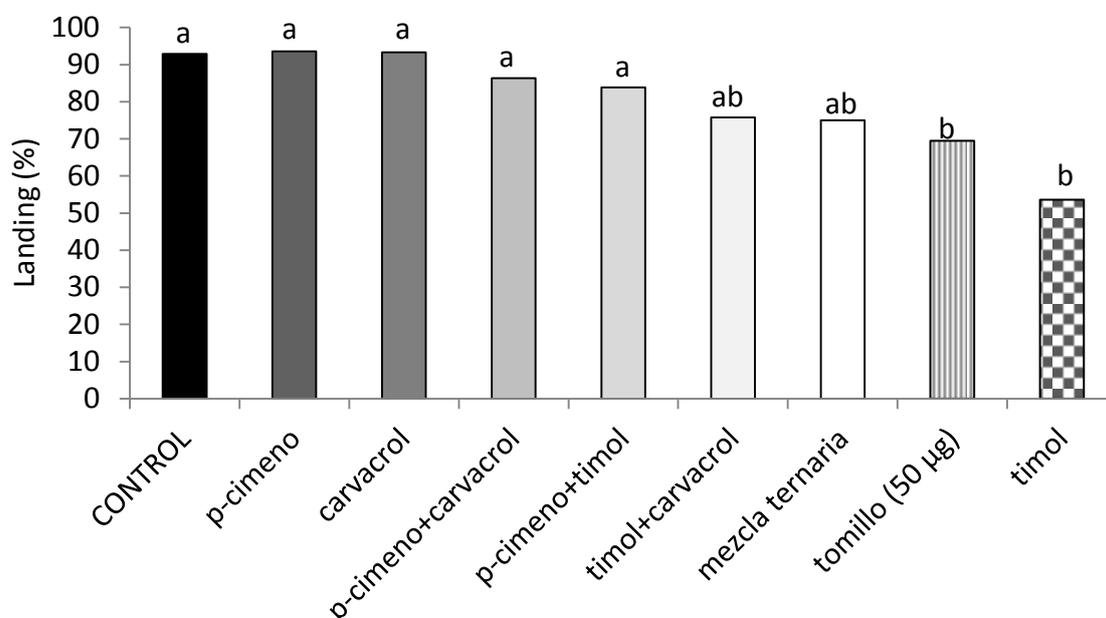


Figura 6.8. Porcentaje de machos de *G. molesta* que contactan con la feromona (5 μg) cuando ésta se presenta junto a 22,5 μg de timol, 16 μg de *p*-cimeno o 1,5 μg de carvacrol, de manera aislada o en mezclas binarias y ternaria. Letras diferentes sobre las barras indican resultados significativamente diferentes respecto al control (Prueba no paramétrica de Chi-cuadrado, $P < 0.05$).

4. DISCUSIÓN

Los aceites esenciales y extractos de plantas pueden considerarse una alternativa a tener en cuenta en el control de plagas debido a su bajo impacto ambiental en comparación con los pesticidas sintéticos convencionales y su amplio espectro de acción (Isman 2004). Se ha demostrado que muchos aceites esenciales y sus componentes presentan diferentes efectos sobre las distintas fases de desarrollo de diversos órdenes de insectos (Nerio et al., 2010), como dípteros (Erler et al., 2006; Conti et al., 2010; Diongue et al., 2010; Koc et al., 2012), coleópteros (Regnault-Roger et al., 1993; Odeyemi et al., 2006; Rizwan-ul-Haq & Aljabr, 2015), blatodeos (Gaire et al., 2013), ortópteros (Mansour et al., 2015) y lepidópteros (Kanat & Alma, 2003 ; Pavela 2012; Pavela 2014; Ribeiro et al., 2015) entre otros; además de su acción sobre otros organismos como hongos, bacterias y plantas. El efecto tóxico y repelente de los aceites esenciales seleccionados ha sido ampliamente demostrado en la bibliografía (Regnault-Roger et al., 1993; Isman et al., 2004; Nerio et al., 2010; Kuppusami et al., 2016). Así se ha demostrado en especies de lepidópteros pertenecientes a la familia *Gelechiidae* (Iannacone & Lamas, 2003; Thiéry & Moreau, 2005; Gökçe et al., 2006; Guerra et al., 2007; Ma & Xiao, 2013, Hannour et al., 2017) y *Tortricidae* (Laroque et al., 1999; Landolt et al., 1999; Machial et al., 2009; Colpo et al., 2014), pero solo un número reducido de aceites esenciales ha sido evaluado sobre *T. absoluta* (Barbosa et al., 2011; Derbalah et al., 2012; Moreno et al., 2012; Moawad et al., 2013; Umpiérrez et al., 2016; Goudarzvand-Chegini & Abbasipour, 2017) y *G. molesta* (Colpo et al., 2014). Nuestras observaciones en el laboratorio sugieren que algunos de estos aceites esenciales podrían emplearse como disuasores/repelentes espaciales de estas especies.

