



Feromonas de lepidópteros para un uso sostenible de insecticidas en la agricultura: Avances en la identificación de la feromona sexual de *Pseudaletia adultera* (Lepidoptera: Noctuidae)

Tesis de Maestría en Química

Facultad de Química

Universidad de la República

Por

Qca. Valeria Cal

Orientador Dr. Andrés González Ritzel

Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR

FEROMONAS DE LEPIDÓPTEROS PARA UN USO SOSTENIBLE DE INSECTICIDAS EN LA AGRICULTURA: AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE LA FEROMONA SEXUAL DE *PSEUDALETIA ADULTERA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMEN

Se estima que se conocen más de un millón y medio de especies de insectos, siendo el grupo más diverso de organismos eucariotas, y que un 10% de estas especies constituyen plagas agrícolas.

Los efectos negativos del uso de insecticidas sintéticos en la salud, el medio ambiente y los organismos que viven en él, fomentan la búsqueda y desarrollo de estrategias alternativas para el control de plagas. El uso de semioquímicos (feromonas y kairomonas) en estrategias de manejo de insectos plaga data de varias décadas; su modo de acción involucra la modificación del comportamiento de la especie diana y pueden ser utilizados solos o en conjunto con otros compuestos que sean tóxicos o adhesivos. Los beneficios del uso de feromonas incluyen su inocuidad, ser especie-específicas y por ende, constituyen una herramienta muy sensible a la detección de la plaga en bajas poblaciones.

En Uruguay, la utilización de feromonas en programas de manejo integrado de plagas se inició hace ya varias décadas (finales de la década de 1970), aunque se ha visto limitada a especies de amplia distribución e importancia económica internacional. Existen, sin embargo, plagas locales o regionales con alta incidencia económica, como es el caso de *Pseudaletia adultera*, para las cuales no se han identificado sus feromonas, dificultando el desarrollo de estrategias alternativas de control.

Pseudaletia adultera (Lepidoptera: Noctuidae) es un insecto polífago cuyas preferencias alimenticias son las gramíneas cultivadas y gramíneas de praderas naturales; se ha reportado la presencia de esta plaga a nivel local (Norte de Argentina, Sur de Brasil, Paraguay y Uruguay). Su importancia económica radica en la frecuencia de los ataques (en Uruguay pueden presentar de 3 a 4 generaciones al año) y la magnitud de los mismos, pudiendo ocasionar daños a hojas, tallos, espigas y granos.

En la actualidad, para el muestreo de larvas de esta especie se recomienda el uso de red entomológica; el monitoreo de adultos se realiza mediante trampas de luz. El uso de feromonas sexuales en trampas de monitoreo es un método sensible y específico para lepidópteros, permitiendo detectar adultos incluso en muy bajas densidades, y predecir explosiones poblacionales. De esta manera, se pueden establecer umbrales de capturas para la adopción de medidas de control químico.

De acuerdo a lo antedicho, el desarrollo de esta tesis se enmarca en la identificación de la feromona sexual de *P. adultera*, a través del conocimiento de la biología del insecto, la extracción de glándulas productoras de feromona, identificación química de los compuestos activos y formulación y evaluación de una mezcla sintética que simule la feromona sexual.

El presente informe de tesis de maestría consta de una introducción que incluye los antecedentes y los objetivos, dos capítulos centrales que describen el trabajo experimental realizado. En el primero se describe la aproximación a la identificación de los componentes de la feromona sexual de *Pseudaletia adultera*, y el segundo describe los estudios comportamentales en laboratorio y ensayos a campo. El último capítulo incluye las conclusiones y perspectivas, sección en la cual se releva toda la información presentada y se definen directrices para darle continuidad al trabajo.

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A Facultad de Química, por proveer las instalaciones y recursos necesarios para el desarrollo de mis estudios de posgrado.
- ✓ A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar mis estudios de posgrado.
- ✓ A la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por financiar la finalización de mis estudios de posgrado.
- ✓ A Pedeciba – Química por financiar mis asistencias a cursos y congresos.
- ✓ A mi tutor, Andrés González, por haber contribuido en mi formación como estudiante y profesional, por su dedicación, su paciencia, por haberme enseñado mucho y estar siempre presente.
- ✓ A Carmen Rossini por su apoyo y su buena onda, por estar siempre disponible para ayudar y acompañar.
- ✓ A Viviana Heguaburu, David González y Beatriz Scatoni por aceptar ser miembros de mi tribunal de tesis. Sobre todo a Beatriz, quien me acompañó durante todo mi pasaje por el Laboratorio de Ecología Química, realizando aportes y enseñanzas muy valiosas.
- ✓ A Daniela Gamemara, por su confianza, por motivarme a iniciar trabajos en Facultad de Química y haberme dado un lugar en el Laboratorio de Ecología Química.
- ✓ A Horacio Silva, Adela Riberio, Viviana Heguaburu, Silvana Abbate, Enrique Castiglioni de la Estación Experimental Dr. Mario Cassinoni (EEMAC), por ayudar en la colocación de trampas de feromona de *Pseudaletia adultera* y realizar el seguimiento y mantenimiento, por su buena onda y su disposición.
- ✓ A Stella Zerbino, Mabel, Ximena y compañeros de INIA La Estanzuela, por abrirme sus puertas y recibirme cada semana, por ayudarme en la colocación de trampas de feromona y realizar el seguimiento, por su disposición y cordialidad.
- ✓ A los chicos del Laboratorio de Ecología Química, con quienes compartí muchísimos momentos lindos, algunos más duros y sobre todo mucho aprendizaje. En particular agradecer a:
 - Caro: Por apoyarme y ayudarme desde que inicié mi trabajo en el laboratorio
 - María Laura: Por ser mi compinche y compañera durante muchos años
 - Paula: Por ser quien inició los trabajos con *P. adultera*, siempre fue mi referente y me orientó durante todo el transcurso de la tesis, pensando juntas soluciones y alternativas a las dificultades enfrentadas.
 - Guille: Por haber desarrollado su tesis con *P. adultera*, compartimos muchos momentos, tareas y tropezones, gracias por la paciencia, el apoyo y por la buena onda.
- ✓ A mis padres, por su apoyo incondicional y por estar siempre, por haberme enseñado a ser como soy.
- ✓ A Fede, por ser mi compañero de vida y haberme apoyado en todo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	4
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas	8
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	9
Los insectos y su implicancia en la agricultura	9
Los insectos como plagas agrícolas.....	9
Sustancias químicas en el manejo de plagas	11
Semioquímicos y su aplicación en el manejo integrado de plagas agrícolas.....	14
Feromonas sexuales de lepidópteros	20
Caracterización química y emisión de la feromona sexual.....	21
Recepción de feromona sexual.....	23
<i>Pseudaletia adultera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	25
Objetivos	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos	27
Bibliografía	28
CAPÍTULO 2. Identificación de la feromona sexual de <i>P. adultera</i>	31
Materiales y métodos	31
Mantenimiento de cría de laboratorio	31
Obtención y análisis de glándulas de feromona	33
Estudio de respuesta electrofisiológica de machos.....	36
Resultados.....	38
Análisis de glándulas de feromonas.....	38
Respuesta electrofisiológica de machos.....	46
Discusión	49
Bibliografía	51
CAPÍTULO 3. Estudios comportamentales en laboratorio y capturas a campo	52
Materiales y Métodos.....	53
Respuesta comportamental de machos en laboratorio	53
Captura de machos en campo	55

Resultados.....	61
Respuesta comportamental de machos en laboratorio	61
Captura de machos en campo	64
Discusión	70
Bibliografía	72
CAPÍTULO 4. Conclusiones.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los semioquímicos, con ejemplos [Howse, P. E. 1998].....	14
Figura 2. <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae), especie que utiliza la primera feromona sexual identificada (izquierda). Estructura de los compuestos que forman parte de la feromona sexual de <i>B. mori</i> (derecha).	15
Figura 3. Ruta biosintética de feromonas de lepidópteros utilizando la síntesis de ácidos grasos, desaturación, acortamiento de cadena por enzimas específicas y/o modificación del carbono del grupo carbonilo para producir mezclas de ésteres de acetato, aldehídos o alcoholes especie-específicas que constituyen la feromona	22
Figura 4. Caja de adultos destinados para cría de <i>Pseudaletia adultera</i> , con abanicos de papel y germinadores de cebada para favorecer la postura de huevos. La dieta a base de agua miel se coloca en frascos con papel absorbente para permitir la succión por parte de los adultos	31
Figura 5. Recipientes cerrados con tul, donde se mantienen las pupas de <i>P. adultera</i> , separadas por sexo, hasta la emergencia de los adultos (Foto tomada por G. Rehmann).	32
Figura 6. Izquierda: Adulto hembra de <i>Pseudaletia adultera</i> en posición de llamada (izquierda). Se encuentra señalada la extrusión del ovipositor. Derecha: Glándula productora de feromona de hembras de <i>Pseudaletia adultera</i> . La glándula se encuentra entre el octavo y el noveno segmento abdominal, y su extrusión se logra mediante presión ejercida con la ayuda de pinzas entomológicas (Fotos tomada por G. Rehmann).	33
Figura 7. Reacción de derivatización de Z11-16:OAc con DMDS, resultando en el isómero treo	35
Figura 8. Antena entre electrodos en el sistema GC-EAD (Foto tomada por G. Rehmann).....	37
Figura 9. Cromatograma total de iones (TIC) de un extracto de 27 glándulas de adultos hembra de <i>P. adultera</i> , extraídas mecánicamente durante el período de llamada.....	38
Figura 10. Espectro de masas obtenido a partir del análisis del pico A, con $t_R = 20,5$ min, en el extracto de glándulas. Según la fragmentación observada, se identificó tentativamente como 11-hexadecen-1-ol.....	39
Figura 11. Espectro de masas obtenido a partir del análisis del pico B, con $t_R = 22,3$ min, en el extracto de glándulas. Según la fragmentación observada, se identificó tentativamente como acetato de 11-hexadecen-1-ilo	39
Figura 12. Cromatograma de iones totales (TIC) de Z11-16OH (arriba) y del resultante de la derivatización del Z11-16OH (abajo).....	42
Figura 13. Cromatograma de iones totales (TIC) de E11-16OH (arriba) y del resultante de la derivatización del E11-16OH (abajo).....	42
Figura 14. Cromatograma de iones totales (TIC) de Z11-16OAc (arriba) y del resultante de la derivatización del Z11-16OAc (abajo)	43
Figura 15. Espectro de masas del compuesto resultante de la derivatización del Z11-16OH (idéntico al del producto de derivatización del E11-16OH).....	43
Figura 16. Espectro de masas del compuesto resultante de la derivatización del Z11-16OAc	44
Figura 17. Fragmentación del aducto entre Z11-16:OAc y disulfuro de dimetilo.....	44
Figura 18. Fragmentación propuesta para el Z11-16:OH derivatizado con DMDS.....	45
Figura 19. GC-Electroantenograma de antenas de machos de <i>P. adultera</i> (n = 9) frente a extracto de glándulas. Se indican los compuestos identificados por GC-MS, las amplitudes de las señales y los tiempos de retención.....	46
Figura 20. Electroantenograma de antenas de machos de <i>P. adultera</i> (n = 9) frente a la mezcla de estándares sintéticos conteniendo Z11-16Ald ($t_R=19,91$ min CW; $t_R=19,22$ min DB5), Z11-16OH ($t_R=21,69$ min CW; $t_R=20,12$ min DB5), Z11-16OAc ($t_R=19,01$ min CW; $t_R=21,91$ min DB5), 10 ppm, relación 1:1:1 en columna Carbowax (arriba) y columna DB5 (abajo).....	48
Figura 21. Túnel de viento, por el cual circula un flujo regulado de aire laminar, limpio (carbón activado). En el túnel de viento se realizan ensayos de comportamiento con machos de <i>P. adultera</i> para evaluar su respuesta (vuelo a contraviento en dirección a la fuente de olor) frente a distintos estímulos químicos volátiles.....	53

Figura 22. Estructura de trampas delta. La estructura es hueca y se coloca en el centro el estímulo atrayente, colgando de un alambre. Los estímulos químicos fueron colocados en septos de goma (arriba). Los estímulos vivos (hembras de <i>P. adultera</i>) fueron colocadas en un cilindro transparente abierto, cubierto con tul en los extremos (abajo).....	56
Figura 23. Disposición de un bloque de trampas delta en cultivos en la estación experimental EEMAC, Paysandú (izq.); esquema mostrando la disposición de los bloques y distancias (der)	57
Figura 24. Trampa tipo “bucket”, específica para noctuideos.	58
Figura 25. Ubicación de las trampas del segundo ensayo en la Estación INIA La Estanzuela, Colonia. Se utilizaron los alambrados para la colocación de las trampas.	59
Figura 26. Capturas de adultos de <i>P. adultera</i> en trampa de luz, ubicada en INIA La Estanzuela.....	59
Figura 27. Imagen aérea de la zona de colocación de trampas del tercer ensayo, en la Estación INIA La Estanzuela, Colonia, en cultivos de avena y raigrás (izq.). Las áreas elegidas para disponer las trampas se encuentran señaladas, así como su distribución en el cultivo.....	60
Figura 28. Respuesta comportamental (vuelo en pluma) de machos de <i>P. adultera</i> en túnel de viento frente a diferentes fuentes de olor: hexano (control), hembras vírgenes llamando y 10 ng de mezclas de compuestos sintéticos, en las proporciones indicadas en el gráfico (n: número de machos evaluados, letras diferentes indican diferencias significativas entre pares de tratamientos: test de χ^2 ; $P < 0,05$).....	62
Figura 29. Respuesta comportamental (llegada a la fuente) de machos de <i>P. adultera</i> en túnel de viento frente a diferentes fuentes de olor: hexano (control), hembras vírgenes llamando y 10 ng de mezclas de compuestos sintéticos en las proporciones indicadas en el gráfico (n: número de machos evaluados, letras diferentes indican diferencias significativas entre pares de tratamientos: test de χ^2 ; $P < 0,05$).....	63
Figura 30. N° de adultos de machos de <i>Pseudaletia adultera</i> capturados en cada revisión semanal, en ensayo de campo en Paysandú (EEMAC), utilizando como estímulos químicos el componente que elicitaba la mayor respuesta de la antena de machos de <i>P. adultera</i> (Z11-16OH), mezclas ternarias (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, dos proporciones diferentes 95:5:1 y 70:30:30), el disolvente de las mezclas como control negativo, y hembras vivas de <i>P. adultera</i> como control positivo.....	64
Figura 31. Capturas promedio y acumuladas de machos de <i>Pseudaletia adultera</i> en ensayo de campo en Paysandú (EEMAC), utilizando como estímulos químicos el componente que elicitaba la mayor respuesta de la antena de machos de <i>P. adultera</i> (Z11-16OH), mezclas ternarias (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, dos proporciones diferentes 95:5:1 y 70:30:30), el solvente de las mezclas como control negativo, y hembras vivas de <i>P. adultera</i> como control positivo.	65
Figura 32. Trampas delta con capturas de adultos machos de <i>P. adultera</i> en campos de avena, utilizando como estímulos diferentes mezclas químicas colocadas en septos de goma (izquierda) y hembras vivas de <i>P. adultera</i> colocadas en tubos transparentes abiertos cubiertos con tul (derecha).....	65
Figura 33. N° de adultos de machos de <i>Pseudaletia adultera</i> capturados en cada revisión semanal, en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2014), utilizando como estímulos químicos el componente que elicitaba la mayor respuesta de la antena de machos de <i>P. adultera</i> (Z11-16OH), una mezcla ternaria (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporción 95:5:1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.	66
Figura 34. Capturas promedio y acumuladas de machos de <i>Pseudaletia adultera</i> en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2014), utilizando como estímulos químicos el componente que elicitaba la mayor respuesta de la antena de machos de <i>P. adultera</i> (Z11-16OH), una mezcla ternaria (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporción 95:5:1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.	67
Figura 35. N° de adultos de machos de <i>Pseudaletia adultera</i> capturados en cada revisión semanal, en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2015), utilizando como estímulos químicos dos mezclas ternarias, para las cuales se obtuvo mayor respuesta en túnel de viento (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporciones	

95:5:1 y 95:5:0,1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.	68
Figura 36. Capturas promedio y acumuladas de machos de <i>Pseudaletia adultera</i> en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2014), utilizando como estímulos químicos dos mezclas ternarias, para las cuales se obtuvo mayor respuesta en túnel de viento (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporciones 95:5:1 y 95:5:0,1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Cálculo de índice de retención de Kovats de los picos identificados en el cromatograma del extracto de glándulas de <i>P. adultera</i>	40
Tabla 2. Proporción relativa, medida como área total en GC-FID, de los tres compuestos candidatos a formar la feromona sexual de <i>P. adultera</i> , obtenidos en el análisis por cromatografía gaseosa de extractos de glándulas	41

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

LOS INSECTOS Y SU IMPLICANCIA EN LA AGRICULTURA

Los invertebrados constituyen el 95% de las especies conocidas de animales, siendo su distribución geográfica la más diversa. Dentro del Filo Arthropoda encontramos la Clase Insecta; considerada como la más evolucionada dentro del Filo. Se estima que se conocen más de un millón y medio de especies de insectos, siendo el grupo más diverso de organismos eucariotas. Aproximadamente la mitad de las especies de insectos son herbívoros, y es dentro de esta clase que se encuentra el mayor número de especies consideradas plagas agrícolas [Gallo *et al.* 2002].

Los insectos como plagas agrícolas

Desde los inicios de la práctica de la agricultura, hace alrededor de 10000 años [Oerke, E. C. 2006], los agricultores se han enfrentado a diversos problemas causantes de pérdidas en los cultivos. Los organismos dañinos que generan estas pérdidas se agrupan en factores bióticos, tales como insectos plaga, fitopatógenos y malezas (causantes de enfermedades); y factores abióticos, siendo los más relevantes la disponibilidad de agua, temperatura y fuentes de nutrientes. [Oerke, E. C. 1994]

El perjuicio económico causado por los insectos está dado por diversas variables, tales como la densidad poblacional de la plaga, la duración del ataque y la estructura u órgano vegetal atacado. Del total de las especies de insectos descritas hasta la actualidad, se estima que un 10 % constituyen plagas agrícolas [Gallo *et al.* 2002], siendo las causantes de hasta un 15 % de las pérdidas mundiales en cultivos [Gupta, D. 2004].

Los daños causados por los insectos se dividen en daños directos, cuando atacan el producto a comercializar, o indirectos, cuando atacan estructuras vegetales que no son comercializadas pero que afectan los procesos fisiológicos de la planta, y por ende afectan el rendimiento. Otro daño indirecto es la transmisión de patógenos, en especial virus, y la facilitación del desarrollo de bacterias y hongos en los tejidos vegetales dañados por la alimentación.

Se atribuye al ataque de los insectos en los cultivos la disminución del contenido de ingredientes esenciales; esto reduce el valor del producto en el mercado, afecta el tiempo de conservación y favorece la contaminación del producto con sustancias generadas por las plagas o productos utilizados para erradicarlas. Las pérdidas cuantitativas refieren a la disminución del rendimiento del cultivo por unidad de área [Oerke, E. C. 2006]. Las pérdidas de la cosecha pueden expresarse en términos absolutos (kg/há, pérdida económica/há) o en términos relativos (expresado en %) del rendimiento esperado o del rendimiento real en las condiciones del cultivo.

Los daños y pérdidas causados por diversas plagas en cultivos deben ser minimizados hasta un nivel aceptable mediante medidas de protección; estas medidas pueden ser físicas (por ejemplo, desmalezado), biológicas y culturales (rotación de cultivos, elección de cultivos linderos, antagonistas, predadores, entre otros) o químicas (pesticidas). Estas medidas pueden adoptarse solas o combinadas, en lo que resulta el Manejo Integrado de Plagas. El Manejo Integrado se ve optimizado con el conocimiento y cuantificación de los umbrales de daño¹ y de riesgo, así como la ecología de las especies involucradas.

¹ El umbral de daño se define como: «la población que produce un daño igual al costo de prevenir el mismo» (Manejo de plagas en pasturas y cultivos, Serie Técnica No 112, Ed. Zerbino, M. S.; Ribeiro, A. 2000. INIA).

Sustancias químicas en el manejo de plagas

La presencia de plagas agrícolas es un factor importante en la reducción de la productividad de los cultivos, lo que ha generado que los productores busquen continuamente métodos para reducir las pérdidas en la producción y proteger a los cultivos de estos organismos dañinos.

En sus principios, el control de malezas e insectos plaga dependía de la eliminación manual o mecánica de las malezas y la recolección de larvas en los cultivos. Otros organismos dañinos, como son los microorganismos o especies cuyo daño no se manifiesta de forma visible, difícilmente eran detectados y por lo tanto no se contaba con métodos para su control, más que la elección de variedades resistentes. [Oerke, E. C. 2006; Russel, P. E. 2005].

Los primeros métodos de control de plagas y enfermedades que involucraron sustancias químicas datan del año 2500 AC, los sumerios fueron los pioneros en el uso de fuentes naturales conteniendo compuestos sulfurados para el control de insectos y ácaros. En el 1200 AC, aparecen en China los insecticidas botánicos para el tratamiento de semillas y para el uso como fungicidas. Posteriormente, se descubrieron otros insecticidas de origen botánico que contenían nicotina, piretro, rotenona, entre otros, los cuales actúan a nivel respiratorio o del sistema nervioso central. Las desventajas de estos insecticidas botánicos incluyen su baja disponibilidad, ser fotolábiles y requerir numerosas aplicaciones para asegurar su eficacia, lo cual los hacía muy costosos. Por lo anteriormente mencionado estos insecticidas no generaron un gran impacto en la agricultura [Gupta, 2004, Russel, P. E. 2005].

El siguiente nivel en la aplicación de control químico data del año 1865, e involucra compuestos químicos sintéticos. El primer insecticida conocido es el Verde de París (acetoarsenito de cobre, $\text{Cu}_3\text{As}_2\text{O}_3\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), se comercializó inicialmente en 1814 como pigmento para tintas, debido su color verde intenso. Tras atribuirse a este compuesto el envenenamiento de algunas personas que pintaban cuadros, se prohibió su empleo como tinte y no fue hasta el año 1867 que comenzó a emplearse como insecticida. Fue ampliamente aplicado con éxito en el control del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata*, en Colorado, Estados Unidos. Años después fue prohibido, debido a su alta residualidad, su característica de ser venenoso para seres humanos y presentar toxicidad en mamíferos [Gupta, 2004].

Los insecticidas basados en compuestos orgánicos retomaron importancia y protagonismo con la aparición del DDT (diclorodifeniltricloroetano), sintetizado por Zeidler en 1874. Los primeros usos de este compuesto se relacionaron con el control de la malaria durante la Segunda Guerra Mundial [Gupta, D. 2004]; años después, Paul Müller descubrió su actividad insecticida, lo cual le mereció un Premio Nobel en 1948. En los años subsiguientes surgieron una variedad de compuestos organoclorados, los cuales tuvieron un alto impacto debido a su eficacia y persistencia en el ambiente. Sin embargo, poco tiempo después se vieron reflejados sus efectos adversos, como residuos en los alimentos debido al bajo grado de biodegradación, contaminación de

aguas subterráneas, aparición de resistencia por parte de los insectos diana, biomagnificación² y reaparición de plagas [Jones, O. T. 1998; Gupta, D. 2004]. La magnitud de los efectos adversos fomentó la regulación legal y la restricción del uso de ciertos pesticidas sintéticos en la década de 1950 [Russel, P. E. 2005].

Favorecido por este escenario, se introdujo una nueva generación de insecticidas de la familia de los compuestos organofosforados: ésteres del ácido fosfórico (actúan mediante inhibición de la acetilcolinesterasa, causando convulsiones y luego la muerte); carbamatos (ésteres del ácido carbámico; actúan así mismo inhibiendo la acetilcolinesterasa); y piretroides (compuestos lipofílicos análogos sintéticos de la piretrina; actúan sobre el sistema nervioso). Estos insecticidas se caracterizan por presentar menor residualidad que los organoclorados, pero son así mismo tóxicos para el ser humano y organismos benéficos [Ghanim, M. & Ishaaya, I. 2010; Gupta, D. 2004].

El uso de pesticidas ha aumentado drásticamente desde los inicios de la década de 1960, acompañado de un incremento (por un factor >2, entre 1960 y 2004) en la producción mundial de trigo, arroz y maíz, los cuales, junto a la cebada, abarcan casi el 40% de la producción mundial y son la mayor fuente de nutrientes para el ser humano [Oerke, E. C. 2006; Tilman, D. 1999]. Sin embargo, el uso de pesticidas no ha logrado disminuir las pérdidas por daños ocasionados por plagas, sino que la proporción global de pérdidas en cultivos ha aumentado.

Las causas de este fenómeno incluyen: i) uso inapropiado o excesivo de pesticidas, el cual puede perjudicar enemigos naturales, generando la reaparición de plagas controladas naturalmente; ii) reducción en la rotación de cultivos, lo cual disminuye la disponibilidad de nutrientes y aumenta la inoculación de plagas en las capas superficiales del sustrato [Tilman, D. 1999; Oerke, E. C. 2006]; iii) expansión de los cultivos a áreas menos apropiadas, con el fin de aumentar la producción; esto favorece la dispersión de plagas y su incidencia en áreas sin restricciones naturales (clima, enemigos naturales, entre otros); iv) establecimiento de estándares de calidad más estrictos para los alimentos, disminuyendo el rendimiento de la producción por no alcanzar los estándares establecidos; v) generación de resistencia a los insecticidas por parte de los insectos plaga [Oerke, E. C. 2006].

