

# **MONITOREO Y DETECCIÓN DE EPINOTIA (*Crociosema aporema*, Lepidoptera:Tortricidae) CON TRAMPAS DE FEROMONAS**

## **Proyecto FPTA- 208**

**Desarrollo de una tecnología basada en feromonas para el monitoreo de *Epinotia aporema* en cultivos de oleaginosas y pasturas: caracterización química de la feromona sexual; implementación y evaluación en campo de trampas de monitoreo**

**Editores: Paula Altesor\***  
**Andrés González\*\***

**Equipo de trabajo:** Paula Altesor, Andrés González, Carmen Rossini, Paola Liberati.  
Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química.  
Horacio Silva, Enrique Castiglioni.  
Depto. de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía (EEMAC).  
Daniela Gamenara, Leticia Alves, David González, Juan Ramos, Ignacio Carrera.  
Gustavo Seoane.  
Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Química.

\* Lic. MSc. Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República.

\*\*Dr. PhD. Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República.

**Título:** MONITOREO Y DETECCIÓN DE EPINOTIA (*Crociosema aporema*, Lepidoptera: Tortricidae) CON TRAMPAS DE FEROMONAS

**Editores:** Paula Altesor  
Andrés González

**Equipo de trabajo:** Paula Altesor; Andrés González Carmen Rossini; Paola Liberati; Horacio Silva; Enrique Castiglioni; Daniela Gamenara; Leticia Alves; David González; Juan Ramos; Ignacio Carrera; Gustavo Seoane

**Serie:** FPTA N° 46

© 2013, INIA

**Foto de tapa:** Macho de *Crociosema (=Epinotia) aporema* atraído por la feromona sexual de la hembra liberada desde un septo de goma. La feromona fue químicamente caracterizada y sintetizada en este proyecto, con el fin de producir trampas de monitoreo para este insecto plaga de leguminosas.

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia del Tecnología del INIA

Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay  
<http://www.inia.org.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

---

Impreso en Editorial Hemisferio Sur S.R.L.  
Buenos Aires 335  
Montevideo - Uruguay

**Depósito Legal 362-134/13**

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

## **Integración de la Junta Directiva**

**Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente**

**D.M.T. V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente**



**D.M.V. Álvaro Bentancur**

**D.M.V., MSc. Pablo Zerbino**



**Ing. Agr. Joaquín Mangado**

**Ing. Agr. Pablo Gorriti**





## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.

b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.

c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.



# CONTENIDO

## Página

### Capítulo 1

Introducción: el uso de feromonas en el manejo de lepidópteros plaga ..... 9

### Capítulo 2

*Crociosema (=Epinotia) aporema*: biología e importancia ..... 13

### Capítulo 3

Estrategia experimental ..... 17

### Capítulo 4

Comportamiento reproductivo de *epinotia* ..... 23

### Capítulo 5

Identificación de la feromona sexual de *epinotia* ..... 25

### Capítulo 6

Ensayos con feromona sintética en laboratorio y campo ..... 29

### Capítulo 7

Discusión, conclusiones y perspectivas ..... 33

Bibliografía ..... 35



Paula Altesor\*  
Carmen Rossini\*  
Andrés González\*

\*Laboratorio de Ecología Química,  
Facultad de Química.

# CAPÍTULO 1.

## Introducción: el uso de feromonas en el manejo de lepidópteros plaga

*Proyecto FPTA 208*

*Período de Ejecución: Ene. 2007-Dic. 2009*

La comunicación química en insectos ha sido mayormente investigada en plagas agrícolas y forestales con el objetivo de desarrollar estrategias de manejo alternativas al uso de insecticidas, de modo de racionalizar su empleo y mitigar sus efectos nocivos para la salud y el medioambiente. Los semioquímicos (señales químicas) que se han utilizado con más éxito en este contexto son indudablemente las feromonas sexuales de lepidópteros (Witzgall *et al.*, 2010). Otros semioquímicos importantes e intensamente estudiados en los últimos años, como los atrayentes volátiles de plantas y los volátiles que median interacciones tritróficas, presentan un futuro promisorio en la búsqueda de aplicaciones para el control de plagas.

El empleo de semioquímicos respecto a los plaguicidas convencionales tiene la ventaja de no dejar residuos tóxicos, afectar únicamente a la especie diana, y requerir pequeñas cantidades de productos volátiles e ino cuos (Howse *et al.*, 1998; Witzgall *et al.*, 2010). El uso sostenido de semioquímicos incrementa su propia efectividad, ya que se estabilizan las poblaciones de organismos benéficos como depredadores y parasitoides, los que potencialmente controlan el surgimiento de plagas secundarias.

Las feromonas de lepidópteros se utilizan para la detección y monitoreo poblacional de plagas, así como para el control de las mismas. El monitoreo espacial y temporal de plagas permite un uso informado de estrategias de control químico, lo cual disminuye significativamente las aplicaciones de insecticidas respecto al uso preventivo de los mis-

mos. Por otro lado, el control de plagas basado en feromonas puede eliminar o reducir en forma muy importante la necesidad de control químico, y es utilizado con éxito para aproximadamente una decena de especies, aunque su potencial es significativamente mayor (Witzgall *et al.*, 2010).

### I) DETECCIÓN Y MONITOREO

La aplicación más extendida de feromonas sexuales consiste en su uso para detección y monitoreo de insectos plaga. Las feromonas sintéticas se cargan en septos de goma en cantidades que oscilan entre 0,1 y 1 mg, y se colocan dentro de trampas que retienen a los machos atraídos. Los datos de capturas de machos permiten determinar cuándo y dónde la plaga está presente, y además estimar su dinámica poblacional, estableciendo así los momentos precisos de aplicación de estrategias de control. En algunas especies se ha desarrollado una correlación precisa entre las capturas de machos y la población de larvas esperadas para la generación siguiente. Esto permite la utilización de umbrales de capturas que dispensen medidas de control, lo cual requiere que los datos de capturas sean confiables en términos absolutos, remarcando la necesidad del uso de trampas estandarizadas para asegurar la constancia de los mismos (Arn *et al.*, 1997; Witzgall *et al.*, 2010).

Las trampas de feromonas son lo suficientemente sensibles y específicas para detectar bajas densidades de una especie. Esto posibilita la detección de especies invasoras que puedan conside-

rarse plagas cuarentenarias, el seguimiento de una especie exótica ya establecida, así como el éxito en la introducción de una especie benéfica (Cossé *et al.*, 2005) o un programa de erradicación (El-Sayed *et al.*, 2006; Kean y Suckling 2005). En tiempos de intensos movimientos de plagas importantes, como la principal plaga de viña en Europa *Lobesia botrana*, el uso de trampas de feromonas para la detección preventiva y temprana es una herramienta poderosa para planificar estrategias de erradicación cuando el insecto aún se encuentra en una etapa de instalación, por ende más vulnerable.

La información sobre variaciones poblacionales de una plaga, en combinación con el conocimiento del desarrollo del insecto y su relación con la temperatura, son extremadamente importantes cuando se emplean medidas de control cuya efectividad depende de una ventana estrecha de tiempo. Por ejemplo, el uso de productos específicos para ciertos estadios inmaduros del insecto, o la liberación de agentes biológicos de control, se ven facilitados por una precisa información espacio-temporal de la presencia de la plaga objetivo.

Las feromonas de unas 600 especies de lepidópteros se han caracterizado químicamente (El-Sayed 2011), y en la actualidad decenas de especies plaga son rutinariamente monitoreadas mediante septos de feromonas comercializados por distintas empresas regionales o internacionales. Se estima que unos 20 millones de septos de feromona son producidos cada año, en su mayoría para especies de lepidópteros (Witzgall *et al.*, 2010). Una perspectiva a futuro es la combinación de programas regionales de monitoreo con sistemas de información geográfica, los que permitirán una concentración de medidas de control en zonas focales de la especie plaga (Tobin *et al.*, 2007).

## II) CONTROL

Aunque el objetivo central de este proyecto FPTA fue el desarrollo de trampas de monitoreo, cabe hacer mención a las estrategias de control basadas en feromonas: el trapeo masivo, los atraccidas y la confusión sexual. Aunque

esta última ha sido y continúa siendo la más importante, tanto a nivel de investigación como de aplicación (Witzgall *et al.*, 2010), en los últimos años ha aumentado la importancia relativa de los estudios de atraccidas, probablemente por la posibilidad de disminuir los costos de aplicación al reducir la cantidad de feromona necesaria.

El trapeo masivo y el uso de atraccidas comparten el concepto de atraer y eliminar una proporción importante de insectos en un área, de modo de mantener sus poblaciones por debajo del umbral de daño. La diferencia entre ellas radica en la forma de eliminación, mediante trampas (trapeo masivo) o insecticidas (atraccidas). Si se utilizan atrayentes para ambos sexos, por ejemplo feromonas de agregación o cebos alimenticios, se reducen las poblaciones de machos y hembras, con mayor probabilidad de éxito en el control de la plaga. Sin embargo, si se emplean feromonas sexuales, como es el caso en lepidópteros, se reduce únicamente la población de machos, con la intención, no siempre realista, de que esta reducción tenga una incidencia significativa en la probabilidad de que las hembras copulen. Ambos métodos requieren menor cantidad de feromonas que la confusión sexual, lo cual puede reducir significativamente los costos de utilización (Witzgall *et al.*, 2010).

La técnica de confusión sexual, por su parte, consiste en sobrecargar el ambiente con grandes cantidades de feromona sexual, de manera de alterar el comportamiento del macho. Esta técnica causa desorientación e interrupción de la comunicación entre los sexos, y por lo tanto retrasa, reduce o previene la fertilización de las hembras. A diferencia de las técnicas descritas anteriormente, en confusión sexual no es necesario el empleo de la mezcla natural que compone la feromona sexual, ya que el efecto de confusión puede ocurrir con mezclas simplificadas o simplemente con el componente mayoritario, con importantes ventajas en cuanto al costo del método (Stelinski *et al.*, 2008).

En forma general, se requiere la aplicación de 10 a 100 gramos de feromona por hectárea y por temporada para lograr

la interrupción de la comunicación sexual (Witzgall *et al.*, 2010). Por lo tanto, el desarrollo de esta estrategia de control en escala comercial requiere que la feromona necesaria sea sintetizada en una escala del orden de cientos a miles de kilogramos, lo cual representa una limitante importante en la aplicación masiva de esta técnica.

La permeación eficiente del aire en un cultivo es un aspecto fundamental para el éxito de la confusión sexual, por lo que la tecnología asociada al desarrollo de liberadores ha jugado un papel importante en el avance de esta técnica. Se han desarrollado una gran variedad de liberadores de feromona, incluyendo algunos asperjables como microcápsulas o fibras huecas, y otros de aplicación manual, que son los más utilizados. Entre éstos, los más comunes son los liberadores de alambre forrados en polietileno (rope dispensers), los que se pueden moldear para asegurarlos en ramas u otras estructuras. Éstos se aplican en cantidades entre 500 y 1000 por hectárea, y cada uno emite aproximadamente 1000 veces más feromona que una hembra (Witzgall *et al.*, 2008).

La confusión sexual es más efectiva en grandes áreas, debido en parte a que se reduce el impacto de hembras copuladas que migran al área tratada, además que se facilita una permeación homogénea del aire por el aumento de la relación área/borde. Por lo tanto, en cultivos y regiones donde la producción se realiza en forma fragmentada, es esencial la coordinación de productores para aplicar la técnica simultáneamente.

