



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios dirigidos a la ecología química de insectos plaga mediante semioquímicos

Aroa Domínguez Cuadrado

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

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

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

***PRODUCCIÓN Y PERCEPCIÓN
FEROMONAL DE Tuta absoluta***

Capítulo 4

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FEROMONA Y COMPORTAMIENTO REPRODUCTOR

T. absoluta es una especie multivoltina que puede llegar a producir entre 12-14 generaciones al año, y, dependiendo de las condiciones ambientales, su ciclo biológico puede durar entre 29 y 38 días. Tras la eclosión de los huevos pasa por cuatro fases larvarias que se desarrollan en el interior del mesófilo de las hojas hasta la formación de la pupa. Esta especie posee un alto potencial reproductivo (Torres et al. 2001), pudiendo llegar a poner una sola hembra 55-130 huevos que son depositados mayoritariamente en las hojas de la planta hospedadora (Coelho & França, 1987), mostrando predilección por las de la parte superior (Torres et al., 2001).

Las hembras son las que producen y emiten la feromona sexual en esta especie, al igual que en otros lepidópteros. Durante el periodo de llamada, permanecen inmóviles y elevan el abdomen con el ovipositor y la glándula feromonal expuestos. Al percibir la feromona de la hembra, los machos comienzan a batir las alas e inician el vuelo para aproximarse a las hembras receptivas y encontrarse con ellas (Hickel et al., 1991; Attygalle et al., 1995; Medeiros et al., 2009; Lee et al., 2014). Esto ocurre durante la primera hora de la fotofase, momento en el que también se produce el apareamiento, que puede durar de unos minutos a varias horas. Aunque solo pueden copular una vez al día, tanto los machos como las hembras poseen la capacidad de aparearse varias veces a lo largo de su vida (Lee et al., 2014), siendo el número de cópulas más elevado cuando los insectos están recién emergidos y disminuyendo a medida que aumenta su edad.

La feromona sexual de esta especie fue identificada en 1995 como una mezcla del acetato de (3E,8Z,11Z)-tetradeca-3,8,11-trienilo (3,8,11-E,Z,Z-14:Ac o TDTA) y acetato de (3E,8Z)-tetradeca-3,8-dienilo (3,8-E,Z-14:Ac o TDDA) en proporción 90:10 (Attygalle et al., 1995). El compuesto mayoritario, TDTA, se caracteriza por presentar una insaturación en la posición 3E, una estructura muy rara entre las feromonas sexuales de hembras de lepidópteros de tipo acetato, presente en muy pocas especies, todas ellas pertenecientes al género *Scrobipalpula*. Poco después de su elucidación, se comprobó la gran capacidad de atracción que tenía el TDTA con un alto número de capturas en trampas cebadas con él, ofreciendo una alternativa a los insecticidas empleados hasta entonces. Las hembras sintetizan los dos componentes feromonales en una estructura especializada que se encuentra en el extremo del abdomen, la glándula feromonal (Vogel et al., 2010). Las feromonas sexuales de las hembras de lepidópteros son, en general, compuestos derivados de ácidos grasos de 12 a 18 carbonos con dobles enlaces y un grupo funcional oxigenado como alcoholes, aldehidos y esterés (Antony et al., 2009). La biosíntesis de estos compuestos se realiza de novo a partir de ácidos grasos desde acetyl-CoA que son modificados por enzimas del tipo acetyl-CoA carboxilasa, ácido graso sintasa, reductasas, oxidasas, acetiltransferasas y desaturasas que están presentes en las glándulas feromonales (Antony et al., 2009; Vogel et al., 2010). La síntesis feromonal está regulada por factores endocrinos, como el PBAN (neuropéptido activador de biosíntesis de feromona) y la hormona juvenil, que a su vez responden a factores extrínsecos, como el fotoperiodo, apareamiento, temperatura, o la presencia de planta hospedadora (Raina, 1993). En varias especies de lepidópteros, se ha determinado que el PBAN interactúa con su receptor en la glándula feromonal, induciendo la entrada de calcio y la producción de adenosin

monofosfato cíclico (AMPC), que a través de quinasas y fosfatasas activará el enzima acetil-CoA carboxilasa que iniciará la ruta biosintética; y a las enzimas ácido graso sintasas que producirán precursores de 14, 16 y 18 carbonos que serán modificados posteriormente por desaturasas, ácido grasos reductasas, oxidasas y acetiltransferasas hasta formar los esterés (Roelofs & Wolfs, 1988; Jurenka & Roelofs, 1989; Vogel et al., 2010).

1.2. PERCEPCIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS VOLÁTILES, PRODUCCIÓN DE FEROMONA Y OVIPOSICIÓN: INFLUENCIA DEL ESTADO FISIOLÓGICO Y DE LA PRESENCIA DE LA PLANTA HOSPEDADORA

Los insectos están expuestos cada día a una gran cantidad de estímulos procedentes del medio que les rodea. Gran parte de esta información se recibe a través del sistema olfativo, convirtiendo la comunicación química en una de las modalidades de comunicación más importante en insectos. A través de unas estructuras especiales situadas mayoritariamente en las sensilas de las antenas, los insectos son capaces de percibir señales procedentes de individuos conespecíficos para el apareamiento, fuentes de alimentos, lugares de oviposición, y depredadores. La respuesta a este tipo de señales puede verse influida tanto por factores ambientales como por características del propio individuo, como son la experiencia previa y el estado fisiológico de éste (Gadenne et al., 2016); por ejemplo, el estado de saciedad puede afectar a la respuesta de moléculas odoríferas procedentes de la fuente de alimento (Edgecomb et al., 1994), y el estado de apareamiento puede tener un efecto sobre la percepción de la feromona en machos y olores de las plantas en hembras (Anton et al., 2007). Este último fenómeno ha sido descrito en varias especies de polillas, observándose en la mayoría de ellas una supresión reversible de la respuesta a los estímulos sexuales después del apareamiento y activación de otras, como las de búsqueda del lugar de oviposición. Por otro lado, al igual que en el caso de la percepción, en varias especies de polillas se ha puesto de manifiesto que la biosíntesis de feromonas sexuales se encuentra regulada e influida por un gran número de factores tanto extrínsecos, como la temperatura, fotoperiodo y presencia de plantas hospedadoras; como intrínsecos como la edad, apareamiento y factores endocrinos, como el PBAN y la hormona juvenil (Raina, 1993; Delisle et al., 2000; Rafaeli, 2016). Este tipo de relaciones se han dilucidado en algunas especies de polillas, pero el efecto del estado de apareamiento sobre la respuesta antenal de machos y hembras de *T. absoluta* a su propia feromona sexual y a los volátiles de su planta hospedadora no ha sido estudiado. Además, en el actual capítulo, también profundizaremos en la influencia que tiene el estado fisiológico en el contenido feromonal y enzimático de la glándula feromonal de *T. absoluta* en combinación con la presencia de planta hospedadora. Un conocimiento más profundo de la biología de esta especie es necesario para entender el efecto que tienen distintos factores, concretamente el estado de apareamiento y la presencia de la planta hospedadora, sobre el mecanismo de percepción de esta especie y su comportamiento, para tenerlos en cuenta a la hora de diseñar distintos métodos de control de esta plaga.

Por otro lado, la fase de larva en lepidópteros es relativamente inmóvil, por lo que su supervivencia dependerá de la elección de la fuente de alimento que realice la hembra adulta (Awmack & Leather, 2002). Todas las etapas que tienen lugar desde que se encuentra la planta hospedadora hasta la aceptación del lugar de oviposición (búsqueda, orientación, encuentro,