4.1. ACTIVIDAD DE DIFERENTES ACEITES ESENCIALES SOBRE *T. absoluta*

Se ha observado que todos los aceites esenciales mostraron actividad intrínseca en EAG sobre antenas de machos y hembras de *T. absoluta*, siendo el eucalipto el más activo. En la mayoría de los casos, se necesita una dosis mínima de 10 µg para obtener respuesta en al menos un 50% de las antenas ensayadas, respondiendo la totalidad de ellas a la dosis de 100 µg de cada aceite. Sólo en el caso del tomillo, las mayores dosis ensayadas (1 y 10 mg) provocaron un descenso acusado en la magnitud de las despolarizaciones respecto a la obtenida a dosis menores. Sin embargo, en GC-EAD a la dosis de 100 µg ningún componente de los aceites esenciales ha inducido respuestas aceptables, posiblemente debido a que las cantidades relativas de cada compuesto aislado a esa dosis son pequeñas y las respuestas desencadenadas por ellos están por debajo de los límites de detección del aparato empleado, o porque la estimulación requiere mayores dosis de ciertos constituyentes.

En los ensayos de comportamiento llevados a cabo sobre larvas, todos los aceites esenciales fueron capaces de reducir significativamente el número de contactos con la fuente de alimento incluso a la menor dosis ensayada (10 µg). A esta dosis únicamente el perejil mostró un efecto inhibitor por encima del 50%, mientras que a la dosis mayor (100 µg) los aceites más efectivos fueron los de tomillo y jengibre con un 68% de inhibición, seguido del aceite de lavanda, con un 62%. El efecto de estos aceites esenciales sobre larvas de distintas especies ha sido corroborado por diversos autores. De Evert y col. (2015) en un estudio realizado con extractos de varias especies de plantas, demostraron la capacidad del eucalipto para controlar

la población de larvas de *T. absoluta* bajo condiciones de invernadero, provocando una alta mortalidad de éstas al rociar plantas de tomate con extractos del aceite. Estudios desarrollados sobre *Phthorimaea operculella* por Rafiee-Dastjerdi y col. (2013) pusieron de manifiesto la toxicidad de varios aceites esenciales sobre larvas de primer estadio al demostrar la incapacidad de éstas de penetrar en tubérculos de patata que habían sido tratados con aceites esenciales y extractos de distintas especies vegetales, entre las que se encontraban dos especies de menta, lavanda y jengibre. Sharaby et al. (2014) también probaron varios aceites esenciales sobre esta misma especie, entre ellos otra especie de menta (*Mentha citrate*), demostrando una vez más la efectividad de este tipo de sustancias en disminuir el número de larvas que penetraban en las patatas. Moawad et al. (2007) demostraron una vez más la capacidad de varios aceites esenciales, entre ellos el romero, de disminuir la penetración de larvas de primer estadio en los tubérculos espolvoreadas con estas sustancias. Se cree que estos aceites podrían actuar sobre larvas como repelentes o como barreras protegiendo los tubérculos de patata contra la infestación (Moawad et al., 2007). Estudios similares han sido llevados a cabo con larvas de especies pertenecientes a otras familias de lepidópteros como Noctuidae y Lymantriidae, en los que se pone de manifiesto el efecto antialimentario de estos aceites esenciales (Jiang et al., 2012; Sousa et al., 2013; Sánchez-Vioque et al., 2015; Sharaby & El-Nojiban, 2015).