El uso de confusión sexual como estrategia de control tiene inconvenientes, que explican en parte lo limitado de su aplicación. La especificidad e inocuidad de las feromonas, aspectos destacados como positivos, pueden también ser su principal problema. Los cultivos afectados por una diversidad de plagas requieren el desarrollo de estrategias de confusión en paralelo, o la combinación de confusión sexual para la plaga principal

con otros métodos para el control de plagas secundarias. Asimismo, cada especie requiere liberadores específicos, y la síntesis de feromonas en la escala necesaria para confusión sexual es económicamente factible únicamente para algunas especies, dependiendo de la estructura química, la distribución de la especie plaga, y la propia demanda por métodos de control basados en feromonas. Indudablemente, muchas especies podrían ser controladas por este método, más allá de la decena para las cuales se utiliza, de existir la disponibilidad de productos comerciales para un universo mayor de especies. Finalmente, al ser un tratamiento inocuo, es totalmente inútil en situaciones en las cuales pueden ingresar hembras copuladas al predio tratado con feromonas (Witzgall *et al.*, 2008).

La ecuación de costos de manejo de plagas es otro aspecto importante, y ésta depende de muchos factores. En países donde una variedad de insecticidas de amplio espectro como organofosforados y carbamatos son aun permitidos, el bajo costo de éstos generalmente limita la competitividad de la confusión sexual, la cual a su vez es altamente dependiente del alto costo de las feromonas sintéticas. Es aquí que la tecnología de liberadores «inteligentes» podría ser fundamental, ya que se lograría disminuir en forma muy importante la cantidad de feromona necesaria. Las regulaciones públicas sobre el uso de insecticidas, la demanda de los consumidores, así como las barreras impuestas por algunos mercados en base a residuos de plaguicidas, forman un conjunto de condiciones que afectan la motivación del productor por demandar y utilizar estrategias alternativas de control de plagas, aunque las mismas sean más caras o complejas en su aplicación. Esta motivación es un factor importante para explicar la sustancial diferencia a nivel regional en la aplicación de confusión sexual para especies como *C. pomonella*, cuya eficacia ha sido sólidamente comprobada (Witzgall 2001).



Paula Altesor\*  
Carmen Rossini\*  
Andrés González\*

\*Laboratorio de Ecología Química,  
Facultad de Química.

## CAPÍTULO 2.

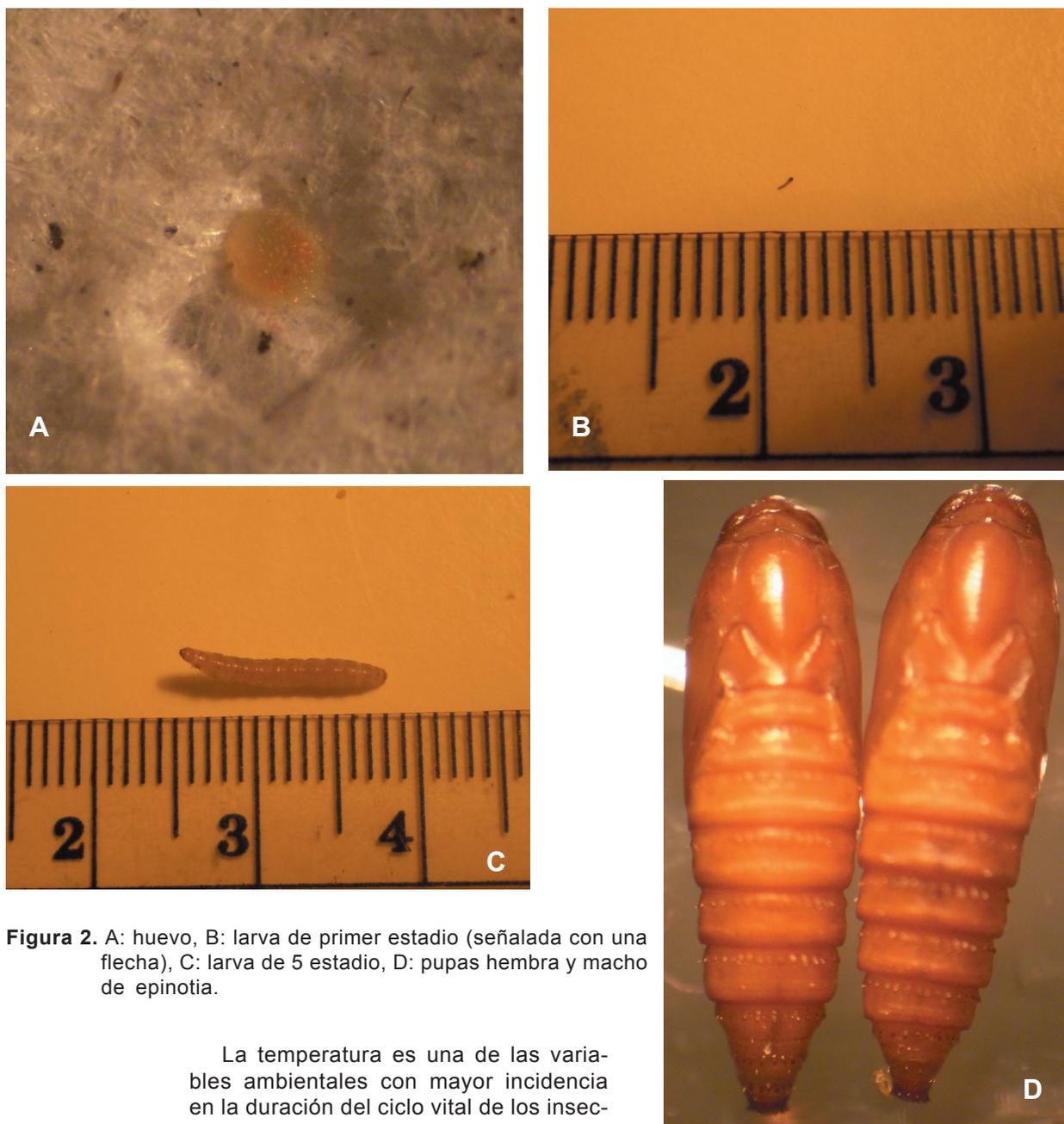
### *Crociosema* (=*Epinotia*) *aporema*: biología e importancia

*Crociosema* (= *Epinotia*) *aporema* (Lepidoptera: Tortricidae), comúnmente denominada «lagarta o barrenador de los brotes», o simplemente «epinotia», es una especie regional que se alimenta de leguminosas, siendo por lo tanto una plaga relevante tanto en cultivos de invierno (leguminosas forrajeras) como de verano (soja). Su distribución abarca el sur de EE.UU. hasta Chile, Argentina y Uruguay. Los adultos miden 1 cm aproximadamente, los sexos se diferencian por la coloración del cuerpo, presentando las hembras el dorso oscuro en la región

anterior y los flancos claros en la región posterior; en los machos el dorso es claro y los flancos son oscuros (Figura 1). Las hembras ponen entre 130 y 200 huevos a lo largo de su vida. Estos miden menos de 1 mm y se depositan de forma aislada sobre el follaje. Las larvas recién nacidas miden 1 mm, pasan por 5 estadios y en su estadio final llegan a medir 1 cm. Las pupas miden unos 7 mm, son de color castaño-rojizo, pudiéndose diferenciar hembras de machos por el número de segmentos abdominales (Bentancourt y Scatoni 2006) (Figura 2).



**Figura 1.** Adultos de *Crociosema aporema*. Izquierda: hembra; derecha: macho.



**Figura 2.** A: huevo, B: larva de primer estadio (señalada con una flecha), C: larva de 5 estadio, D: pupas hembra y macho de epinotia.

La temperatura es una de las variables ambientales con mayor incidencia en la duración del ciclo vital de los insectos. Para una temperatura de 21-23 °C, el ciclo total de epinotia se completa en 33-46 días, teniendo la etapa de huevo una duración de 4-5 días, la larva de 21-25 días, la pupa de 11-15 días y el adulto de 10-25 días. Presenta de 5 a 6 generaciones por año, permaneciendo activa en el invierno dada la presencia de leguminosas en ese período (lotus, trébol, alfalfa, entre otras) (Bentancourt y Scatoni 1999). Los enemigos naturales que posee son escasos; como depredadores se destacan *Geocoris* sp. (Lygaeidae) y *Orius* sp. (Anthocoridae); el parasitoide *Itoplectis niobe* (Hymenoptera) y los entomopató-

genos *Zoophthora radicans* (Zigomycete) y el virus de la granulosis (Baculoviridae) (Alzugaray *et al.*, 1999, Alzugaray y Ribeiro 2000, Bentancourt y Scatoni 2006).

Con el aumento significativo del cultivo de soja en Uruguay (Figura 3), se ha registrado un crecimiento notorio en la importación de insecticidas (Figura 4). Entre los insecticidas que más se utilizan en el control de lepidópteros se encuentra el clorpirifós, organofosforado moderadamente tóxico para humanos, y la cipermetrina, piretroide moderadamen-

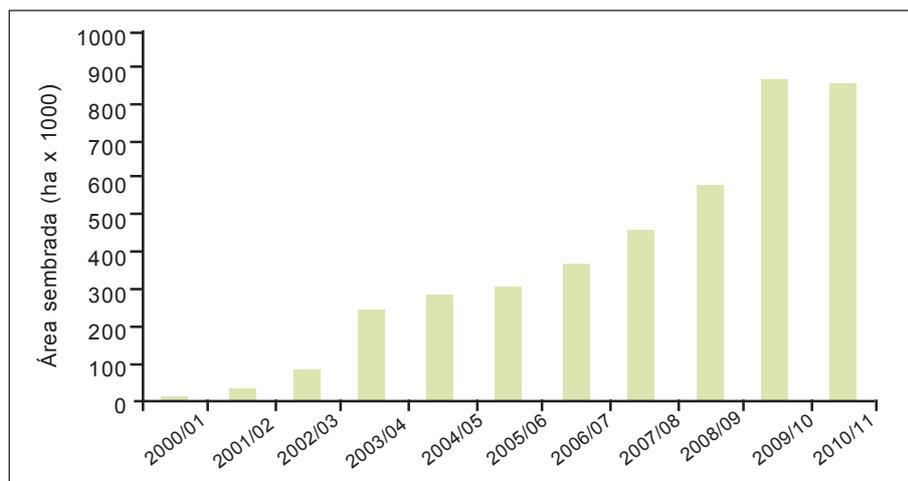


Figura 3. Evolución del área sembrada de soja en Uruguay. Fuente: DIEA/MGAP.

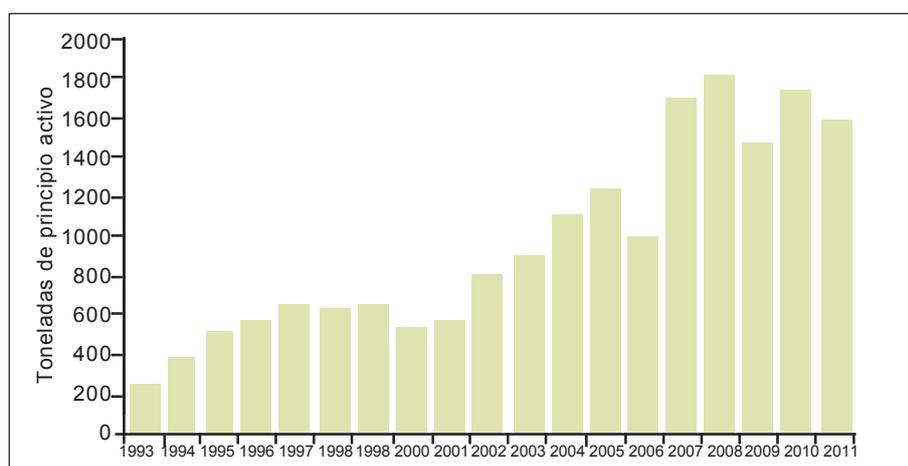


Figura 4. Evolución de la importación de insecticidas en Uruguay. Fuente: MGAP, Dirección General de Servicios Agrícolas.

te peligroso, según clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Blum *et al.*, 2008).