aterriaje, evaluación de la superficie y aceptación) dependen de una gran variedad de información recogida por el insecto a través de distintas estructuras, como antenas, tarsos, probóscide y ovipositor; por lo que la información procedente de la planta, como las características físico-químicas de la hoja, es fundamental (Renwick & Chew, 1994), aunque otros factores como la presencia de otros huevos, la percepción de feromonas y el aprendizaje del insecto también son decisivos a la hora de elegir el lugar de oviposición (Renwick & Chew, 1994). Como se ha mencionado anteriormente, el apareamiento en insectos induce grandes cambios fisiológicos y comportamentales que son especialmente notables en el caso de las hembras, en las que se inhiben los mecanismos relacionados con la cópula y se activan los relacionados con la oviposición. Estas estrategias se han descrito en algunas especies de dípteros, como en las hembras de *Ceratitis capitata*, las cuales tras el apareamiento muestran una mayor atracción por los volátiles de la planta hospedadora que por la feromona sexual masculina (Jang, 1995). En *Drosophila melanogaster*, las hembras que han copulado muestran cambios comportamentales como el rechazo a los machos, disminución en su receptividad antenal y un aumento de la producción de huevos y oviposición en comparación con las que permanecen vírgenes (Kubli, 2003). Estos cambios dirigidos a ovipositar también se han detectado en especies de lepidópteros como *Spodoptera littoralis*, donde las hembras son fuertemente atraídas por flores ricas en néctar cuando son vírgenes y por las plantas que servirán de alimento a la descendencia una vez que han copulado (Saveer et al., 2016). Comportamientos similares se han observado también en *Helicoverpa armigera* (Hartlieb & Rembold, 1996), *Trichoplusia ni* (Landolt, 1993) e incluso en *T. absoluta* (Proffit et al, 2011). Estos cambios han sido relacionados en algunos casos con la presencia de péptidos transferidos por los machos a través del esperma y de fluidos seminales (Kingan et al., 1995; Wolfner, 2009; Kubli 2003; Gillott, 2003, Ottiger et al., 2000; Rafaeli, 2016), disminuyendo así la competencia y asegurando la continuidad de su descendencia. Se sabe que la fertilidad y la oviposición de *T. absoluta* están influidas por varios factores, como la disponibilidad de alimento para el adulto, la estacionalidad (Imenes et al. 1990, Torres-Vila & Jennions 2005) y la temperatura (Krechemer & Foerster, 2015). Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el comportamiento reproductor de esta especie sobre distintos hospedadores pero poco se sabe de cómo los sentidos influyen en la puesta de huevos, por eso se han llevado a cabo ensayos que han permitido evaluar el peso que tienen el sentido del olfato y del tacto en esta especie sobre la oviposición.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. COMPUESTOS QUÍMICOS

Tanto para la identificación de los compuestos feromonales hallados en las glándulas de las hembras como para los ensayos en electroantenograma, se utilizaron como patrones los compuestos TDTA y TDDA (Figura 4.1) sintetizados por el Dr. Marc Puigmartí Borrell.

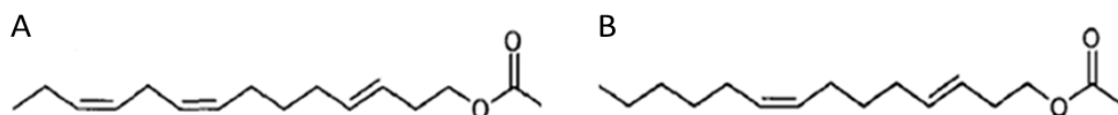


Figura 4.1. Estructura de los componentes de la feromona sexual de *T. absoluta*: acetato de 3E,8Z,11Z-tetradecatrienilo (TDTA) (A) y acetato de 3E,8Z-tetradecadienilo (TDDA) (B).

Por otra parte, los compuestos encontrados en los volátiles de hojas de tomate (β -felandreno, β -cariofileno, (S)-limoneno, 2-careno; Figura 4.2) fueron suministrados por el Dr. Antonio Ortiz Baeza de la Universidad de Jaén, a excepción del (S)-limoneno, el cual fue adquirido en Sigma-Aldrich (EEUU), con una pureza del 96%.

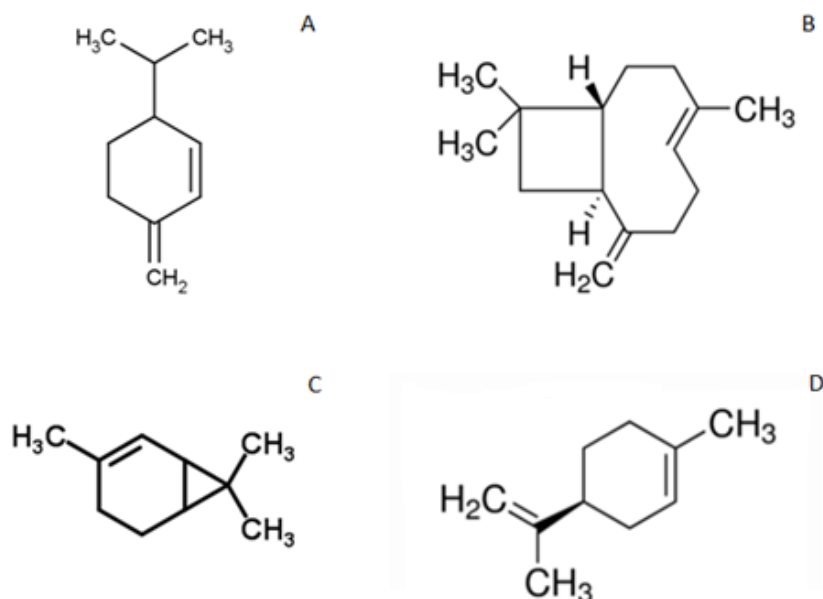


Figura 4.2. Estructura de los principales compuestos volátiles presentes en las hojas de tomate: β -felandreno (A), β -cariofileno (B), 2-careno (C) y (S)-limoneno (D).

Los componentes de los tampones utilizados para la extracción de proteínas a partir de muestras biológicas (urea, TEAB, DTT, IAA y TFA) fueron adquiridos también comercialmente a Sigma-Aldrich, a excepción del SDS que fue adquirido en PRS Panreac (España). La cuantificación de las proteínas fue llevada a cabo utilizando el kit Bradford Protein Assay de Bio-Rad (España), y la tripsina utilizada en la digestión fue adquirida en Promega (EEUU).

2.2. INSECTOS

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

2.3. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Tanto el EAG utilizado como la preparación de las antenas están descritos en el apartado 2.1 del capítulo 3. Brevemente, se hizo pasar un flujo de aire continuo y humidificado (700 ml/min) sobre la antena para evitar su desecación a través del brazo principal de un tubo de vidrio (7 cm de largo x 5 mm de diámetro). Los compuestos sometidos a estudio se aplicaron sobre la antena mediante insufladas de aire (160 ml/min) durante 100 ms a través de una pipeta Pasteur que contenía un pequeño papel de filtro (2 x 1 cm) con cada uno de los compuestos disueltos en hexano en las concentraciones que se querían probar. Se utilizó un total de 10 antenas para elaborar una curva dosis-respuesta de cada uno de los compuestos en estudio. Las antenas se estimularon dos veces con cada una de las distintas dosis de cada componente en orden ascendente en intervalos de 60 s. Previamente a la excitación de la antena a cada dosis de feromona, se estimuló la misma con hexano (blanco) y a la media de las dos respuestas del agente estimulante se restó la media de la respuesta al blanco.

Para llevar a cabo los análisis estadísticos, se utilizó el software IBM SPSS Statistic, versión 23. Las respuestas (mV) obtenidas para cada uno de los tratamientos fueron analizadas usando un análisis de la varianza (ANOVA) para hallar diferencias entre cada una de las dosis utilizadas, cuando estas diferencias fueron significativas las medias fueron comparadas usando el test de Tukey ($P < 0,05$). Para comparar el efecto del estado fisiológico sobre la respuesta a una misma dosis, se llevó a cabo un test de t de Student ($P < 0,05$). Anterior al análisis, los datos fueron comprobados para verificar que seguían una distribución normal, y en caso de ser necesario, los datos fueron transformados en $\ln(x + 0,1)$.