El presente trabajo pone de manifiesto el impacto negativo que tienen los aceites esenciales no solo sobre las larvas de *T. absoluta*, sino también sobre la oviposición de los adultos. Se observó una reducción significativa del número medio de huevos depositados respecto al control en presencia de los aceites y a las dos dosis ensayadas. Los resultados muestran que la efectividad es dependiente de la concentración en el caso del tomillo, menta y perejil, provocando una mayor reducción de la fertilidad cuanto mayor es la dosis. Existe un gran número de estudios en los que se ha puesto de manifiesto la capacidad de estas sustancias para reducir la fertilidad en varias especies de insectos, así como su efecto ovicida y disuasorio de la oviposición (Guerra et al., 2007; Moawad & Ebadah, 2007; Ramírez et al., 2010; Rafiee-Karahroodi et al., 2011; Rafiee-Dastjerdi et al., 2013; Rafiee-Karahroodi et al., 2014; Sharaby et al., 2014). Nuestros resultados coinciden con muchos de los obtenidos previamente por otros autores al reducirse el número de huevos depositados por las hembras en presencia de estos aceites esenciales. Por ejemplo, Moawad (2013) demostró que los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*), perejil (*P. crispum*) y lavanda (*L. angustifolia*) y tres monoterpenoides comerciales (eugenol, isoeugenol y cineol) reducían el número de huevos depositados por hembras de *T. absoluta* sobre hojas de tomate que habían sido tratadas previamente con ellos. Rafiee-Dastjerdi (2014) evaluó el efecto sobre la oviposición de aceites esenciales de *L. angustifolia*, *Mentha longifolia*, *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* y *Satureja hortensis*, concluyendo que las hembras de *P. operculella* depositaban menos huevos sobre tubérculos de patatas que habían sido tratados con estos aceites esenciales. Rafiee-Karahroodi (2011) evaluó la toxicidad sobre *Plodia interpunctella* de 6 aceites esenciales, llegando a la conclusión de que los obtenidos de *L. angustifolia*, *M. piperita* y *Ziziphora clinopodioides* poseían un mayor efecto ovicida y disuasorio de la oviposición.

En los ensayos de doble elección llevados a cabo con machos adultos de *T. absoluta* se observó que la menta, jengibre y eucalipto inhiben la atracción de los mismos por la feromona sexual femenina. Es particularmente notable el efecto que tiene 1 mg de aceite de eucalipto, en el que los machos eligen mayoritariamente el brazo control. La actividad repelente de las especies del género *Eucalyptus* también ha sido ampliamente demostrada sobre mosquitos y otros artrópodos fitófagos y de importancia veterinaria y médica (Kanat & Alma, 2004; Amer & Mehlhorn, 2006; Erler et al., 2006; Batish et al., 2008; Nerio et al., 2010). El aceite esencial de *M. piperita*, así como el de otras especies de este género ha demostrado su efecto repelente sobre hembras adultas de varias especies de mosquitos (Ansari et al., 2000; Amer & Mehlhorn, 2006; Erler et al., 2006; Nerio et al., 2010), ácaros (Momen et al., 2001), coleópteros (Nerio et al., 2010) y ftirápteros (Khater et al., 2009; Nerio et al., 2010). Igualmente, también se ha demostrado el efecto repelente que posee el aceite de *Z. officinale* sobre mosquitos (Pushpanathan et al., 2008; Nerio et al., 2010) y coleópteros (Ukeh, 2008; Ukeh et al., 2009), entre otros.

4.2. ACTIVIDAD DE DIFERENTES ACEITES ESENCIALES SOBRE *G. molesta*

Ambos sexos de esta especie son capaces de responder a volátiles de plantas no hospedadoras que se hallan presentes en los aceites esenciales ensayados tanto en EAG como en bioensayos de laboratorio. En EAG, los aceites esenciales demostraron tener actividad intrínseca en forma dosis dependiente tanto en antenas de machos como de hembras, siendo los más activos el jengibre y la menta, mientras que los procedentes del tomillo y perejil fueron los menos activos. Las dosis de 1 y 10 mg de tomillo provocaron un descenso acusado en la magnitud de las despolarizaciones respecto a la obtenida a dosis menores sólo en antenas de machos. Al probar la dosis de 100 µg en GC-EAD no se pudieron identificar constituyentes activos en estos aceites esenciales, posiblemente por las mismas razones ya expuestas en *T. absoluta*.