Epinotia es generalmente la primer plaga que aparece en la soja, alimentándose fundamentalmente de los brotes foliares, florales y chauchas. El manejo que se define para esta plaga incide en el posterior manejo del cultivo, ya que las aplicaciones tempranas de insecticidas tienen un efecto negativo en el control de las plagas que suceden a epinotia, como son las lagartas defoliadoras, que a diferencia de epinotia, poseen un sistema eficiente de controladores biológicos (Bentancourt y Scatoni 2001). En leguminosas forrajeras epinotia tiene importancia especial ya que el daño se produce en el momento de la floración, período en el cual es muy dificultoso aplicar

insecticidas por la presencia de polinizadores.

Dado que las larvas de epinotia tienen hábitos endofíticos, el control químico resulta generalmente ineficiente, teniendo que reforzarse las aplicaciones para reducir las poblaciones de la plaga (Bentancourt y Scatoni 2001). Buscar alternativas al uso de insecticidas, como puede ser la utilización de la feromona de epinotia en el monitoreo del insecto, es por lo tanto de vital importancia en el caso de esta especie de difícil manejo.

La feromona de epinotia no había sido aún estudiada químicamente, por lo que el objetivo central del proyecto aquí presentado fue la caracterización química de la feromona sexual de *Crocidosema (=Epinotia)* aporema, y el desarrollo de una tecnología basada en feromonas para

## 16 Monitoreo y detección de epinotia

---

el monitoreo de esta plaga en leguminosas forrajeras y soja. Para alcanzar este objetivo, se realizaron actividades tendientes a la identificación de los componentes químicos de la feromona de epinotia y sus proporciones relativas; la

síntesis de los componentes identificados; y la determinación de una formulación óptima para la utilización de la feromona en trampas de monitoreo en cultivos de oleaginosas y pasturas.

Paula Altesor\*  
Andrés González\*

\*Laboratorio de Ecología Química,  
Facultad de Química.

## CAPÍTULO 3.

### Estrategia Experimental

El desarrollo del proyecto se basó en tres etapas fundamentales: estudios de comportamiento reproductivo en el laboratorio, identificación y síntesis de los componentes de la feromona, y ensayos con feromona sintética en laboratorio y campo. En este capítulo se detallan los aspectos metodológicos utilizados en dichas etapas, mientras que los resultados se describen en los tres capítulos subsecuentes.

#### ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO EN EL LABORATORIO

El estudio químico de las feromonas de un insecto requiere como primer paso el estudio del patrón temporal de la emisión de feromona. Con este objetivo, se mantuvo una cría de epinotia sobre dieta artificial, renovando la población con larvas recolectadas en campo (INIA-La Estanzuela). Todos los estadios se mantuvieron en incubadora a  $22 \pm 1$  °C, 60-70 % de humedad relativa y fotoperiodo de 14: 10 (luz: oscuridad). Las larvas fueron alimentadas con una dieta artificial estándar para la cría de tortricidos (Shorey y Hale 1965). Las pupas se separaron por sexo, de modo de tener adultos vírgenes para los experimentos. Estos últimos fueron alimentados *ad libitum* con una dieta basada en agua y miel.

Los estudios de comportamiento de llamada se realizaron por observación directa de hembras vírgenes en cautiverio (N = 25), colocadas individualmente en recipientes cilindros de plástico (7 cm diámetro x 10 cm altura). Se registró cada 15 minutos el comportamiento de las hembras desde el día de la emergencia hasta el séptimo día a lo largo de la

fase oscura. Las hembras, mantenidas durante la fase clara en incubadora, fueron colocadas para su aclimatación una hora antes del experimento en la cámara de observación (26-28 °C, 50-60 % de humedad relativa). Se utilizó luz roja para las observaciones, ya que los insectos no ven en el rango de frecuencia correspondiente a ese color (Figura 1).

La proporción de hembras llamando se analizó mediante un ANOVA de dos factores para la evaluación del efecto de la edad de las hembras y las horas de la fase oscura en el comportamiento de llamada (datos transformados según  $\arccos \sqrt{p}$ ). Para la comparación de las medias se utilizó el test de Tukey,  $P < 0,05$ .



**Figura 1.** Hembras en recipientes individuales durante la fase oscura, iluminadas con luz roja para el registro del comportamiento de llamada.

#### IDENTIFICACIÓN Y SÍNTESIS DE LOS COMPONENTES DE LA FEROMONA

Una vez conocido el comportamiento reproductivo de la especie, y en particular sus aspectos temporales, se trabajó en la identificación de los componentes

químicos de la feromona sexual y sus proporciones relativas, determinando en bioensayos de laboratorio la formulación más atrayente de los componentes de la feromona.

### **Disección y extracción de glándulas de feromonas**

La disección de glándulas de hembras se realizó en el pico de llamada identificado en el estudio de comportamiento (5-7 h de la fase oscura), utilizando hembras de 2-6 días de emergidas, mantenidas en las mismas condiciones ya descritas. Observando a través de una lupa, fueron escindidas las glándulas presionando con pinzas la región final del abdomen (Figura 2). Se acumularon glándulas en un vial cónico (0,2 mL) a  $-15^{\circ}\text{C}$ , hasta su extracción con 100  $\mu\text{L}$  de hexano por 20 min. El extracto fue separado de las glándulas y concentrado con  $\text{N}_2$  para obtener un equivalente de hembra (el contenido de una glándula) por  $\mu\text{L}$  de solución. Se realizaron extracciones durante varias generaciones, mejorando la técnica de escisión de las glándulas y aumentando su número dada la poca



**Figura 2.** Disección de la glándula productora de feromona. En el extremo del abdomen se visualiza la glándula y el ovipositor, que fueron escindidos con una pinza.

cantidad de feromona producida por las hembras. Finalmente se obtuvo un extracto de 83 glándulas con el que se efectuó el estudio de identificación química.

### **Análisis químico de la feromona**

El análisis químico del extracto fue realizado por cromatografía gaseosa acoplada a electroantenografía (GC-EAD) (Figura 3) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El GC-EAD consiste en un acople entre un cromatógrafo de gases y un sistema de electrodos/amplificador que registra la respuesta nerviosa (eléctrica) de una antena, la cual se fija sobre los electrodos mediante un gel conductor (Figura 3, derecha abajo) (Bjostad 1998).

Una solución de n-alcanos co-inyectada con el extracto de glándulas en GC-EAD permitió utilizar el tiempo de retención como un criterio adicional de identificación de los compuestos, mediante el cálculo de índices de retención ( $IR_x$ ) (Adams 2007).

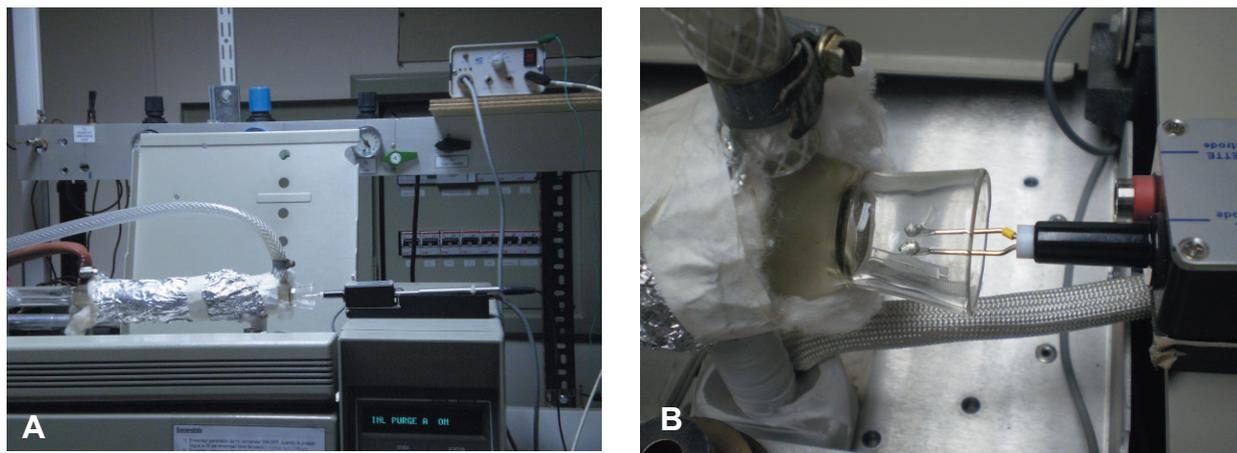
Para la corroboración de los compuestos de la feromona, los mismos estudios en GC-EAD y GC-MS con el extracto se efectuaron con estándares sintéticos. La metodología de síntesis no se incluye en este reporte por ser información técnica muy específica, la misma está disponible en el informe técnico del proyecto, y en una publicación científica (González *et al.*, 2012).

### **ENSAYOS CON FEROMONA SINTÉTICA EN LABORATORIO Y CAMPO**

Una vez identificados químicamente los componentes de la feromona, se procedió a comprobar que éstos eran activos comportamentalmente; esto es, si los machos de epinotia volaban hacia cebos de feromona sintética, tanto en el laboratorio como en ensayos de campo.

#### **Ensayos en túnel de viento**

El túnel de viento utilizado en este trabajo consistió en un cilindro de acrílico transparente de 150 cm de largo y 40 cm de diámetro, con una base que



**Figura 3.** A: Equipo de GC-EAD. B: Ubicación de los electrodos conectados a un amplificador, a la salida de los efluentes del GC. C: Antena sobre electrodos, con gel conductor para establecer contacto.

incluye un patrón de forma y color que sirve al insecto como marco de referencia en su vuelo orientado (Figura 4). Por el túnel de viento se hizo pasar aire con flujo laminar a 0,3 m/s, mediante una bomba suctora ubicada al final del mismo. El aire fue filtrado previo al pasaje por el túnel mediante filtros de carbón activado acoplados en la entrada. El aire utilizado salió de la pieza a través de un tubo para no contaminar el sitio de experimentación (Hare 1998). La temperatura y humedad relativa fue de 20-25 °C y 50-70%, respectivamente. Se utilizó luz roja para las observaciones, y las pruebas se iniciaron 3-4 h después del inicio de la fase oscura, y hasta 2 h antes de la fase clara.

Los individuos utilizados se ubicaron en la pieza 4 h antes del inicio del experimento para su aclimatación. Los machos vírgenes (1-5 días) fueron colocados individualmente en cilindros de vidrio (8 cm largo x 4,5 cm diámetro) y las hembras vírgenes (2-5 días) en grupos de 5 en cilindros de vidrio (10 cm largo x 8 cm diámetro), ambos cerrados con tul. Los diferentes estímulos (hembras llamando y feromona) se dispusieron en la entrada del túnel, y los machos a observar al final del mismo, ambos colgando en el centro del túnel.

Como estímulos se utilizaron hembras vírgenes (al menos una en postura de llamada), y feromona sintética en

diversas proporciones de sus dos componentes. Con las hembras vírgenes se evaluaron 28 machos, y con el resto de los tratamientos 10 machos en cada uno. En el caso de feromona sintética, se mantuvo un total de 1,6 µg de feromona



**Figura 4.** Túnel de viento del Laboratorio de Ecología Química (Facultad de Química, UdelaR; en comodato de INIA).

por septo, combinando acetato de (Z,Z)-7,9-dodecenilo (Z7,Z9-12:Ac) y (Z,Z)-7,9-dodecenol (Z7,Z9-12:OH) en proporciones 15:1, 1:1 y 1:0. Las diferentes mezclas se aplicaron a septos de goma natural que actuaron como dispensadores, apoyados dentro de un cilindro de vidrio de iguales características que los utilizados con las hembras. El control consistió en la aplicación de solvente (hexano) en los septos. Se utilizó un nuevo septo por cada macho a ensayar, preparándose antes del comienzo de los experimentos y manteniéndose en frío hasta su utilización, para evitar la evaporación de los compuestos.

El experimento comenzó al retirar el tul al tubo conteniendo el macho, de modo que pudiera volar libremente por el túnel. Se observó durante 10 min el comportamiento del macho, registrando el tiempo de inicio de vuelo, la observación de vuelo en *zig-zag* característico del vuelo orientado hacia una fuente de feromona (vuelo en la pluma), la presencia de aleteos rápidos típicos de una respuesta a feromona, y la llegada a la fuente de estímulo odorífero.