2.3.1. RESPUESTA DE MACHOS Y HEMBRAS A LOS COMPUESTOS FEROMONALES

Se evaluó la respuesta electrofisiológica de hembras y machos, tanto vírgenes como copulados de 1-4 días de edad, a los dos componentes de la feromona sexual de esta especie de manera aislada, y a la mezcla binaria de ambos en proporción 9:1. Las dosis utilizadas estaban comprendidas entre 1 ng y 100 µg. En el caso de los machos, se llevó a cabo un estudio adicional en el que se evaluó la respuesta de la antena a lo largo del tiempo a una determinada dosis del compuesto feromonal mayoritario (1 µg). Los insectos utilizados tenían un día de edad, los machos vírgenes habían sido aislados en la fase de pupa y no habían percibido nunca la feromona sexual femenina. Por su parte, los machos copulados emergieron ya en presencia de hembras, y se les mantuvo en contacto con las hembras durante un día. Las mediciones se realizaron a los minutos 0, 9, 13, 19, 24 y 33 desde el comienzo del experimento, y la secuencia de insufladas en cada uno de los tiempos fue hexano-1 µg TDTA (x2)-hexano. Para el estudio

estadístico, se comprobó previamente la normalidad de los datos y la ausencia de posibles valores atípicos, y se siguió el mismo procedimiento que el descrito por López et al. (2017). En este experimento, en el que cada insecto tenía un perfil de 6 medidas secuenciales y correlacionadas en el tiempo, se ajustó un modelo multinivel (modelo de regresión lineal con constante aleatoria, LRIRM) usando el método de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) de la varianza para tener en cuenta la variabilidad dentro de cada insecto y entre insectos. El tiempo, la dosis y la interacción de primer orden fueron las covariables del modelo en cada grupo (es decir, en cada insecto) o nivel-2. Para cada LRIRM, también se realizaron el diagnóstico de los residuos, la bondad del ajuste del modelo y la estimación de la desviación estándar a nivel del insecto (nivel-2, $\sqrt{\sigma_u^2}$) y los niveles de observación (nivel-1, $\sqrt{\sigma_e^2}$), el coeficiente de correlación interclase condicional (ρ) y el coeficiente de determinación (R^2). La diferencia media del incremento de la respuesta derivado de los valores predichos y sus intervalos de confianza al 95% también se calcularon. Estos análisis fueron realizados utilizando el software estadístico Stata 12.0 (StataCorp 2011) usando para los contrastes bilaterales un nivel de significación estadística de $\alpha = 0.05$.

2.3.2. RESPUESTA DE HEMBRAS A VOLÁTILES DE HOJAS DE TOMATE

Se estudió la respuesta en EAG de antenas de hembras vírgenes y copuladas de 1-4 días de edad a distintas cantidades (100 ng a 10 mg) de los cuatro volátiles que se encuentran en mayor proporción en las hojas de tomate (β -felandreno, β -cariofileno, (S)-limoneno, 2-careno) de manera individual y la mezcla de todos ellos en la proporción en la que se encuentran en la naturaleza (78:14:2:6) (Pellitero et al., 2011).

2.4. COMPOSICIÓN FEROMONAL

Para el análisis de la composición feromonal, hembras recién emergidas fueron sometidas a diferentes condiciones fisiológicas y ambientales. Cuando las hembras (vírgenes y copuladas) alcanzaron dos días de edad, se prepararon extractos de sus glándulas para identificar y cuantificar cada uno de los componentes feromonales en ausencia y presencia de planta. Las hembras mantenidas en la planta fueron a su vez sometidas a distintos tratamientos: insectos mantenidos en presencia de plantas pero sin contacto directo con ella (solo olfacción), insectos en contacto con la planta pero a los cuales se les había cortado previamente las antenas (solo contacto), e insectos que permanecieron en contacto con la planta y conservaban las antenas (contacto y olfacción). Las glándulas fueron extraídas durante la primera hora de la fotofase. Tras anestesiarse durante 10 s a las hembras con CO_2 , se presionó suavemente el abdomen hasta que la glándula feromonal quedó expuesta, momento en el que se extrajo tirando suavemente de ella con unas pinzas. Posteriormente se colocaron dos glándulas en un vial cónico sumergidas en 100 μl de hexano durante 60 min a temperatura ambiente. Para facilitar la cuantificación se añadió acetato de dodecilo (12:Ac) como estándar interno (10 ng/extracto). Se realizaron 10 réplicas de cada uno de los tratamientos y se almacenaron a -80°C hasta que fueron analizados. Antes de ser analizadas, las muestras fueron concentradas con nitrógeno hasta un volumen final de 1-2 μl .

Para identificar los compuestos feromonales se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y se utilizaron como patrones los compuestos TDTA y TDDA sintéticos y sus espectros de masas se compararon con los encontrados en los extractos. El programa de temperatura utilizado fue inyección a 60°C (1 min), rampa de 5°C/min hasta 240°C y 10°C/min hasta 280°C (10 min), con splitless de 0,8 min.

Para la cuantificación de cada uno de los componentes, se utilizó la ecuación obtenida de elaborar una recta de calibración con distintas cantidades de TDTA. A cada una de las diluciones preparadas (5, 10, 20 y 40 ng/μl) se le agregó 12:Ac como patrón interno en la misma concentración en la que se había añadido a los extractos (10 ng/μl). El volumen de inyección de cada una de las diluciones de TDTA fue de 1 μl y para cada concentración se realizaron cuatro réplicas. Con los datos de concentración del TDTA (T) junto con el estándar interno (Ei) y los datos de la integración del área correspondiente al TDTA (A_T) y al estándar interno (A_{Ei}), se obtuvo una recta de calibración entre la relación T/Ei y A_T/A_{Ei} del tipo Y = AX + B, donde "Y" representa la relación entre las áreas A_T/A_{Ei}, y "X" es la relación entre las concentraciones T/Ei, la pendiente de la recta A es igual a 0,6788 y el punto de intercepción B adquiere el valor 0,0369.

$$\text{Cantidad de feromona (ng)} = [(A_T/A_{Ei}) + 0,0369] / 0,6788 * 10$$

Tanto la recta de calibración como los extractos se inyectaron en un cromatógrafo de gases Trace 2000 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de sílice HP-5 de 25 m × 0.2 mm i.d. × 0.25 μm (Agilent Technologies, España). El programa utilizado fue el mismo que el empleado en el GC-MS, pero los tiempos de retención variaron ligeramente. Para el estudio estadístico, todos los datos fueron transformados previamente en ln (x+0.1), posteriormente se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y el test de Tukey (P<0,05) para la comparación de medias para TDDA, mientras que para el TDTA se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes al no cumplir las condiciones necesarias para aplicar la ANOVA, seguido de un test Z Kolmogorov-Smirnov para las comparaciones por pares (P<0,05).

2.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS GLANDULARES

La metodología empleada aparece detallada en el apartado 5.5 del capítulo 3.

2.5.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para el estudio sobre la expresión diferencial de proteínas presentes en la glándula feromonal de hembras que habían emergido en presencia y ausencia de la planta hospedadora, se extrajeron glándulas de hembras vírgenes y copuladas siguiendo la metodología detallada en el apartado 2.4, y se prepararon tres lotes de 20 glándulas en viales Eppendorf (Alemania), con los que se preparó un homogeneizado para extraer las proteínas que contenían añadiendo 500 μl de tampón de lisis y 250 μl de bolas de óxido de zirconio de 0,5 mm de diámetro. La lisis del material biológico se llevó a cabo en un Bullet Blender (WisBiomed, EEUU). La muestra lisada se centrifugó en una microcentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Alemania) y se retiró el

sobrenadante cuidadosamente. El procedimiento detallado aparece en el apartado 5.2 del capítulo 3.

Para la cuantificación se empleó el kit RC-DC protein assay (Bio-Rad). La cantidad de proteína total en el extracto se cuantificó por triplicado mediante la elaboración de tres rectas patrón de ocho puntos utilizando BSA a una concentración de 4 mg/ml como proteína estándar, y por interpolación de los valores en dicha recta, como se detalla en el apartado 5.3 del capítulo 3. La medición de la absorbancia se realizó en un lector de placas Spectra Maxplus 360 (Molecular Devices, EEUU) a una longitud de onda de 650nm. La recta obtenida que se utilizó para calcular la concentración proteica en cada extracto fue:

$$Y = 0,1364 X + 0,0651; R^2=0,9942$$

donde “Y” es la absorbancia medida, y “X” es la concentración de proteínas expresada en mg/ml.

2.5.2. DIGESTIÓN FASP

El procedimiento aparece ampliamente detallado en el apartado 5.5.1 del capítulo 3. En resumen, alícuotas de un volumen de material lisado en tampón equivalente a 100 µg de proteína de cada extracto de glándulas de *T. absoluta*, fueron solubilizados en tampón UA hasta obtener una concentración de SDS por debajo de 0,1%; a continuación fueron cargados en cada uno de los filtros Amicron Ultra-0.5 ml (Millipore, EEUU) que anteriormente habían sido pasivados y centrifugados a 14000 rcf a 13°C durante 15 min. Una vez filtrada la mezcla de proteínas se lavó tres veces añadiendo 200 µl de tampón UA al filtro y centrifugando a 14.000 rcf durante 10 min a 13°C. Después, las proteínas se alquilaron con 100 µl de tampón de alquilación en oscuridad durante 30 min a 25°C. Tras ello, el extracto de proteína se lavó tres veces con 100 µl de UA y tres veces con 100 µl de TEAB 200 mM. La digestión con tripsina se realizó a 37°C durante 18-20 h usando una relación enzima:proteína de 5:100. Los péptidos tripticos se eluyeron mediante la adición de 3 x 100 µl de 200mM de TEAB 200 mM seguida de una centrifugación a 14.000 rcf durante 15 min a 13°C.