La resistencia a los pesticidas por parte de los insectos ocurre principalmente por dos mecanismos: modificación de su comportamiento o modificación de su fisiología. Los mecanismos de resistencia comportamentales involucran la evasión de las sustancias tóxicas de la planta durante la ingesta mediante la elección de la fuente de alimentación; mecanismo que les permite una exposición nula o en concentraciones subletales del insecticida. La resistencia mediante una alteración fisiológica o genética, se divide en dos grandes clases: alterando el sitio de unión en el que el químico actúa o incrementando el metabolismo de detoxificación; la combinación de ambos mecanismos provee gran resistencia a uno o más compuestos químicos. El aumento en

² La biomagnificación incluye los procesos de bioconcentración (adsorción de un contaminante por organismos acuáticos donde el agua es la única fuente contaminante) y bioacumulación (adsorción de un contaminante proveniente tanto del agua como fuentes de la dieta) que resultan en un aumento en las concentraciones tisulares de un contaminante, a medida que pasa por dos o más niveles tróficos [Suedel, B. C. *et al.* 1994]

la excreción, la cual favorece el transporte del pesticida por el tracto digestivo, es asimismo un posible mecanismo de resistencia [Ghanim, M. & Ishaaya, I. 2010].

En la actualidad, se estima que entre el 97 y el 99 % de los insecticidas aplicados no alcanza la especie diana y se pierde en el ambiente (aire, suelo y agua) [Gupta, D. 2004; Barg, R. & Queirós, F. 2007]. Se ha reportado que, en Uruguay, la importación de plaguicidas aumentó un 350 % desde el año 1997 hasta el 2005, aplicándose en la actualidad más de 10 millones de kilos de plaguicidas por año [Barg, R. & Queirós, F. 2007].

En un estudio llevado a cabo en el año 2004 por la Intendencia Municipal de Montevideo, junto a la Cátedra de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía y la Comisión Administradora del Mercado Modelo, se analizaron 200 muestras de las principales frutas y hortalizas con el fin de determinar contaminación de plaguicidas, encontrándose residuos mayores a los límites máximos de residuos establecidos (LMR) en aproximadamente el 7 % de las muestras analizadas y en un 65 % se encontraron residuos por debajo de los LMR, en algunos casos, se encontraron residuos de más de un agrotóxico [Barg, R. & Queirós, F. 2007].

En las últimas tres décadas, se ha progresado notoriamente en la investigación y desarrollo de insecticidas: IGR's (de la denominación en inglés: Insect Growth Regulators). Estos compuestos químicos se caracterizan por interferir en el desarrollo y crecimiento normal del insecto, como son los inhibidores de la síntesis de quitina, miméticos de la hormona juvenil y agonistas de la ecdisona [Gupta, D. 2004; Ghanim, M. & Ishaaya, I. 2010]. Se han desarrollado también compuestos que actúan de forma selectiva en grupos de insectos, mediante la inhibición o el aumento de actividad bioquímica (por ejemplo, la respiración) y mediante la activación del receptor de acetilcolina (neonicotinoides) o del receptor GABA (avermectinas). Los insecticidas selectivos que permiten minimizar el efecto negativo sobre enemigos naturales y son amigables con el medio ambiente se clasifican como insecticidas bioracionales [Ghanim, M. & Ishaaya, I. 2010]. Los mismos han sido incorporados en programas de control de plagas, con el fin de ralentizar la aparición de resistencia por parte de las especies diana. Tal como fue mencionado anteriormente, se demostró que un gran número de especies plaga ha desarrollado resistencia hacia la mayor parte de los insecticidas convencionales y, en las últimas décadas, se ha descubierto que también han desarrollado resistencia a estos insecticidas más nuevos (neonicotinoides e IGR's) [Ghanim, M. & Ishaaya, I. 2010].

Los efectos negativos del uso de insecticidas sintéticos en la salud, el medio ambiente y los organismos que viven en él, fomentan la búsqueda y desarrollo de estrategias alternativas para el control de plagas, siendo un aspecto fundamental la educación de agricultores y otras partes involucradas en la importancia de implementar estrategias de control a largo plazo, capaces de sostener la producción requerida, preservando el ecosistema [Tilman, D. 1999; Gupta, D. 2004].

Semioquímicos y su aplicación en el manejo integrado de plagas agrícolas

El comportamiento de los insectos es en gran medida mediado por compuestos químicos presentes en el ambiente, provenientes de otros organismos. Los compuestos involucrados en esta modalidad de comunicación o percepción del medio se denominan semioquímicos [Malo, E. A. 2008; Gupta, D. 2004; Wyatt, T. D. 2003]. Si bien este concepto aplica a todos los organismos, incluyendo el ser humano, es en los insectos que cobra una dimensión realmente importante. Estos compuestos pueden actuar sobre el comportamiento como atrayentes o repelentes, o pueden generar una alteración fisiológica en el organismo receptor. Los semioquímicos se dividen en intraespecíficos (comunicación entre organismos de la misma especie) denominados feromonas, e interespecíficos (organismos de especies diferentes), denominados aleloquímicos (Figura 1).

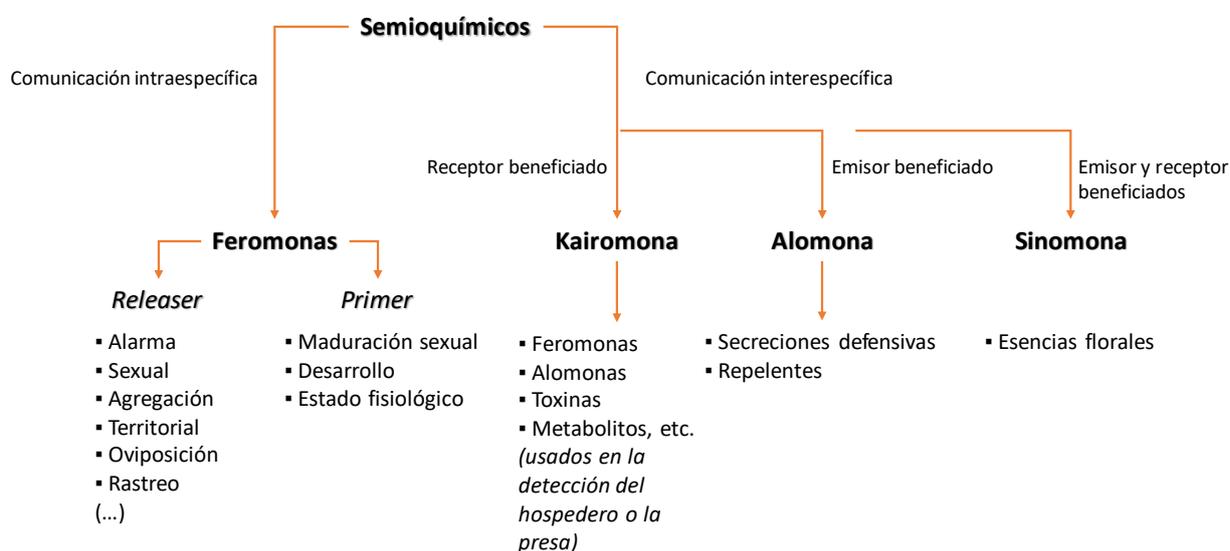


Figura 1. Clasificación de los semioquímicos, con ejemplos [Howse, P. E. 1998]

Las feromonas pueden ser clasificadas según el efecto en el receptor, las feromonas “releaser” son aquellas que causan una alteración inmediata en el comportamiento del organismo receptor; las feromonas “primers” producen un cambio en el desarrollo del organismo (por ejemplo, la maduración sexual).

El término aleloquímico fue propuesto por Whittaker [Malo, E. A. 2008]; y se subdivide en tres categorías: aquellos compuestos cuya emisión favorece al organismo emisor pero perjudican al receptor, se denominan alomonas (por ejemplo, secreciones de defensa); las kairomonas son aleloquímicos cuya percepción beneficia al organismo receptor y afecta negativamente al organismo emisor (por ejemplo, compuestos que pueden ser percibidos por predadores o parásitos); las sinomonas, son aquellos compuestos químicos involucrados en la comunicación que benefician tanto al emisor como al receptor [Howse, P. E. 1998; Gupta, D. 2004; Malo, E. A. 2008].

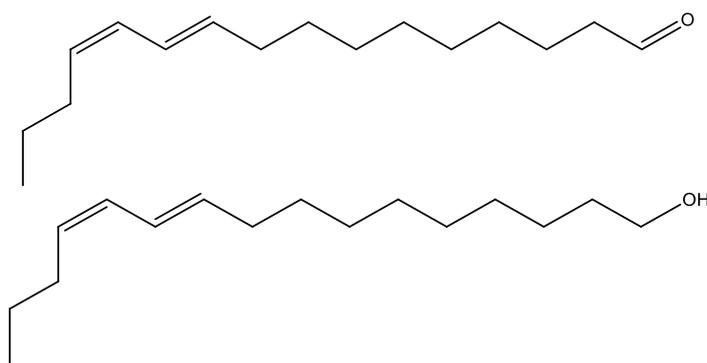
La clasificación de los semioquímicos en función de su rol en interacciones específicas puede generar que un mismo compuesto químico cumpla diferentes roles dependiendo de la interacción en estudio. Existen ejemplos de feromonas que actúan como kairomonas, ya que son utilizadas por predadores o parásitos para encontrar a su presa [Grasswitz, T. R. 2003].

El término feromona proviene del griego «*Pherein*», acarrear y «*hormon*», excitar o estimular y fue propuesto en el año 1959 por Peter Karlson y Martin Lüscher [Karlson, P. & Lüscher, M. 1959] para definir sustancias químicas de animales.

La primera feromona sexual fue químicamente identificada por el científico alemán Adolf Butendandt, denominada bombicol [(*E,Z*)-10,12-hexadecadien-1-ol]; feromona sexual de la especie *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), conocida como gusano de seda [Malo, E. A. 2008]. Fueron necesarios 20 años y medio millón de hembras para elucidar la estructura química de esta feromona. Desde entonces, numerosas especies han sido estudiadas en relación a la naturaleza química de estos compuestos, los mecanismos de biosíntesis y la naturaleza molecular del proceso de percepción y transducción de las señales una vez que el órgano sensorial detecta la feromona. [Malo, E. A & Rojas, J. D. 2012].



Bombyx mori (Lepidoptera, Bombycidae, Bombycinae, Bombycini)



Feromona sexual emitida por hembras de *B. mori*: (*E,Z*)-10,12-Hexadecadienal (arriba) y (*E,Z*)-10,12-Hexadecadien-1-ol (abajo)

Figura 2. *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), especie que utiliza la primera feromona sexual identificada (izquierda). Estructura de los compuestos que forman parte de la feromona sexual de *B. mori* (derecha).

El origen del uso de semioquímicos (feromonas y kairomonas) en estrategias de manejo de insectos plaga data de varias décadas; su modo de acción involucra la modificación del comportamiento de la especie diana y pueden ser utilizados solos o en conjunto con otros compuestos que sean tóxicos o adhesivos. Un ejemplo clásico del uso de semioquímicos como disruptores del comportamiento es el uso de feromonas sexuales, aplicado con el fin de interferir en el desarrollo normal de la comunicación para el encuentro sexual, disminuyendo el encuentro sexual y por lo tanto la tasa de reproducción [Raguso et al. 2015].

Los beneficios en el uso de feromonas están dados por sus características de ser inocuas para el medio ambiente y para otras especies no diana [Howse, P. E. 1998]; ser especie-específicas, lo que las hace efectivas en bajas concentraciones, y muy sensibles, capaces de detectar presencia de insectos en poblaciones bajas. Las

feromonas pueden ser utilizadas en diversas estrategias de manejo de poblaciones, las que incluyen monitoreo, trampeo masivo, confusión sexual, o en combinación con insecticidas (atractivos o “attract and kill”).

La detección y monitoreo poblacional de especies mediante feromonas sexuales son los métodos más utilizados a nivel mundial y su eficiencia ha sido demostrada para decenas de especies [Witzgall et al. 2010]. Las capturas en trampas de feromonas muestran de forma precisa cuándo una especie está presente y/o cuándo aumenta su densidad poblacional, pudiendo detectar picos de vuelo de adultos. En ciertas condiciones, los datos de capturas se utilizan de modo predictivo, pudiendo correlacionar la densidad de las capturas con la abundancia y/o el daño que producirá la próxima generación de larvas y así establecer umbrales de daño.

De esta manera, los sistemas de monitoreo mediante feromonas proveen una herramienta para definir el momento más adecuado para la aplicación de insecticidas o liberación de agentes de control biológico, disminuyendo de forma significativa el uso preventivo de los mismos y pudiendo mantener las poblaciones por debajo del umbral de daño [Birch, M. C. 1974; Malo, E. A. 2008; Witzgall et al. 2010; Gupta, D. 2004; Howse P. E. 1998]. El monitoreo puede ser utilizado así mismo para verificar la efectividad luego de la aplicación de medidas de control [Grasswitz, T. R. 2003].

Una de las primeras feromonas utilizadas en el monitoreo fue la feromona sexual de *Lymantria dispar*, la polilla gitana asiática, una importante plaga forestal invasora en América del Norte. El extracto crudo de segmentos terminales del abdomen de este insecto fue colocado en trampas para monitorear la distribución de la especie en grandes áreas de Estados Unidos. Luego de 30 años, en 1970, la feromona sexual fue aislada, identificada y sintetizada [Gupta, D. 2004]. Desde entonces, la aplicación de feromonas en el manejo de plagas (agrícolas, hortícolas, forestales, de productos almacenados) ha ido en aumento en las últimas décadas [Witzgall et al. 2010].

El éxito en el uso de feromonas implica contar con un amplio conocimiento de diversos aspectos de la biología del insecto, tales como el número de generaciones por temporada, la duración del ciclo de vida y su relación con la temperatura; por otro lado, es importante conocer aspectos fenológicos del cultivo en relación al ataque del insecto, así como la formulación adecuada de la feromona sintética.

Los sistemas de monitoreo implican la aplicación de la feromona en una matriz inerte (liberador o dispensador), dentro de una trampa adecuada a la especie a monitorear. Esta trampa contiene incorporado un método para retener a los insectos atraídos, el cual puede ser removido y sustituido cuando se requiera, de modo de evitar la disminución en la efectividad de la trampa por la saturación del sistema de retención [Grasswitz, T. R. 2003].

Los dispensadores son dispositivos que liberan la feromona de forma controlada. Existe una amplia variedad de dispensadores, pudiendo estar constituidos por septos de goma, viales de polietileno o sistemas de tecnología más avanzada, como fibras, sistemas poliméricos, entre otros. El objetivo de la liberación controlada es disminuir la tasa de liberación de la feromona, de modo de cubrir el período activo de los insectos. Los sistemas

convencionales no tienen una tasa de liberación constante, sino que tienden a liberar mayores cantidades de feromona cuando son recién instalados en campo y menor cantidad a medida que transcurren las semanas (liberadores de primer orden) [Jones, O. T. 2009].

Una desventaja de los emisores más comúnmente usados es la liberación continua de feromona, siendo efectiva para la captura de insectos únicamente en un período definido de tiempo (durante el cual la especie es sexualmente activa). Existen “emisores inteligentes” que pueden ser programados para liberar la feromona en el período que los insectos se encuentran activos, disminuyendo los costos del sistema de monitoreo [Malo, E. A. 2008].

Las feromonas sexuales pueden asimismo ser utilizadas como un método de control de plagas por sí mismas; este método data del año 1960, cuando se postuló la primera idea para utilizar atrayentes sexuales como bloqueador del canal de comunicación entre el macho y la hembra [González et al. 2012]. Este mecanismo se conoce hoy en día como confusión o disrupción sexual y es la estrategia de control de plagas mediante feromonas más ampliamente utilizada a nivel mundial [Witzgall et al. 2010].

La confusión sexual consiste en recargar el ambiente con grandes cantidades de feromona sexual sintética, de modo que la señal emitida por hembras llamando a los machos quede camuflada, desorientando a los machos y de esta forma retrasa o reduce el encuentro sexual y por lo tanto la reproducción de la especie [Gupta, D. 2004]. Los mecanismos específicos que resultan en el éxito de la confusión sexual son diversos, e incluyen: i) el camuflaje de la pluma de feromona natural en el ambiente, debido a las altas concentraciones de feromona sintética; ii) la desensibilización o habituación, producida por la exposición continua a altas concentraciones de feromona (fenómeno que ocurre a nivel del sistema nervioso central); iii) adaptación de los receptores sensoriales de las antenas de machos debido a la estimulación constante y repetitiva y iv) desbalance sensorial, que ocasiona una inhibición del mecanismo de orientación debido a la alteración de la proporción natural de los componentes de la feromona por la presencia de uno o más componentes sintéticos. Mientras estos mecanismos no implican una competencia con la feromona natural (mecanismos no competitivos), se postula también que el seguimiento de pistas falsas por parte de los machos, con el consiguiente agotamiento energético, podría ser un mecanismo competitivo que contribuye a la eficacia del método [Howse, P.E. 1998; González et al. 2012; Grasswitz, T. R. 2003].

La efectividad de la confusión sexual radica en que una proporción sustancial de la población de machos no consiga copular a las hembras; para ello, los dispensadores de feromonas deben ser colocados en una proporción mucho mayor que para el caso de monitoreo poblacional. En esta metodología no es necesario el uso de la composición exacta de la feromona sexual, ya que el componente mayoritario o una mezcla simplificada pueden alcanzar el efecto deseado. Aunque es una metodología muy exitosa para algunas plagas, existen algunas desventajas o desafíos que deben considerarse; entre ellos, cabe destacar que el uso continuado de una mezcla simplificada (diferente a la mezcla natural) puede perder efectividad, debido a la

adaptación de los machos a encontrar a la hembra en presencia de mayores concentraciones de uno o algunos de los componentes de la feromona [Mochizuki et al. 2002]. Así mismo, se requiere el uso de mayores cantidades de feromona (con respecto al uso en monitoreo) para lograr la interrupción de la comunicación sexual (del orden de 1 ng/m^3), lo cual repercute en el costo. Finalmente, la metodología es más eficiente cuando se aplica con cargas bajas iniciales de la plaga y en grandes áreas para minimizar la relación área/borde, la cual define la probabilidad del ingreso de hembras copuladas al área tratada [Grasswitz, T. R. 2003].

El control de plagas utilizando feromonas también puede realizarse mediante atracticidas. En esta estrategia, la formulación del dispositivo contiene la feromona e insecticidas de contacto, con lo cual una vez que el insecto tiene contacto con la fuente emisora muere, queda estéril o absorbe dosis letales, que disminuyen su capacidad de encontrar a la hembra [Grasswitz, T. R. 2003]. Esta estrategia permite la aplicación de insecticidas únicamente a la especie diana, sin afectar enemigos naturales. Una variación de este método es el uso de atrayentes para concentrar las poblaciones de insectos a un área restringida, donde se trata con insecticidas convencionales o control biológico.

En esta metodología también es de vital importancia la formulación de la feromona, ya que es un método competitivo que debe asegurar el contacto del insecto con la fuente emisora. Es fundamental que el insecticida no tenga un efecto repelente y debe causar un efecto tóxico inmediato por contacto. Una gran dificultad que presenta esta metodología es la de optimizar la cantidad de feromona e insecticida adecuada, de modo que sea lo suficientemente baja para no atraer insectos de fuera del área tratada, y que no actúe como mecanismo de confusión sexual pero que sea lo suficientemente alta que asegure la competitividad con las hembras presentes [González et al. 2012].

El trapeo masivo es otra estrategia de control basada en semioquímicos, cuyo objetivo es atraer una proporción suficientemente grande de la población de insectos plaga, de modo de reducir los daños en el cultivo hasta un nivel aceptable. En esta estrategia se pueden utilizar de atrayentes para ambos sexos (feromonas de agregación, cebos alimenticios), reduciendo de forma efectiva el nivel poblacional, o feromonas sexuales, aunque éstas limitan la metodología ya que atraen únicamente uno de los sexos, generalmente los machos en el caso de lepidópteros. El trapeo masivo se ha desarrollado en mayor medida para coleópteros, los cuales segregan feromonas de agregación [Grasswitz, T. R. 2003]. Los atrayentes se colocan en trampas que contienen un adhesivo, un depósito de agua u otro medio que retiene al insecto atraído. Este método debe ser optimizado de forma que todos los insectos atraídos sean capturados en las trampas, de lo contrario, el efecto puede ser el inverso, ya que se atraen insectos desde fuera del área tratada y resulta en un aumento en la densidad poblacional.

A nivel mundial, el mercado internacional de semioquímicos ha crecido de manera constante en las últimas dos décadas, en proporciones mayores al 10 % por año [Jones, O. 2009]. Datos relativos de los mercados mundiales indican que el dinero destinado en semioquímicos alcanza los 250 millones de dólares, constituyendo cerca del

3% del mercado total de productos para el control de plagas, para el tratamiento de aproximadamente 750.000 hectáreas.

Las trampas más utilizadas en el monitoreo de especies plaga son las trampas basadas en feromonas, trampas con atrayentes alimenticios y de oviposición [Grasswitz, T. R. 2003]. Las especies ampliamente monitoreadas mediante semioquímicos incluyen plagas forestales (*Lymantria dispar* y otros escarabajos de corteza del género *Ips*), polillas de la fruta (*Cydia pomonella*, *Grapholita molesta*, *Anarsia lineatella*), plagas de viña (*Lobesia botrana*, *Eupoecilia ambiguella*), plagas de algodón (*Pectinophora gossypiella*, *Anthonomus grandis*) y variedad de especies de moscas de la fruta (*Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera oleae*) [Jones, O. 2009].

En Uruguay, la utilización de feromonas en el monitoreo de insectos plaga se inició a fines de los años setenta, y casi 10 años después se iniciaron las primeras investigaciones para el control de insectos mediante confusión sexual. Sin embargo, la aplicación de feromonas en manejo integrado de plagas se ha visto limitada a especies de amplia distribución e importancia económica internacional, cuyas feromonas han sido identificadas en otros países (por ejemplo, *Cydia pomonella* y *Cydia molesta*) [Núñez, S. 1999]. Existen, sin embargo, plagas locales o regionales con alta incidencia económica, como es el caso de *Pseudaletia adultera*, para las cuales no se han identificado sus feromonas, dificultando el desarrollo de estrategias alternativas de manejo.

FEROMONAS SEXUALES DE LEPIDÓPTEROS

El orden Lepidoptera se caracteriza por ser uno de los que presenta mayor diversidad y éxito evolutivo, incluyendo al menos 150.000 especies descritas de polillas (Lepidoptera: Heterocera) y mariposas (Lepidoptera: Rhopalocera) [Ando *et al.* 2004]. El éxito en la diversificación puede ser explicado por la eficaz explotación de los recursos y la variedad de hospederos que frecuentan como fuentes de alimentación, así como a su sistema de apareamiento mediado por feromonas sexuales de larga distancia. Además de permitir la reproducción en condiciones de poblaciones bajas, la comunicación mediante feromonas sexuales actúa como un mecanismo de aislamiento reproductivo muy eficiente, ya que el receptor presenta un alto nivel de sensibilidad a la feromona mediante receptores específicos desarrollados, y la feromona se caracteriza por ser una mezcla de composición específica y estable, presentando una gran variabilidad estructural en los compuestos que la componen [Strandh, M. 2005; Wyatt, T. 2003].

Los componentes de la feromona sexual se dividen en dos clases: Componentes primarios y secundarios. Los componentes primarios son aquellos compuestos químicos emitidos por un insecto que elicitan una anemotaxis a contraviento de larga distancia en el organismo receptor. En algunas especies, el componente primario es suficiente para elicitación toda la secuencia comportamental que lleva a la cópula. En otros casos, el o los compuestos primarios se definen como aquellos compuestos necesarios para la captura en trampas en un ensayo a campo a una concentración similar a la emitida por el insecto. Los compuestos secundarios se definen como aquellos compuestos emitidos por un insecto que no son esenciales para elicitación la anemotaxis a contraviento, pero en combinación con los compuestos primarios permiten completar la secuencia comportamental que lleva a la cópula. En general, son responsables por inducir respuestas de corto alcance, tales como aterrizaje en la fuente emisora, movimiento de alas, muestra del "cepillo" ("*hairpencils*" su nombre en inglés) e intentos de cópula. Los compuestos secundarios se definen asimismo como aquellos que aumentan las capturas en trampa en ensayo a campo cuando se combinan con el o los compuestos primarios. Existen además otras pistas no químicas como estímulo visual, táctil y auditivo, que pueden estar involucradas en el vuelo orientado y el encuentro sexual. [Roelofs, W. L. & Cardé, R. T. 1977].

La comunicación química en lepidópteros mediante feromonas tiene un rol fundamental en la biología reproductiva de estos insectos, especialmente en las especies con hábitos nocturnos, tal como las pertenecientes a la familia Noctuidae [Wyatt, T. 2003].

Caracterización química y emisión de la feromona sexual

La mayor parte de las feromonas emitidas por hembras adultas del orden Lepidoptera son mezclas de compuestos derivados de ácidos grasos, de cadenas carbonadas de entre 10 a 18 carbonos de largo de cadena, con un grupo funcional terminal oxigenado (generalmente acetato, aldehído o alcohol) y una a tres insaturaciones con geometría *Z* o *E* [Ando *et al.* 2004; Malo, E. A. 2008]. Existe otro grupo minoritario de feromonas en lepidópteros que incluye hidrocarburos poliinsaturados y sus derivados epóxidos, con cadenas carbonadas más largas (C₁₇-C₂₃), sin grupo funcional terminal.