Se utilizó un ANOVA para la comparación del tiempo de inicio de vuelo de los

diferentes tratamientos, previa transformación a log (x+1) para normalizar los datos. Como prueba a posteriori se usó el test de Dunnett que no asume varianzas iguales. El test de Chi Cuadrado se utilizó en la comparación del porcentaje de machos que respondió a los diferentes estímulos, mediante tablas de Contingencia de 2x2 ( $P < 0,05$ ).

## Ensayos de campo

Una vez conocidos los componentes de la feromona sexual, sus proporciones relativas en la glándula de la hembra, y las proporciones más atractivas en el laboratorio, se trabajó en la determinación de la formulación más atrayente de los componentes de la feromona, mediante ensayos de campo en una chacra experimental de soja en Paysandú.

Se colocaron trampas de tipo delta de plástico corrugado (15 x 15 x 25 cm) con septos de feromona en su interior, en un campo de soja de 2 ha en la Estación Experimental «Dr. Mario Cassinoni» (EEMAC), Facultad de Agronomía, Departamento de Paysandú (32,5° de latitud sur y 58° de longitud oeste), durante seis semanas entre marzo y abril de 2009 (Figura 5).



**Figura 5.** A: Campo de soja con trampas de feromona en la estación experimental Dr. Mario E. Cassinoni, Facultad de Agronomía, Paysandú. B: trampa tipo delta con el septo de feromona en su interior. El septo cuelga cerca del piso engomado de la trampa, de modo que los machos atraídos por la feromona quedan pegados al ingresar a la trampa.

Los tratamientos con diferentes proporciones de los dos componentes de la feromona (Z7,Z9-12:OH y Z7,Z9-12:Ac) fueron la proporción 15:1 (OH:Ac) (presente en la glándula), 1:1, 1:0, 0:1, así como el control (igual volumen de hexano en el septo), utilizándose 0,1 mg de feromona por septo. Se dispusieron ocho bloques conteniendo cada uno todos los tratamientos, con una distancia mínima entre bloques de 30 m, y de las trampas dentro de cada bloque de 15 m (Figura 6). La altura de las trampas varió según el tamaño de las plantas, colocándolas siempre en la parte superior del follaje o sobre ellas. La posición de cada tratamiento fue aleatorizada cada día de muestreo, realizado dos veces por semana. Personal del laboratorio de entomología de la EEMAC realizó la identificación y el conteo de las especies atrapadas, retirándolas de la trampa en cada muestreo.

A su vez, se realizaron dos muestreos de larvas a lo largo del experimento, revisando 10 plantas al azar dentro de cada bloque.

Dado que en algunos casos se perdieron datos de capturas por caerse las trampas, los datos faltantes fueron estimados según Snedecor y Cochran (1980), mediante el cálculo iterativo de los valores hasta que permanecieron incambiables, estimando el valor inicial del dato faltante y teniendo en cuenta los restantes datos y la suma de bloques y tratamientos. Se realizó un ANOVA multifactorial para comparar medias de tratamientos, teniendo en cuenta el efecto de bloques y días de muestreo. Los datos se transformaron previamente a  $\log(x+1)$  para normalizarlos. Se utilizó el test de Tukey para evaluar diferencias entre pares de medias de tratamientos ( $P < 0,05$ ).

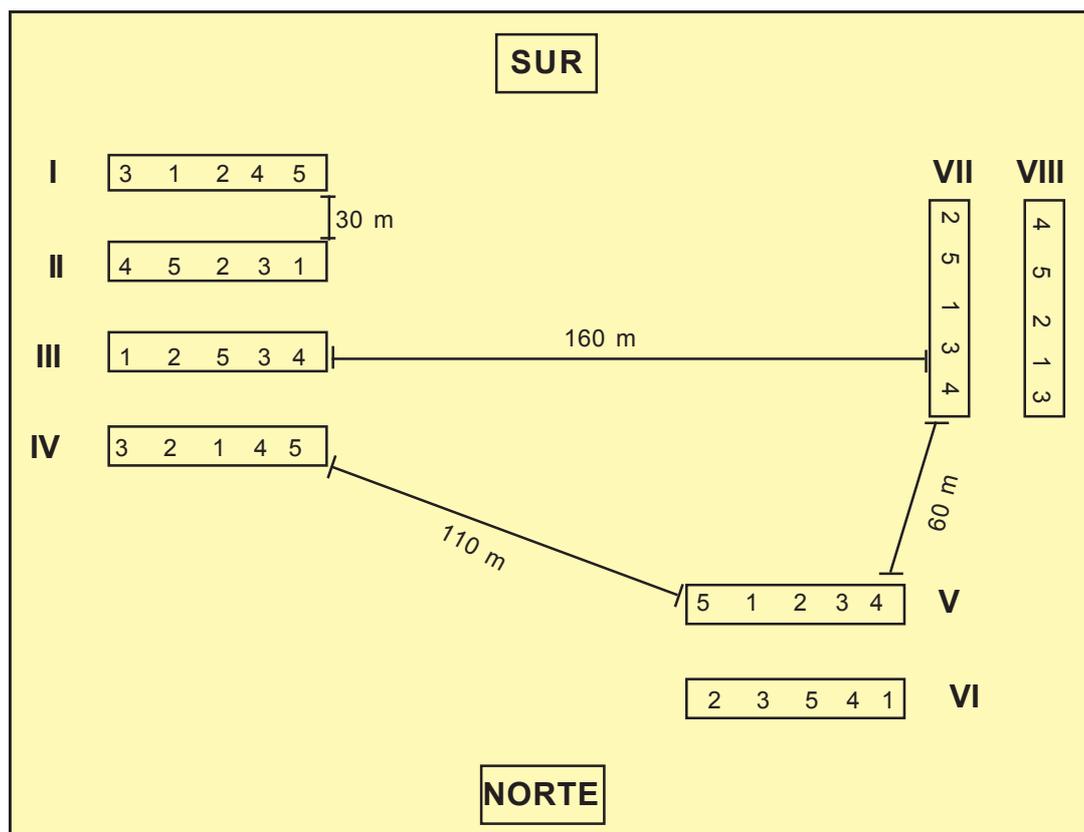


Figura 6. Esquema del campo de soja con la distancia entre los ocho bloques. Cada bloque incluyó los cinco tratamientos, posicionados de forma aleatoria a 15 m entre sí.



Paula Altesor\*  
Andrés González\*

\*Laboratorio de Ecología Química,  
Facultad de Química.

---

## CAPÍTULO 4.

### Comportamiento reproductivo de epinotia

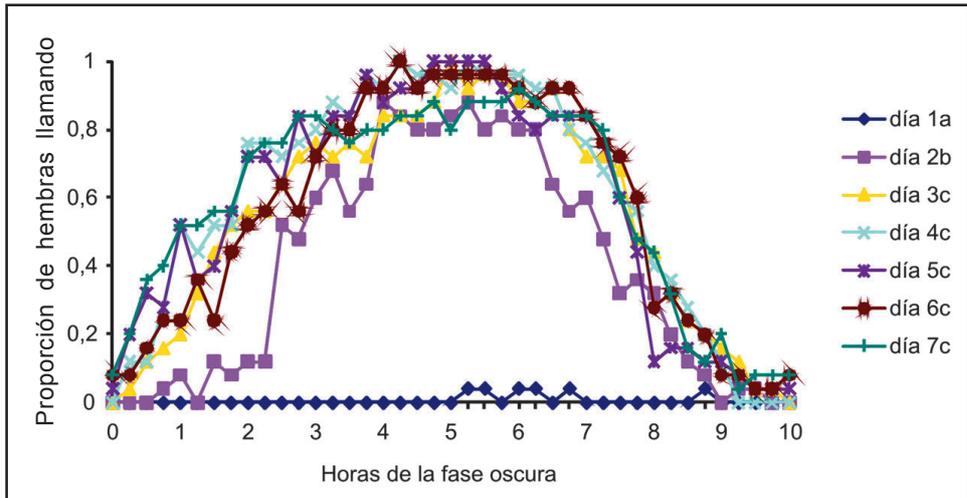
La postura de llamada de las hembras se observó claramente en contraposición a la postura de reposo. Durante el llamado las hembras separaron las alas del cuerpo, levantando el abdomen y curvándolo hacia adentro, permaneciendo inmóviles en esa posición. Se observó asimismo la extrusión de una estructura abdominal que contiene a la glándula emisora de feromona (Figura 1).

Se encontraron diferencias significativas en el comportamiento de llamada de las hembras tanto en relación a los días (edad) como a las horas de la fase oscura (ANOVA de dos factores para edad,  $F = 339,01$ ;  $P < 0,001$ ; ANOVA de dos facto-

res para horas,  $F = 274,06$ ;  $P < 0,001$ ). El primer día de emergidas, la mayoría de las hembras no realizó postura de llamada, observándose dicho comportamiento a partir del segundo día (en 88 % de las hembras) y encontrándose del tercero en adelante una mayor proporción de hembras llamando (test de Tukey,  $P < 0,05$ ) (Figura 2). A medida que pasaron los días se observó también que las hembras comenzaron antes a llamar, y el último día se registró la disminución en el número de hembras llamando (90 %), sugiriendo el comienzo de la senescencia reproductiva de las hembras.



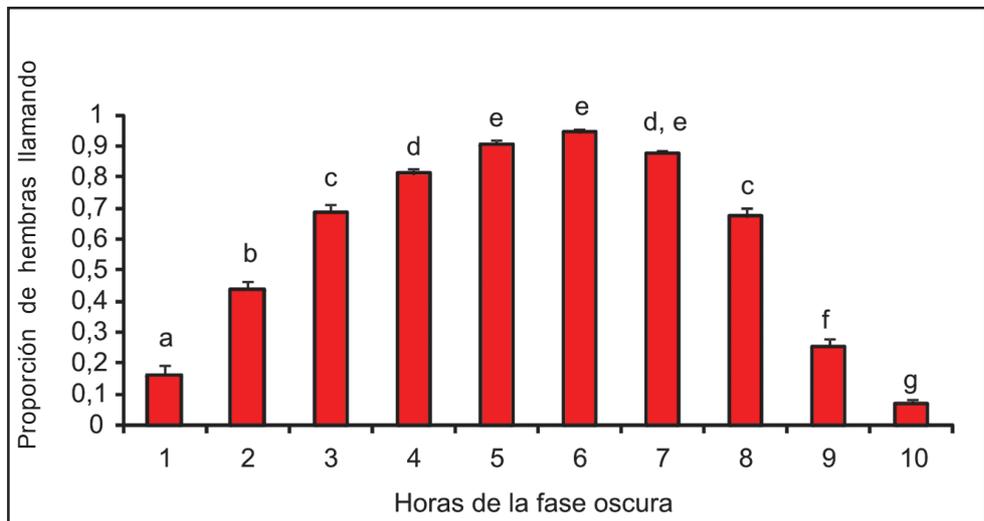
**Figura 1.** Hembra de epinotia en postura de llamada. En el extremo del abdomen se observa la glándula emisora de feromona, visible únicamente cuando la hembra está en la postura típica de llamada.



**Figura 2.** Proporción de hembras llamando a lo largo de la fase oscura, durante 7 días a partir de la emergencia de los adultos. Distintas letras en los días de la leyenda indican diferencias significativas en comparaciones de pares post-ANOVA de dos factores ( $P < 0,05$ ; test de Tukey).

Tomando en cuenta únicamente los días de mayor número de hembras llamando (3 a 7) se encontró que un mayor número de hembras se colocó en dicha postura entre las 5 y las 7 h después del

comienzo de la fase oscura (test de Tukey,  $P < 0,05$ ) (Figura 3). El tiempo promedio de llamada de las hembras fue de  $339 \pm 25$  min (prom.  $\pm$  EE), con un rango de 75-585 min (calculado para el día 5).