2.5.3. ANÁLISIS POR LC-MS/MS Y BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS

El análisis de péptidos tripticos obtenidos tras la digestión FASP fue realizado por la Dras. Monserrat Carrascal y la Dra. Vanessa Casas (CSIC-UAB). Un microgramo de mezcla de péptidos tripticos de cada una de las muestras, obtenidos tras la digestión FASP, fue analizado por LC-MS/MS usando un cromatógrafo HPLC con una bomba capilar nano Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL equipado con una fuente de ionización nanoelectrospray. Las muestras fueron inyectadas una sola vez siguiendo la metodología indicada en el capítulo 3, apartado 5.5.2 y el artículo de Casanova et al. (2017). Brevemente, un microgramo de péptidos fue resuspendido en 20 µl de 1% ácido fórmico (v/v) y 5% metanol (v/v), fue inyectado en el HPLC-MS y los péptidos se separaron mediante un cartucho de preconcentración C18 (Agilent Technologies, EEUU) conectado a una columna C18 de 15 cm X 100 µm i.d. (Nikkkyo Technos Co., Japón). La fase móvil consistió en acetonitrilo (A) y agua con 0,1% ácido fórmico (B) usando un programa de gradiente lineal de 3% de (A), a 40% de B en

360 min y con un flujo de 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$. La fuente de ionización se hizo funcionar en modo positivo con un voltaje de pulverización de 1.8 kV y el análisis de espectrometría se realizó en modo dependiente de los datos, adquiriendo el escaneo completo (*full scan*) en primer lugar, seguido por MS/MS en la trampa lineal de las 10 señales más intensas detectadas en la lista global del *full scan*. Para la adquisición en *full scan* el rango de masa utilizado fue de 400-1800 con una resolución de 60.000.

Los datos obtenidos fueron analizados con el software Proteome Discoverer 1.4.0.288. El espectro de fragmentación fue buscado con el motor de búsqueda SEQUEST frente a la base de datos *Lepidoptera* usando los siguientes parámetros: tripsina con un máximo de 3 puntos de hidrólisis de cisteína ausentes, tolerancia de masa de fragmentación de 0.6 Da, carbamidometilación de cisteína y oxidación de metionina como posible modificación. Las muestras fueron filtradas al 0,1% FDR para descartar falsos positivos, y se consideraron válidas las proteínas identificadas con más de un péptido único y con un número mínimo de 3 PSMs. La abundancia relativa de cada una de las proteínas entre los distintos tipos glandulares fue estimada mediante el cociente del número de péptidos que identificaban una proteína concreta de uno de los tipos glandulares entre los péptidos hallados en otro tipo. Las comparaciones realizadas fueron hembras copuladas con vírgenes sin planta y también con planta. Se consideraron proteínas glandulares sobreexpresadas aquellas cuyo resultado fue superior o igual a 3 (Zhou et al., 2002).

2.6. ENSAYOS DE OVIPOSICIÓN

Para determinar la influencia de los volátiles de planta sobre el comportamiento ovipositor, se empleó un ensayo de elección simple (no-choice). Durante la primera hora de la fotofase, en el interior de un cilindro de metacrilato (30 x 20 cm) se liberaron diez parejas de adultos de *T. absoluta* recién emergidos a los que se les proporcionó una solución acuosa azucarada para mantenerlos hidratados durante el tiempo que duraban los ensayos. En el interior se colocaron varios tratamientos que consistían en distintos tipos de fuentes de olor y sustrato donde las hembras podían depositar su puesta. Un total de 50 parejas se probaron para cada uno de los tratamientos, usándose insectos distintos en cada réplica. Los distintos tratamientos a los que fueron sometidos fueron los siguientes: planta de tomate (*S. lycopersicum*), planta de geranio (*Geranium sp.*) y cilindros que no contenían ninguna planta pero a los que se les había colocado un papel Whatman con 1 y 10 mg de mezcla sintética de los principales volátiles presentes en las hojas de tomate (Pellitero et al., 2011), o de 30 μl de extracto natural de hoja de tomate. Dicho extracto se preparó con 7 g de hojas de plantas de tomate troceadas y sumergidas en 7 ml de hexano durante una hora a temperatura ambiente. En los dos últimos tratamientos, se proporcionó a los insectos un fragmento de crespón de color verde (15 x 15 cm) arrugado como sustrato para la oviposición. Los ensayos se prolongaron 72 h, y se revisaron a primera hora de la fotofase. Se contabilizó el número de parejas que se encontraban copulando en ese momento y el número de huevos depositados. Estos ensayos se realizaron en condiciones estándar de temperatura y humedad, y un fotoperiodo natural de 16:8 horas. Para el tratamiento estadístico del número de cópulas y huevos contados cada día se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey para las comparaciones por pares ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1. RESPUESTA ELECTROANTENOGRÁFICA

3.1.1. RESPUESTA A LOS COMPUESTOS FEROMONALES

3.1.1.1. RESPUESTA EN MACHOS DE *T. absoluta*

Las antenas de machos mostraron una alta sensibilidad y una relación dosis-dependiente para ambos componentes feromonales, con una respuesta a la dosis mayor de $5,5 \pm 1,8$ mV para el TDTA, $5,2 \pm 1,9$ mV para el TDDA y $5,8 \pm 1,6$ mV para la mezcla binaria en machos vírgenes, y ligeramente superior en machos copulados, alcanzando valores medios de $5,7 \pm 2,4$ mV para el componente mayoritario, $5,5 \pm 1,8$ mV para el minoritario y $6,4 \pm 2,2$ mV para la mezcla. Aunque entre las distintas dosis sí se registraron diferencias significativas en todos los compuestos (ANOVA de 1 vía, post-hoc: Test de Tukey, $P < 0,05$), el estado fisiológico no tenía efecto sobre la respuesta antenal, no llegándose a detectar en ningún momento diferencias significativas entre los subgrupos de machos a una misma dosis (t de Student, $p < 0,05$) (Figura 4.3).