En bioensayos de atracción sobre larvas de cuarto estadio únicamente los aceites esenciales de jengibre y menta redujeron significativamente los contactos con la fuente de alimento a la dosis menor ensayada (10 µg), mientras que a la dosis mayor (100 µg) todos los aceites produjeron una reducción significativa en el número de contactos con la dieta. Los aceites más efectivos fueron los de menta, tomillo y jengibre. Cabe destacar que dos de estos aceites (tomillo y jengibre) resultaron ser también los más eficaces en los ensayos realizados sobre larvas de *T. absoluta*. Como se ha citado anteriormente, existe un gran número de estudios en los que se pone de manifiesto el efecto antialimentario de estos aceites esenciales y muchos otros (Jiang et al., 2012; Sousa et al., 2013; Sánchez-Vioque et al., 2015; Sharaby & El-Nojiban, 2015). Así, el efecto antialimentario o repelente de *L. angustifolia* ha sido observado también sobre larvas de otros lepidópteros como *Cydia pomonella* (Landolt et al., 1999), *P. operculella* (Rafiee-Dastjerdi et al., 2013), *Glyphodes pyralis* (Yazdani et al., 2013) y *T. absoluta* (Moawad et al., 2013); el efecto de *Z. officinale* sobre *Spodoptera litura* (Sahayaraj, 1998), *Spilosoma obliqua* (Agarwal et al. 2001); y la acción de *T. vulgaris* sobre *S. litura* (Hummelbrunner & Isman, 2001), *Trichoplusia ni* (Jiang et al., 2012, Tak et al. 2015), *Anticarsia gemmatalis* (Ribeiro et al., 2015) y *S. littoralis* (Pavela, 2010); además de ser efectivos también en especies

pertenecientes a otros órdenes de insectos (Ukeh et al., 2009; Regnault-Roger & Hamraoui, 1994).

En los ensayos para estudiar el posible efecto disuasivo de oviposición de los aceites, se observó una reducción significativa del número medio de huevos depositados en presencia de los mismos y a las dos dosis ensayadas, mostrando un efecto dosis dependiente los aceites de tomillo y eucalipto. Destaca de nuevo el importante efecto del aceite de tomillo, coincidiendo con los resultados de otros autores sobre otras especies (Tingle et al., 1994; Pavela et al., 2009, Ribeiro et al., 2015).

Los compuestos volátiles de plantas son capaces de aumentar o disminuir la respuesta comportamental de los insectos desencadenada por la acción de las feromonas (Reddy & Guerrero, 2004), siendo susceptibles de ser utilizados en programas de control integrado de plagas debido a su capacidad para interferir en la comunicación entre sexos. Por ejemplo, el citral, el cual está presente en la composición de varios aceites esenciales, demostró su capacidad para interrumpir la comunicación química entre sexos de *Lobesia botrana*, *C. pomonella* y *G. molesta* (Meiwald et al., 2001; Hapke et al., 2001; Faraone et al., 2013). En el caso de *G. molesta*, la interrupción de la comunicación química entre sexos es una alternativa muy efectiva al uso de los insecticidas para el control de *G. molesta* (Trimble et al., 2004). Hemos demostrado que en túnel de viento estos aceites también poseen un efecto disruptor sobre la percepción de la feromona sexual. En este sentido, aunque la mayoría de los aceites probados requieren una proporción mínima feromona:aceite esencial 1:10 para producir una reducción significativa en el número de contactos con la fuente, los aceites de eucalipto y romero produjeron una disminución significativa ya en las formulaciones feromona-aceite esencial 1:1. El aceite esencial de menta fue el más efectivo en la proporción 1:20, reduciendo el número de contactos con respecto al control hasta el 35%.