**Figura 3.** Proporción de hembras llamando durante las horas de la fase oscura entre los días 3 y 7 a partir de la emergencia de la hembra adulta. Las barras de error indican error estándar. Letras distintas sobre las barras muestran diferencias significativas en comparaciones de pares post-ANOVA de dos factores ( $P < 0,05$ ; test de Tukey).

Paula Altesor\*  
Andrés González\*

\*Laboratorio de Ecología Química,  
Facultad de Química.

---

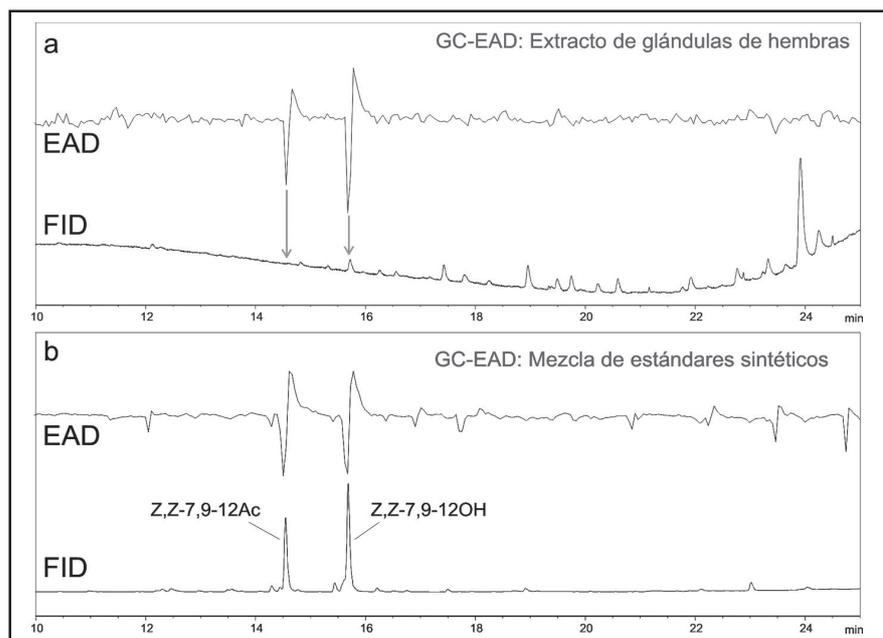
## CAPÍTULO 5.

# Identificación de la feromona sexual de epinotia

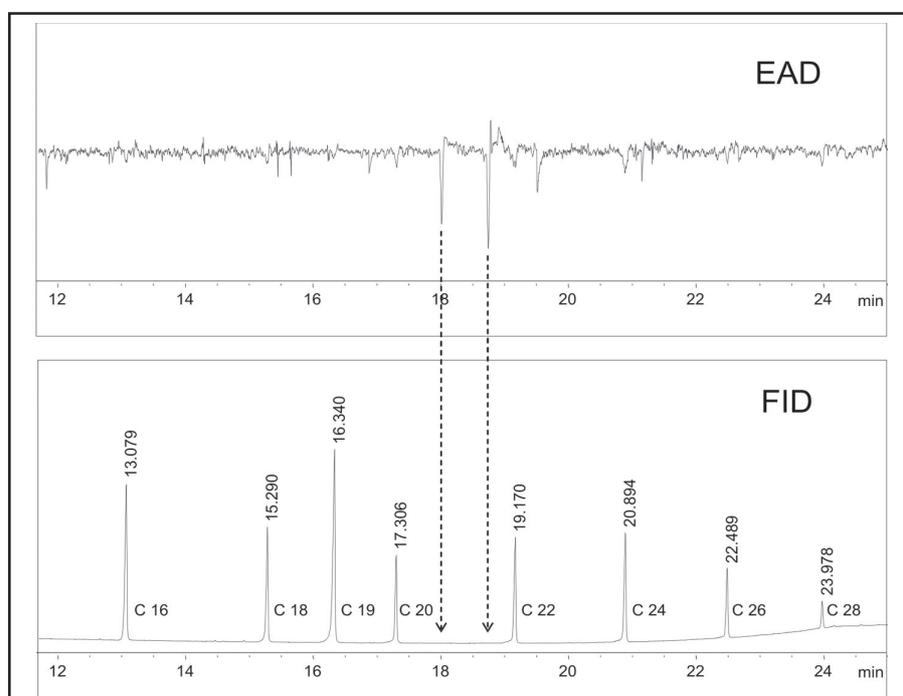
El extracto de glándulas de feromonas analizado por GC-EAD (electroantenograma acoplado a cromatografía de gases) resultó en dos claras señales de las antenas de machos. Una de estas señales se correspondió con un pico muy débil en el detector del GC (FID), mientras que la otra no tuvo correlato con un pico en el FID dada la poca cantidad de este compuesto en el extracto (Figura 1a). La coinyección en GC-EAD del extracto con una solución de hidrocarburos permitió el cálculo de los índices de retención de los compuestos a los que la antena fue activa (IR = 1076 e IR = 2155 en columna polar, IR = 1529 e IR = 1664 en columna apolar) (Figura 2). Asimismo, el intercambio de las columnas de fases estacionarias distintas, permitió descubrir que los dos componentes cambiaron el orden relativo de elusión de una columna a la otra, con el compuesto mayoritario eluyendo antes en la columna apolar (IR = 1529) y segundo en la columna polar (IR = 2159). Esta inversión, y la diferencia de 135 unidades en-

tre los índices de retención de ambos compuestos en la fase apolar, permitieron suponer que se trataba de una mezcla alcohol/acetato. Los índices de retención en ambas fases se correspondieron además con los reportados para alcoholes y acetatos dodecadienilos conjugados, por lo que se decidió comparar el extracto con dos dodecadienilos reportados para una especie europea del género *Epinotia* (*E. tedella*; Z7,Z9-12:Ac y Z7,Z9-12:OH).

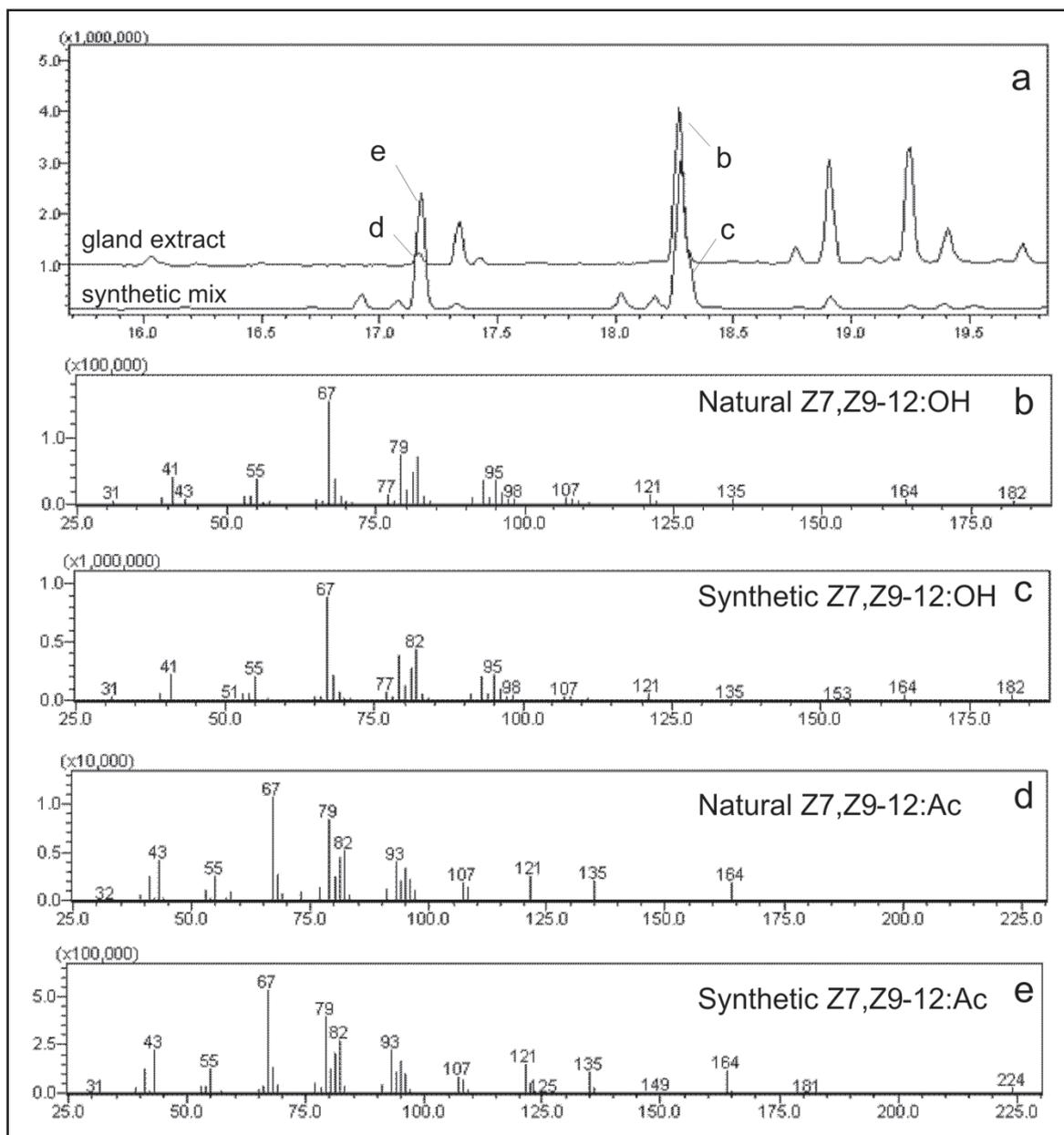
El análisis comparado de dichos estándares sintéticos se correspondió en forma exacta, tanto en GC-EAD como en GC-MS, con los compuestos presentes en el extracto de glándulas (Figuras 1b y 3). Asimismo, una comparación de distintos isómeros de dodecadienilos conjugados permitió observar una clara separación de los mismos, y una correlación entre tiempos de retención del Z7,Z9-12:OH con el componente mayoritario EAD-activo del extracto (Figura 4). Los resultados obtenidos permitieron concluir que la feromona de epinotia está constituida por una mezcla 15:1 de Z7,Z9-12:OH: Z7,Z9-12:Ac (Figura 5), según la proporción de sus áreas relativas en el cromatograma de iones totales del GC-MS.



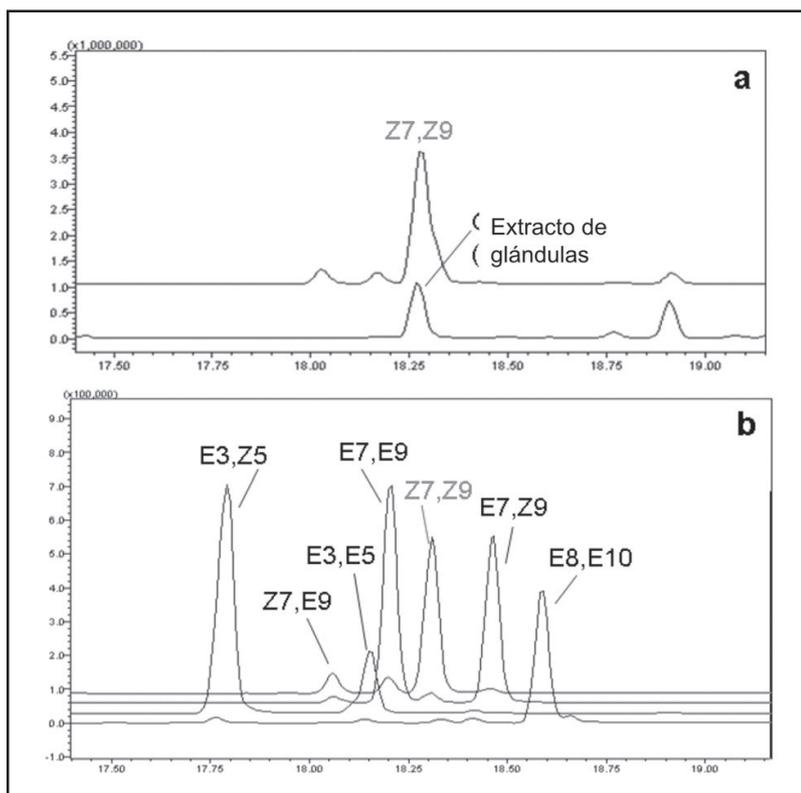
**Figura 1.** Resultado del análisis por GC-EAD de a) extracto de glándulas de feromonas de hembras de epinotia, y b) una solución 100 ppm de los estándares sintéticos. La parte superior de ambas gráficas muestra la respuesta de la antena del macho (EAD), y la parte inferior la señal del detector del GC (FID). Se observa claramente que los estándares sintéticos coincidieron en tiempo de retención con los compuestos activos del extracto, y produjeron a su vez la misma respuesta electrofisiológica en la antena del macho.