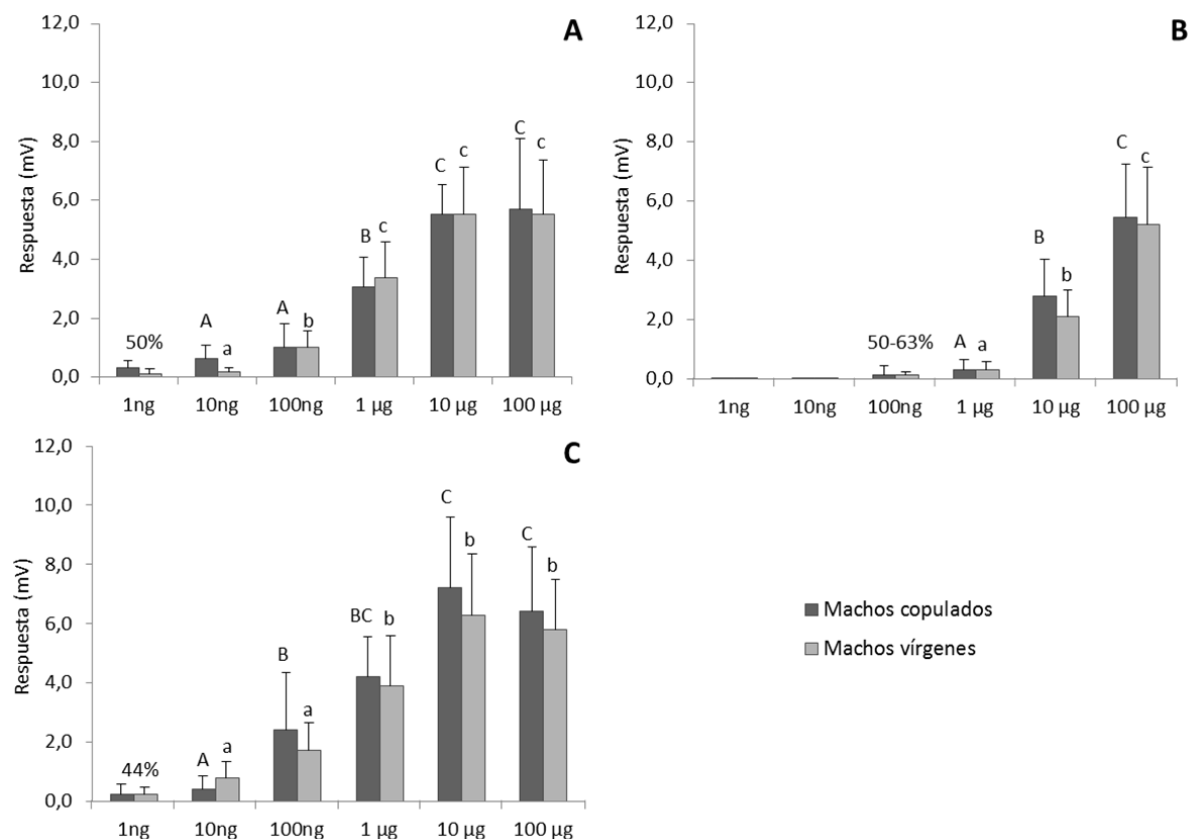


Figura 4.3. Respuesta en EAG (media \pm DE) de 8-9 antenas de machos de *T. absoluta* frente a los compuestos feromonales sintéticos, TDTA (A) y TDDA (B), y a la mezcla binaria de ambos (C). Los números sobre las barras indican el porcentaje de antenas que respondió a esa dosis y no se consideraron para los estudios estadísticos. En caso de ausencia, el porcentaje de las antenas que respondió fue del 100%. Letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre dosis (ANOVA, test de Tukey, $P < 0,05$).

Cuando se evaluó la respuesta a una misma dosis de feromona a lo largo del tiempo, se observó un incremento sucesivo de la respuesta a los diferentes tiempos de medición tanto en machos vírgenes como copulados existiendo diferencias significativas entre ellos (Tabla 4.1). La respuesta a 1 μg de TDTA a T=0 fue de $2,02 \pm 1,1$ mV para los machos vírgenes y de $2,5 \pm 0,8$ mV para los copulados (N=10 y 11, respectivamente), incrementándose con el tiempo hasta alcanzar valores de $3,4 \pm 1,3$ mV y $6,6 \pm 2,4$ mV, respectivamente, y observándose diferencias significativas entre ambos estados fisiológicos en el incremento de la respuesta respecto del valor inicial a los 24 y 33 min después del primer estímulo (LRIRM, $P < 0.05$) (Figura 4.4, Tabla 4.2).

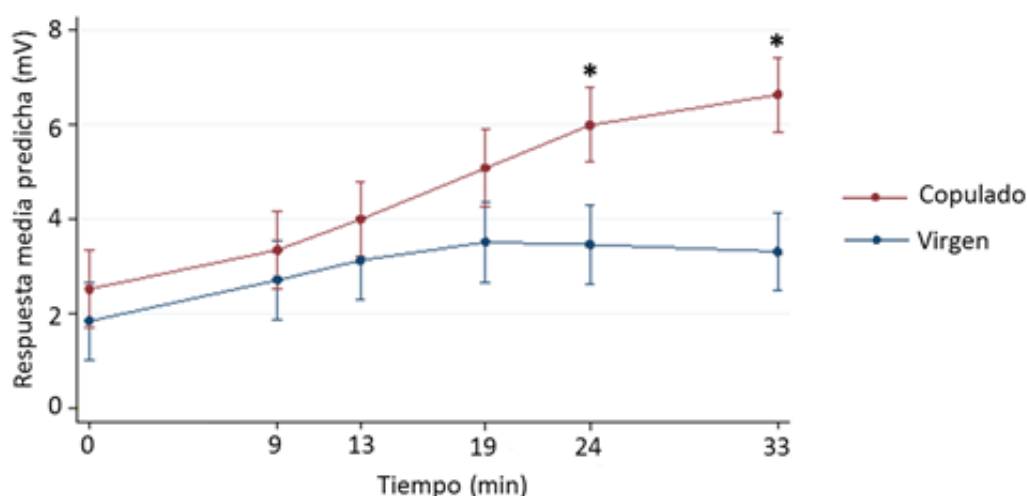


Figura 4.4. Respuesta media predicha en EAG ($\text{mV} \pm 95\%$ IC) de 10-11 antenas de machos vírgenes y copulados de *T. absoluta* estimuladas con 1 μg de TDTA a 9, 13, 19, 24 y 33 min después del primer estímulo (T=0 min). Asteriscos sobre los pares de puntos en el mismo tiempo indican la existencia de diferencias significativas entre los distintos estados fisiológicos ($P < 0.05$).

Tabla 4.1. Incremento de la respuesta media predicha a 1 μg de TDTA en antenas de machos vírgenes y copulados a diferentes tiempos respecto a T=0 min. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en los distintos tiempos de medición respecto T=0 ($P < 0.05$).

Estado	Tiempo (min)	Incremento de la respuesta media predicha respecto al valor basal T_0 (mV)	95% IC
COPULADO	9	0,83	(-0,02 ; 1,67)
	13	1,47*	(0,65 ; 2,29)
	19	2,55*	(1,72 ; 3,39)
	24	3,46*	(2,64 ; 4,28)
	33	4,10*	(3,29 ; 4,92)
VIRGEN	9	0,86 *	(0,03 ; 1,70)
	13	1,28*	(0,45 ; 2,12)
	19	1,66*	(0,80 ; 2,53)
	24	1,61*	(0,78 ; 2,45)
	33	1,47*	(0,63 ; 2,30)

Tabla 4.2. Diferencia de respuesta media predicha a 1 µg de TDTA entre antenas de machos copulados y vírgenes a diferentes tiempos respecto a T=0 min. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los dos estados fisiológicos (P<0.05).

Tiempo (min)	Respuesta media predicha en machos copulados	Respuesta media predicha en machos vírgenes	Diferencia	95% IC
9 vs 0	0,83	0,86	-0,037	(-1,22 ; 1,15)
13 vs 0	1,47	1,28	0,19	(-0,98 ; 1,36)
19 vs 0	2,55	1,66	0,89	(-0,31 ; 2,09)
24 vs 0	3,46	1,61	1,85*	(0,68 ; 3,019)
33 vs 0	4,10	1,47	2,63*	(1,47 ; 3,81)

3.1.1.2. RESPUESTA EN HEMBRAS DE *T. absoluta*

Las hembras mostraron capacidad para responder a su propia feromona, aunque en una magnitud muy inferior a la de los machos de la misma especie. Al igual que en los machos, se aprecia un efecto dosis dependiente, aumentando la respuesta a medida que aumenta la dosis. No se observaron diferencias significativas entre la respuesta de hembras vírgenes y copuladas a cada uno de los componentes por separado (TDTA y TDDA), necesitando para ambos una dosis mínima de 10 µg para desencadenar respuesta en la totalidad de las antenas. En el caso de la mezcla binaria, las hembras que se habían apareado previamente mostraron una mayor sensibilidad siendo capaces de responder el 75% de las antenas a 100 ng, mientras que las hembras vírgenes necesitaban una dosis mínima de 1 µg. Sin embargo, fueron las hembras vírgenes las que mostraron una respuesta significativamente mayor a la dosis de 100 µg (F=1,287, P=0,007) (Figura 4.5).