La emisión de la feromona sexual por parte de las hembras ocurre durante un período determinado por el fotoperíodo, regulado por un ritmo circadiano. Esta emisión se ve acompañada por un comportamiento característico denominado comportamiento de llamada, que incluye una serie de eventos entre los que se encuentran: extrusión de la glándula productora de feromona de forma continua o discontinua, vibración de las alas, vuelos cortos o adopción de una posición estacionaria. Estos comportamientos favorecen la dispersión modulada de la feromona en el ambiente, la cual difunde en el aire adoptando una forma característica, conocida como pluma o estela de olor. Este patrón de dispersión se caracteriza por estar inicialmente afectada por la difusión de las moléculas, lo cual genera una dispersión mínima en las cercanías de la hembra emisora y posteriormente, se forman remolinos que alteran la estructura de la estela de olor produciendo una forma sinusoidal. En condiciones atmosféricas estables, la pluma de olor ondula únicamente en dirección horizontal, pero las condiciones más reales son inestables y generan simultáneamente una variación en el eje vertical [Howse, P.E. 1998]. La emisión de feromona se realiza en bajas concentraciones, siendo la concentración de feromona emitida en el orden de ng/hr.

En la mayoría de los casos, los componentes de la feromona sexual son sintetizados *de novo* a partir de ácidos grasos presentes en la hemolinfa, pero pueden también ser sintetizados por microorganismos simbióticos o ser adquiridos de fuentes externas. En el caso de la síntesis *de novo*, ocurre generalmente en glándulas productoras, formadas por la modificación de membranas intersegmentales en el extremo del abdomen, en general de los segmentos 8° o 9° [Ma, P.W.C. & Ramaswamy, S.B. 2003]. La síntesis se inicia a partir de precursores provenientes del metabolismo de ácidos grasos, los cuales son modificados por unos pocos tipos de enzimas específicas presentes en la glándula productora de feromona, capaces de dar lugar a una gran variedad de moléculas.

Las vías biosintéticas involucran enzimas responsables por la introducción de insaturaciones *Z* o *E* (desaturasas), acortamiento de cadena mediante β -oxidación y una etapa final de modificación del grupo funcional oxigenado mediante reducción (reductasas), acetilación (acetil transferasas) u oxidación (oxidadas). La proporción de cada componente en la feromona, así como su estereoquímica, están mediadas por una o varias de las enzimas involucradas en la ruta biosintética, siendo variable entre especies.

Síntesis de
ácidos grasos

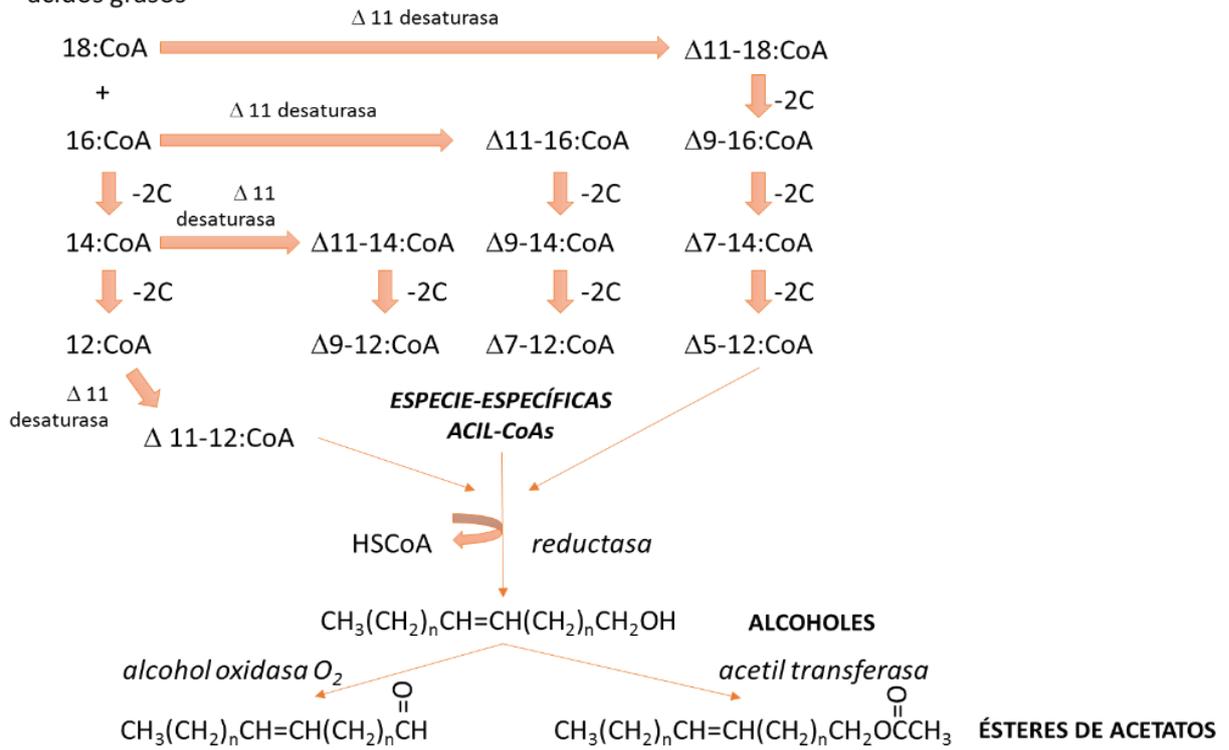


Figura 3. Ruta biosintética de feromonas de lepidópteros utilizando la síntesis de ácidos grasos, desaturación, acortamiento de cadena por enzimas específicas y/o modificación del carbono del grupo carbonilo para producir mezclas de ésteres de acetato, aldehídos o alcoholes especie-específicas que constituyen la feromona

Recepción de feromona sexual

La detección de la feromona sexual en lepidópteros ocurre mayoritariamente por parte de los machos, quienes perciben la feromona sexual emitida por la hembra, pudiendo encontrarla a través de largas distancias [Strandh, M. 2005; Breer, B. 1996]. El mecanismo de orientación del macho para localizar la fuente de feromona sexual, implica el vuelo a contra viento, denominado anemotaxis positiva, químicamente inducida y guiada por estímulos visuales fijos [Howse, P.E. 1998]. El vuelo orientado se caracteriza por ser un vuelo zigzagueante, cuya frecuencia y amplitud está modulada por la concentración del estímulo y presenta una anemotaxis optomotora, la cual guía al insecto en dirección a la fuente emisora, utilizando patrones estáticos del ambiente para medir su avance [Baker *et al.* 1984; Howse, P. E. 1998].

Una vez que el macho percibe la feromona, comienza el vuelo en dirección opuesta al viento, con un patrón ondulante de trayectorias cortas y ángulos pequeños en torno al eje principal de la estela de olor. Este movimiento en zigzag, genera el encuentro y desencuentro continuo con la pluma de olor, si pierden contacto con la misma, realizan movimientos que incluyen giros largos y mayores ángulos que cruzan la trayectoria principal de la pluma de olor, hasta establecer nuevamente el contacto, siempre en dirección a la fuente emisora [Baker, T. C. & Haynes, K. F. 1996; Arzuffi, R. & Castrejón F. 2012]. Este vuelo orientado se conoce como “vuelo en pluma”. Una vez el macho consigue localizar la fuente de emisión, se posa en la fuente o en áreas adyacentes y en ocasiones extrude órganos abdominales de cortejo, los que también suelen liberar feromonas de corto alcance, camina y bate alas hasta entrar en contacto con la hembra.

El órgano sensorial responsable de la detección odorífera en lepidópteros es el par de antenas, las cuales constituyen una ventaja adaptativa. Su forma y tamaño, así como el dimorfismo sexual (común en especies de lepidópteros nocturnos), ilustran la presión evolutiva sobre la responsabilidad del macho de detectar la feromona sexual [Howse P. E., 1998]. Las antenas constituyen apéndices sensoriales segmentados, que contienen en su estructura proyecciones cuticulares, similares a cerdas o pelos, denominadas sensilias olfativas. Las sensilias son las responsables de la percepción de señales químicas del exterior, su estructura está directamente relacionada con su función y con el tipo de molécula que son capaces de percibir (volátiles, gustatorias, etc.), pudiendo aparecer en una misma antena varios tipos de sensilias.

La familia Noctuidae se caracteriza por presentar antenas pectinadas, con un mayor número y mayor tamaño de sensilias tricoideas en antenas de machos adultos en comparación con las hembras [Hallberg *et al.* 2006]. Este fenómeno se debe a que, en general, las sensilias tricoideas contienen neuronas receptoras especializadas en la percepción de la feromona sexual [Baker *et al.* 1984].

Los responsables finales de la detección de las moléculas odoríferas son las neuronas receptoras olfativas (NRO's), las cuales se encuentran dentro de las sensilias olfativas en cantidades variables (una a muchas NRO's) [Guidobaldi, F. & Guerenstein, P. 2012]. Las neuronas receptoras se especializan en el reconocimiento de estímulos específicos, pudiendo existir neuronas de diversos tipos en una misma sensilia. Las NRO's responden

a los estímulos olfativos específicos con un cambio en el potencial de membrana, a partir de la apertura de los canales iónicos, generando un potencial receptor que desencadena diversos potenciales de acción, los cuales codifican la intensidad y duración del estímulo feromonal. Los potenciales de acción son transmitidos desde los axones de las NRO's hacia el lóbulo olfativo, en el cual la información es procesada en complejos glomerulares [Breer, B. 1996]. Las NRO's son responsables de transmitir información acerca de la intensidad, la duración y la calidad de la feromona percibida, mediante una secuencia de potenciales de acción hacia el deutocerebro. Las señales químicas que inducen un cambio en la fisiología o el comportamiento del insecto son, en general, mezclas de compuestos, con lo cual la recepción de la señal involucra la estimulación de varias NRO's, específicas para cada uno de los compuestos o para una serie de compuestos similares [Breer, B. 1996].

PSEUDALETIA ADULTERA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Las orugas militares del género *Pseudaletia* constituyen importantes plagas alrededor del mundo. Por este motivo, las feromonas sexuales involucradas en el encuentro sexual han sido ampliamente estudiadas e identificadas, para su posterior aplicación en métodos de monitoreo mediante trampas de feromona. *Pseudaletia unipuncta* está presente en Norte América y Eurasia, es una importante plaga de gramíneas, pequeños granos, tomates, algodón y otros cultivos. Los compuestos encontrados en las glándulas productoras de feromona que pueden formar parte de su feromona sexual son: acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ol (Z11-16OAc, libre del isómero E), acetato de hexadecan-1-ol (16OAc) y (Z)-11-hexadecen-1-ol (Z11-16OH) y acetato de (Z)-9-hexadecen-1-ol; estos compuestos en proporciones relativas: 1:0,15:0,13:0,02 [Mc Donough *et al.* 1980]. La feromona sexual de la oruga militar oriental, *Pseudaletia separata*, fue identificada como una mezcla de (Z)-11-hexadecenal, hexadecanal y (Z)-11-hexadecen-1-ol en proporciones relativas 100:10:0,1 (mezcla con mejores resultados en evaluación en campo) [Pingchou *et al.* 1987]. *Pseudaletia sequax*, plaga importante de gramíneas en el sur de Brasil, es una especie simpátrica con *Pseudaletia adultera*, ya que se encuentran ambas en el sureste de América del Sur. Los componentes activos presentes en las glándulas productoras de feromona sexual de *P. sequax* fueron (Z)-11-hexadecenal (Z11-16Ald), acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ol (Z11-16OAc) y (Z)-11-hexadecen-1-ol (Z11-16OH); la proporción activa en ensayos en laboratorio fue 85,2:12,8:2 [Almeida, A. A. 2007].

P. adultera (Lepidoptera: Noctuidae) es un insecto polífago cuyas preferencias alimenticias son las gramíneas cultivadas: trigo, avena, cebada, centeno, raigrás, arroz, alpiste, maíz y gramíneas de praderas naturales. También se puede alimentar de los cultivos de lino, alfalfa y tomate [Bentancourt, C. M. & Scatoni, I. B. 2006; Zerbino, M. S. 2007]. La distribución de este insecto comprende el Norte de Argentina, Sur de Brasil, Paraguay y Uruguay [Bentancourt, C. M. & Scatoni, I. B. 1999], con una gran variabilidad anual en la magnitud de los ataques en nuestro país [Zerbino, M. S. 2007].

El tipo de daño que causan las larvas de *P. adultera* varía de acuerdo con el hospedero. En trigo las larvas se alimentan fundamentalmente de hojas y en ataques severos llegan a comer las aristas, provocando daños indirectos. En cebada cortan las espigas y en avena y raigrás cortan el grano por lo tanto las pérdidas son directas. *P. adultera* se caracteriza por presentar una gran variabilidad en la magnitud de sus ataques entre años y en distintas localidades. Esta característica determina la importancia de contar con una herramienta confiable y eficiente de monitoreo para el manejo de esta plaga, de modo de facilitar un uso más racional de insecticidas.

En Uruguay se registran entre 3 y 4 generaciones de *P. adultera* por año, apareciendo los primeros adultos en la primavera (principios de octubre), los que dan origen a las larvas que causan daño tardío en los cultivos de invierno (trigo, cebada, arroz), con un pico poblacional de larvas en la primera quincena de noviembre [Zerbino, M. S. 1991]. Estas larvas completan su ciclo y se transforman en adultos de primera generación, los cuales tienen actividad en los meses de diciembre, enero y febrero. Las larvas de la segunda generación probablemente se

alimenten de maíz, sorgo y gramíneas naturales, y sus adultos desarrollan actividad en los meses de febrero y marzo. Estos a su vez dan origen a otra generación, que se caracteriza porque el vuelo de los adultos es muy extendido en el tiempo (desde mayo hasta agosto) y poco abundante. En el último estadio larval, que dura entre 5 y 6 días, se alimentan con mayor voracidad, consumiendo aproximadamente 145 cm² de hoja bandera durante todo el estadio (una hoja bandera promedio mide entre 20 y 30 cm²), lo cual resulta en un daño del 80% de la vegetación. Este hecho genera un daño importante ya que el área de hoja bandera debe mantenerse intacta hasta el llenado del grano para obtener el máximo rendimiento del cultivo. Existen publicaciones que vinculan la población de larvas en el cultivo y la relación entre la precipitación y la evaporación en el período verano-otoño, habiéndose determinado para otra especie del mismo género (*Pseudaletia unipuncta*) que los veranos y/u otoños con temperaturas superiores a la media, sin registros de exceso de agua en el suelo, predisponen a que la población de larvas en la primavera siguiente sea alta [Turgeon *et al.* 1982]. Esta situación puede ser mitigada y vigilada si se establece un adecuado sistema de advertencia, para el cual es crítico el desarrollo de un método de monitoreo, así como definir el número de larvas a partir del cual es necesario aplicar medidas de control, permitiendo así al productor hacer un uso racional de los insecticidas [Zerbino, M. S. 1991].

Actualmente, para el muestreo de larvas se recomienda el uso de red entomológica y la evaluación visual directa, a pesar que son métodos laboriosos y que se ven obstaculizados por el hecho que los adultos seleccionan para oviponer las zonas donde el cultivo se encuentra revolcado. Se recomienda tomar la decisión de control cuando la densidad poblacional se encuentra entre 10 y 15 lagartas/m² mayores a 1,5 cm. Para el monitoreo de adultos se utiliza regionalmente el uso de trampas con luz, muy utilizadas para atraer insectos noctuideos; en estas trampas se coloca una luz negra que atrae todo tipo de polillas, así como coleópteros y dípteros, entre otros, los cuales dificultan el conteo de adultos de la plaga objetivo [Cagnolo *et al.* 2010]. Es de destacar que en el presente no se cuenta con un método alternativo para monitorear de forma específica a *P. adultera*.

En función de lo anterior, la importancia económica de este insecto radica fundamentalmente en dos razones: sus ataques son frecuentes y pueden alcanzar grandes magnitudes, y las gramíneas que se ven afectadas, fundamentalmente trigo, arroz y cebada, ocupan un área importante de la región agrícola-ganadera del país. El uso de feromonas en trampas de monitoreo es un método sensible y específico para lepidópteros, permitiendo detectar adultos incluso en muy bajas densidades, y predecir explosiones poblacionales. De esta manera, se pueden establecer umbrales de capturas para la adopción de medidas de control químico.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Identificar los componentes de la feromona sexual de la oruga militar, *Pseudaletia adultera*, que permitan desarrollar una estrategia, basada en feromonas sexuales, para el monitoreo de poblaciones de esta especie en cultivos de gramíneas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los componentes de la feromona sexual de *Pseudaletia adultera*, y sus proporciones relativas.
2. Determinar con bioensayos en túnel de viento la mezcla de compuestos que resulte atractiva para machos de *P. adultera*.
3. Determinar la composición óptima de la feromona para el trapeo de machos de *Pseudaletia adultera* en cultivos locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, A. A. 2007. Comportamiento reproductivo e identificación de feromônio sexual de *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera:Noctuidae). Tesis de posgrado presentada a la Universidad Federal de Viçosa.
- Ando, T.; Inomata, S.; Yamamoto, M. 2004. Lepidopteran sex pheromones. *Topics in Current Chemistry*. Vol. 239. Pp. 51-96.
- Arzuffi, R.; Castrejón F. 2012. Feromonas involucradas en el comportamiento sexual de Lepidoptera, pp. 72-94. En *Temas selectos en Ecología Química de Insectos*, eds. Rojas, J. C.; Malo, E. A. *El Colegio de la Frontera Sur. México*.
- Baker, T. C.; Willis, M. A.; Phelan, P. L. 1984. Optomotor anemotaxis polarizes self-steered zigzagging in flying moths; *Physical Entomology*. Vol. 9. Pp 365-376
- Baker, T. C.; Haynes, K. F. 1996. Pheromone-mediated optomotor anemotaxis and altitude control exhibited by male oriental fruit moths in the field; *Physical Entomology*. Vol. 21. Pp. 20-32.
- Barg, R.; Queirós F. 2007. Agricultura agroecológica – orgánica en Uruguay: Principales conceptos, situación actual y desafíos.
- Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. 1999. Guía de Insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en Uruguay. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. *Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Uruguay*.
- Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. 2006. Lepidópteros de importancia económica en Uruguay. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Pp 351-359. 2da edición. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. *Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Uruguay*
- Birch, M. C. 1974. Programs utilizing pheromones in survey or control, en *Pheromones*, ed. Birch, M. C. *American Elsevier Publishing Company, INC., New York, USA*. pp 411-454.
- Breer, B. 1996. Molecular mechanisms of pheromone reception in insect antennae, en *Insect Pheromone Research*. Pp. 115-130
- Cagnolo M.; Brussino D.; Bustos J.; Millessi P.; Winter A.; Ramello J.; Tacconi N. 2010. Infoplagas de Villa María para la región. *Unidad de extensión y experimentación Villa María*, Nº 177. Villa María, Argentina.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira, S.; Lima, R.; Casadei de Baptista, G.; Berti, E.; Postali, J. R.; Zucchi, R. A.; Batista, S.; Djair, J.; Marchini, L. C.; Spotti, J. R.; Omoto, C. 2002. Entomología Agrícola. *Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz*, Vol. 10.
- Ghanim, M.; Ishaaya, I. 2010. Insecticides with novel modes of action, Mechanisms and resistance management; en *Tolerance to Environmental Contaminants*, *CRC Group London, New York*. Pp 385-408
- González A.; Altesor, P.; Sellanes, C.; Rossini, C. 2012. Aplicación de feromonas sexuales en el manejo de lepidópteros plaga de cultivos agrícolas, pp. 343-360. En *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*, eds. Malo, E. A.; Rojas, J. C. *El Colegio de la Frontera Sur. México*.
- Grasswitz, T. R. 2003. Chemical Ecology and Pest Management en *Chemical Ecology*, ed. Hardege, J. D. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Oxford, UK*
- Guidobaldi, F.; Guerenstein, P. 2012. El Sistema olfativo de los insectos, pp. 46-71. En *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*, eds. Rojas, J. C.; Malo, E. A. *El Colegio de la Frontera Sur. México*.
- Gupta, D. 2004. Pest Control: Insects and other arthropods. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. Vol 2. Pp. 294-319
- Hallberg, E.; Hansson, B.; Lofstedt C. 2006. Sensilla and Proreceptor in Lepidoptera, moths and butterflies, ed. Kristensen, N. Vol. 2, *Morphology, physiology and development*
- Howse, P.E. 1998. Insect Semiochemicals and communication. En *Insect Pheromones and their use in Pest Management*, eds. Howse, P.; Stevens, I.; Jones, O. *Chapman & Hall, London*.
- Jones, O. T. 1998. Practical applications of pheromones and other semiochemicals, pp. 261-355. En *Insect pheromones and their use in pest management*, eds. Howse, P.; Stevens, I.; Jones, O. *Chapman and Hall, London*
- Jones, O. 2009. Current Worldwide Use of Pheromones and Other Semiochemicals. *2nd Conference on Pheromones, food lure, traps and biological control: Alternatives for the 21st century*. Murcia, UK

- Karlson, P.; Lüscher M. 1959. Pheromone, ein Nomenklatur-vorschlag für ein Wirkstoffklasse. *Naturwiss.* Vol 46. Pp. 63-64.
- Ma, P.W.C.; Ramaswamy, S.B. 2003. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing tissue, pp. 19-51, en *Insect Pheromone biochemistry and molecular biology, the biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*, eds. Blomquist, G.J.; Vogt, R.G. *Elsevier Academic Press, London*.
- Malo, E. A. 2008. Tropical insect chemical ecology, en *Internacional Commission on Tropical Biology and Natural Resources*, eds. Del Claro, K.; Oliveira, P. S.; Gray, V. R.; Ramirez, A.; Almeida Barbosa A. A.; Bonet, A.; Rubio Scarano, F.; Louis Consoli, F.; Morales Garzon, J. M.; Naoki Nakajima, J.; Costello, J. A.; Vinicius Sampaio, M.; Quesada, M.; Morris, M. R.; Palacios Rios, M.; Ramirez, N.; Marcal Junior, O.; Ferraz Macedo, R. H.; Marquis, R. J.; Parentoni Martins, R.; Rodrigues, S. C.; Luttge, U. *Encyclopedia of Life Support System (EOLSS), Oxford, UK*
- Malo, E. A.; Rojas, J. C. 2012. Métodos de investigación en Semioquímicos, pp 17-45. En: *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*, eds. Malo, E. A.; Rojas, J. C. *El Colegio de la Frontera Sur. México*
- McDonough, L. M.; Kamm, J. A.; Bierl-Leonhardt, B. A. 1980. Sex pheromone of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 6. N° 3.
- Mochizuki, F.; Fukumoto, T.; Noguchi, H.; Sugie, H.; Morimoto, T.; Ohtani, K. 2002. Resistance to a mating disruptant composed of (Z)-11-tetradecenyl acetate in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Yasuda) (Lepidoptera:Tortricidae). Vol. 37 (2). *AGRIS: International Information System for the Agricultural Science and Technology*
- Núñez, S. 1999. Evaluación del método de confusión sexual y aplicación reducida de insecticidas para el control de carpocapsa y lagartitas en manzanas, pp. 8 a 9, en *Evaluación de distintas combinaciones de feromonas para la monitorización de Bonagota cranaodes*, Resultados experimentales en protección vegetal en frutales y vid, eds. Núñez, S.; Canessa, S. *Actividades de difusión N° 204 Serie INIA. Las Brujas Canelones, Uruguay*
- Oerke, E. C. 1994. Crop protection – Past and present in Crop production and crop protection; en *Estimated losses in major food and cash crops*. *Elsevier Science, Amsterdam*. Pp 45-71
- Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. Vol 144. Pp 31-43
- Pingchou, Z.; Fanlei, K.; Yongqing, Y. 1987. Sex pheromone of oriental armyworm *Mythimna separate* Walker. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 13. N° 5.
- Raguso, R. A.; Agrawal, A. A.; Douglas, A. E.; Jander, G.; Kessler, A.; Poveda, K.; Thaler, J. S. 2015. The raison d'être of chemical ecology. *Ecology*. Vol. 96 (3). Pp. 617-630. *Ecological Society of America*
- Roelofs, W. L.; Cardé, R. T. 1977. Responses of Lepidoptera to synthetic sex pheromone chemicals and their analogues; *Annual Review of Entomology*. Vol. 22. Pp 377-405
- Russel, P. E. 2005. A century of fungicide evolution. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. Vol 143. Pp 11–25
- Schneider, D. 1964. Insect antennae, *Annual Review of Entomology*. Vol. 9. Pp. 103-122
- Steck, W. F.; Underhill, E. W.; Bailey, B. K.; Chisholm, M. D. 1982. A 4-component sex attractant for male moths of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. Vol. 32. Pp. 302-304. *The Netherlands Entomological Society*.
- Strandh, M. 2005. Evolution of Sex Pheromone production in moths, Introductory paper N° 171. *Department of Ecology, Lund University, USA*,
- Suedel, B.C.; Boraczek, J. A.; Peddicord, R. K.; Clifford, P. A.; Dillon, T.M. 1994. Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. *Rev Environ Contam Toxicol*. Vol. 136 pp. 21-89
- Tilman, D. 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. Vol. 96. Pp 5995-6000. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. Colloquium paper.
- Turgeon J. J.; McNeil J. and Roelofs W. L. 1982. Responsiveness of *Pseudaletia unipuncta* males to the female sex pheromone. *Physiological Entomology*. Vol 8. Pp. 339 – 344
- Witzgall, P.; Kirsch P.; Cork, A. 2010. Sex pheromone and their impact on pest management, *Journal of Chemical Ecology*. Vol, 36, Pp. 80-100
- Wyatt, T. 2003. Pheromones and animal behaviour, Communication by smell and taste. *University of Oxford, USA*. Cap. 10.