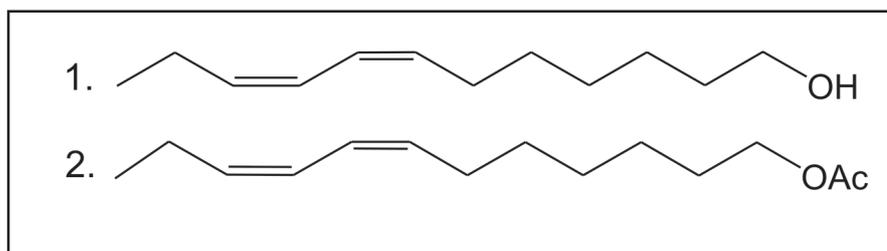
**Figura 2.** Resultado de la coinyección del extracto de glándulas con una solución de hidrocarburos para el cálculo de índices de retención de los compuestos activos. La parte superior muestra la respuesta de la antena del macho y la inferior la señal simultánea del FID (coinyección del extracto con la solución de hidrocarburos).



**Figura 3.** Comparación de los cromatogramas de iones totales obtenidos del análisis del extracto de hembras (a, superior) con los compuestos sintéticos Z7,Z9-12:Ac y Z7,Z9-12:OH (a, inferior). Los espectros de masa de los compuestos naturales (b,d) fueron virtualmente idénticos a los de los compuestos sintéticos (c,e), al igual que sus tiempos de retención.



**Figura 4.** a) Comparación de los tiempos de retención de Z7,Z9-12:OH (rojo) con el compuesto del extracto de glándulas identificado como tal; b) separación cromatográfica de distintos isómeros posicionales de dodecadienoles conjugados en GC-MS.



**Figura 5.** Estructuras químicas de Z7,Z9-12:OH (1) y Z7,Z9-12:Ac (2), componentes identificados en la feromona sexual de *C. aporema* (epinotia).

Paula Altesor\*, Horacio Silva\*\*  
Paola Liberati\*, Leticia Alves\*\*\*  
Juan Ramos\*\*\*, Daniela Gamenara\*\*\*,  
David González\*\*\*, Ignacio Carrera\*\*\*  
Gustavo Seoane\*\*\*, Carmen Rossini\*  
Enrique Castiglioni\*\*, Andrés González\*

\* Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química.

\*\* Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía.

\*\*\* Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Química.

## CAPÍTULO 6.

# Ensayos con feromona sintética en laboratorio y campo

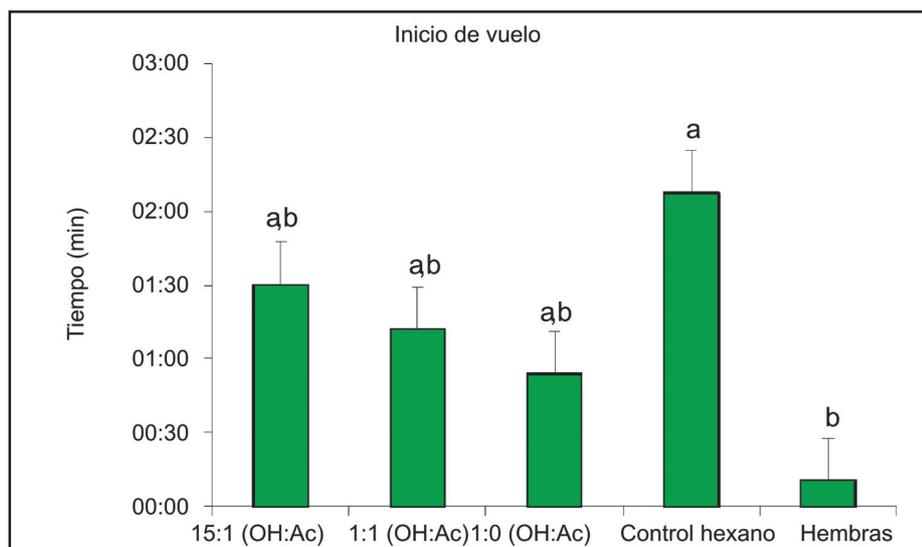
### ENSAYOS EN TÚNEL DE VIENTO

El tiempo de inicio de vuelo de los machos en el túnel varió de unos pocos segundos hasta varios minutos. Frente a hembras los machos iniciaron el movimiento por el túnel rápidamente, siendo este resultado significativamente diferente del control aunque no de los restantes tratamientos con diferentes proporciones de la feromona (Figura 1).

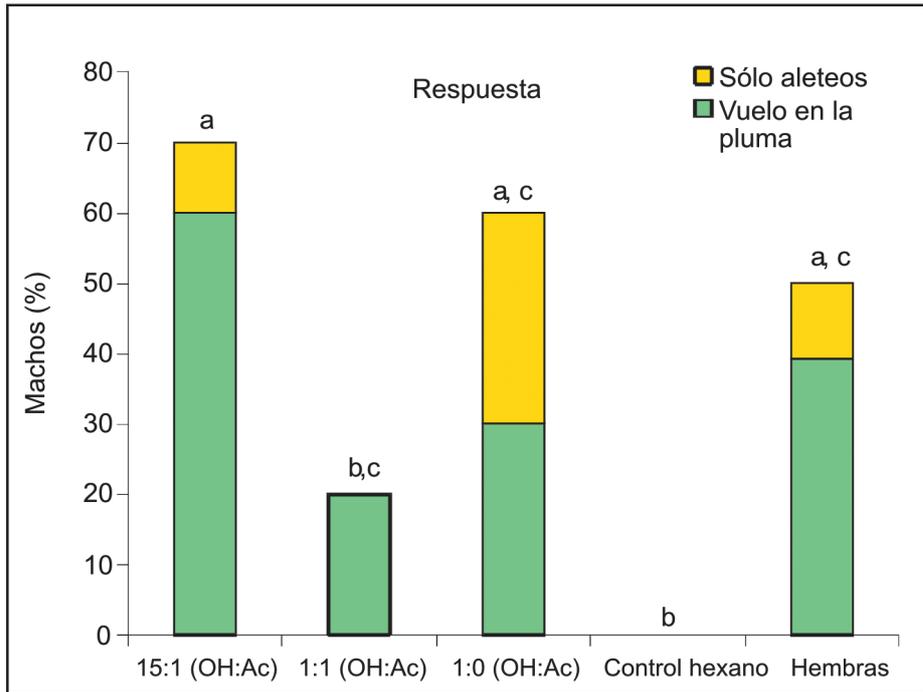
Por su parte, el comportamiento de aleteo y vuelo en la pluma de los machos frente a la feromona fue mayor teniendo como estímulo la proporción 15:1 (OH:Ac) (70 % de los machos respondieron). Por

su parte, la proporción 1:1 (OH:Ac) fue la menos atractiva de las 3 proporciones ensayadas (20 % de los machos respondieron), siendo diferente significativamente de la proporción más atractiva (15:1) (OH:Ac) (Figura 2).

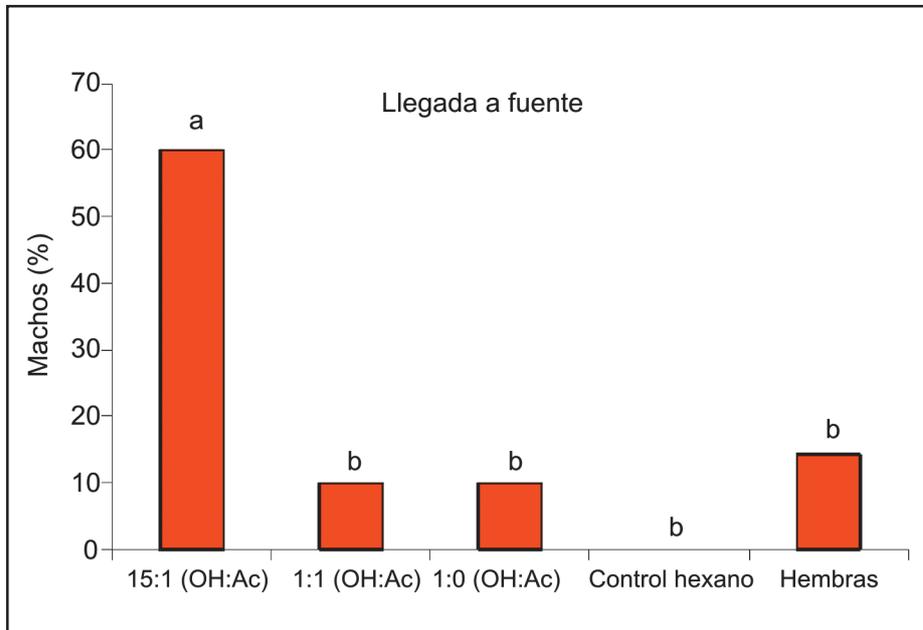
Respecto a la llegada a la fuente de olor, una cantidad significativamente mayor de machos probados en el tratamiento 15:1 (OH:Ac) (60 %) llegó a tocar el estímulo en relación a los demás tratamientos, incluyendo las hembras (Figura 3). La mayoría de los machos que se posaron en la fuente de olor desarrollaron conductas de cortejo, tanto frente a hembras como a los septos de feromona, exponiendo las estructuras de pelos (co-remata) del final del abdomen (Figura 4).



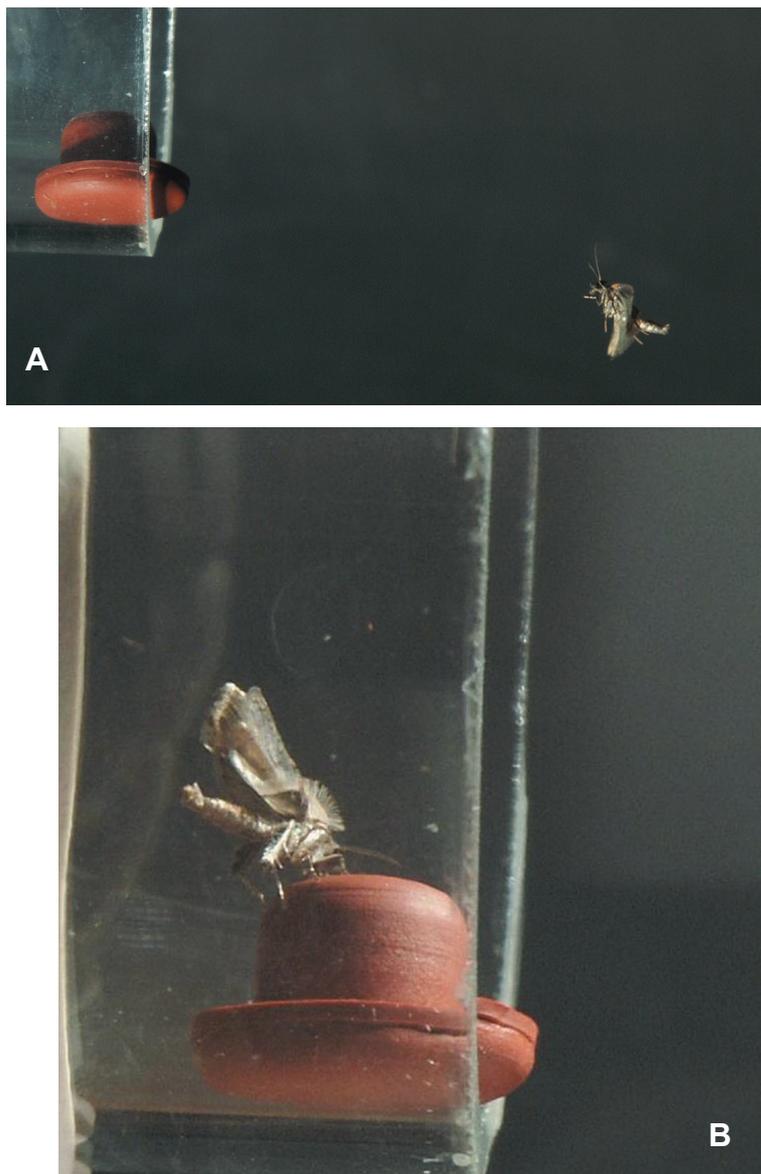
**Figura 1.** Tiempo de inicio del vuelo de los machos en túnel de viento frente a los diferentes tratamientos. Las barras indican error estándar. Letras distintas sobre las barras muestran diferencias significativas entre tratamientos (Test de Dunnett,  $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Porcentaje de machos que respondió con vuelos en la pluma y aleteos frente a los diferentes tratamientos. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Chi Cuadrado,  $P < 0,05$ ).