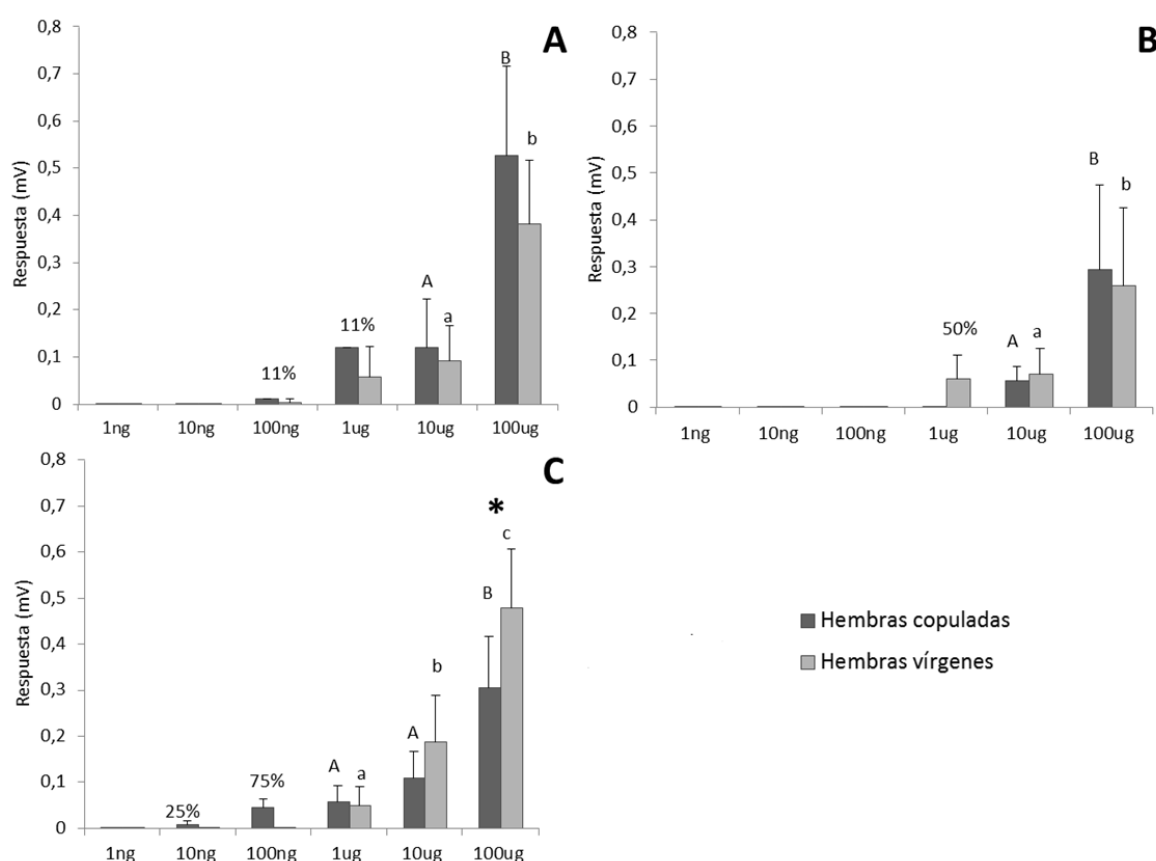


Figura 4.5. Respuesta en EAG (media \pm DE) de 8-9 antenas de hembras de *T. absoluta* frente a los compuestos feromonales sintéticos, TDTA (A) y TDDA (B), y a la mezcla binaria (C). La presencia de un número sobre las barras representa el porcentaje de antenas que respondió a cada una de las dosis, y no se tuvieron en cuenta en el estudio estadístico. En el caso de no indicarse, este porcentaje fue igual al 100%. Letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre dosis (ANOVA, test de Tukey, $P < 0,05$), y asteriscos sobre los pares de columnas indican que hay diferencias significativas entre los estados fisiológicos (t de Student, $p < 0,05$).

3.1.2. RESPUESTA DE HEMBRAS A VOLÁTILES DE HOJAS DE TOMATE

Los cuatro componentes mayoritarios detectados en las hojas de tomate y la mezcla de todos ellos en la proporción en la que se encuentra en la naturaleza mostraron una actividad electrofisiológica dosis-dependiente en antenas de hembras. Para todos los compuestos, el umbral de respuesta se da a los 100 μ g, dosis con la que se obtuvo respuesta en todas las antenas. No se observan diferencias significativas entre las respuestas de las hembras vírgenes y copuladas, a excepción de la dosis más alta del (S)-limoneno, en la que la respuesta de las hembras vírgenes fue significativamente mayor que en las copuladas ($F=0,142$, $P=0,009$) (Figura 4.6).

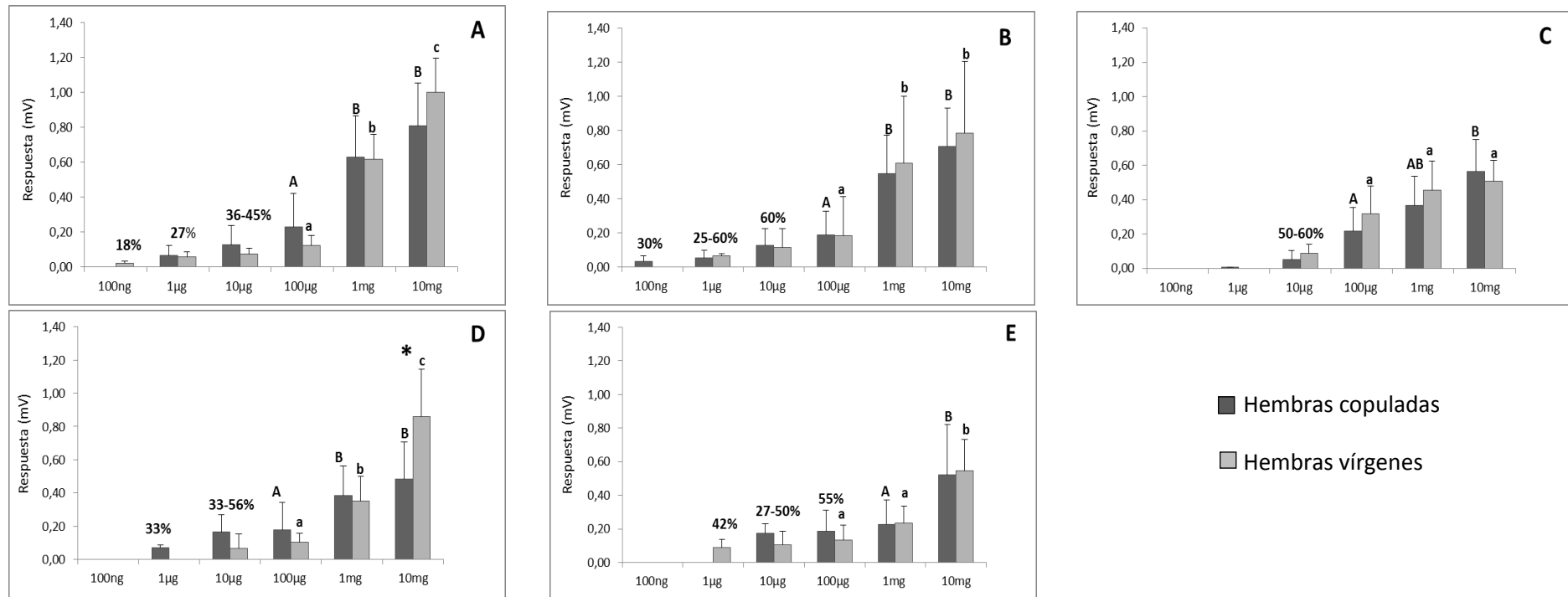


Figura 4.6. Respuesta en EAG (media \pm EE) de 8-9 antenas de hembras copuladas (gris oscuro) y vírgenes (gris claro) de *T. absoluta* a la mezcla de los compuestos volátiles de hojas de tomate (A) y a cada uno de ellos por separado [felandreno (B), cariofileno (C), limoneno (D) y 2-careno (E)]. Los números sobre las barras representan el porcentaje de antenas que respondió a cada una de las dosis, en el caso de estar ausentes este porcentaje es igual a 100%. Letras iguales sobre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre dosis (ANOVA, test de Tukey, $P < 0,05$), y asteriscos sobre los pares de columnas indican la existencia de diferencias significativas entre ambos estados fisiológicos (t de Student, $P < 0,05$).

3.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FEROMONALES

Se comprobó la composición cualitativa de la feromona sexual de hembras de la colonia mantenida en el insectario mediante GC-MS por comparación con los tiempos de retención y espectros de masas con los componentes feromonales sintéticos (Figura 4.7). Con el programa de temperatura empleado, los tiempos de retención fueron 26,35 min para el TDTA y 26,19 min para el TDDA.