4.3. EL CASO PARTICULAR DEL TOMILLO

El tomillo (*T. vulgaris*) es una planta perenne de la familia de las labiadas endémica de la cuenca mediterránea. El aceite esencial de esta planta y algunos de sus componentes presentan múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria (Rota et al., 2008), ya que posee propiedades antibacterianas (Bagamboula et al., 2004; Rota et al., 2008), antifúngicas (Giordani et al., 2004), e insecticidas (Hummelbrunner & Isman, 2001; Knio et al., 2008; Nerio et al. 2010; Pavela 2010; Jiang et al., 2012; Tak et al. 2015; Ribeiro et al., 2015). Su composición varía en función de su distribución geográfica, las condiciones ambientales y fase de crecimiento y método de extracción (Pavela et al., 2009). Entre los compuestos más abundantes de este aceite esencial cabe destacar el timol, carvacrol y el *p*-cimeno, precursor de los dos anteriores. Las proporciones relativas de sus componentes varían según el tipo de tomillo considerado (Hudaib et al., 2002; Giordani et al., 2004; Rota et al., 2008), siendo las del aceite esencial comercializado por Sigma Aldrich 45:3:32, respectivamente (Bagamboula et al., 2004). La efectividad de estos compuestos como insecticidas, larvicidas, antialimentarios y disuasorios de la oviposición ha sido demostrada por diversos autores sobre varias especies de lepidópteros y otros órdenes de insectos (Anderson et al., 1993; Hummelbrunner & Isman, 2001; Pavela, 2010; Park et al., 2017).

Tanto el aceite esencial de tomillo como los compuestos aislados (timol, *p*-cimeno y carvacrol) fueron activos en EAG sobre antenas de machos y hembras de *T. absoluta* y *G. molesta*, pero, a diferencia del resto de aceites esenciales probados, la respuesta electroantenográfica a las dosis más altas (1 y 10 mg) de tomillo, timol y carvacrol, provocó un descenso acusado en la magnitud de las despolarizaciones respecto a la obtenida a dosis inferiores en ambos sexos y especies. Así, se obtuvo una pequeña despolarización seguida de una gran hiperpolarización, a diferencia de la respuesta típica observada en el resto de aceites esenciales y caracterizada por una rápida despolarización seguida de un retorno lento a la línea base. Este tipo de despolarizaciones en la actividad electrofisiológica también se ha observado en antenas de dos especies de lepidópteros (Ramachandran et al., 1990) y en la musculatura que controla el vuelo del díptero *Phaenicia sericata* (Waliwitiya et al., 2010); en el que se ha relacionado con la potenciación de los receptores de GABA_A aumentando así el efecto inhibitor de este neurotransmisor (Priestley et al., 2003; Waliwitiya et al., 2010). El *p*-cimeno, por su parte, provocó una curva dosis-respuesta típica, en la que aumentó la respuesta a medida que lo hacía la dosis.

Los constituyentes reseñados del aceite de tomillo también han demostrado influir en varios aspectos de la biología de *T. absoluta* y *G. molesta*. En primer lugar, demostraron tener un efecto antialimentario sobre larvas de las especies objeto de estudio. En el caso de *T. absoluta* todos los tratamientos redujeron de forma significativa los contactos con la fuente de alimento, mientras que en el caso de *G. molesta* el *p*-cimeno y la mezcla *p*-cimeno + carvacrol fueron los únicos tratamientos que no produjeron una disminución significativa. Además, en los ensayos de oviposición solo el timol y sus mezclas con los otros componentes fueron capaces de reducir el número de huevos depositados por las hembras de ambas especies. En ensayos de túnel de viento sobre machos de *G. molesta* únicamente el timol fue capaz de reducir significativamente el número de contactos con la fuente, interfiriendo en la percepción de la feromona sexual, siendo menos efectivo cuando se combinó con *p*-cimeno y carvacrol. El timol y carvacrol han demostrado ser buenos disuasorios de la alimentación también de larvas de *S. litura* (Hummelbruner & Isman, 2001), y poseer un alto poder insecticida sobre larvas de *S. littoralis* (Pavela, 2010), *T. pityocampa* (Kanat & Alma, 2003), *Acanthoscelides obtectus* (Regnault-Roger & Hamraoui, 1995) y sobre adultos y ninfas de *Pochazia shantungensis* (Park et al., 2017). Además, estos dos compuestos, en combinación con eugenol, nerolidol y fitol, también han resultado ser buenos inhibidores de la oviposición de *S. littoralis* (Anderson et al., 1993). También se ha documentado el efecto repelente del timol sobre *Pediculus humanus capitis* (Tolosa et al., 2006) y sobre *Anopheles gambiae* (Odaló et al., 2005).