Zerbino, M. S. 1991. Lagarta de los cereales. Serie Técnica N° 9. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), La Estanzuela, ed. Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA. *Montevideo, Uruguay*.

Zerbino, M. S. 2007. Jornada de Cultivos de Invierno. *Mesa de Trigo y SRRN*, Young, INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), La Estanzuela. *Montevideo, Uruguay*.

CAPÍTULO 2. Identificación de la feromona sexual de *P. adultera*

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría en laboratorio

Durante el desarrollo de la tesis, se mantuvo una cría permanente de *Pseudaletia adultera* en el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química, la cual fue mantenida con éxito bajo condiciones de temperatura de 17 °C a 27 °C y humedad de 60-70 % HR. La cría se mantuvo con fotoperíodo invertido de 14:10 (luz: oscuridad) y fue periódicamente renovada con insectos de campo provenientes de la Estación Experimental Dr. Mario Cassinoni (Paysandú). Los adultos fueron mantenidos en cajas de 40 x 40 cm y alimentados con una dieta a base de agua y miel. Los adultos se dispusieron en sexos separados para fines experimentales, o en cajas con ambos sexos para favorecer la cópula y postura de huevos para el mantenimiento de la cría (Figura 4).



Figura 4. Caja de adultos destinados para cría de *Pseudaletia adultera*, con abanicos de papel y germinadores de cebada para favorecer la postura de huevos. La dieta a base de agua miel se coloca en frascos con papel absorbente para permitir la succión por parte de los adultos

Se colocaron abanicos de papel en las cajas de adultos destinadas al mantenimiento de la cría, para que las hembras efectuaran las puestas de huevos. Dichos abanicos fueron extraídos periódicamente y se colocaron en recipientes de 30 x 15 x 15 cm, cubiertos con papel en la base y tul en la superficie, hasta el nacimiento de las larvas. Las mismas fueron transferidas a recipientes grupales de plástico de iguales dimensiones, en los que permanecieron hasta el estado de pupa. Las larvas se alimentaron con dieta artificial específica para lepidópteros, basada en porotos de manteca y germen de trigo (composición: porotos de manteca 100 g,

desinfectados y mantenidos en agua previamente por 24-48 horas, ácido sórbico 1 g, ácido ascórbico 3 g, levadura seca 15 g, germen de trigo 50 g, sémola de maíz 50 g, agar-agar 18 g, en 400 ml de agua). Se agregaron así mismo hojas de cebada cultivadas en el laboratorio. Las pupas extraídas de los recipientes fueron sexadas, separadas por sexo y mantenidas en recipientes de plástico (15 x 10 x 10 cm) hasta la emergencia de los adultos (Figura 5).



Figura 5. Recipientes cerrados con tul, donde se mantienen las pupas de *P. adultera*, separadas por sexo, hasta la emergencia de los adultos (Foto tomada por G. Reherrmann).

Obtención y análisis de glándulas de feromona

La observación directa del comportamiento de hembras de *Pseudaletia adultera* (Figura 6 izq.) en trabajos realizados previamente, demostró que el comportamiento de llamada ocurre entre la penúltima y la antepenúltima hora de la fase oscura, a partir del segundo día de emergencia de los adultos hembras. Las observaciones fueron realizadas con iluminación por luz roja, de modo de no alterar el comportamiento de los insectos, en hembras agrupadas colocadas en las cajas de adultos.

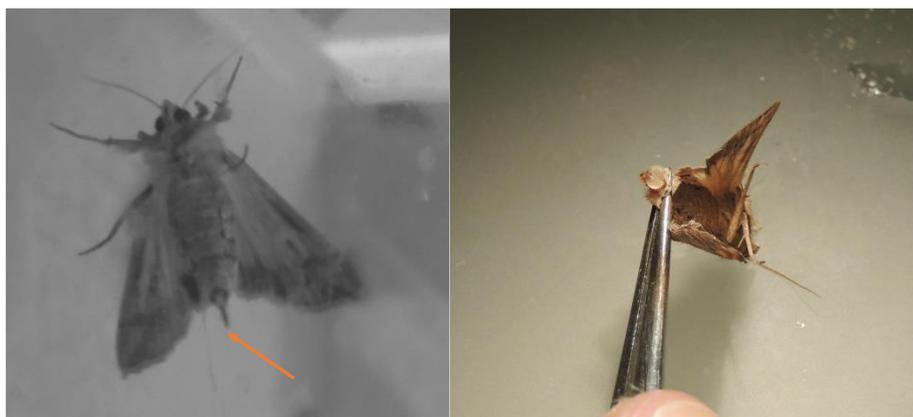


Figura 6. Izquierda: Adulto hembra de *Pseudaletia adultera* en posición de llamada (izquierda). Se encuentra señalada la extrusión del ovipositor. Derecha: Glándula productora de feromona de hembras de *Pseudaletia adultera*. La glándula se encuentra entre el octavo y el noveno segmento abdominal, y su extrusión se logra mediante presión ejercida con la ayuda de pinzas entomológicas (Fotos tomada por G. Rehermann).

Los extractos de glándulas se obtuvieron a partir de la extracción mecánica de glándulas productoras de feromona de adultos hembras, ubicadas entre el octavo y noveno segmento abdominal. Para la disección de glándulas se eligieron hembras de entre 2 y 8 días de emergidas, en el período en el cual ocurre el comportamiento de llamado, y se retiraron de manera individual las hembras identificadas en posición de llamada. Se extrajeron las glándulas observando a través de una lupa, presionando suavemente el abdomen hasta que la glándula quedó expuesta y fue separada con pinzas entomológicas (Figura 6 der). Las glándulas se mantuvieron en un vial cónico refrigerado hasta la extracción con solvente.

Una vez finalizada la escisión de glándulas, las mismas fueron mantenidas en refrigeración por un período no mayor a 20 días, hasta la extracción con solvente. Se aglomeraron y presionaron las glándulas en el vial, de modo de permitir la ruptura de las mismas, permitiendo que liberen su contenido. El solvente utilizado fue hexano (pureza $\geq 97\%$, GC, bidestilado en el Laboratorio de Ecología Química a partir de hexano calidad HPLC), y el volumen de solvente utilizado fue proporcional al número de glándulas extraídas, de modo de utilizar una cantidad que cubriera la totalidad de las glándulas. La extracción se realizó con sonicación por 20 minutos. El sobrenadante fue separado de las glándulas y concentrado bajo corriente de N_2 , sin evaporar por completo el disolvente, para minimizar la volatilización de los compuestos de interés (menos volátiles que el hexano), hasta obtener un extracto conteniendo 2 a 3 equivalentes de hembra por μl de extracto. Se obtuvieron extractos en

varias generaciones de adultos, mejorando la técnica de escisión de glándulas, modificando el número de glándulas extraídas y el momento de la extracción durante el comportamiento de llamada.

El análisis del extracto de glándulas se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS; Shimadzu QP 2010). El análisis por GC-MS permite la separación e identificación de compuestos volátiles en mezclas complejas, en situaciones donde la cantidad de analitos no permite una separación de tipo preparativa para posterior análisis espectroscópico. En el caso de las feromonas sexuales, puede estimarse que en las mejores condiciones se obtienen 10 ng por hembra.

Las condiciones de análisis fueron: gas portador He, volumen inyectado: 1 μ l, inyección *splitless*, programa de temperatura: 70 °C, 1 min isoterma, 7 °C/min hasta 300 °C, 3 min isoterma; columna capilar Rtx-5MS (30 m largo; 0,25 mm diám. int.; 0,25 μ m espesor) temperatura del inyector 250 °C, temperatura de la interfase 300 °C, temperatura de la fuente de iones 200 °C, energía de ionización: 70 eV, en modalidad "scan".

La configuración de los dobles enlaces presentes en los compuestos de interés es de suma importancia, ya que la estereoquímica puede tener grandes efectos en la recepción y respuesta de los machos; de hecho, el isómero incorrecto puede generar una respuesta inhibitoria a la feromona como mecanismo o barrera de aislamiento reproductivo [Arzuffi *et al.* 2012]. Las barreras de aislamiento reproductivo constituyen características de la especie que previenen la reproducción cruzada, en este caso por presentar atractividad débil o ausente por la feromona sexual de especies congéneres [Ridley, M. 2003].

Dado que el análisis por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas en general puede no resolver los compuestos que presentan doble enlace *Z* y *E*, ni puede dar información para definir la posición del doble enlace en la molécula, fue necesario recurrir a técnicas alternativas para discernir la posición y estereoquímica de los compuestos encontrados en los extractos de glándulas.

Existen varias formas de definir la posición del doble enlace en compuestos monoinsaturados, entre ellas, la derivatización con disulfuro de dimetilo y posterior análisis por GC-MS. Los derivados se forman a partir de la adición de un grupo tiometilo (SCH₃) a cada carbono involucrado en el doble enlace.

Esta reacción se caracteriza por ser estereoselectiva (*trans*), formando el isómero *eritro* en caso de un doble enlace con configuración *E*, y el isómero *treo* en el caso de un compuesto con configuración *Z*, según se muestra en la figura 7. Se obtienen de esta manera derivados de los compuestos *Z* y *E* con espectros de masa idénticos, pero con distintos tiempos de retención, permitiendo su resolución. Así mismo, la masa de los fragmentos obtenidos por ruptura α al átomo de azufre indica la posición del doble enlace, lo cual no es posible determinar sin la derivatización.

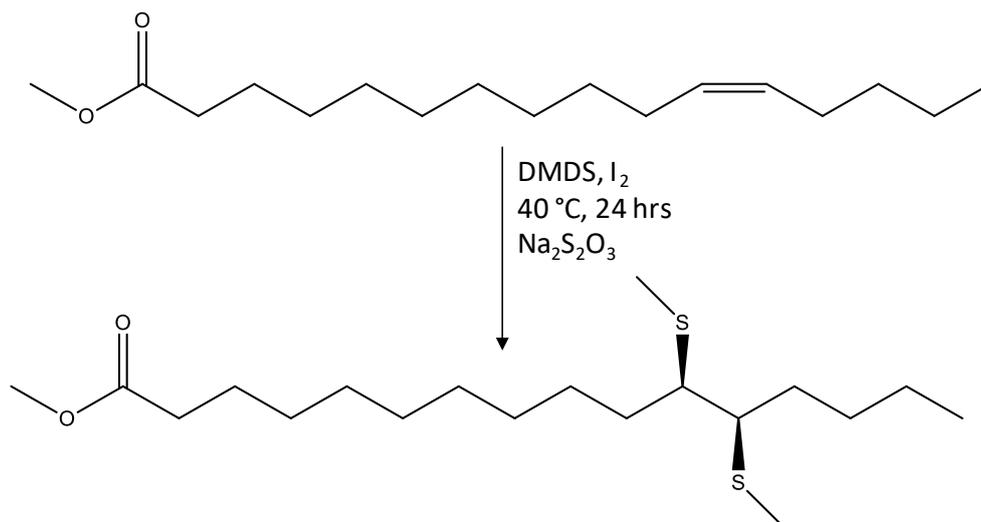


Figura 7. Reacción de derivatización de Z11-16:OAc con DMDS, resultando en el isómero treo

La optimización de la reacción se llevó a cabo utilizando estándares de los compuestos de interés, el alcohol y el acetato de 16 carbonos, monoinsaturados. Se utilizaron (*Z*)-11-hexadecen-1-ol (en adelante, Z11-16OH), (*E*)-11-hexadecen-1-ol (en adelante, *E*11-16OH) y acetato de (*Z*)-11-hexadecen-1-ol (en adelante, Z11-16OAc) en cantidad 1000 ng (solución 10 ppm), junto a 50 μ l de DMDS, 5 μ l de una solución de I₂ en Et₂O (15mg de I₂ en 250 μ l de Et₂O). La mezcla de reacción se mantuvo a 40 °C por 24 h, el exceso de yodo se extrajo con 50 μ l de Na₂S₂O_{3(ac)} al 5%, y luego se realizó una microextracción con 100 μ l de hexano. Se extrajo la capa orgánica y se concentró con N₂ hasta 50 μ l (Buser *et al.* 1983; Nichols *et al.* 1986). La solución fue inyectada inmediatamente en el GC-MS, en cantidad 1 μ l, inyección splitless, programa de temperatura idéntico al utilizado para el análisis de extracto de glándulas.

La reacción de derivatización con extracto de glándulas se llevó a cabo con un extracto de 41 glándulas de hembras de entre 2-5 días, extraídas en el período de llamada en la fase oscura, en las condiciones de reacción optimizadas con los estándares sintéticos.

Estudio de respuesta electrofisiológica de machos

El análisis electrofisiológico es una herramienta poderosa, capaz de medir de forma directa la respuesta, a nivel periférico, a señales químicas externas que el insecto detecta. El método más común es la electroantenografía, la cual se basa en registrar el cambio de potencial entre la parte distal de la antena y la base de la misma, cuando se expone la antena a un estímulo olfativo. Los receptores olfativos del insecto (sensilias) son específicos a uno o unos pocos compuestos, generando con el estímulo adecuado un potencial o señal nerviosa desde los receptores olfativos hacia el cerebro. Esta señal nerviosa causa una diferencia de potencial del orden de 1 – 20 mV entre la base y la punta de la antena, la cual se mide como un pico electroantenográfico, el cual es proporcional al número de quimiorreceptores estimulados por la presencia del estímulo olfativo, y en un cierto rango a su concentración [Malo, E. A. & Rojas, J. C. 2012; Howse, P. E. 1998]. El electroantenograma (EAG) es la suma de potenciales de los receptores olfativos presentes a lo largo de la antena. Estas señales pueden cuantificarse mediante la amplitud de la señal en mV, desde la línea de base hasta el extremo más alejado [Malo, E. A. & Rojas, J. C. 2012]. Esta técnica puede no ser completamente representativa de la respuesta comportamental del insecto frente al estímulo, ya que no distingue aquellos estímulos que sean atractivos, repelentes, inhibitorios, sinérgicos con otros estímulos. Por otra parte, un número pequeño de neuronas puede responder a un componente esencial del canal de comunicación, sin ser suficientes para producir una señal detectable de EAG, por lo que un negativo a una medida de EAG no es valiosa para descartar una posible respuesta.

En este trabajo se estudió la respuesta de la antena de machos de *P. adultera* frente al extracto de glándulas y a compuestos sintéticos mediante electroantenografía acoplada a cromatografía de gases, de modo de separar los compuestos previamente a la llegada del estímulo a la antena. Para este fin se cuenta con un detector de electroantenograma (EAD) acoplado a un cromatógrafo de gases HP5890-Series II. El acople involucra una división del flujo del gas portador del cromatógrafo de gases (GC), mediante un divisor de sílica fundida (0,22 mm diám. int.; sin fase estacionaria), que divide la columna cromatográfica de modo que un extremo es conducido al detector FID (GC) y el otro extremo se dirige a la antena (EAD), haciendo posible la obtención simultánea de la respuesta química y electrofisiológica. Una vez dividido el flujo de gas proveniente de la columna, la porción que se dirige al EAD se mantiene a 220 °C hasta su salida del horno del cromatógrafo, de modo de evitar la condensación de los compuestos. El flujo es posteriormente dirigido hacia el exterior y arrastrado hacia la antena, dispuesta a 1 cm, por una corriente (30 ml/min) de aire limpio (filtrado con carbón activado) y humedecido. La antena se coloca en un electrodo de dos puntas, con gel conductor, el cual está conectado a un amplificador de alta impedancia (Syntech, 2004) (Figura 8). Este equipo amplifica y digitaliza la señal, que es adquirida por un software que la integra y arroja un gráfico de diferencia de voltaje en función del tiempo. La ventaja de esta metodología es que discrimina selectivamente los compuestos del extracto de glándulas que presentan actividad antenal y que sugieren una posible actividad biológica. Estos compuestos son los elegidos para la evaluación comportamental en túnel de viento y para ensayos de campo. La antena se

colocó entera, extraída desde la base, inmediatamente después de separada del insecto vivo; se cambió la antena en cada ensayo. Se utilizaron dos tipos de columnas, una columna capilar Permabond SE52 (25 m largo; 0,25 mm diám. int.; 0,25 μ m espesor) y una Rtx-5MS de iguales características que la utilizada para el análisis por GCMS. El gas portador fue H_2 , volumen inyectado 1 μ l, inyección modo splitless, el programa de temperatura utilizado fue de 70 $^{\circ}C$, 1 min isoterma, 7 $^{\circ}C/min$ hasta 230 $^{\circ}C$, 1 min isoterma, temperatura del inyector: 220 $^{\circ}C$, temperatura del detector FID y de la interfase al EAG 240 $^{\circ}C$.

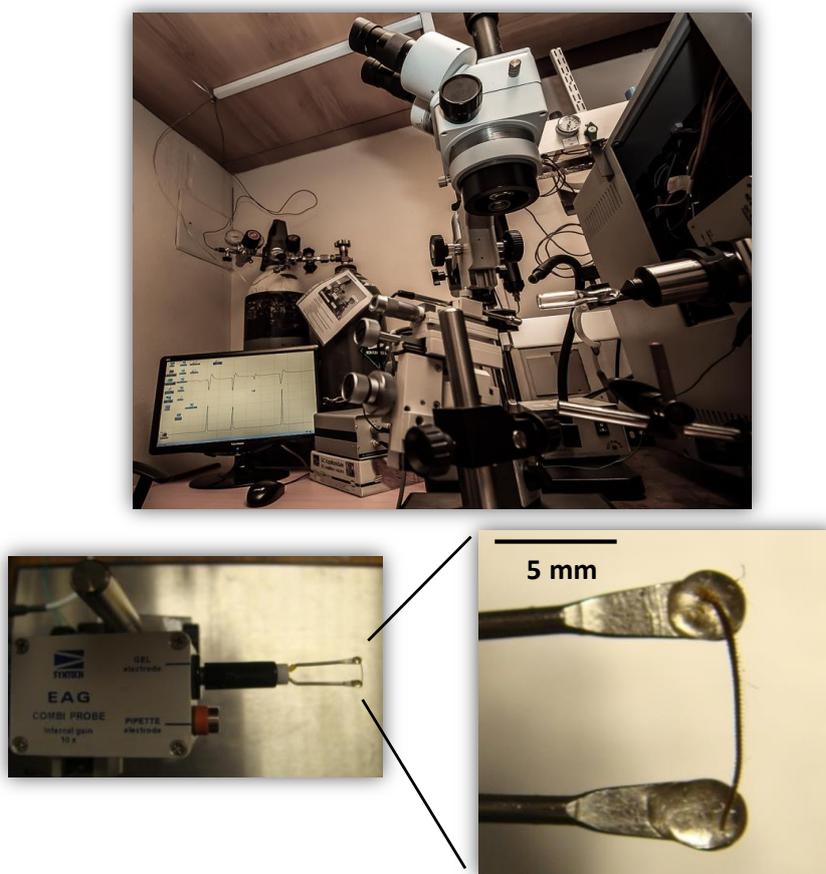


Figura 8. Antena entre electrodos en el sistema GC-EAD (Foto tomada por G. Rehermann)

RESULTADOS

Análisis de glándulas de feromonas

En el transcurso de esta tesis se realizó la extracción de alrededor de 1200 glándulas productoras de feromonas de adultos hembras, obteniendo un gran número de extractos de glándulas. La composición cualitativa y cuantitativa entre los diferentes extractos resultó ser muy variable, lo cual pudo ser causado por la diferencia en la edad de las hembras, diferencias en la emisión de feromona entre generaciones, o causas experimentales como contaminantes del solvente o de los tejidos adyacentes a las glándulas. El momento óptimo para realizar la extracción de glándulas fue la penúltima hora de la fase oscura, momento en el cual se encontró el mayor número de hembras llamando. Elegir la penúltima hora de la fase oscura permite así mismo conseguir un mayor grado de avance en la biosíntesis de feromona a partir de los precursores por parte de las hembras de *P. adultera*.

A modo de ejemplo, se muestra un cromatograma de iones totales (TIC) de un extracto de 27 glándulas (Figura 9), en el cual se observa una serie de picos mayoritarios en la zona comprendida entre los 20 y los 25 minutos de tiempo de retención.

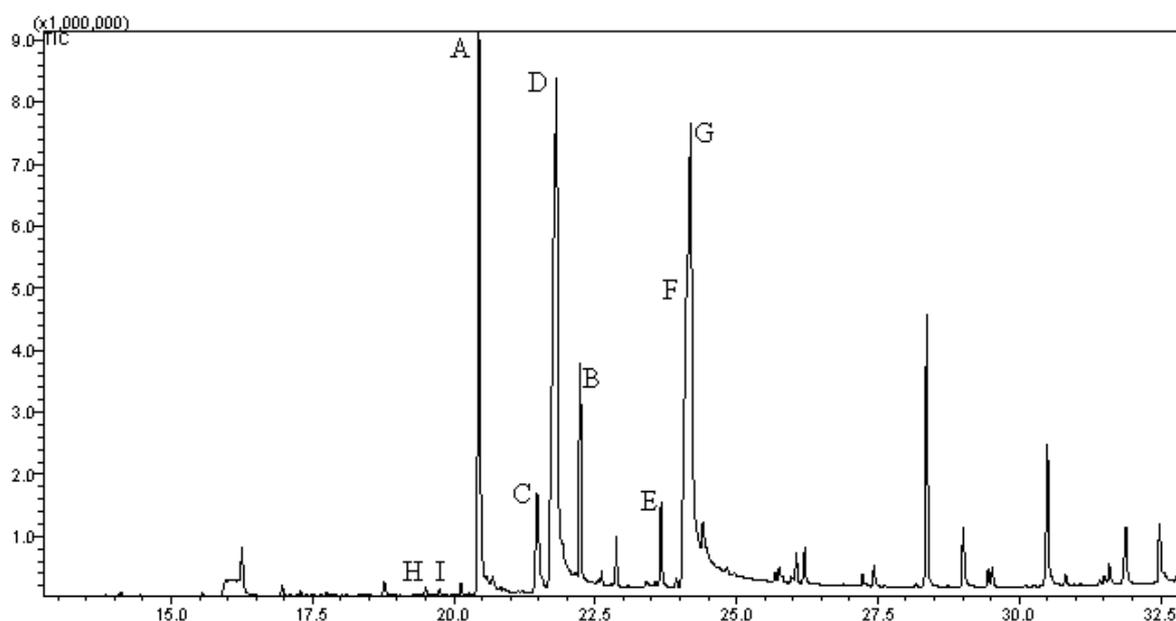


Figura 9. Cromatograma total de iones (TIC) de un extracto de 27 glándulas de adultos hembra de *P. adultera*, extraídas mecánicamente durante el período de llamada

La primera aproximación a la identificación de los compuestos se realizó por comparación de sus espectros de masas con los disponibles en bases de datos (NIST08). El perfil de iones del compuesto mayoritario (Figura 10), designado con la letra **A** y con tiempo de retención (t_R) = 20,5 min, lo identifica tentativamente como un alcohol primario monoinsaturado de 16 carbonos. Se observó la presencia del ion molecular (M^+) con una relación m/z

240, y una pérdida de una molécula de agua (m/z 18), común en este tipo de compuestos, resultando en un ion m/z 222. Otros fragmentos de masa menor, caracterizados por un m/z par (194, 180, etc.), así como los iones mayoritarios con relaciones m/z 41, 55, 82 y 96, y el ion de m/z 31 (CH_3O^+) (no mostrado), son todos coincidentes con el perfil de alcoholes lineales monoinsaturados. Se asumió una insaturación con configuración Z y posición 11 por analogía con especies congéneres; esto se estudió posteriormente por derivatización del extracto con DMDS, aunque no pudo verificarse.

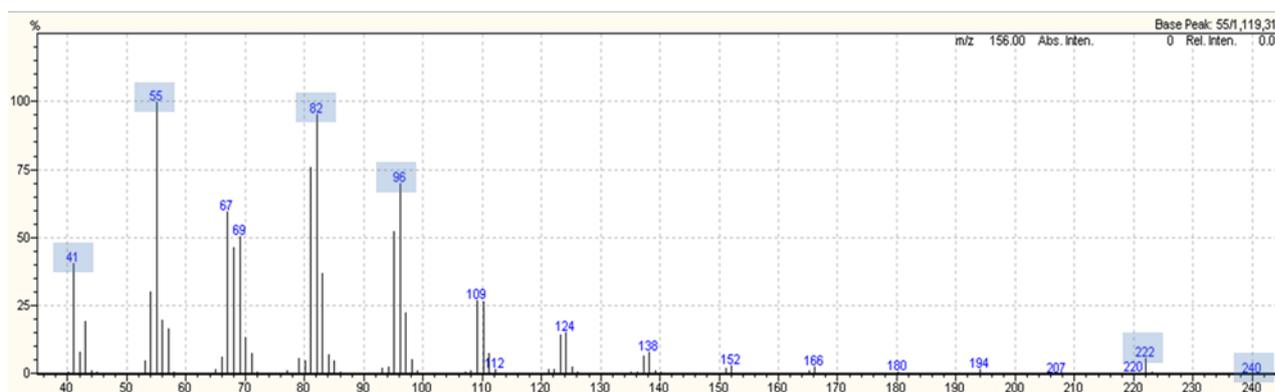


Figura 10. Espectro de masas obtenido a partir del análisis del pico A, con $t_R = 20,5$ min, en el extracto de glándulas. Según la fragmentación observada, se identificó tentativamente como 11-hexadecen-1-ol

El pico señalado como B en la figura 9 ($t_R = 22,3$ min) presentó un espectro de masas muy similar al del pico A, con la notoria diferencia del ion $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$ de m/z 43, característico de acetatos (Figura 11). Se identificó, por lo tanto, tentativamente, como el acetato correspondiente al alcohol insaturado de 16 carbonos A. El ion con m/z 222 correspondería por lo tanto a la pérdida de una molécula de ácido acético, de masa 60, mientras que el ion M^+ (282) no es observable.