**Figura 3.** Porcentaje de machos que llegó a la fuente de olor de los distintos tratamientos. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas (Test de Chi Cuadrado,  $P < 0,05$ ).



**Figura 4.** Macho de epinotia volando en túnel de viento, atraído por el septo conteniendo la proporción 15:1 de los compuestos de la feromona (A) y una vez posado sobre el septo, intentando cortejarlo (B). Se observan las escamas levantadas y el coremata expuesto (Fotos: A. González).

## ENSAYOS DE CAMPO

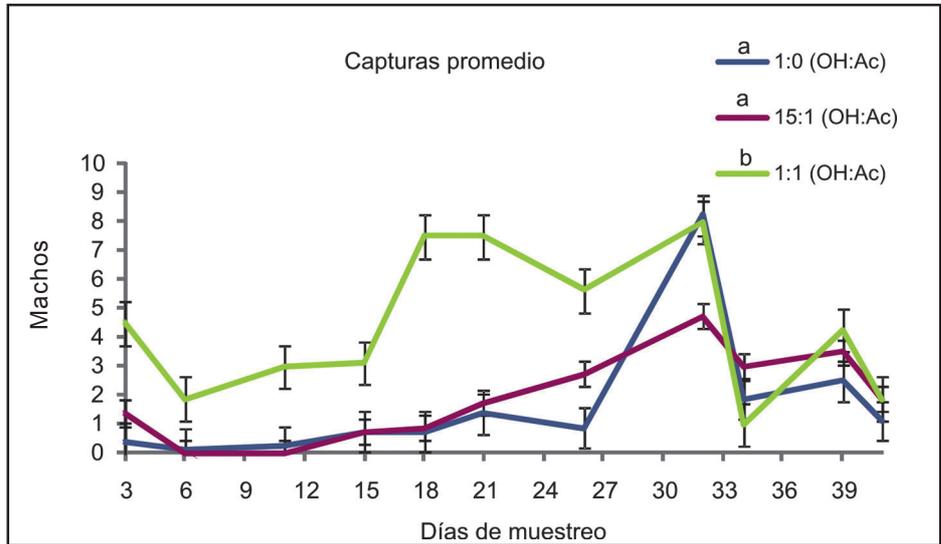
El control y la proporción 0:1 (OH:Ac) no capturaron machos, por lo que no se incluyeron en el análisis. Considerando las capturas promedio de los restantes tratamientos (Figura 5), encontramos un pico máximo de capturas alrededor de los 30 días del experimento. Las capturas promedio del tratamiento con la proporción 1:1 (OH:Ac) fueron significativa-

mente mayores que las de los otros dos tratamientos (Test de Tukey,  $P < 0,05$ ). Las capturas acumuladas se muestran en la Figura 6, atrapando el tratamiento 1:1 (OH:Ac) un promedio de 47,5 machos, el tratamiento 1:0 (OH:Ac) 27,6 machos y el tratamiento 15:1 (OH:Ac) 20,6 machos en los 41 días que duró el experimento.

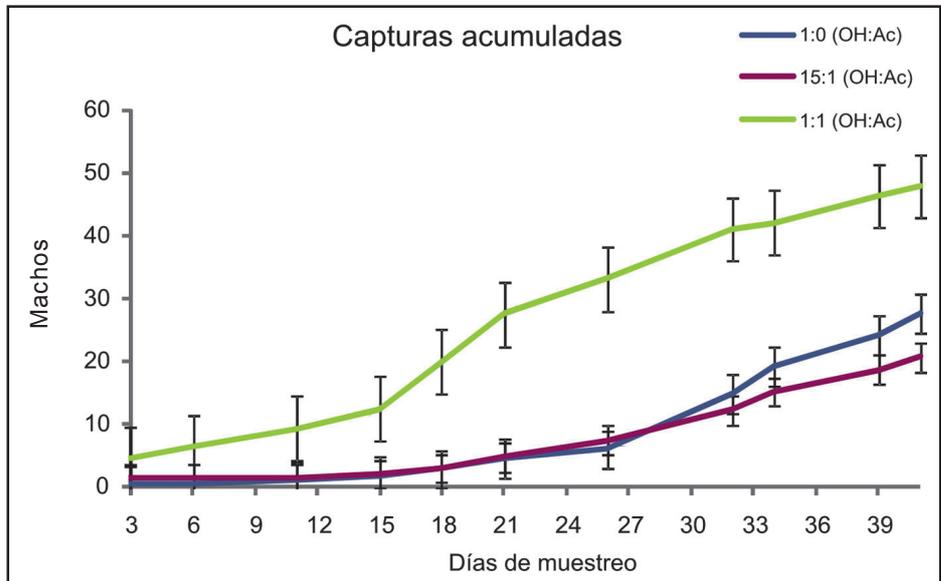
El muestreo de larvas arrojó un resultado muy bajo de infestación del cultivo,

encontrándose solamente una larva en un total de 2790 brotes revisados. Por

este motivo no se pudo correlacionar capturas de adultos en trampas con la presencia de larvas en las plantas.



**Figura 5.** Capturas promedio de machos por tratamiento durante el experimento. Letras distintas en la leyenda indica diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey,  $P < 0,05$ ).



**Figura 6.** Capturas acumuladas de machos por tratamiento durante el experimento

Paula Altesor\*  
Andrés González\*

\*Laboratorio de Ecología Química,  
Facultad de Química.

# CAPÍTULO 7.

## Discusión, conclusiones y perspectivas

En la mayoría de los lepidópteros nocturnos la emisión de feromonas está asociada con una postura estereotipada, determinada generalmente por la separación y vibración de las alas y la extrusión, a veces rítmicamente, de la glándula productora de feromona, ubicada al final del abdomen (Cardé y Haynes 2004). El comportamiento de llamada de las hembras de epinotia consiste en el mantenimiento de una postura inmóvil caracterizada por la separación de las alas respecto al cuerpo, curvatura hacia adentro del abdomen, y extrusión de la glándula de feromonas.

Como también ocurre en la mayoría de los lepidópteros nocturnos, la actividad sexual de epinotia está regulada por el fotoperiodo. A partir del inicio de la fase oscura se incrementa la actividad de vuelo de ambos sexos, disminuyendo con el inicio de la fase clara. El apareamiento ocurre durante la noche, mayormente entre las 4 y 6 h de la fase oscura, estando relacionado con el período de mayor cantidad de hembras en postura de llamada (5-7 h de la fase oscura) (Altesor *et al.*, 2010). A diferencia de dos tortricidos relacionados, *Pandemis pyrusana* y *Argyrotaenia citrana*, que son activos sexualmente desde la primer noche de emergidos (Knight 1996, Knight y Turner 1998), epinotia no presenta actividad alguna en su primer noche. Sin embargo, la mayoría de las hembras llaman a partir de la segunda noche y se aparean rápidamente (Altesor *et al.*, 2010).

La cantidad de feromona producida por las hembras de lepidópteros es muy baja (en el orden de nanogramos) aunque suficiente para atraer a los machos desde grandes distancias (Cardé y Haynes 2004). Con miras a lograr identificar la

feromona sexual de epinotia, la descripción de su patrón temporal de llamada fue imprescindible para obtener una mayor cantidad de feromona, realizando la disección de las glándulas durante el pico de llamada de las hembras (5-7 h de la fase oscura) y a partir del segundo día de emergidas.

Los compuestos Z7,Z9-12:OH y Z7,Z9-12:Ac fueron identificados como constituyentes de la feromona de epinotia en una proporción de 15:1 (OH:Ac) en las glándulas de las hembras. La proporción de los compuestos presentes en la glándula de feromona de epinotia podría no ser la misma que la efectivamente emitida. Sin embargo, la proporción 15:1 de los compuestos Z7,Z9-12:OH: Z7,Z9-12:Ac fue la más atractiva en túnel de viento. Inclusive, dicha respuesta fue superior a la obtenida frente a hembras llamando, lo cual puede deberse a que las hembras no emiten feromona en forma continua, a pesar de mantenerse en postura de llamada durante todo el experimento.

La proporción 1:0 (OH:Ac), conteniendo únicamente el compuesto mayoritario, genera una respuesta atractiva de los machos, que no obstante no se concreta en el arribo a la fuente. Esto demuestra lo crucial de la presencia del acetato en la mezcla para producir una respuesta comportamental completa en los machos, a pesar de presentarse en pequeña cantidad respecto al alcohol. Por su parte, la proporción 1:1 (OH:Ac) redundaba también en una menor respuesta de llegada de los machos a la feromona, debido en este caso al exceso del compuesto minoritario. La especificidad de la respuesta a la feromona sexual de lepidópteros reside no solamente en los componentes de la

misma, sino también en sus proporciones relativas, siendo crítico en especies simpátricas que utilizan los mismos compuestos para la atracción entre sexos (Ando *et al.*, 2004). Es así que la determinación de los compuestos presentes en la feromona de este insecto, y la mezcla más atractiva de los mismos, constituye un paso crucial para la implementación de trampas de monitoreo de epinotia en cultivos.

A diferencia del experimento en túnel de viento, donde se obtuvo una mayor llegada de machos al septo con la proporción presente en la glándula (15:1 OH:Ac) (Altesor *et al.*, 2009), en el experimento de campo el promedio de capturas en trampas de feromona fue mayor para la proporción 1:1 (OH:Ac) (González *et al.*, 2012). Una posible explicación para la diferencia encontrada en túnel de viento y campo, es que en éste se da la evaporación paulatina y diferencial de los compuestos absorbidos en el septo, mientras que en el primero cada réplica se realiza con un septo nuevo e inmediatamente después de cargar el mismo con la mezcla a evaluar. En la evaporación de los compuestos que componen la feromona incide tanto el peso molecular como el grupo funcional presente (Butler y McDonough 1979, Butler y Mc Donough 1981, Gut 2004). Los compuestos con mayor peso molecular tienen menor presión de vapor, y por tanto se evaporan menos que los compuestos con menor peso molecular. El grupo funcional hidroxilo (OH), por su parte, resulta en un compuesto más polar y por tanto menos volátil, a diferencia del grupo acetilo (Ac) (Gut 2004). En este contexto, podría suponerse que en condiciones de campo el tratamiento con la proporción 15:1 (OH:Ac) de la feromona pasó rápidamente a ser similar al de la proporción 1:0 (OH:Ac), tratamientos que registraron similares niveles de captura. Asimismo, el tratamiento con la proporción 1:1 (OH:Ac) fue enriqueciéndose en el alcohol, acercándose durante el correr del experimento a la proporción presente en la glándula (15:1, OH:Ac), y siendo por lo tanto más atractiva que los restantes tratamientos durante la mayor parte del experimento.