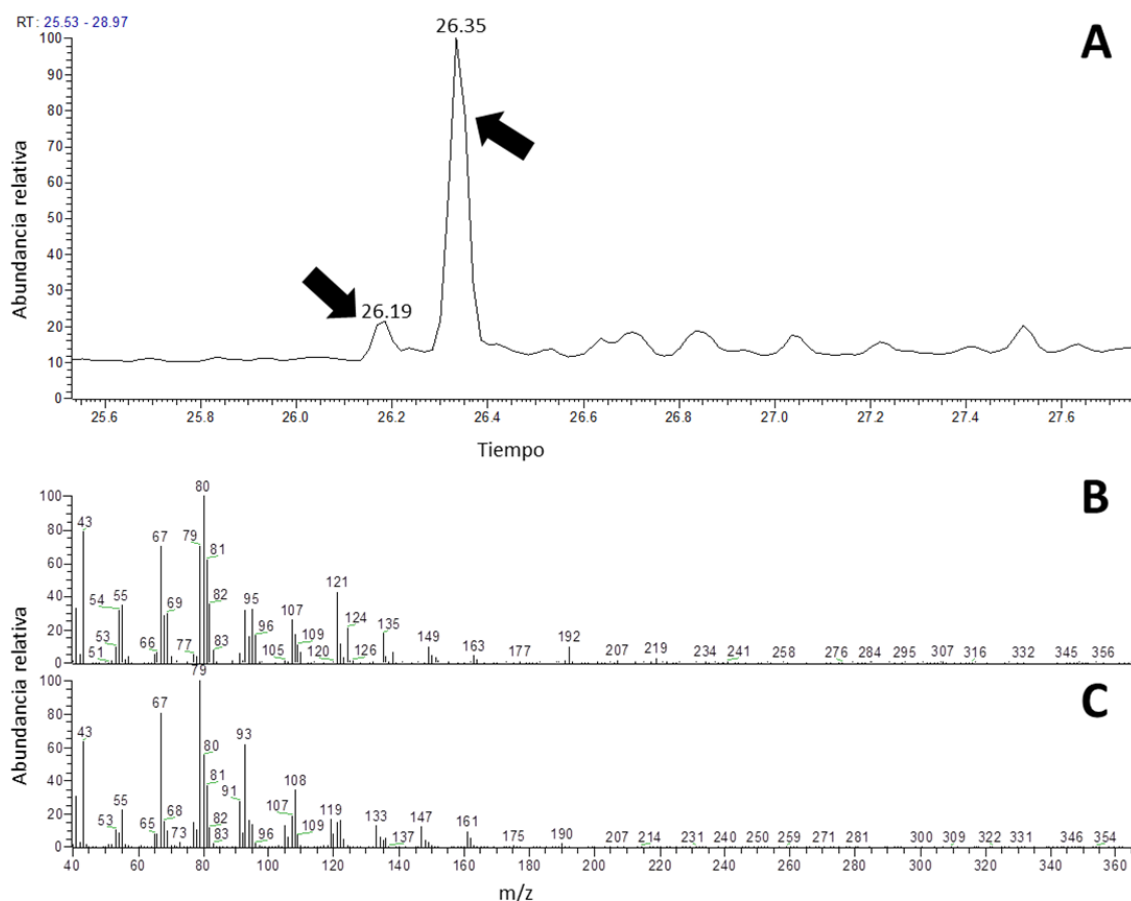


Figura 4.7. Cromatograma de un extracto de glándulas feromonales de hembras de *T. absoluta* en el que se muestran los tiempos de retención del TDDA (26,19 min) y TDTA (26,35 min) (A). Espectro de masas correspondientes al TDDA (B) y TDTA (C) del cromatograma anterior.

3.3. COMPOSICIÓN FEROMONAL

Se compararon extractos glandulares de hembras vírgenes y copuladas de dos días de edad sometidas a distintos tratamientos, hallándose diferencias significativas entre algunos de ellos tanto para el componente minoritario ($F=6,516$; $P<0,001$) como para el mayoritario ($X^2=46,437$; $P<0,001$) (Tabla 4.3).

En las hembras copuladas, la cantidad de TDTA presente fue similar entre insectos que no mantuvieron contacto con la planta ($12,5 \pm 1$ ng/glándula) y entre los que el contacto fue parcial a través del tacto o del olfato, presentando unos valores medios de $11,4 \pm 0,8$ y $12,7 \pm 1,9$ ng por glándula y aumentando hasta los $17,1 \pm 1,7$ ng/glándula cuando el contacto con la

planta fue total. La cantidad de TDDA presente en la glándula de hembras copuladas en las condiciones estudiadas es alrededor de 1 ng por glándula y permanece sin diferencias apreciables en todos los casos (Tabla 4.3).

Por otro lado, las hembras que no habían tenido contacto previo con machos mostraron una mayor variabilidad en el contenido de ambos componentes. Los niveles de feromona se mantuvieron en valores mínimos en ausencia de plantas de tomate ($5,5 \pm 0,5$ ng de TDTA por glándula y $0,6 \pm 0,12$ de TDDA) y valores similares a los de hembras copuladas cuando captan de alguna manera (olfacción o contacto) la presencia del hospedador. Sin embargo, en presencia de planta y con olfacción y contacto las hembras vírgenes producen valores máximos de feromonas ($26,3 \pm 1,8$ y $2,58 \pm 0,51$ ng/glándula) (Tabla 4.3). En todos los casos, la proporción TDTA:TDDA se mantiene constante, con proporciones próximas al 90:10 características de esta especie.

Tabla 4.3. Cantidad media (ng \pm DE) de compuesto mayoritario (TDTA) y minoritario (TDDA) encontrada en extractos de glándulas feromonales de *T. absoluta*. Los valores seguidos por diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($P < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov para TDTA y test de Tukey para el TDDA).

		VÍRGENES ng/glándula		FECUNDADAS ng/glándula	
		TDTA	TDDA	TDTA	TDDA
SIN PLANTA		$5,5 \pm 0,5$ a	$0,6 \pm 0,1$ A	$12,5 \pm 1$ b	$0,9 \pm 0,1$ AB
CON PLANTA	SOLO OLFACCIÓN	$12,9 \pm 1,1$ bc	$1,04 \pm 0,1$ AB	$12,7 \pm 1,9$ bc	$1,1 \pm 0,1$ AB
	SOLO CONTACTO	$12,6 \pm 1,5$ bc	$1,03 \pm 0,2$ AB	$11,4 \pm 0,8$ b	$0,9 \pm 0,1$ AB
	OLFACCION/CONTACTO	$26,3 \pm 1,8$ d	$2,6 \pm 0,5$ C	$17,1 \pm 1,7$ c	$1,2 \pm 0,1$ B

3.4. PROTEÍNAS GLANDULARES

3.4.1. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS GLANDULARES

La cantidad promedio de proteína/antena (expresado como media \pm DE) obtenida fue de $13,3 \pm 1,6$ y $14,3 \pm 1,2$ μ g para hembras copuladas de *T. absoluta* en ausencia y presencia de planta, respectivamente, y de $12,3 \pm 1,9$ μ g para las hembras vírgenes que no habían tenido contacto previo con la planta hospedadora de *T. absoluta* y $14,1 \pm 1,5$ μ g para aquellas que sí lo habían tenido.

En los distintos tipos de muestras se han identificado casi 10000 péptidos a partir de los cuales se han caracterizado 1383 proteínas (Figura 4.8). De éstas, 140 eran proteínas estructurales, 596 proteínas de tipo enzimático, 322 proteínas con diferentes funciones (reguladoras, transportadoras,...) y 326 proteínas cuyas funciones no aparecen determinadas en las bases de datos o aún no han sido caracterizadas. Dentro de las proteínas enzimáticas, las más abundantes son las del tipo sintetasa (181), seguidas por las deshidrogenasas (111) y liasas (82) (Figura 4.8).