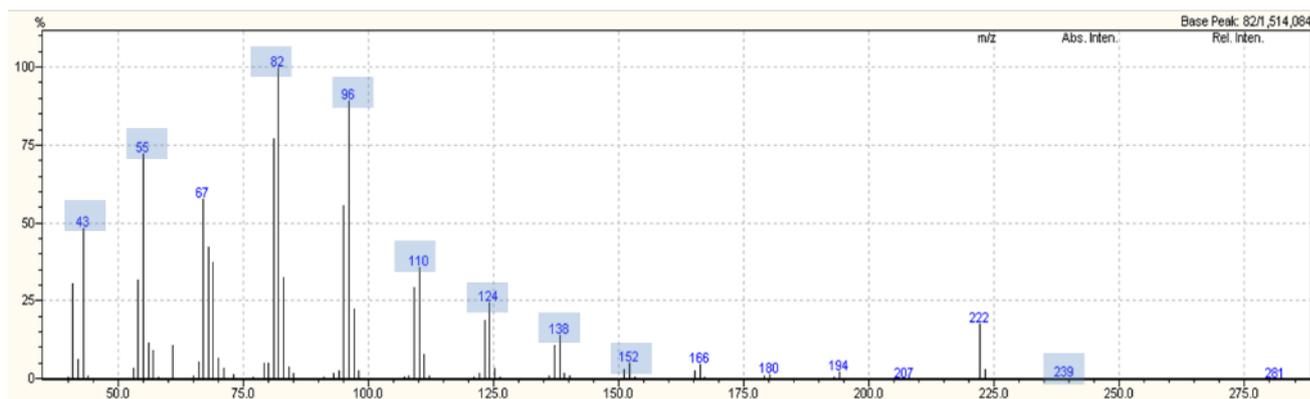


Figura 11. Espectro de masas obtenido a partir del análisis del pico B, con $t_R = 22,3$ min, en el extracto de glándulas. Según la fragmentación observada, se identificó tentativamente como acetato de 11-hexadecen-1-ol

Los perfiles de iones (no mostrados) de los picos designados como C, D, F y G en la Figura 9 permitieron identificarlos tentativamente como ácidos grasos saturados (D), monoinsaturados (C, G) y di-insaturados (F), de

16 y 18 carbonos, pudiendo corresponder a precursores biosintéticos de los componentes de la feromona. Los compuestos que eluyen a tiempos de retención mayores a 25 minutos se identificaron tentativamente como hidrocarburos lineales de cadena larga, compuestos típicos de la cutícula que recubre las glándulas (espectros no mostrados). Dada su baja volatilidad a temperatura ambiente, tanto los hidrocarburos cuticulares como los ácidos de cadena larga no son factibles de formar parte de la feromona sexual. Otros compuestos en el extracto incluyen el señalado con la letra E, identificado tentativamente como 2-nonadecanona; y el compuesto H, para el cual no se pudo obtener un espectro de masas que permita su identificación, dada su baja cantidad presente en el extracto. Sin embargo, el espectro de masas de H (t_R 19,5) presentó iones mayoritarios indicativos de un aldehído de cadena lineal. Finalmente, se observaron impurezas siliconadas de la columna y otros compuestos menores.

El perfil cromatográfico del extracto se comparó con estándares sintéticos de compuestos candidatos. En otras especies del género *Pseudaletia* se ha descrito consistentemente que la composición de su feromona sexual se basa en los compuestos Z11-16OH y Z11-16OAc, tales como *P. separata* (Pingchou *et al.* 1987; Lebedeva *et al.* 2000), *P. unipuncta* (McDonough *et al.* 1980) y *P. sequax* (Almeida, A. 2007). Para estas especies se ha reportado además la presencia del compuesto Z11-16Ald, en el caso de *P. sequax* como componente mayoritario de su feromona sexual. Por este motivo, se analizaron por GCMS los estándares sintéticos del (Z)-11-hexadecen-1-ol, acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ol y (Z)-11-hexadecenal, confirmando que los tiempos de retención y espectros de masas de los tres estándares sintéticos coinciden con los tiempos de retención de los picos A, B y H, respectivamente, presentes en el extracto de glándulas de *P. adultera*.

Este análisis se realizó con los estándares sintéticos mencionados, en conjunto con hidrocarburos lineales saturados, de modo de calcular simultáneamente los índices de retención de los compuestos del extracto. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 1 Cálculo de índice de retención de Kovats de los picos identificados en el cromatograma del extracto de glándulas de *P. adultera*

Pico	z	n	tr_x (min)	tr_z (min)	$tr_{(z+n)}$ (min)	IR calculado	IR literatura	Compuesto tentativamente identificado
A	18	1	17,65	17,307	18,732	1824	1809	11-16Ald
B	18	1	18,556	17,307	18,732	1888	1874	11-16OH
H	20	2	20,327	20,083	22,634	2019	2004	11-16OAc

Siendo:

z = N° de carbonos del hidrocarburo anterior al compuesto objetivo

z+n = N° de carbonos del hidrocarburo siguiente al hidrocarburo anterior al compuesto objetivo

n = Diferencia entre el número de carbonos entre z y z+n

tr_x = Tiempo de retención del compuesto objetivo

$tr_z, tr_{(z+n)}$ = Tiempo de retención de los hidrocarburos anterior y posterior al compuesto objetivo

El índice de Kovats se estimó según:

$$IRx=100*z + 100*n*\left(\frac{tr_x - tr_z}{tr_{(z+n)} - tr_z}\right)$$

Las composiciones relativas de estos tres compuestos se obtuvieron mediante análisis de diferentes extractos de glándulas en un cromatógrafo de gases, con detector de ionización de llama (FID), en las condiciones descritas para GC-EAD. Se calculó el área relativa de los picos y se normalizaron al pico que presentó menor área relativa (asignándole valor 1). Las proporciones variaron entre diferentes extractos, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Proporción relativa, medida como área total en GC-FID, de los tres compuestos candidatos a formar la feromona sexual de *P. adultera*, obtenidos en el análisis por cromatografía gaseosa de extractos de glándulas

ID. EXTRACTO DE GLÁNDULAS	Z11-16OH	Z11-16OAc	Z11-16Ald
1	92	6	1
2	2,4	1,2	1
3	3,1	2,1	1
4	106	6	1

Como se mencionó anteriormente, se observó una gran variabilidad entre diferentes extractos, posiblemente por razones experimentales. En este caso, se diferencian dos grupos de mezclas; el primer y cuarto extracto de glándulas presentan una relación cercana a 16:1 entre el alcohol y el acetato, así como una relación constante de 6 a 1 entre el acetato y el aldehído. El segundo y tercer extracto presentan proporciones relativas más cercanas entre sí, siendo el alcohol apenas 3 veces mayor que el compuesto minoritario, el aldehído.

Para confirmar la posición del doble enlace en los componentes de la feromona de *P. adultera*, se analizaron los productos de dimetildisulfuración con DMDS. Se trabajó primero con los estándares sintéticos (Z11-16OH, E11-16OH, Z11-16OAc), incluyendo también isómeros geométricos para obtener diasterómeros separables por cromatografía de gases. En los cromatogramas de los estándares derivados se observa que en algunos casos la reacción no fue total, pero se da una disminución de la concentración relativa del compuesto original (señalado en las figuras), y la aparición de un pico que corresponde al compuesto dimetildisulfurado. Los tiempos de retención de los estándares derivados son en todos los casos mayores que los compuestos sin derivatizar: $t_R = 28,76$ min para el derivado de (Z)-11-hexadecen-1-ol; $t_R = 28,79$ min para el de (E)-11-hexadecen-1-ol; y $t_R = 30,10$ min para el correspondiente al acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ol (Figuras 12, 13, 14)

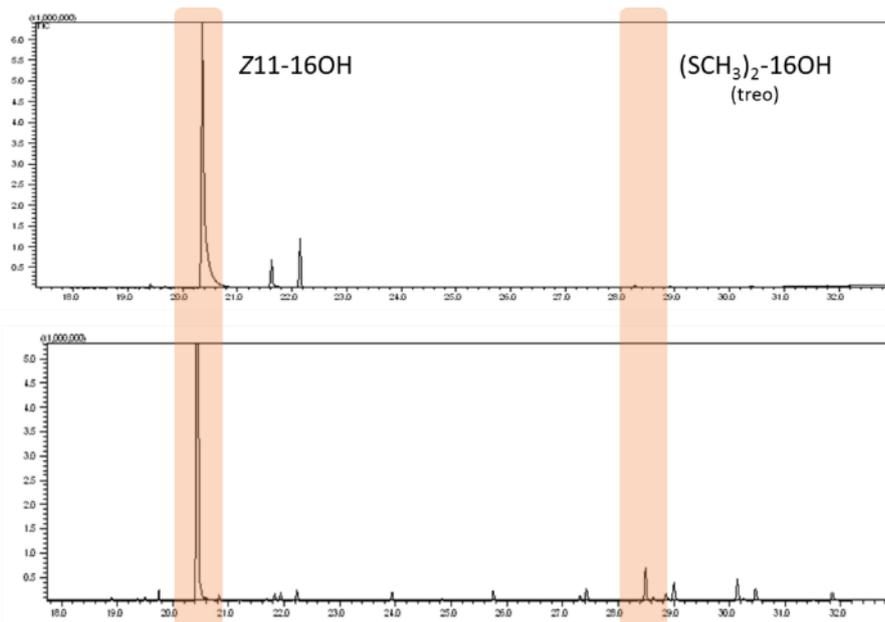


Figura 12. Cromatograma de iones totales (TIC) de Z11-16OH (arriba) y del resultante de la derivatización del Z11-16OH (abajo)

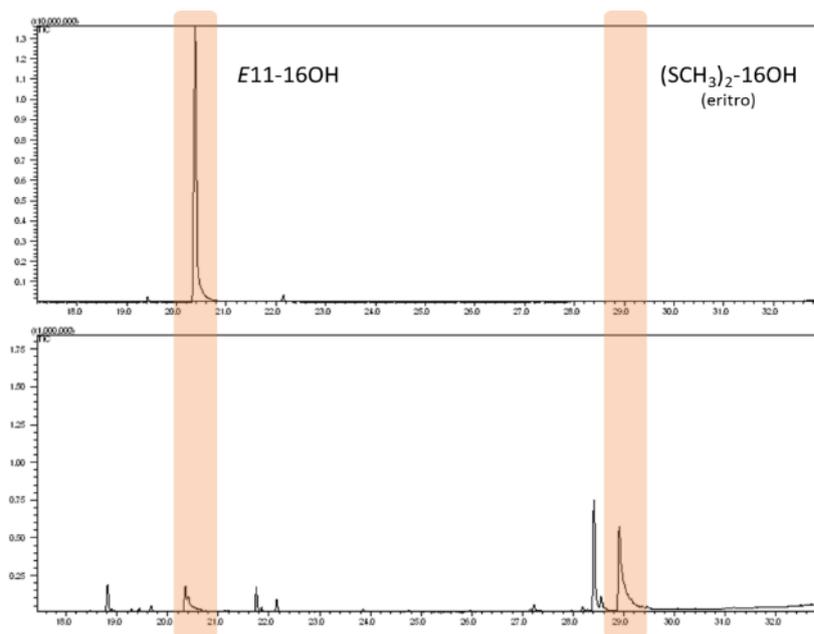


Figura 13. Cromatograma de iones totales (TIC) de E11-16OH (arriba) y del resultante de la derivatización del E11-16OH (abajo)

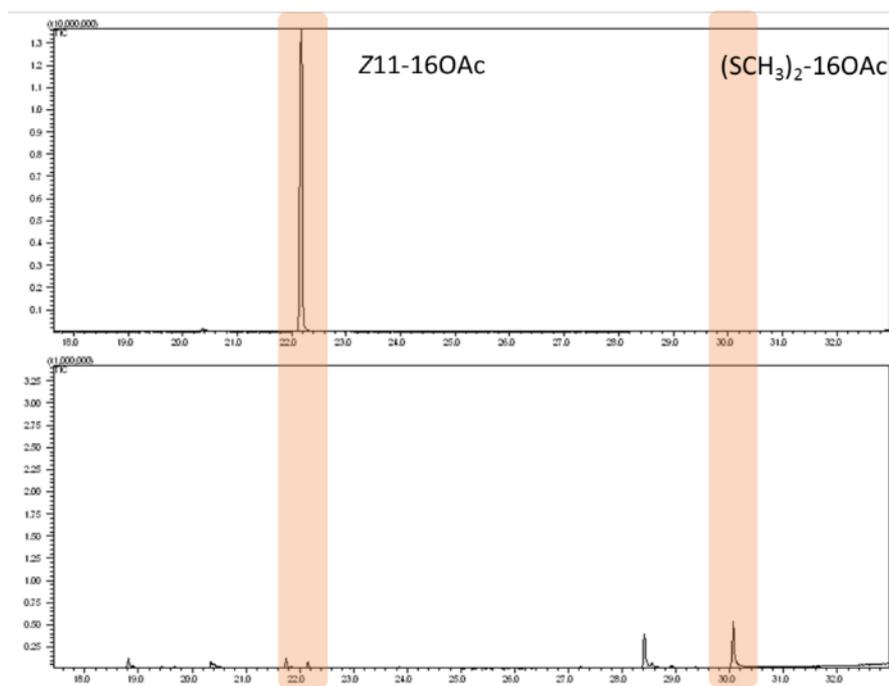


Figura 14. Cromatograma de iones totales (TIC) de Z11-16OAc (arriba) y del resultante de la derivatización del Z11-16OAc (abajo)

La confirmación de la identidad de los estándares sintéticos derivatizados se basó en la identificación de los iones M^+ esperables tras la adición de dos sustituyentes SCH₃ a la molécula original, es decir, un incremento de masa de 94 unidades. Asimismo, la presencia característica de un ion con m/z 61 $[H_2CSCH_3]^+$ es diagnóstica de los aductos de olefinas con DMDS (Figuras 15 y 16).

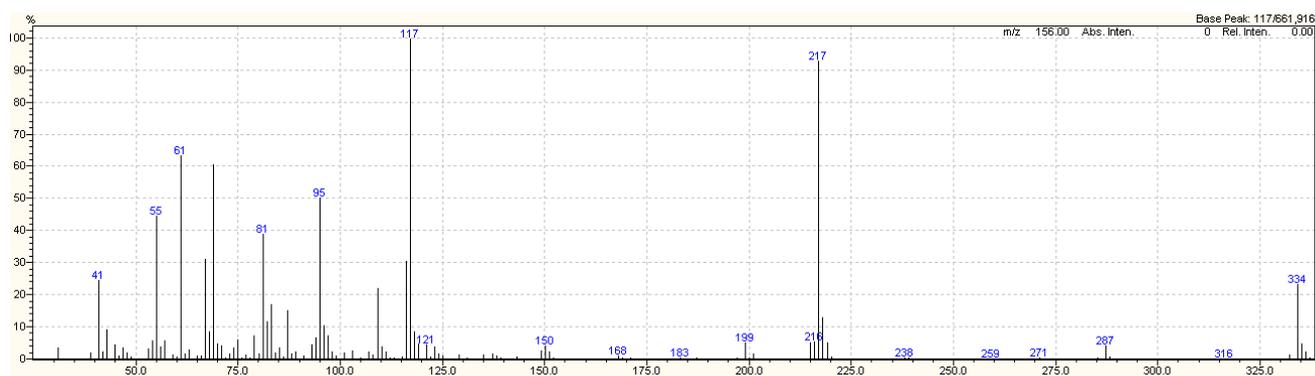


Figura 15. Espectro de masas del compuesto resultante de la derivatización del Z11-16OH (idéntico al del producto de derivatización del E11-16OH)

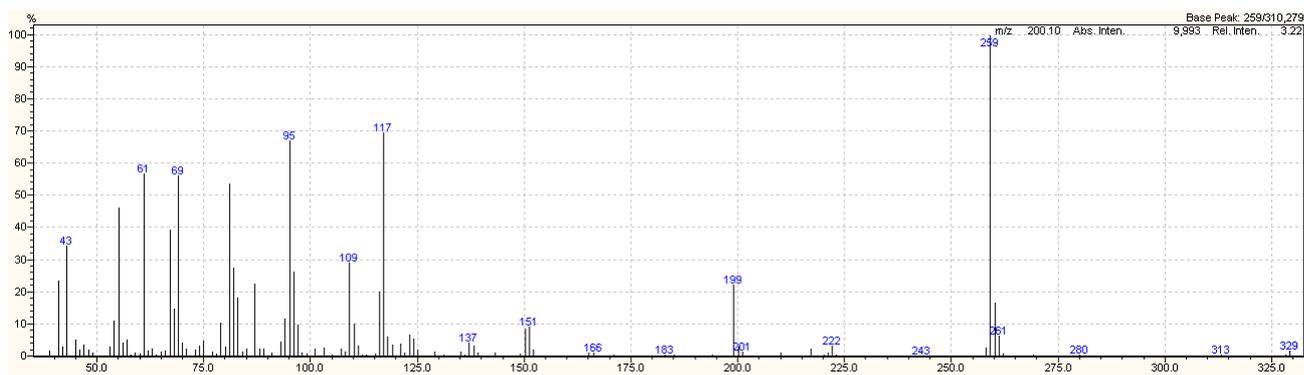


Figura 16. Espectro de masas del compuesto resultante de la derivatización del Z11-16OAc

La posición del doble enlace en la olefina original se deduce a partir de la fragmentación favorecida entre los carbonos que sostienen los grupos metil-sulfuro, lo cual da como resultado dos grandes fragmentos de relativa estabilidad, por lo tanto, abundantes en los espectros de masas de los aductos. A modo de ejemplo, se muestra la fragmentación esperada para el derivado con DMDS de Z11-16OAc, donde los iones producidos son los de m/z 259 y m/z 117 (Figuras 16, 17).

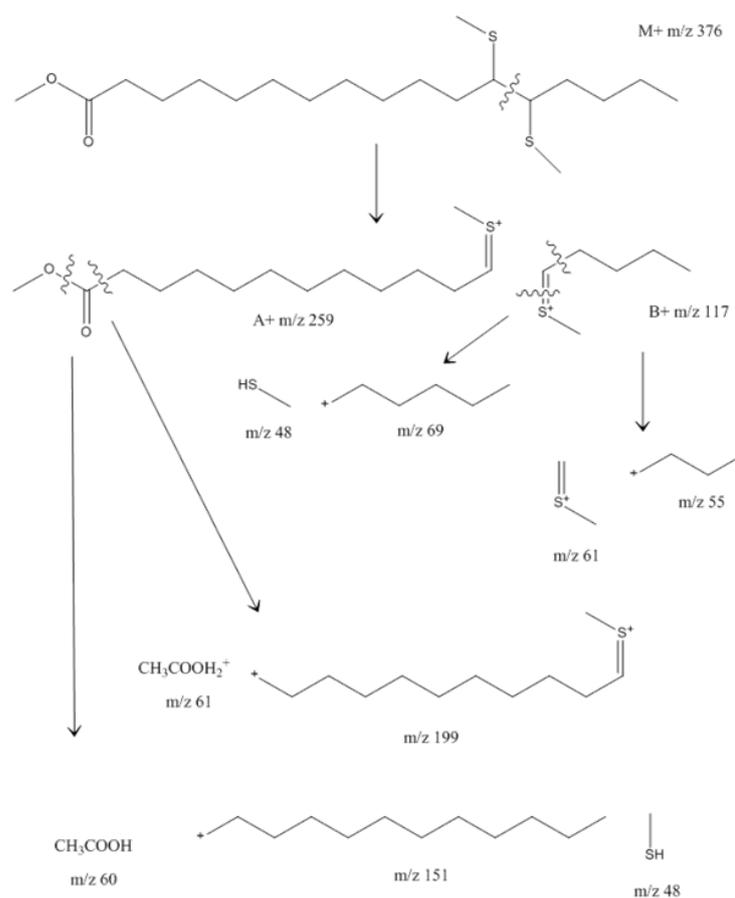


Figura 17. Fragmentación del aducto entre Z11-16:OAc y disulfuro de dimetilo.

Similarmente, el análisis de las fragmentaciones de los alcoholes derivatizados se muestra en la Figura 18. Aunque ambos alcoholes derivatizados produjeron el mismo espectro de masas (Figuras 12 y 13), se diferenciaron por el tiempo de retención de los aductos.

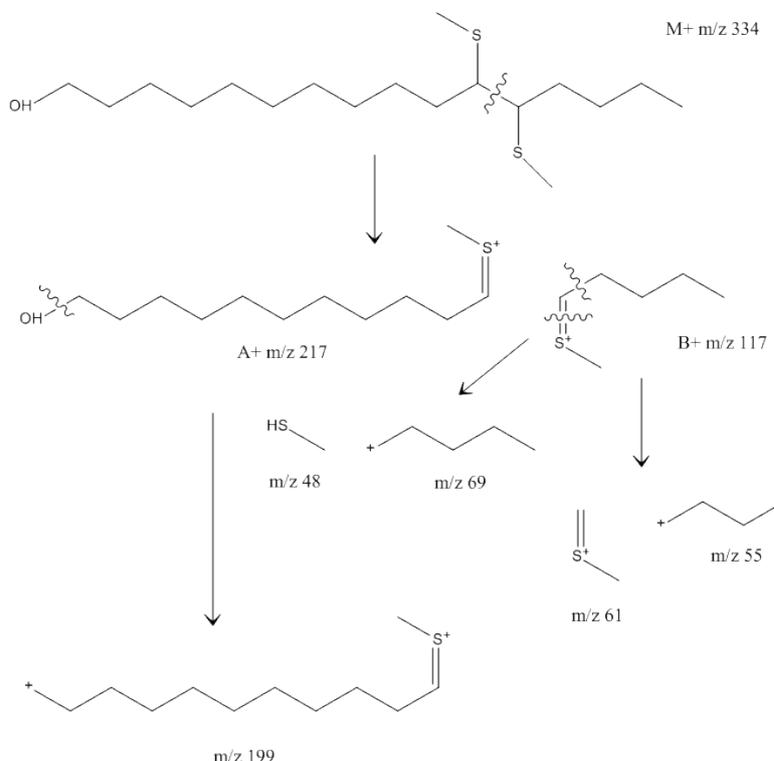


Figura 18. Fragmentación propuesta para el Z11-16:OH derivatizado con DMDS

Al realizar la derivatización del extracto de glándulas, la reacción no produjo los aductos esperados, y más adelante en el transcurso de la tesis no se logró obtener un extracto con la cantidad necesaria de los compuestos de interés como para realizar nuevamente la derivatización, por lo que la confirmación de configuración y posición del doble enlace quedó pendiente. Sin embargo, siguiendo una lógica filogenética, se asumió tentativamente que la posición del doble enlace es 11 y la configuración es Z, a los efectos del estudio de actividad biológica. Como se verá más adelante (capítulo 3), dada la evidencia electrofisiológica y comportamental, esta suposición se estima muy probable.

Respuesta electrofisiológica de machos

Se analizó el extracto de glándulas por GC-electroantenografía (GC-EAD), utilizando antenas de machos de *P. adultera* de entre 4 y 6 días de emergidos. Se obtuvieron señales claras y reproducibles a diferentes compuestos del extracto, se presentan los resultados obtenidos como un promedio de las señales ($n = 9$) cuando se exponen las antenas al extracto de glándulas (Figura 19).

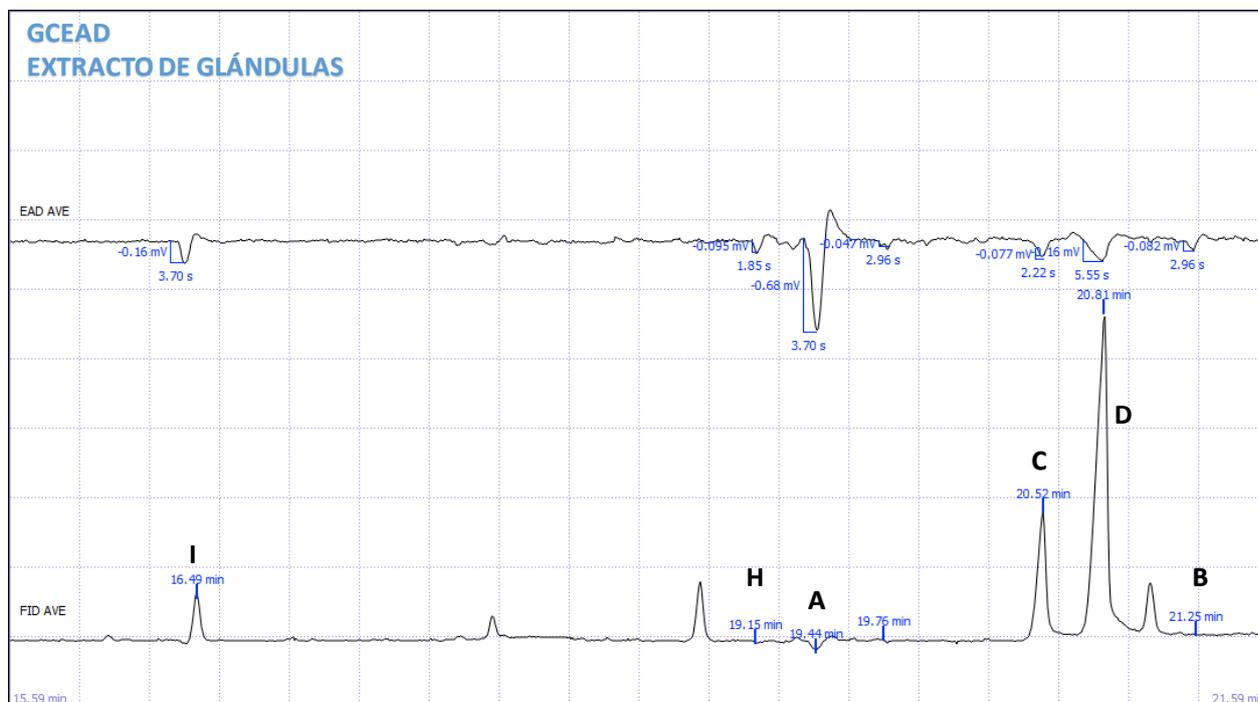


Figura 19. GC-Electroantenograma de antenas de machos de *P. adultera* ($n = 9$) frente a extracto de glándulas. Se indican los compuestos identificados por GC-MS, las amplitudes de las señales y los tiempos de retención

Se observa una señal mayoritaria reproducible (amplitud promedio 1 mV), cuyo tiempo de retención corresponde al alcohol monoinsaturado (**A**), identificado tentativamente como Z11-16OH. Cabe notar que el análisis por GC-EAD corresponde a extractos con muy baja cantidad de feromona y mayoría de ácidos precursores, obtenidos posteriormente al extracto de la Figura 9. Se confirmó la correlación de las señales utilizando como estímulos los estándares sintéticos (Figura 20).