La actividad biológica de los aceites esenciales depende tanto del contenido cualitativo de sus componentes como de las proporciones en las que se encuentran y las relaciones que guardan entre ellos (Pavela, 2010; Pavela et al., 2014). Se conoce una gran cantidad de compuestos que aceites esenciales de plantas que se caracterizan por su capacidad para influir en el comportamiento de insectos, por ejemplo, el 1,8-cineol del aceite esencial de hojas de *Hyptis martiusii* posee un gran efecto insecticida sobre las larvas de *A. aegypti* y *Bemisia argentifolii* (Araújo et al., 2003), y el timol extraído de *T. vulgaris* posee una gran toxicidad e inhibición del crecimiento de larvas de *S. litura* (Hummelbrunner & Isman 2001). En la mayoría de estudios

realizados con este tipo de sustancias se observa que la bioactividad de las combinaciones de los distintos compuestos es más efectiva que la de los compuestos aislados (Mansour et al., 2000; Hummelbrunner & Isman 2001, Nerio et al., 2010), pero este hecho no se ha observado en el presente trabajo, donde las formas oxigenadas, el timol y en menor medida el carvacrol, presentan una actividad similar que las mezclas binarias y ternaria en los ensayos de inhibición de la alimentación de larvas, disuasión de la oviposición e incluso mayor en la disrupción de la feromonal en túnel de viento, coincidiendo con las conclusiones obtenidas por Regnault-Roger y Hamraoui (1995) y Park y col. (2017).

Poco se sabe del mecanismo de acción de los aceites ensayados y de sus componentes, sin embargo, el rápido efecto de algunos de ellos sobre los insectos es indicativo de un posible efecto neurotóxico (Isman, 2004; Rattan, 2010; Blenau et al., 2012). Se ha comprobado el efecto de algunas de estas sustancias sobre el sistema colinérgico, como el del aceite de *Z. officinale* (Felipe et al., 2008) o el linalool (Ryan & Byrne, 1988), que inhiben la enzima acetilcolinesterasa, provocando la acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica y un estado permanente de estimulación en la membrana postsináptica, produciendo la descoordinación del sistema neuromuscular y la eventual muerte del insecto (Rattan, 2010). Otra posible diana sugerida para los aceites esenciales y algunos de sus componentes, como el timol (Priestley et al., 2003; Waliwitiya et al., 2010), es la interferencia con los canales de cloro regulados por GABA, principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, cuyo bloqueo provoca hiperexcitación, convulsiones e incluso la muerte (Rattan, 2010). Además, se ha especulado que estas sustancias actuarían sobre el sistema octopaminérgico. En los insectos, la octopamina actúa como neurotransmisor, neurohormona y neuromodulador, y está implicada en un gran número de procesos biológicos relacionados con comportamientos activos o estresantes que implican un gran coste energético, como la oviposición, la lucha y el vuelo. Para esta amina se conocen tres tipos de receptores, los cuales están ligados generalmente a la enzima adenilato-ciclasa (Kostyukovsky et al., 2002). Estudios realizados por Enam (2001) sobre cucarachas demostraron que ciertos monoterpenoides presentes en aceites esenciales eran capaces de alterar los niveles normales de AMP cíclico, activando la adenilato-ciclasa, lo que en última instancia conllevaría un bloqueo de los sitios de unión de la octopamina (Nathanson et al., 1993; Enam, 2001; Kostyukovsky et al., 2002). Los agonistas y antagonistas de la octopamina actúan como compuestos antialimentarios, y pueden tener efectos negativos en el comportamiento de los insectos, con síntomas como temblores, hiperactividad, convulsiones y muerte, entre otros (Nathanson et al., 1993; Hummerbrunner & Isman, 2001). Puesto que el sistema octopaminérgico es exclusivo de los insectos, lo convierte en una potencial diana para los tratamientos utilizados en el control de plagas, además de ser relativamente inocuos para el medio ambiente y más seguros que los insecticidas utilizados actualmente, como los carbamatos, organofosforados y piretroides.