El aumento del nivel de capturas en los tratamientos 15:1 (OH:Ac) y 1:0 (OH:Ac) a los 30 días del experimento

puede haber registrado un pico poblacional del insecto, indicando que las trampas de feromonas para el monitoreo poblacional de epinotia tendrían una duración significativa en campo. A pesar del prácticamente nulo nivel de infestación de larvas, las trampas de feromona fueron capaces de capturar adultos, mostrando que son eficientes en la detección del insecto aún con cargas muy bajas de feromona en el septo (0.1 mg/septo), y en niveles poblacionales bajos.

Epinotia es una plaga considerada importante en cultivos de leguminosas, aunque ha devenido en menor relevancia en los últimos años, posiblemente por efectos climáticos y la ausencia de hospederos invernales. En particular, la temporada del experimento de campo (2009) se caracterizó por una intensa sequía que afectó considerablemente los cultivos de verano, y en particular la soja. En el mismo período del año anterior, un trabajo preliminar con trampas cebadas con la proporción 1:1 (OH:Ac), arrojó un nivel máximo de capturas de 653 machos, cifra mucho mayor a la obtenida en 2009 (47,5 machos).

La síntesis de los componentes de la feromona sexual de epinotia es un paso esencial para el desarrollo de una herramienta de monitoreo, ya que éstos no están disponibles en el mercado. Los componentes no resultaron sencillos de sintetizar, en particular por la presencia de un sistema conjugado de configuración Z,Z. Se logró inicialmente sintetizar una pequeña cantidad que permitió realizar los experimentos de campo, y más recientemente se logró la síntesis de mayores cantidades (González *et al.*, 2012), lo cual hace viable el desarrollo de trampas de monitoreo a escala productiva. Los detalles técnicos de la síntesis desarrollada exceden los objetivos de esta publicación.

Como conclusiones finales, el marco de este proyecto se identificó químicamente la feromona sexual de *Crocidosema (=Epinotia) aporema*, siendo éste el primer caso de una feromona químicamente identificada en Uruguay. La feromona está compuesta por (Z,Z)-7,9-dodecadien-1-ol y acetato de (Z,Z)-7,9-dodecadienilo. El alcohol es el componente mayoritario en las glándulas de las hembras, sin embargo, la proporción más

efectiva para el monitoreo de epinotia en campo, y por lo tanto la recomendación de uso como resultado de este proyecto, es la formulación 1:1. Las evaluaciones de campo demostraron que aún con niveles mínimos de la feromona en trampas de tipo delta (0,1 mg por trampa, sin reposición), la capacidad de captura de la feromona alcanza los 40 días. Por lo tanto, el uso de trampas de feromonas para el monitoreo de poblaciones de epinotia en soja y leguminosas forrajeras es viable, tanto por la buena capacidad de captura observada en nuestros experimentos, como por la duración de las trampas. En el caso de cultivos de soja, donde las evaluaciones de campo fueron realizadas, las trampas deben ubicarse inmediatamente sobre la altura del follaje.

La captura de machos en las trampas de feromona fue alta, aún cuando las poblaciones de larvas fueron prácticamente nulas. De esta manera, no se logró realizar una correlación cuantitativa entre capturas de machos en trampas y población residente o esperable de larvas. Por lo tanto, las trampas de feromona de epinotia serían aplicables como estrategia de detección del insecto, quedando pendiente un estudio para establecer umbrales de captura y correlación captura/daño.

La baja en las poblaciones de epinotia es un patrón general que se ha observado en los últimos años, y que puede deberse a una variedad de razones ecológicas (y agro-ecológicas), como la sustitución de un sistema tradicional de rotación entre pasturas y cultivos de invierno por grandes extensiones de soja, y una disminución en el área destinada a pasturas. El sistema tradicional de producción proporcionaba hospederos para epinotia durante todo el año, situación que ha cambiado en los últimos años. Es de prever, sin embargo, que los sistemas de producción agrícola-ganadera en Uruguay sean cambiantes, y con ellos, pueden darse las condiciones para favorecer la vuelta de epinotia como plaga primaria. En este caso, se dispondrá de una herramienta de monitoreo basada en feromonas como resultado de la ejecución de este proyecto. La viabilidad de alcanzar la producción nacional y comercialización de trampas de feromonas de epinotia depende únicamente del surgimiento de una demanda para las mismas,

y del interés de un mediador comercial, ya que los componentes de la feromona pueden producirse en Uruguay, y las trampas pueden formularse y confeccionarse a nivel local.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, R. P.** 2007. *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- ALTESOR, P.; ROSSINI, C.; ZARBIN, P.H.G.; GONZÁLEZ, A.** 2009. Sex Pheromone of the Bud Borer Epinotia aporema: Chemical Identification and Male Behavioral Response. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 349-354.
- ALTESOR, P.; HORAS, V. R.; ARCIA, M. P.; ROSSINI, C.; ZARBIN, P. H. G.; GONZÁLEZ, A.** 2010. Reproductive behaviour of Crocidosema (=Epinotia) aporema (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae): temporal pattern of female calling and mating. *Neotropical Entomology*, 39(3), 324-329.
- ALZUGARAY, R.; RIBEIRO, A.** 2000. Insectos en pasturas. *INIA Serie Técnica: Manejo de plagas en pasturas y cultivos* (eds S. Zerbino & A. Ribeiro), pp. 13-30. INIA, Montevideo.
- ALZUGARAY, R.; ZERBINO, M. S.; STEWART, S.; RIBEIRO, A.; EILENBERG, J.** 1999. Epizootiology of Entomophthoralean fungi. Use of *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko (Zygomycotina: Entomophthorales) for the biocontrol of Epinotia aporema (Wals.) (Lepidoptera: Tortricidae) in Uruguay. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 58, 307-311.
- ANDO, T.; INOMATA, S.-I. ; YAMAMOTO, M.** 2004. Lepidopteran Sex Pheromones. *Topics in Current Chemistry*, 239, 51-96.
- ARN H.; BRAUCHLI J.; KOCH U.T.; POP L.; RAUSCHER S.** 1997. The need for standards in pheromone technology. *IOBC wprs Bulletin* 20:27-34.
- BENTANCOURT, C.; SCATONI, I.** 1999. *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*. Hemisferio Sur SRL.
- BENTANCOURT, C.; SCATONI, I.** 2001. *Enemigos naturales : Manual ilustrado para la agricultura y la forestación*. Eds. Facultad de Agronomía. GTZ. Hemisferio Sur SRL, Montevideo, Uruguay.
- BENTANCOURT, C.; SCATONI, I.** 2006. *Lepidópteros de importancia económica. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales*. Agropecuaria Hemisferio Sur SRL, Montevideo, Uruguay.
- BJOSTAD, L. B.** 1998. Electrophysiological Methods. *Methods in Chemical Ecology. Chemical Methods*. (eds K. F. Haynes & J.

- G. Millar), pp. 339-376. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- BLUM, A.; NARBONDO, I.; OYHANTCABAL, G.; SANCHO, D.** 2008. *Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. La nueva colonización.* RAP-AL Uruguay, Montevideo.
- BUTLER, L. I.; MCDONOUGH, L. M.** 1979. Insect sex pheromones: Evaporation Rates of Acetates from Natural Rubber Septa. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 5.
- BUTLER, L. I.; MC DONOUGH, L. M.** 1981. Insect sex pheromones: Evaporation Rates of Alcohols and Acetates from Natural Rubber Septa. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 7.
- CARDÉ, R. T.; HAYNES, K. F.** 2004. Structure of the pheromone communication channel in moths. *Advances in Insect Chemical Ecology* (eds R. T. Cardé & J. G. Millar), pp. 283-332. Cambridge University Press, Cambridge.
- COSSÉ, A.A.; BARTELT, R.J.; ZILKOWSKI, B.W.; BEAN, D.W.; PETROSKI, R.J.** 2005. The aggregation pheromone of *Diorhabda elongata*, a biological control agent of saltcedar (*Tamarix* spp.): identification of two behaviorally active components. *Journal of Chemical Ecology* 31(3):657-670.
- EL-SAYED, A.M.; SUCKLING, D.M.; WEARING, C.H.; BYERS, J.A.** 2006. Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species. *Journal of Economic Entomology* 99(5):1550-1564.
- EL-SAYED, A.M.** 2011. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. Último acceso: octubre 2011.
- GONZÁLEZ, A.; ALTESOR, P.; ALVES, L.; LIBERATI, P.; SILVA, H.; CARRERA, I.; GONZÁLEZ, D.; SEOANE, G.; ROSSINI, C.; CASTIGLIONI E.; GAMENARA D.** 2012. Synthesis and field evaluation of synthetic blends of the sex pheromone of *Crociosema aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) in Soybean. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, in press.
- GUT, L. J.; STELINSKY, L. L.; THOMSON D. R.; MILLER, J. R.** 2004. Behaviour-modifying Chemical: Prospect and Constrain in IPM. *Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges* (ed K. Opende). CABI, Cambridge, MA, USA.
- HARE, J. D.** 1998. Bioassay methods with terrestrial invertebrates. *Methods in Chemical Ecology. Bioassay Methods*. (eds K. F. Haynes & J. G. Millar), pp. 212-270. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- HOWSE, P.; STEVENS, I.; JONES, O.** (1998) Insect pheromones and their use in pest management. London: Chapman and Hall.
- HUNG, C. C.; HWANG, J. S.; HUNG, M. D.; YEN, Y. P.; HOU, R. F.** 2001. Isolation, identification and field tests of the sex pheromone of the carambola fruit borer, *Eucosma notanthes*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 1855-1866.
- KEAN, J.M.; SUCKLING, D.M.** 2005. Estimating the probability of eradication of painted apple moth from Auckland. *N. Z. Plant Protection* 58:7-11.
- KNIGHT, A. L.** 1996. Sexual biology and mating disruption of orange tortrix, *Argyrotaenia citrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 93, 111-120.
- KNIGHT, A. L.; TURNER, J. E.** 1998. Sexual biology of *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae) under laboratory conditions. *Journal of Entomological Society of British Columbia*, 95, 89-94.
- PRIESNER, E.; REED, D. W.; UNDERHILL, E. W.; BOGENSCHUETZ, H.** 1989. (Z,Z)-7,9-Dodecadienyl Acetate, Sex Pheromone of *Epinotia tedella* Clerck (Lepidoptera Tortricidae). *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2457-2464.
- SHOREY, H. H.; HALE, R. L.** 1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 58, 522-524.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G.** 1980. *Métodos estadísticos*. Editorial Continental, México.
- STELINSKI, L.L., MILLER, J.R., ROGERS, M.E.** 2008. Mating disruption of citrus leafminer mediated by a noncompetitive mechanism at a remarkably low pheromone release rate. *Journal of Chemical Ecology* 34:1107-1113.
- TOBIN, P.C.; BLACKBURN, L.M.; LEONARD, D.S.; LIEBHOLD, A.M.; MCMANUS, M.L.; ROBERTS, E.A.; SHAROV, A.A.; THORPE, K.W.; ZIEGLER, A.H.** 2007. Slow the Spread: a national program to manage the gypsy moth. Newtown Square, PA: Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station.
- WITZGALL, P.** 2001. Pheromones - future techniques for insect control? In: Witzgall P, editor. *Pheromones for Insect Control in Orchards and Vineyards: IOBC wprs Bulletin*. p 114-122.
- WITZGALL P, KIRSCH P, CORK A.** 2010. Sex pheromone and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology* 36:80-100.
- WITZGALL, P.; STELINSKI, L.; GUT, L.; THOMSON, D.** 2008. Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology*. p 503-522.