En la Figura 19 se observan otras señales minoritarias, en los tiempos de retención correspondientes al aldehído (**H**) y al acetato monoinsaturados (**B**). Se observa además una pequeña señal a un compuesto que eluye antes (**I**, $t_R = 16,49$ min), el cual por la diferencia en los tiempos de retención se supone sea un compuesto cuya cadena carbonada posee 14 átomos de carbono, y sea un alcohol o un aldehído. Aparecen otras señales correspondientes a los ácidos grasos presentes en la glándula, que posiblemente constituyan los precursores de los componentes activos de la feromona sexual. Se concluye que su similitud química y

estructural elicit respuestas en las antenas de machos de *P. adultera*, pero no poseen una función en la comunicación química del insecto por su baja volatilidad a temperatura ambiente.

Con la identificación primaria del alcohol, aldehído y acetato monoinsaturados, se ensayaron antenas de machos de *P. adultera* en las mismas condiciones que el análisis de GC-EAD del extracto. Se utilizaron los estándares sintéticos Z11-16OH, Z11-16Ald y Z11-16OAc, así como (Z)-9-tetradecen-1-ol (en adelante, Z9-14OH), (Z)-9-tetradecenal (en adelante, Z9-14Ald), en concentración 10 ppm.

Los estándares sintéticos del aldehído, el alcohol y el acetato de 16 carbonos (doble enlace posición 11, isomería Z) elicitaron respuestas claras y reproducibles, presentándose una señal de mayor amplitud al alcohol y una señal de menor amplitud al aldehído (Figura 20). Tal como se mencionó anteriormente, en corridas sucesivas se logró demostrar que los tiempos de retención de estos estándares coinciden con los tiempos de retención de las señales obtenidas en el extracto de glándulas, a pesar que los tiempos que se pueden observar en la figura 20 (elegida a modo de representación de los resultados obtenidos), presenta un leve corrimiento en el eje del tiempo. Esto pudo deberse a cambios de columna en el transcurso de la tesis y ajustes al programa de temperaturas en el GC.

Los compuestos de 14 carbonos elicitaron una respuesta de la antena, pero los tiempos de retención no coincidieron con ninguna de las señales obtenidas cuando se expuso la antena al extracto de glándulas.

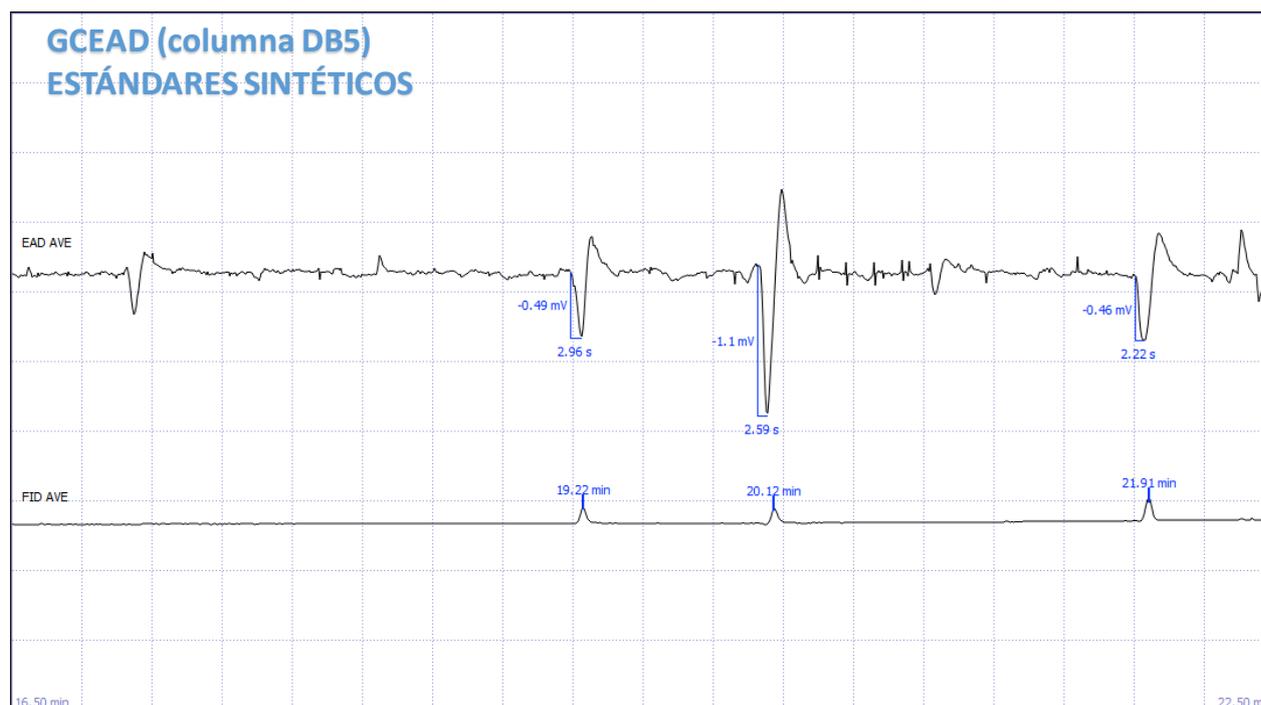
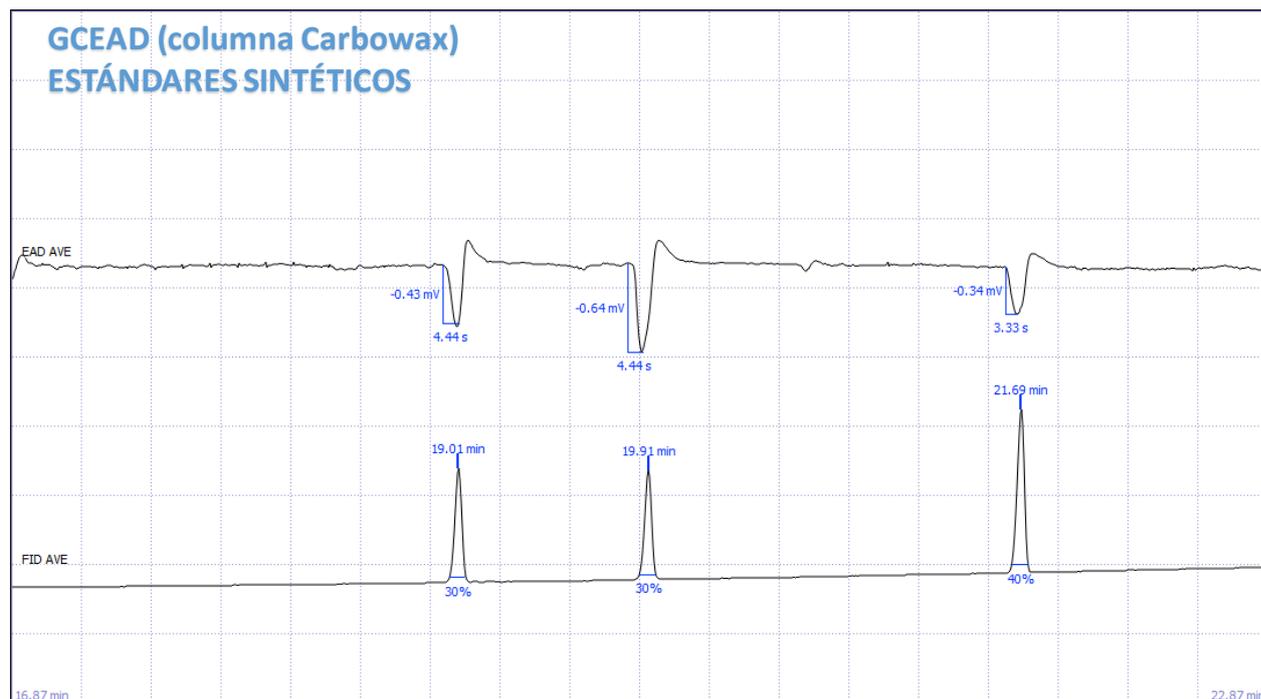


Figura 20. Electroantenograma de antenas de machos de *P. adultera* ($n = 9$) frente a la mezcla de estándares sintéticos conteniendo Z11-16Ald ($t_R=19,91$ min CW; $t_R=19,22$ min DB5), Z11-16OH ($t_R=21,69$ min CW; $t_R=20,12$ min DB5), Z11-16OAc ($t_R=19,01$ min CW; $t_R=21,91$ min DB5), 10 ppm, relación 1:1:1 en columna Carbowax (arriba) y columna DB5 (abajo)

DISCUSIÓN

La observación directa de hembras adultas en la penúltima y antepenúltima hora de la fase oscura, permitió diferenciar claramente las hembras en posición de llamada. Únicamente estas hembras fueron seleccionadas para la extracción de las glándulas y la posterior obtención del extracto de glándulas. El método mecánico utilizado fue adecuado para la separación de las glándulas del resto del cuerpo del insecto adulto, minimizando la contaminación por tejidos cuticulares anexos.

El análisis cromatográfico de los extractos de glándulas evidenció de manera reiterativa, en casi la totalidad de los extractos obtenidos, la presencia de un pico correspondiente a un alcohol primario monoinsaturado. El análisis electroantenoográfico frente a este compuesto presentó una señal clara, reproducible y mayoritaria.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, en relación a la síntesis *de novo* de las feromonas sexuales, a partir de precursores que son ácidos grasos, en la cual la presencia de enzimas desaturadas (siendo la más común, la $\Delta 11$ desaturada) es temprana en la biosíntesis, fijando la posición del doble enlace para luego dar paso a la funcionalización. Este hecho se fundamentó a través de un análisis multivariante, publicado en 1988, en el cual se analizó información de atrayentes y feromonas sexuales reportadas para siete subfamilias de la familia Noctuidae, con el objetivo de identificar semejanzas estructurales. Este análisis multidimensional reveló la presencia de un compuesto en común, caracterizado como un acetato monoinsaturado, con isomería Z y un doble enlace en el quinto carbono más cercano al extremo no funcional de la cadena (Renou *et al.* 1988).

Datos bibliográficos de especies congéneres, permitieron presumir la isomería Z del alcohol monoinsaturado y la posición del doble enlace (C11-C12), resultando entonces que el alcohol fue Z11-16OH.

Se obtuvieron coincidencias cuando se compararon los tiempos de retención y la respuesta electrofisiológica entre el compuesto en el extracto de glándulas y el compuesto sintético, presumiendo su coincidencia estructural. Los cálculos de índice de Kovats son coherentes con esta conclusión.

La antena presentó, de manera reproducible, otras dos respuestas menores frente al extracto de glándulas, coincidentes en el cromatograma con dos compuestos oxigenados lineales monoinsaturados. El análisis de estos dos picos permitió identificarlos como un acetato monoinsaturado y un aldehído monoinsaturado.

Una vez más, no pudieron identificarse de forma inequívoca los compuestos a partir de su espectro de masas, debido a la baja concentración o ausencia de iones. Por ello, dado que la biosíntesis del doble enlace, a cargo de enzimas desaturadas específicas, y que ocurre previo al paso de la funcionalización del carbono terminal, se presume que la posición del doble enlace del acetato y aldehído, así como la isomería del mismo, es también Z11 en los componentes minoritarios. Otras especies congéneres presentan en la composición de su feromona estos compuestos, Z11-16OAc y Z11-16Ald. Se verificó esta conclusión a partir de la comparación con los estándares sintéticos y la respuesta electrofisiológica de la antena.

Se concluye entonces que los compuestos identificados tentativamente como Z11-16OH; Z11-16OAc y Z11-16Ald; elicitaban señales claras y reproducibles, coinciden sus tiempos de retención en el cromatograma con el extracto de glándulas y los índices de Kovats son coherentes con la identificación primaria. La mayor respuesta es la elicitada por el alcohol, el cual presenta un pico con mayor área en el extracto obtenido; pudiendo presumirse que es el componente principal de la feromona sexual de *P. adultera*.

Se observaron señales menores de la antena a otros compuestos del extracto de glándulas, algunas de ellas no fueron reproducibles, otras no permitieron su identificación inequívoca en el extracto de glándulas y no pudieron verificarse mediante comparación con estándares sintéticos.

La realización de numerosas extracciones a lo largo del transcurso de la tesis, permitió en muy pocas ocasiones obtener extractos en los cuales se logró identificar de forma clara los compuestos de interés; en su mayoría los extractos presentaron líneas de base con interferencias, presencia de ácidos grasos precursores, los compuestos de interés no presentaban picos fácilmente detectables ni espectros de iones abundantes, que permitieran su identificación inequívoca.

Por este motivo, se realizaron esfuerzos en estudiar y modificar ciertas etapas del proceso de extracción, para mejorar el resultado obtenido. Se estudió la sensibilidad del GC-MS realizando curvas de detección utilizando el Z11-16OAc, corroborando la detección de este compuesto en concentraciones de 0,001 ppm. Se renovó la cría de forma continua, incorporando huevos y larvas provistos por las estaciones experimentales de EEMAC – Paysandú e INIA La Estanzuela – Colonia; se modificó la dieta de la cría, complementando la dieta artificial de las larvas con gramíneas cultivadas en el laboratorio. La extracción se realizó en diferentes momentos específicos del período de llamada (cuya duración es de aproximadamente 2 horas); se modificó el número de glándulas extraídas, variando entre 1 a 100 por extracto, sin obtener mejores resultados.

Se cree entonces que el confinamiento ocasionado por el cautiverio y el estrés que esto genera, puede ocasionar una disminución en la síntesis de feromona de parte de las hembras adultas; impidiendo la reproducibilidad de los extractos de glándulas obtenidos. Este hecho se ve reflejado en la presencia de ácidos grasos en grandes cantidades en los extractos de glándulas, los cuales se cree son los precursores en la síntesis de feromona sexual.

En base a los resultados parciales obtenidos, se prosiguió con los estudios biológicos, utilizando los tres compuestos sintéticos con configuración Z11 y un alcohol monoinsaturado de 14 carbonos, para el cual se observaron señales en EAG. La proporción relativa de los tres compuestos principales fue variable entre los extractos de glándulas productoras de feromona obtenidos. Como las proporciones obtenidas en el FID reflejan las presentes en la glándula, pero no necesariamente la emitida como señal por parte de la hembra, se evaluaron distintas proporciones relativas en los ensayos de comportamiento (Capítulo 3: “Estudios comportamentales en laboratorio y capturas a campo”).

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, A. 2007. Comportamento reprodutivo e identificacao de foromonio sexual de *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis presentada a la Universidad Federal de Vicosa, Minas Gerais – Brasil.
- Arzuffi, R.; Castrejón F. 2012. Feromonas involucradas en el comportamiento sexual de Lepidoptera. Pp. 72-94. En Temas selectos en Ecología Química de Insectos, eds. Rojas, J. C.; Malo, E. A. *El Colegio de la Frontera Sur. México*.
- Buser, H.; Arn, H.; Guerin, P.; Rauscher, S. 1983. Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. *Analytical Chemistry*. Vol. 55, No 6. Pp 818-822
- Howse, P.E. 1998. Insect Semiochemicals and communication. En Insect Pheromones and their use in Pest Management, eds. Howse, P.; Stevens, I.; Jones, O. *Chapman & Hall, London*.
- Lebedeva, K. V.; Vendilo, N. V.; Kurbatov, S. A.; Pletnev, V. A.; Ponomarev, V. L.; Pyatnova, Y. B.; Bocharova, N. I. 2000. Identification of the pheromone of eastern-meadow cutworm *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Agrokhimiya*. Vol. 5. Pp 57-69.
- Malo, E. A.; Rojas, J. C. 2012. Métodos de investigación en Semioquímicos, pp 17-45. En: Temas Selectos en Ecología Química de Insectos, eds. Malo, E. A.; Rojas, J. C. *El Colegio de la Frontera Sur. México*
- McDonough, L. M.; Kamm, J. A.; Bierl-Leonhardt, B. A. 1980. Sex Pheromone of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 6, No 3.
- Nichols, P. D.; Guckert, J. B.; White, D. C. 1986. Determination of monounsaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 5. Pp 49 – 55.
- Pingchou, Z.; Fanlei, K.; Yonging, Y. 1987. Sex pheromone of oriental armyworm *Mythimna separata* Walker. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 13, No 5.
- Renou, M.; Lalanne-Cassou, B.; Michelot, D.; Gordon, G.; Doré, J.C. 1988. Multivariate analysis of the correlation between noctuidae subfamilies and the chemical structure of their sex pheromones or male attractants. *J. Chem Ecol*. Vol. 14, No 4.
- Ridley, M. 2003. *Evolution*, 3rd Ed. Blackwell Publishing, Oxford. 751 p
- Syntech. 2004. *Electroantennography, a practical introduction*. Hilversum, The Netherlands.

CAPÍTULO 3. Estudios comportamentales en laboratorio y capturas a campo

La aplicación más común de las feromonas sexuales en el manejo de plagas es la detección y monitoreo temporal y espacial de especies plaga, debido a que las feromonas son suficientemente sensibles y específicas para detectar bajas poblaciones de una especie. Para ello, se utilizan feromonas sintéticas, las cuales se colocan en septos de goma o dispensadores, en cantidades que oscilan entre 0,1 y 1 mg. Estos septos se colocan en trampas, que pueden ser de diversos tipos, y contienen un compartimento cerrado o una sustancia pegajosa que permite atraer y atrapar a los machos [González, A. 2012].

Dado el alto grado de especificidad de las feromonas, la optimización en la formulación de la feromona es un aspecto clave para asegurar el éxito en el monitoreo de una especie. La optimización de la formulación puede desarrollarse mediante estudios comportamentales en el laboratorio, para lo cual el ensayo mayormente utilizado para lepidópteros se realiza en un túnel de viento. El mismo constituye un ensayo discriminante en la identificación de feromonas sexuales, ya que, en presencia de la formulación adecuada que simule la feromona sexual, se puede observar al macho realizar el vuelo en la pluma, llegar a la fuente y realizar intentos de cópula.

Asimismo, y en especial para realizar ensayos de campo complementarios a los de laboratorio, el conocimiento de la biología del insecto es una herramienta útil que permite predecir el desarrollo en campo, siendo de gran ayuda para determinar el momento preciso para efectuar una medida de control o muestreo. Los insectos pueden desarrollarse y reproducirse en condiciones de temperatura acotadas, presentando parámetros conocidos como umbrales de desarrollo. El límite inferior de temperatura (μ_i) implica que debajo del mismo el insecto no se desarrolla ni reproduce, y temperaturas por encima del límite superior (μ_s) también detienen el desarrollo del insecto. El período de tiempo durante el cual la temperatura ambiente se encuentra entre estos valores resulta en una acumulación de calor, denominada y medida como grados-día. El calor acumulado para completar el desarrollo es una constante, intrínseca a una especie; denominada constante térmica, y representa la cantidad de calor requerida para completar el desarrollo de una generación (o de un estado determinado). Esta constante térmica permite determinar, conociendo los datos de un suceso biológico inmediatamente anterior y las condiciones de temperatura, la ocurrencia del próximo suceso, calculado como la sumatoria de temperaturas efectivas diarias registradas entre los umbrales superior e inferior de desarrollo [Bentancourt *et al.* 2006].

Estos parámetros se emplearon para predecir los picos de vuelo de *P. adultera*, a fin de planificar los ensayos de campo. En estos ensayos se pretendió evaluar el nivel de capturas de machos utilizando como atrayentes diferentes mezclas de los compuestos encontrados en los extractos de glándulas que presentaron actividad en los análisis mediante GC-EAD y túnel de viento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Respuesta comportamental de machos en laboratorio

El estudio comportamental de los machos de *P. adultera* frente a los compuestos de la feromona se realizó en un túnel de viento (o túnel de vuelo), el cual consiste en un cilindro de acrílico transparente, de dimensiones 40 cm de diámetro y 150 cm de largo (Figura 21), por el cual se hace circular un flujo de aire laminar (30 cm/s). Para ello, el túnel está equipado con una bomba de succión ubicada al final del mismo. El aire succionado es filtrado por carbón activado, atraviesa el tubo de acrílico y es expulsado al exterior de la habitación, para evitar la contaminación del aire en el sitio de experimentación.

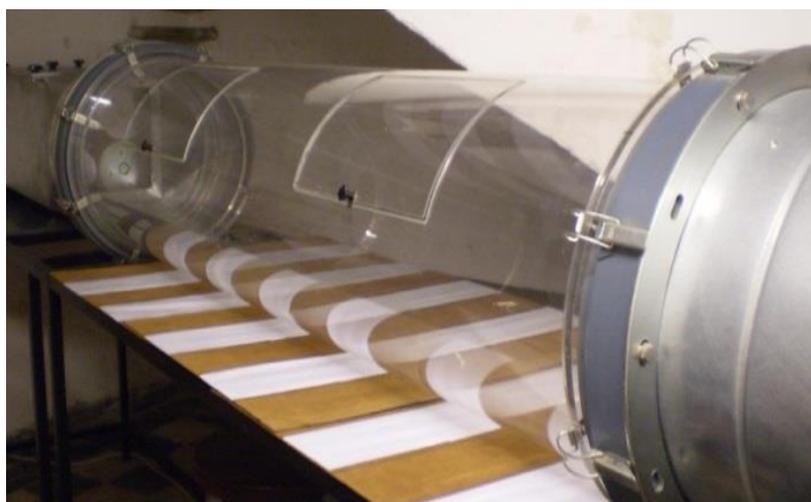


Figura 21. Túnel de viento, por el cual circula un flujo regulado de aire laminar, limpio (carbón activado). En el túnel de viento se realizan ensayos de comportamiento con machos de *P. adultera* para evaluar su respuesta (vuelo a contraviento en dirección a la fuente de olor) frente a distintos estímulos químicos volátiles.

La temperatura y humedad relativa durante los ensayos fueron de $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$ y $(60 \pm 10) \% \text{HR}$, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo en la oscuridad, durante la antepenúltima y penúltima hora de la fase oscura, utilizando luz roja para la observación de la respuesta comportamental de los machos.

El ensayo consistió en colocar en el extremo final del tubo un estímulo volátil y en el extremo opuesto un macho adulto virgen. De esta forma, el flujo de aire arrastra los compuestos volátiles a evaluar, creando una pluma de olor a la cual el macho responderá si el estímulo es atrayente, mostrando un comportamiento característico de vuelo a contraviento. Previo al inicio del experimento, los machos (4-7 días luego de emergidos) fueron colocados individualmente en tubos abiertos de vidrio, de 3 cm de diámetro por 10 cm de largo, cerrados con tul en ambos extremos, lo cual permite la entrada y salida de aire. Un tubo conteniendo un macho se colgó centrado en un extremo del túnel de viento, se mantuvo cerrado por 1 minuto para permitir la percepción de la pluma de olor con el estímulo, luego se removió el tul liberando la salida. Se registró el comportamiento de

los machos durante 10 minutos, registrando el vuelo en pluma (vuelo orientado, en zigzag, directo a la fuente) y la llegada a la fuente. Cada macho fue utilizado una única vez.

Los diversos estímulos volátiles evaluados fueron colocados en un tubo de vidrio abierto (8 cm diámetro x 10 cm largo) cerrado con tul por ambos extremos, permitiendo la salida de volátiles. Se utilizaron hembras vírgenes ($n = 5$, 2 a 5 días de emergidas) en posición de llamada como control positivo. Los estímulos químicos se colocaron en septos de goma que actuaron como dispensadores, los cuales liberan las mezclas gradualmente. El control consistió en el disolvente de las mezclas (hexano) en septos de goma. Se utilizó un único septo por macho ensayado, siendo éstos preparados con antelación y mantenidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Los tubos en los cuales se colocaron los estímulos y los adultos fueron ubicados a la misma altura en el túnel de viento, pendiendo de alambres. La formulación de las mezclas ensayadas se realizó a partir del promedio de áreas relativas obtenidas de cada pico, que representa a los compuestos de interés en el extracto de glándulas, cuando se analiza por GC-FID. Las soluciones se prepararon por toma en volumen, utilizando para las tomas los datos de las diferentes proporciones de áreas relativas de cada compuesto encontradas. Las mezclas evaluadas fueron: el compuesto mayoritario (Z11-16:OH), mezclas binarias (Z11-16OH: Z11-16OAc; proporción relativa 19:1), mezclas ternarias (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald; en proporciones 96:6:1; 2.5:1,2:1; 95:5:0,1; 95:5:0,01) y cuaternarias (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald: Z9-14OH 90:9:1:0,6). En todos los casos se aplicó una dosis de 10 ng al septo dispensador. Se evaluó asimismo la actividad de machos frente a un extracto de glándulas de feromonas de hembras (1 eq.hembra/septo, en 1 μl de hexano).

Los resultados de los ensayos en túnel de viento se analizaron en función de dos comportamientos de los machos, el vuelo orientado (vuelo en pluma) y la llegada a la fuente de olor. Se calculó el porcentaje de machos que realizaron dichos comportamientos, analizando los resultados con el test de Chi Cuadrado mediante tablas de contingencia 2x2 ($P < 0,05$) y por un test de G con ajuste de error alfa para varias comparaciones [Zar, J. 1999].

Captura de machos en campo

Se montaron tres ensayos en dos estaciones experimentales, una ubicada al norte del país, en Paysandú (Estación Experimental "Mario A. Cassinoni") y la segunda ubicada en Colonia (INIA La Estanzuela). La elección del momento en el cual realizar el montaje de los ensayos, de modo que la probabilidad de encontrar adultos fuera mayor, se basó en dos consideraciones: por un lado, datos históricos de picos de vuelo proporcionados por las estaciones EEMAC (Paysandú) e INIA La Estanzuela. Por otro lado, se utilizaron las fechas de los picos de vuelo previos, a partir de las cuales, junto con datos de umbrales de temperatura máximo y mínimo (μ_i , μ_s), se aplicó la fórmula de cálculo de grados-día acumulados para obtener el tiempo necesario para cumplir un ciclo de vida y predecir el próximo pico de vuelo. Tomando en cuenta una constante térmica de *P. adultera* igual a 658,7 GD, y un umbral inferior de temperatura igual a 8,2 °C [Bentancourt *et al.* 2006], el cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\text{Si } \mu_i < \text{Temperatura} < \mu_s, \text{GD}_{\text{acum}} = (T_{\text{mín}} + T_{\text{máx}})/2 - \mu_i$$

$$\text{Si } \text{Temperatura} < \mu_s, \text{GD}_{\text{acum}} = (T_{\text{mín}} + \mu_i)/2 - \mu_i$$

$$\text{Si } \mu_i < \text{Temperatura}, \text{GD}_{\text{acum}} = (\mu_s + T_{\text{máx}})/2 - \mu_i$$

Ensayo en la Estación Experimental “Mario A. Cassinoni”

Datos históricos relevados por la estación experimental de Paysandú muestran que los mayores ataques *P. adultera* ocurren en los inicios de la primavera, entre setiembre y noviembre; ya que atacan cultivos de trigo y cebada sembrados en invierno. Sin embargo, dado que existe información de capturas en trampas de luz, se decidió llevar a cabo un ensayo preliminar a fines de marzo, en plantaciones de avena sembradas entre febrero y principios de marzo. Estas plantaciones son utilizadas para forrajeo de ganado, el cual es trasladado en franjas cada día; por este motivo, se eligieron las zonas en que el cultivo estaba menos crecido, de modo de poder culminar el ensayo previo a la llegada del ganado.

Las trampas utilizadas fueron las denominadas trampas delta, utilizadas comúnmente para lepidópteros. Las trampas se confeccionaron en cartón plast, de 20 cm de largo y 16 cm de lado (Figura 22). Se colocaron pisos engomados en las trampas, de modo que los insectos atraídos queden adheridos a las trampas.

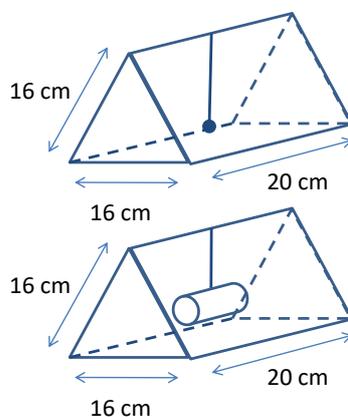


Figura 22. Estructura de trampas delta. La estructura es hueca y se coloca en el centro el estímulo atrayente, colgando de un alambre. Los estímulos químicos fueron colocados en septos de goma (arriba). Los estímulos vivos (hembras de *P. adultera*) fueron colocadas en un cilindro transparente abierto, cubierto con tul en los extremos (abajo).

Las mismas fueron colgadas en varillas de metal de 1 metro de largo, que les permitieran la libre rotación, y dispuestas al ras del piso. Las trampas fueron dispuestas en tres zonas diferentes del cultivo (Figura 23), una de ellas se encontraba en período de forrajeo, otra con avena en crecimiento (5 cm de alto) y la última con avena seca.

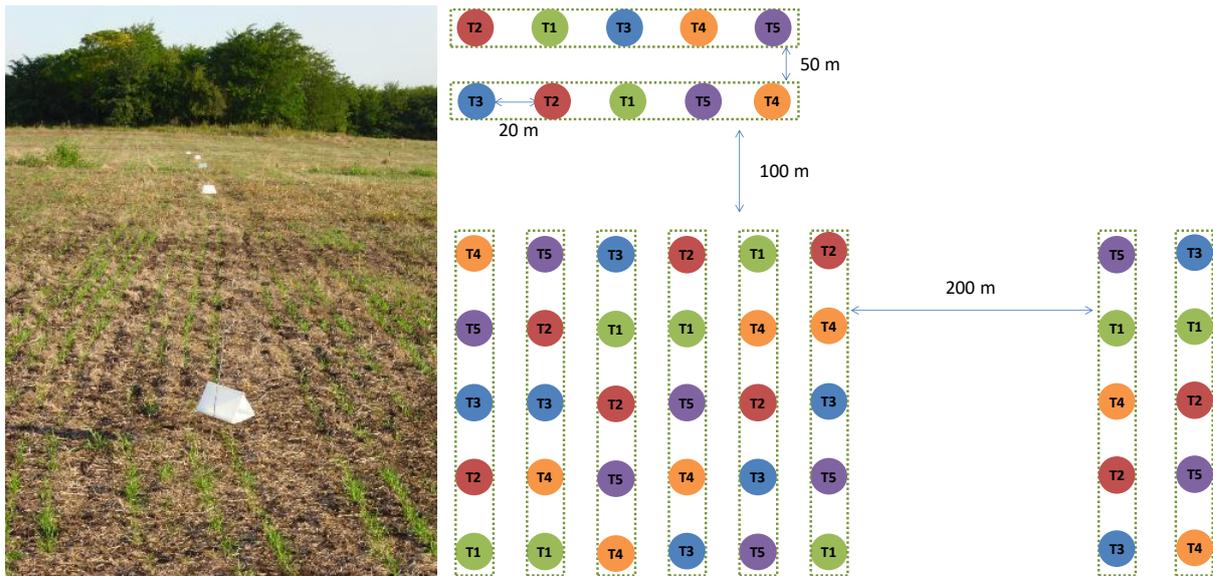


Figura 23. Disposición de un bloque de trampas delta en cultivos en la estación experimental EEMAC, Paysandú (izq.); esquema mostrando la disposición de los bloques y distancias (der)

Se dispusieron las trampas en bloques, cada bloque conteniendo 5 tratamientos (tres mezclas sintéticas, control y hembras vivas), y una trampa de cada tratamiento por bloque, con una distancia de 20 m entre trampas y de 50 m entre bloques. Los tratamientos utilizados fueron: un control positivo, el cual consistió en el uso de hembras vivas de *P. adultera* colocadas en un tubo de vidrio transparente (2 por tubo), con ambos extremos abiertos y cubiertos con tul. Se les colocó un trozo de algodón con solución agua-miel para que pudieran alimentarse, el cual fue repuesto cada semana.

Se utilizó hexano como control negativo (disolvente de las mezclas sintéticas) y tres tratamientos de mezclas sintéticas: El componente que elicó la mayor respuesta en antenas de machos de *P. adultera*, Z11-16OH, la mezcla ternaria Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald en proporción 95:5:1 y una segunda mezcla con mayor proporción de los componentes minoritarios, 70:30:30. Los estímulos químicos y el control negativo fueron colocados en septos de goma, los cuales permiten la liberación lenta de las mezclas, en cantidad de 1 mg total de mezcla por septo (en 10 μ l de hexano), e igual volumen de disolvente en el caso del control. Los septos y las hembras vivas fueron cambiados cada 7-10 días, así como los pisos engomados. Se realizaron revisiones semanales de las trampas para registrar las capturas de machos.

Ensayo en INIA La Estanzuela

El segundo y tercer ensayo se montaron en la estación experimental de INIA La Estanzuela, en el departamento de Colonia. Las trampas utilizadas fueron trampas delta idénticas a las utilizadas en el primer ensayo, y trampas tipo “*bucket*” en adición a las anteriores (Figura 24). Estas trampas se comercializan específicamente para lepidópteros noctúdeos. Se utilizaron igual número de trampas delta y trampas *bucket*, colocando cada tratamiento en ambos tipos de trampas, con el fin de comparar la efectividad de las mezclas y del tipo de trampa.



Figura 24. Trampa tipo “*bucket*”, específica para noctúdeos.

Las trampas bucket fueron previamente evaluadas en laboratorio, para verificar la eficacia en la captura de adultos machos de *P. adultera*. Para ello se utilizaron hembras vivas, colocadas en un tubo dentro del compartimento interior de la trampa. La misma se colocó en el túnel de viento y se liberaron 5 machos adultos; se comprobó la captura de la totalidad de los machos al día siguiente.

El segundo ensayo fue montado a mediados de enero del año 2014, luego de reportarse la presencia de adultos de *P. adultera* en trampas de luz a principios de ese mes. El ensayo fue llevado a cabo entre enero y marzo, se colocaron las trampas en un predio con festuca y rastrojo de trigo. Las trampas fueron colocadas en el alambrado que rodea el campo. Se utilizaron como agentes de retención pisos engomados en las trampas delta y una solución de agua jabonosa en las trampas *bucket*. Se colocaron 6 bloques de 6 tratamientos, con un total de 36 trampas.

Los tratamientos utilizados fueron: hexano como control negativo, en trampa delta (D1) y trampa *bucket* (B1); Z11-16OH en trampa delta (D2) y trampa *bucket* (B2) y mezcla ternaria Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald en proporción 95:5:1, en ambos tipos de trampas (D3 y B3), manteniendo las distancias propuestas en el ensayo previo, 20 metros entre tratamientos y al menos 50 metros entre bloques.



Figura 25. Ubicación de las trampas del segundo ensayo en la Estación INIA La Estanzuela, Colonia. Se utilizaron los alambrados para la colocación de las trampas.

Para la elección de la fecha de montaje del tercer ensayo, se reunieron datos históricos de picos de vuelo de adultos de *P. adultera* en una trampa de luz de INIA La Estanzuela. Los mismos se incluyen a continuación:

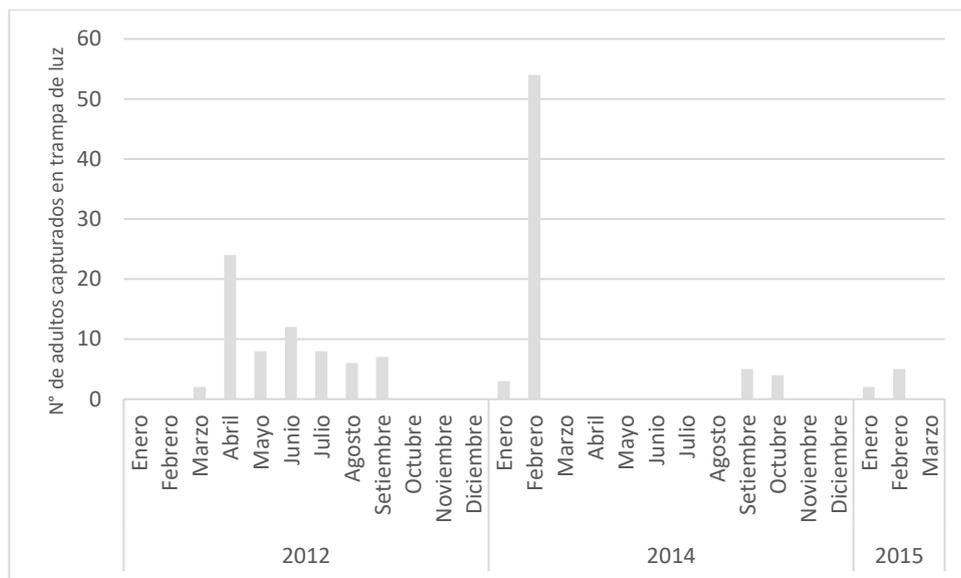


Figura 26. Capturas de adultos de *P. adultera* en trampa de luz, ubicada en INIA La Estanzuela

Estos datos muestran las capturas registradas durante el año 2012, 2014 y 2015, no hay información para el año 2013. Se puede observar la aparición de adultos entre los meses de febrero y marzo, así como entre setiembre y octubre; confirmando la disminución del número de generaciones reportado en 1991 (3 a 4 anuales) [Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. 2006].

Dada la aparición de *P. adultera* entre los meses de abril y julio en el año 2012, y la aparición de pocas hembras entre febrero y marzo, se montó el tercer ensayo a inicios de mayo de 2015, realizando un seguimiento en paralelo de las capturas en trampa de luz durante la totalidad de la duración del ensayo.

La configuración del ensayo fue similar al inmediatamente anterior, aunque las trampas fueron colocadas en cultivos de avena y raigrás sembrados entre abril y mayo, en cuatro predios diferentes (Figura 27).



Figura 27. Imagen aérea de la zona de colocación de trampas del tercer ensayo, en la Estación INIA La Estanzuela, Colonia, en cultivos de avena y raigrás (izq.). Las áreas elegidas para disponer las trampas se encuentran señaladas, así como su distribución en el cultivo.

En este ensayo se utilizaron cintas de insecticida (vaponas strips) en vez de agua jabonosa para las trampas *bucket*, de modo de prevenir el deterioro de los insectos capturados y mejorar el reconocimiento de las especies. Se montaron 10 bloques con 6 tratamientos: dos mezclas diferentes y un control negativo en los dos tipos de trampas. Las mezclas utilizadas fueron: mezcla ternaria Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald en proporciones 95:5:1 y 95:5:0,1; y hexano como control negativo.

En ambos ensayos se utilizaron septos de goma para colocar los estímulos atrayentes; los mismos fueron sustituidos semanalmente, y los pisos engomados se cambiaron cuando fue necesario por la acumulación de capturas.

RESULTADOS

Respuesta comportamental de machos en laboratorio

La totalidad de los machos adultos de *P. adultera* (100%, n=30, Figura 28) respondieron volando en la pluma y llegando a la fuente de olor frente a hembras en postura de llamada. Los resultados de vuelo en pluma con el extracto de glándulas mostraron una respuesta menor con respecto a las hembras llamando, aproximadamente el 70 % de los machos adultos volaron en la pluma y aterrizaron en la fuente de olor (Figuras 28 y 29).

El control negativo (hexano) no elicó ninguna respuesta por parte de los machos en túnel de viento. De la misma manera, el componente mayoritario de la feromona (Z11-16OH), no generó respuesta de los machos cuando fue evaluado de manera individual (Figuras 28 y 29).

La mezcla binaria (Z11-16OH: Z11-16OAc, proporción 19:1), la ternaria de composición Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, proporción 2,5:1,2:1 y la cuaternaria (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald: Z9-14OH, proporción 90:9:1:0,6) mostraron resultados similares, resultando para las tres mezclas que entre el 20 % y 30 % de los machos evaluados mostraron vuelo orientado, y menos del 10 % de los machos alcanzó la fuente de olor.

Por otro lado, entre el 60 % y el 80 % de los machos (no presentan diferencia estadísticamente significativa, $P > 0,05$) volaron en la pluma con las mezclas ternarias de proporciones Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald 95:5:1; 95:5:0,1; 95:5:0,01. Por el contrario, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a la llegada a la fuente, ya que solamente un 25 % de los machos alcanzó la fuente de estímulo atrayente con la mezcla ternaria Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald 95:5:1 y entre el 60 % y 70 % de los machos llegaron a la fuente de olor con las mezclas ternarias en las cuales se redujo entre 10 y 100 veces la concentración del aldehído (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald 95:5:0,1 y 95:5:0,01).

El análisis estadístico de los resultados (test G con ajuste de error α) refleja que la respuesta obtenida en túnel de viento utilizando extracto de glándulas como estímulo es similar a la respuesta encontrada cuando se evaluaron las mezclas ternarias 95:5:0,1 y 95:5:0,01 ($P > 0,05$; Figuras 28 y 29). Se presume entonces que la composición de la feromona se acerca a la evaluada en túnel de viento.

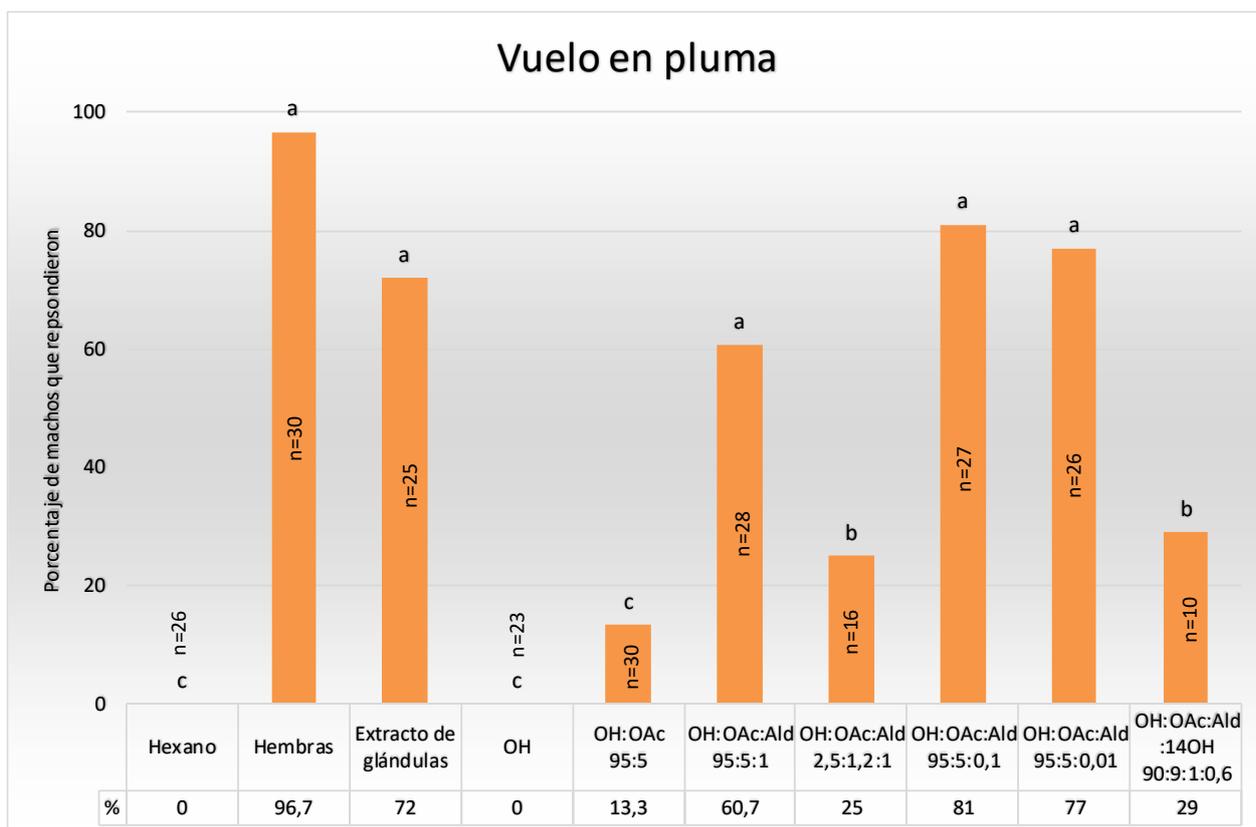


Figura 28. Respuesta comportamental (vuelo en pluma) de machos de *P. adultera* en túnel de viento frente a diferentes fuentes de olor: hexano (control), hembras vírgenes llamando y 10 ng de mezclas de compuestos sintéticos, en las proporciones indicadas en el gráfico (n: número de machos evaluados, letras diferentes indican diferencias significativas entre pares de tratamientos: test de χ^2 ; $P < 0,05$).

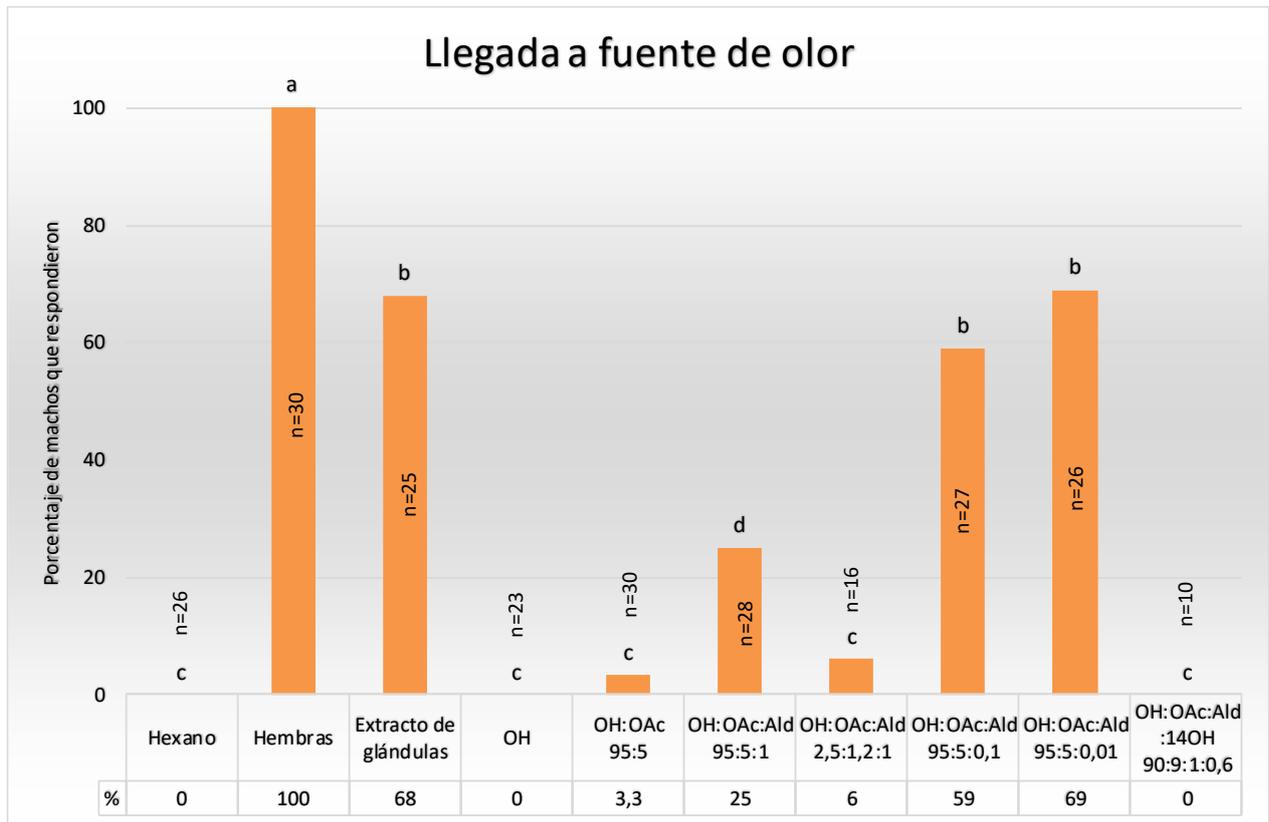


Figura 29. Respuesta comportamental (llegada a la fuente) de machos de *P. adultera* en túnel de viento frente a diferentes fuentes de olor: hexano (control), hembras vírgenes llamando y 10 ng de mezclas de compuestos sintéticos en las proporciones indicadas en el gráfico (n: número de machos evaluados, letras diferentes indican diferencias significativas entre pares de tratamientos: test de χ^2 ; $P < 0,05$).

Captura de machos en campo

Ensayo en estación experimental "Mario A. Cassinoni"

Las revisiones semanales de trampas para registrar las capturas de machos *P. adultera*, no dieron como resultados datos claros sobre el efecto atractivo de los tratamientos en las trampas (Figuras 30, 31, 32). Se obtuvieron capturas de machos en las trampas conteniendo disolvente (control negativo), lo cual dificultó el análisis del resto de los datos.

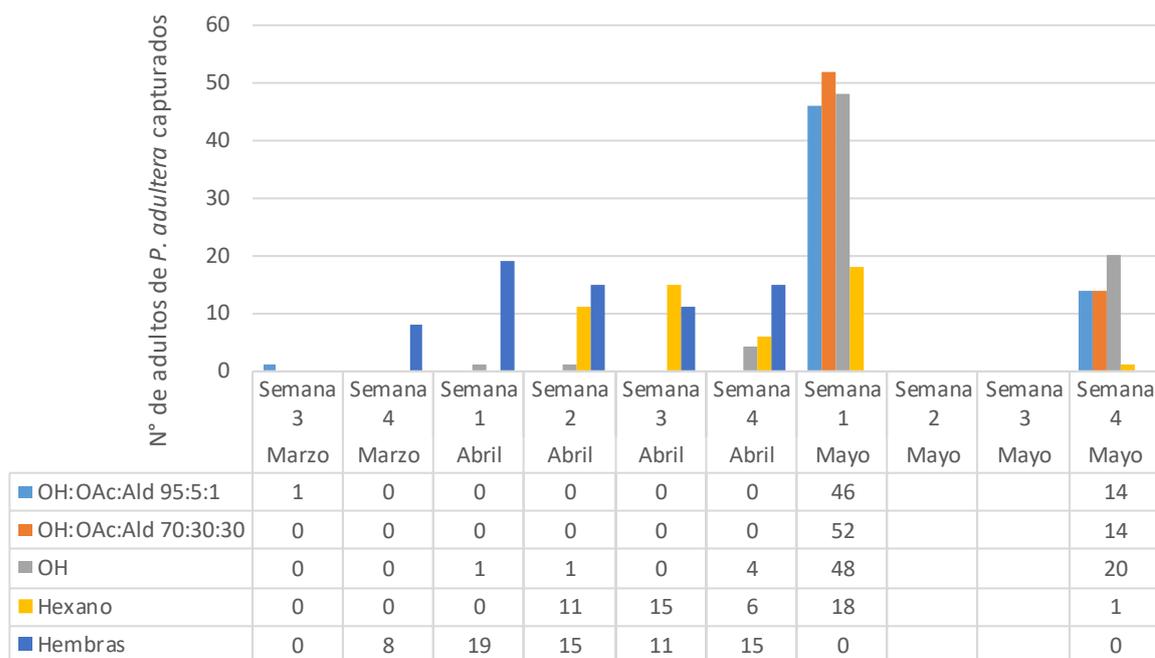


Figura 30. N° de adultos de machos de *Pseudaletia adultera* capturados en cada revisión semanal, en ensayo de campo en Paysandú (EEMAC), utilizando como estímulos químicos el componente que elicit la mayor respuesta de la antena de machos de *P. adultera* (Z11-16OH), mezclas ternarias (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, dos proporciones diferentes 95:5:1 y 70:30:30), el disolvente de las mezclas como control negativo, y hembras vivas de *P. adultera* como control positivo.

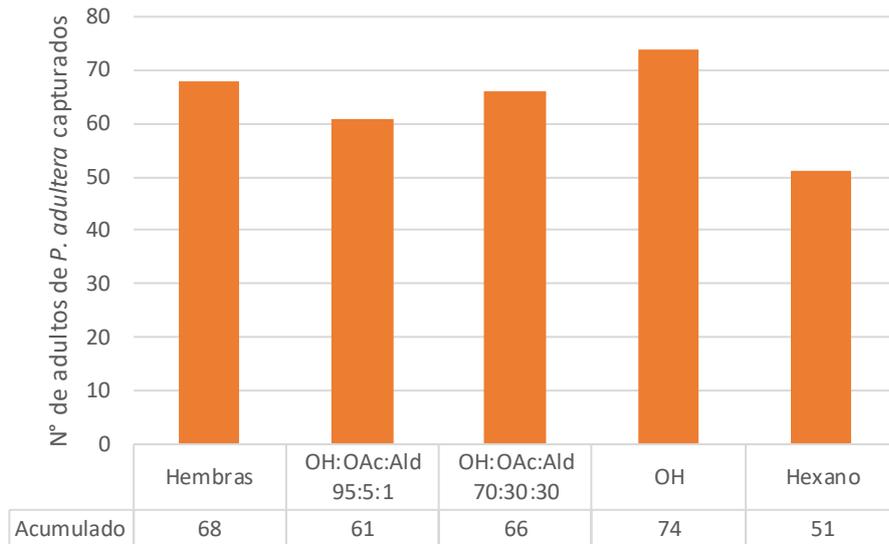


Figura 31. Capturas promedio y acumuladas de machos de *Pseudaletia adultera* en ensayo de campo en Paysandú (EEMAC), utilizando como estímulos químicos el componente que elicitla mayor respuesta de la antena de machos de *P. adultera* (Z11-16OH), mezclas ternarias (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, dos proporciones diferentes 95:5:1 y 70:30:30), el solvente de las mezclas como control negativo, y hembras vivas de *P. adultera* como control positivo.



Figura 32. Trampas delta con capturas de adultos machos de *P. adultera* en campos de avena, utilizando como estímulos diferentes mezclas químicas colocadas en septos de goma (izquierda) y hembras vivas de *P. adultera* colocadas en tubos transparentes abiertos cubiertos con tul (derecha).

Por otro lado, los ensayos permitieron identificar el pico de vuelo de adultos, el cual ocurrió la primera semana de mayo, el día 06. Con esta información y datos meteorológicos disponibles en la página web de la estación EEMAC, se pudo estimar la fecha del siguiente pico de vuelo, prevista para el 06 de setiembre de ese año.

A pesar que no se pudo montar un nuevo ensayo en esa fecha, se confirmó con personal de la estación que el pico de vuelo de adultos de *P. adultera* ocurrió la tercera semana de setiembre, otorgando confiabilidad a la estimación de los picos de vuelo de adultos con información teórica.

Ensayos INIA La Estanzuela

El primer ensayo, montado entre los meses de febrero y marzo de 2014 en la estación INIA La Estanzuela, no arrojó resultados concluyentes, dada el bajo número de capturas obtenidas (Figura 33).

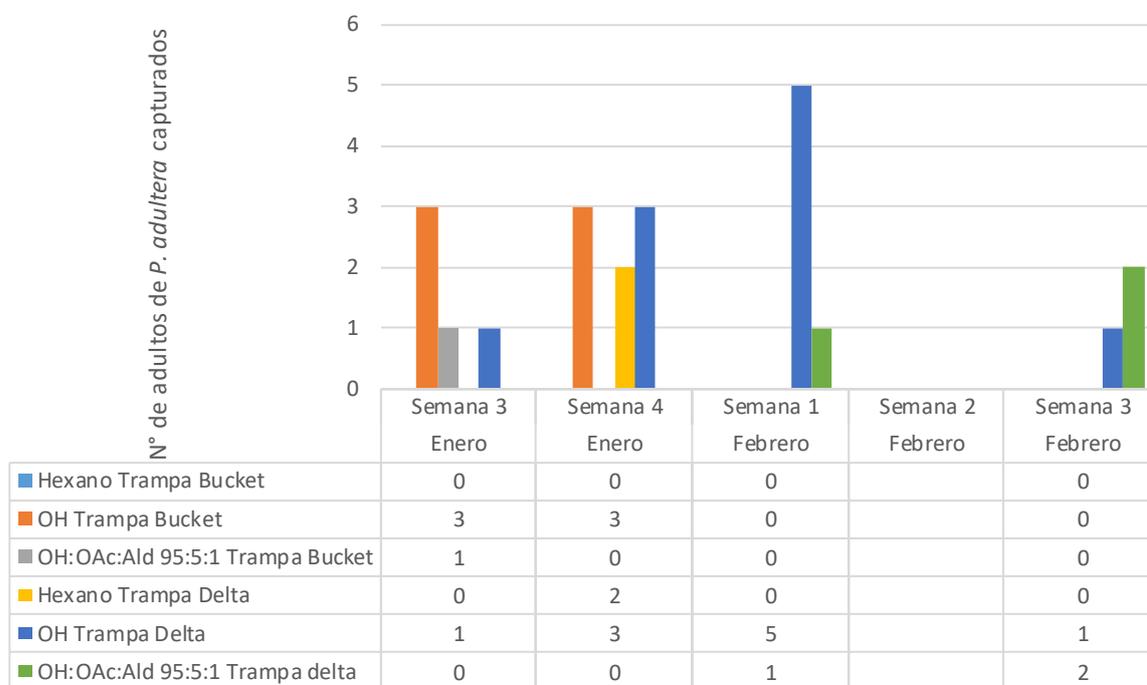


Figura 33. N° de adultos de machos de *Pseudaletia adultera* capturados en cada revisión semanal, en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2014), utilizando como estímulos químicos el componente que elicitó la mayor respuesta de la antena de machos de *P. adultera* (Z11-16OH), una mezcla ternaria (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporción 95:5:1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.

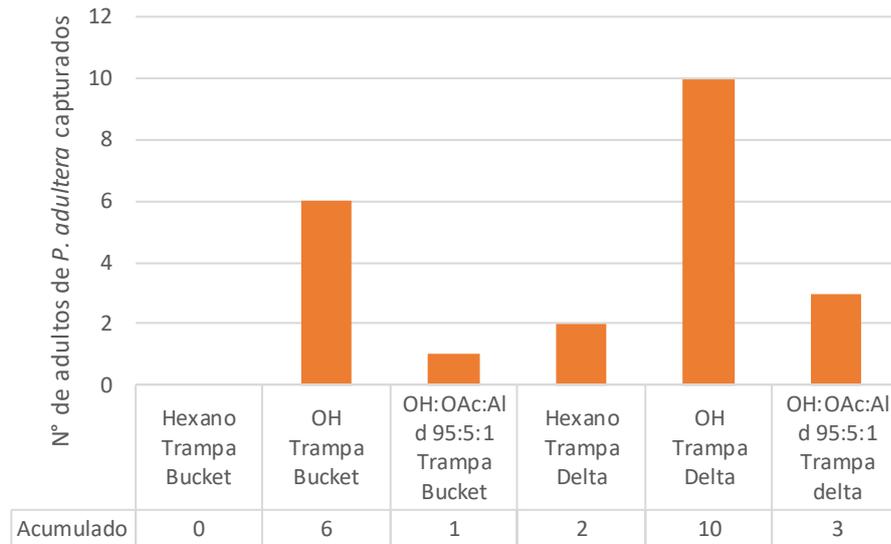


Figura 34. Capturas promedio y acumuladas de machos de *Pseudaletia adultera* en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2014), utilizando como estímulos químicos el componente que elicitaba la mayor respuesta de la antena de machos de *P. adultera* (Z11-16OH), una mezcla ternaria (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporción 95:5:1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.

Este período se caracterizó por ser muy lluvioso, con lluvias acumuladas de 450 mm [sitio web INIA], lo cual dificultó el monitoreo de las trampas y afectó negativamente su efectividad. Así mismo, el predio utilizado no contaba con cultivos en crecimiento, sino que era en mayor parte rastrojo y gramíneas sembradas recientemente. Por otra parte, el uso de una solución jabonosa dificultó el reconocimiento de los pocos insectos capturados, ya que el haber permanecido sumergidos entre 5 y 7 días provocó la pérdida de escamas y el deterioro general de los mismos. Por estos motivos es que no se realizan conclusiones en relación a los resultados obtenidos del montaje de este ensayo a campo. Se tomaron las consideraciones pertinentes en el montaje del siguiente ensayo en la misma estación experimental.

El cálculo de grados día con respecto al pico de vuelo de adultos informado para principios de enero, arrojó una predicción del siguiente pico de vuelo para el 11/02/2014. Los datos de capturas en trampa de luz permitieron demostrar que el pico de vuelo ocurrió el 20/02/2014; sin embargo, este hecho no se vio reflejado en las capturas obtenidas en el ensayo. Tal como se mencionó anteriormente, el predio utilizado no contaba con gramíneas crecidas, y se encontraba alejado de la trampa de luz.

El período de montaje del último ensayo, por el contrario, fue un período de sequía (precipitación acumulada desde inicios de mayo a fines de julio menor a 100 mm). Las capturas fueron nuevamente muy bajas y no se presenciaron picos de vuelo claros con los datos obtenidos en trampa de luz. De los 10 bloques colocados, únicamente en 4 de ellos se obtuvieron capturas de adultos machos de *P. adultera* (figura 35).

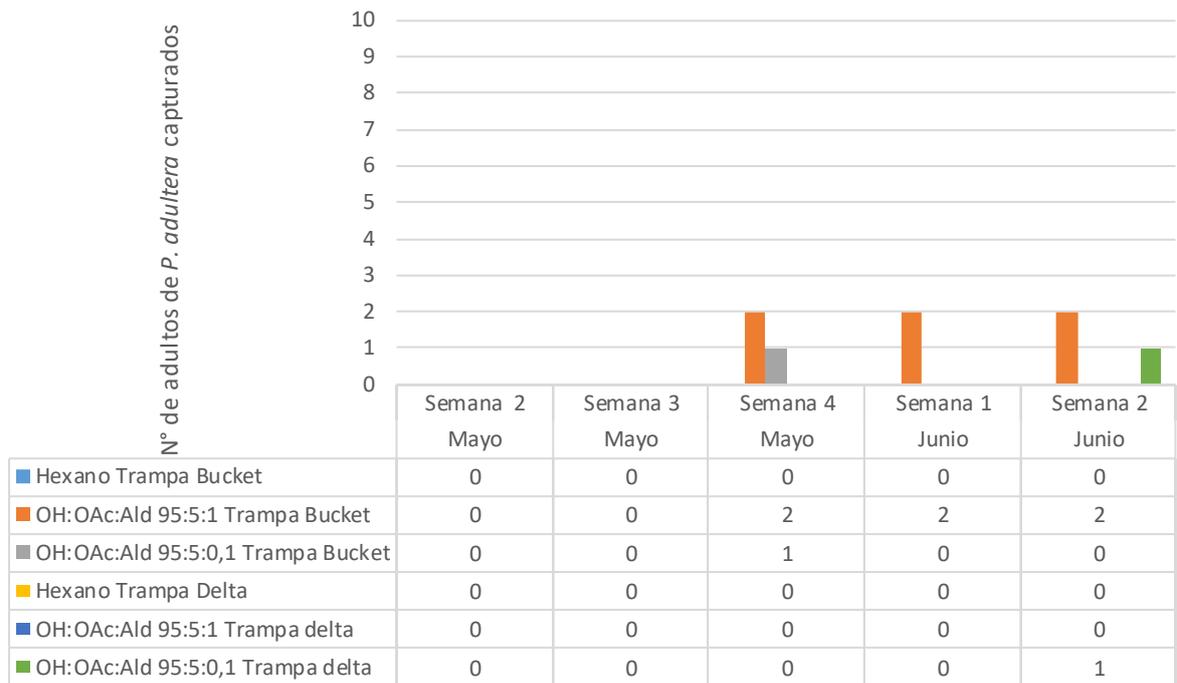


Figura 35. N° de adultos de machos de *Pseudaletia adultera* capturados en cada revisión semanal, en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2015), utilizando como estímulos químicos dos mezclas ternarias, para las cuales se obtuvo mayor respuesta en túnel de viento (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporciones 95:5:1 y 95:5:0,1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.

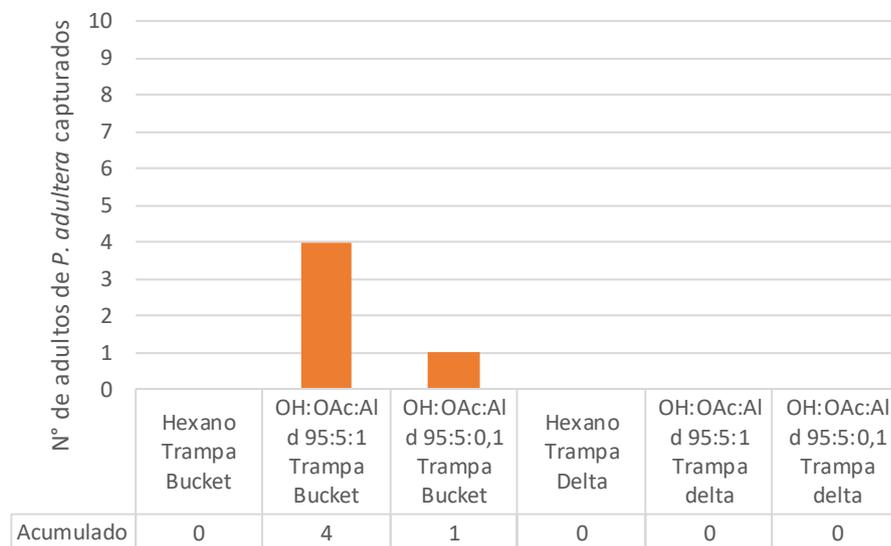


Figura 36. Capturas promedio y acumuladas de machos de *Pseudaletia adultera* en ensayo de campo en INIA La Estanzuela (2014), utilizando como estímulos químicos dos mezclas ternarias, para las cuales se obtuvo mayor respuesta en túnel de viento (Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald, en proporciones 95:5:1 y 95:5:0,1) y el disolvente de las mezclas como control negativo, utilizando dos tipos de trampa para cada tratamiento, trampas bucket y trampas delta.

En este último ensayo, se observó la eficacia tentativa (datos insuficientes para ser analizados estadísticamente) de las trampas con la mezcla ternaria Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald 95:5:1, frente a la mezcla con mejores resultados en túnel de viento, Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald 95:5:0,1.

DISCUSIÓN

Los resultados comportamentales demuestran que, a pesar que el Z11-16OH se encuentra en cantidad ampliamente mayor en el extracto de glándulas con respecto a otros compuestos candidatos y genera una respuesta electroantenográfica diferencial frente a la obtenida con otros compuestos, el alcohol no elicitaba una respuesta atractiva en túnel de viento cuando se evalúa de forma individual.

Sin embargo, cuando se adicionan pequeñas cantidades de Z11-16OAc y Z11-16Ald, se aumenta la tasa de respuesta por parte de los machos adultos. Se logró obtener una mezcla que se acerca a la composición de la feromona sexual presente en el extracto de glándulas, demostrado por la obtención de una respuesta estadísticamente similar a la obtenida cuando se evaluó el extracto de glándulas como atrayente, con un alto porcentaje de llegada a la fuente de olor por parte de los machos de *P. adultera* (entre 60 % y 80 %, n=26).

En tanto las hembras llamando lograron el 100 % de respuesta por parte de los machos (vuelo en pluma y llegada a la fuente), se observó una disminución en la respuesta obtenida utilizando el extracto de glándulas así como las mezclas más atractivas en túnel de viento. Este fenómeno puede deberse a la diferencia en la difusión de la feromona, a la ausencia del componente visual constituido por una hembra de *P. adultera* en posición de llamada, la ausencia de compuestos atrayentes secundarios o de corto alcance, entre otros.

Los ensayos a campo fueron diseñados de acuerdo a los modelos de casos de éxito, en el marco de otras tesinas de posgrado llevadas a cabo en el Laboratorio de Ecología Química.

Se previó en todos los casos disponer los tratamientos en bloques, utilizando distribuciones aleatorias de los tratamientos, y manteniendo distancias entre bloques superior al doble de la distancia entre tratamientos, no menor a 20 metros lineales.

Del primer ensayo se destaca la captura de adultos de *P. adultera* en trampas con disolvente, y el bajo número de capturas en las trampas con hembras vivas. Se estudió la posibilidad de contaminación de los septos durante la manipulación durante el recambio semanal, el cual debió descartarse ya que no se observaron capturas similares en otras trampas, conteniendo estímulos químicos. El uso de trampas con pegamento generó varias dificultades al ensayo: interferencia en el conteo de los machos, ya que se observó un gran número de insectos diversos retenidos en los pisos, una alta frecuencia de recambio de los pisos para no perder efectividad, complejidad en el cambiado de los septos, que debían insertarse en un alambre dispuesto dentro de la trampa.

Con el fin de mejorar la manipulación y facilitar los cambios y conteos semanales, se adquirieron trampas de tipo bucket, específicas para lepidópteros, y se utilizó agua jabonosa para retener los insectos. Esto generó una nueva dificultad, el gran deterioro de los insectos capturados, que permanecían entre 1 y 7 días en ese medio. A pesar de esta dificultad, el número de capturas fue muy bajo y ello no permitió obtener conclusiones claras con respecto a la efectividad de las mezclas.

El tercer y último ensayo incluyó trampas de ambos tipos: las trampas delta fueron de mayor tamaño para permitir una mejor manipulación y contaban con un mejor sistema para colocar los septos; no se utilizaron medios líquidos para retener los insectos, sino que se utilizaron tiras con una sustancia tóxica dentro de la trampa bucket.

En este último ensayo se observó una leve atractividad de la mezcla ternaria que presentó mejores resultados en túnel de viento, Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald en proporciones 95:5:0,1. Dado que el número de capturas fue muy bajo, estos resultados no permiten obtener una conclusión clara, pero sí se detecta una tendencia atractiva de esta mezcla, demostrado en ensayos en laboratorio.

Un factor importante en la formulación de la feromona es la variabilidad en la difusión y la volatilidad de los compuestos en el corto (túnel de viento) y en el largo alcance (ensayos a campo). Teniendo esto en consideración, es posible que la proporción 95:5:0,1 sea insuficiente para atraer machos a largas distancias, dado que, al tener una proporción tan baja del aldehído y ser el compuesto más volátil de la mezcla, los machos percibieran una mezcla binaria de Z11-16OH y Z11-16OAc, en vez de la ternaria formulada inicialmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. 2006. Lepidópteros de importancia económica en Uruguay. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Pp 351-359. 2da edición. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. *Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Uruguay*
- González A.; Altesor, P.; Sellanes, C.; Rossini, C. 2012. Aplicación de feromonas sexuales en el manejo de lepidópteros plaga de cultivos agrícolas, pp. 343-360. En *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*, eds. Malo, E. A.; Rojas, J. C. *El Colegio de la Frontera Sur. México.*
- Zar J. 1999. *Biostatistical Analysis*. Pp 505-506. 4ta edición. Prentice Hall, New Jersey
- <http://www.inia.org.uy/online/site/14351411.php>, último acceso: Febrero 2016.

CAPÍTULO 4. Conclusiones

El objetivo general de esta tesis de Maestría fue identificar los componentes de la feromona sexual de la oruga militar, *Pseudaletia adultera* (Lepidoptera: Noctuidae), con el fin de desarrollar una tecnología basada en feromonas sexuales para el monitoreo de poblaciones de esta especie en cultivos de gramíneas. En este marco, se analizaron extractos de las glándulas productoras de feromona sexual de hembras, y se estudió la respuesta electrofisiológica (EAG) y comportamental de machos de *P. adultera* a los compuestos identificados.

El análisis e identificación química de los componentes de la feromona sexual permitió caracterizar, al menos en parte, la composición en el extracto de glándulas. El componente mayoritario, encontrado en casi la totalidad de los extractos obtenidos, fue un alcohol insaturado de 16 átomos de carbono, tentativamente asignado a (Z)-11-hexadecen-1-ol (Z11-16OH) por comparación de tiempos de retención, respuesta electrofisiológica al compuesto natural y sintético, y parsimonia filogenética con otras tres especies del mismo género, todas compartiendo la insaturación Z11 en sus componentes feromonales. Este compuesto genera la mayor respuesta en EAG, pero no es suficiente para utilizar como atrayente, tal como lo reflejan los resultados obtenidos en túnel de viento.

La identificación tentativa de otros componentes del extracto de glándulas resultó en el aldehído y acetato correspondientes, esto es, acetato de (Z)-11-hexadecenilo (Z11-16OAc) y (Z)-11-hexadecenal (Z11-16Ald). Al no haber logrado un análisis completo del extracto derivatizado, la posición y configuración del doble enlace nuevamente sigue criterios de comparación cromatográfica y espectroscópica, además de lógica filogenética y una clara respuesta electrofisiológica a estos compuestos. Todos estos criterios, sumados, otorgan una buena evidencia de los compuestos propuestos, la cual se incrementa por ensayos comportamentales en túnel de viento. La mayor respuesta atractiva de los machos en túnel de viento fue la proporción 95:5:0,1 de estos compuestos (alcohol: acetato: aldehído); siendo esta respuesta comparable estadísticamente a la obtenida frente el extracto de glándulas puro. Sin embargo, no pudo corroborarse en forma inequívoca la atraktividad de una mezcla sintética en campo, debido a un conjunto de factores que dificultaron estos ensayos en las distintas ocasiones en las que se realizó. Entre estos factores, ocurrieron errores experimentales que resultaron en capturas elevadas en el control negativo, se encontraron poblaciones bajas del insecto y eventos climáticos adversos como lluvias excesivas. De todas formas, el mejor resultado en campo se obtuvo con una mezcla sintética con mayor (x10) proporción relativa de Z11-16Ald, posiblemente debido a diferencias en la volatilidad de estos compuestos a lo largo del tiempo del ensayo de campo, intrínsecamente diferente al túnel de viento en el que se evalúa una mezcla fresca en cada réplica.

Resultó dificultosa la identificación de la feromona a partir de los extractos de glándulas, ya que frecuentemente se obtenían extractos con muy bajas cantidades de estos compuestos, y en algunos casos apenas se pudo identificar el compuesto mayoritario. En una cantidad importante de extracciones se

obtuvieron grandes cantidades de los ácidos precursores, y a pesar de modificar factores como el momento de la fase oscura del fotoperíodo para realizar la extracción, la metodología de disección y extracción, o los disolventes de extracción, no se logró mejorar los resultados. Solamente unos pocos extractos obtenidos permitieron la identificación de todos los compuestos atribuidos a la mezcla de feromona, y su cuantificación relativa.

Los ensayos de campo no arrojaron resultados que permitieran evaluar la efectividad de las mezclas, debido al bajo número de capturas, afectado por el clima y la baja densidad de la especie en campo, estadísticas alteradas por la captura en trampas que funcionaron como blanco, entre otros factores. El último ensayo permitió identificar una leve tendencia de los machos por la mezcla sintética Z11-16OH: Z11-16OAc: Z11-16Ald en proporciones 95:5:0,1. Aunque existió una leve tendencia a mayores capturas en trampas delta frente a trampas tipo *bucket*, los valores bajos obtenidos no permiten una comparación concluyente.

De esta forma, no se puede recomendar como producto de esta tesis una mezcla óptima y trampa adecuada para la detección o monitoreo de *Pseudaletia adultera*, aunque puede anticiparse que dicha mezcla óptima será una combinación de los tres compuestos identificados en el marco de este trabajo. Este trabajo podrá ser por lo tanto de utilidad como información inicial para estudios futuros de estrategias de manejo de esta plaga a nivel nacional y regional.