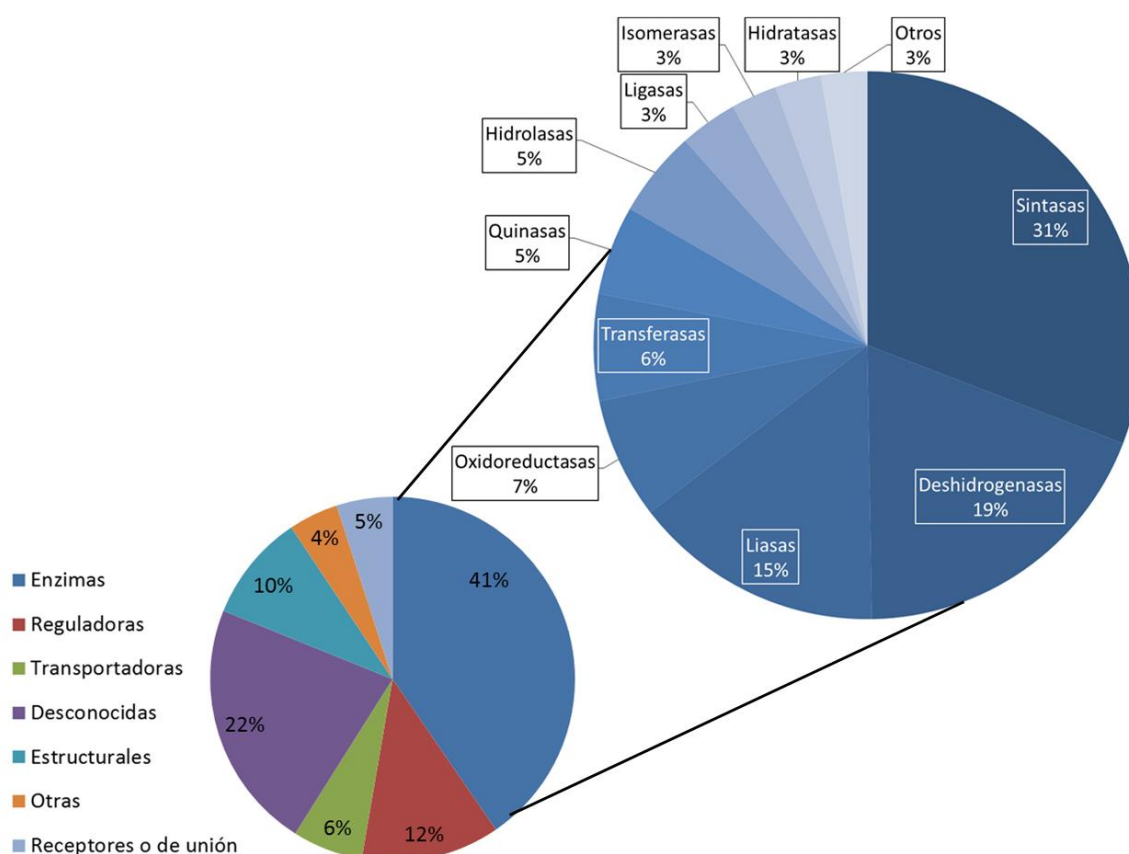


Figura 4.8. Distribución de las proteínas identificadas por análisis proteico de glándulas feromonales de *T. absoluta* e identificadas por MS.

3.4.2. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS FEROMONALES

Del total de proteínas identificadas en las glándulas, se han encontrado unas 100 proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico, y por lo tanto, posiblemente con la biosíntesis de componentes feromonales (Tabla 4.4; Anexo, Tabla 3). En todas ellas, no se han encontrado proteínas específicas de cada estado fisiológico. Sin expresarse de forma diferencial, se han encontrado diversos tipos de acetil-CoA carboxilasas, acetoacetyl-CoA tiolasas, acil-CoA deshidrogenasas, ácido graso sintetasas, enolasas y triosafosfato isomerasas, algunos de los cuales son específicos de ciertos tipos de glándulas, por ejemplo, en el caso de la acetoacetyl tiolasa S4PX78, que únicamente aparece en glándulas de hembras vírgenes, o la A5A797 que está presente solo en glándulas de hembras fecundadas.

Tabla 4.4. Proteínas presentes en glándulas feromonales de *T. absoluta* relacionadas con el metabolismo de lípidos e identificadas por MS.

Proceso en el que está implicada	Proteína	Nº de proteínas
Catabolismo de lípidos	Lisofosfolipasa	1
	Lipasa 3	1
Glucolisis (obtención del piruvato, precursor del acetil-CoA)	Enolasa	10
	Fructosa-1,6-bisfosfatasa	1
	Fructosa-bisfosfato aldolasa	1
	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa	7
	Triosafofosfato isomerasa	7
	Fosfoglicerato mutasa	1
	Fosfoglicerato quinasa	1
Peroxidación de lípidos	Aldo-ceto reductasa	4
	Glutación S-transferasa	6
Síntesis de ácidos grasos	3-Oxoacil-[proteína transportadora de acilo] reductasa	1
	Acetil-CoA carboxilasa	8
	Acetiltransferasa	2
	Ácido graso de cadena larga-CoA ligasa	1
	Ácido graso sintasa	6
	Alcohol graso acetiltransferasa	1
	Dihidrolipoil dehidrogenasa	2
	Proteína transportadora de acilo	1
Síntesis de esteroides	Acetil-CoA acetiltransferasa, mitocondrial	1
	Acetoacetil-CoA tiolasa	3
	Hidroxiesteroide dehidrogenasa	2
β oxidación de ácidos grasos	3-Hidroxiacil-CoA dehidrogenasa	1
	Acil-Coa dehidrogenasa	8
	Acil-Coa oxidasa	1
	Acil-CoA sintasa	1
	Carnitina-acetil-CoA transferasa	1
	Dehidrogenasa/reductasa de cadena corta	1
	Enoil-CoA hidratasa	2
	Enzima multifuncional peroxisomal tipo 2	2
	Hidroxiacil-CoA dehidrogenasa	1
	Tiolasa	1
Transporte de lípidos	Proteína transportadora de esteroides	3
ω-oxidación de ácidos grasos	Aldehido dehidrogenasa	8

3.4.3. PROTEÍNAS DIFERENCIALES

Al comparar las glándulas de hembras vírgenes y copuladas que han emergido en presencia de planta, observamos hay un total de 64 proteínas diferenciales, 35 de las cuales son más abundantes en el caso de las hembras copuladas, ninguna de las cuales relacionada con el metabolismo de ácidos grasos, mientras que 29 están sobreexpresadas en las hembras vírgenes, y de las que 2 enzimas están posiblemente implicadas en el metabolismo feromonal (Anexo, Tabla 1). Cuando las hembras no contactaron en ningún momento con la planta hospedadora, el número de proteínas diferenciales asciende a 85, de las cuales 35 son más abundantes en hembras copuladas y 50 en vírgenes, estando 4 y 2 de ellas, respectivamente, posiblemente involucradas en el metabolismo de ácidos grasos. (Tablas 4.5 y 4.6; Anexo, Tabla 2). También se han encontrado proteínas expresadas diferencialmente y relacionadas con el metabolismo de ácidos nucleicos y de aminoácidos que forman parte de los procesos de transcripción y traducción; así como proteínas relacionadas con el transporte de calcio y la transducción de señales (Tablas 4.5 y 4.6).

Tabla 4.5. Número de identificación y proteínas diferenciales relacionadas con la biosíntesis de feromonas, síntesis de proteínas, transducción de señales y transporte de calcio encontradas al comparar hembras copuladas y vírgenes emergidas en presencia de planta.

HEMBRAS EMERGIDAS EN PRESENCIA DE PLANTA				
	COPULADAS		VÍRGENES	
PROCESO	Número identificativo	Proteína	Número identificativo	Proteína
Biosíntesis de feromona			Q2VEU6 G6DJS7	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa Aldehído deshidrogenasa mitocondrial
Síntesis de proteínas	I4DID9 S4NR04 S4PRL2 S4PGH1 G6DJK6 A0A194QYQ6	Proteína ribosomal ácida Proteína ribosomal S19 Proteína ribosomal L37 Chaperona Peptidil-prolil-cis/trans isomerasa Factor de elongación de la translación II	A0A1E1W397 A0A0N1PFU4 B6A8I0 G6DRL5 G4XH85 E3VWK8 A0A0L7KU55 Q2F5V6 C4NBL3	Proteína ribosomal S6 Proteína ribosomal S9 Proteína ribosomal L11 Proteína ribosomal L23A Proteína ribosomal S30 Tirosina fosfatasa Glutamina sintasa Traslocasa 8 mitocondrial Factor de elongación I- α
Transducción de señales	C7B401	Adenilato ciclasa		
Transporte de calcio	A0A0L7L3I0 A0A0N0PDW9	ATPasa transportadora de calcio Calreticulina		

Tabla 4.6. Número de identificación y proteínas diferenciales relacionadas con la biosíntesis de feromonas, síntesis de proteínas y transporte de calcio encontradas al comparar hembras copuladas y vírgenes emergidas en ausencia de planta.

HEMBRAS EMERGIDAS EN AUSENCIA DE PLANTA				
PROCESO	COPULADAS		VÍRGENES	
	Número identificativo	Proteína	Número identificativo	Proteína
Biosíntesis de feromona	S4PKR2	Fructosa bifosfato aldolasa	A0A0A7BYM7	Acetiltransferasa
	G6CIP4	Dihidrolipoil deshidrogenasa	D2SNT6	Lisofosfolipasa
	D2SNR7	Aldehido deshidrogenasa		
	A0A0L7K2S4	Aldo-ceto reductasa		
Síntesis de proteínas	A0A0A0MYL	Factor de elongación I- α	Q5MAG6	Proteína ribosomal L13
	Q1HQB7	Proteosoma, subunidad α	S4NR04	Proteína ribosomal S19
	S4P662	Fosforribosil-formil-glicina-amina sintasa	S4NLM7	Proteína ribosomal S27
	A0A0L7KU55	Glutamina sintasa	A0A1S6Q5K6	Endopeptidasa
	Q5MGK7	Proteína ribosomal 21	A0A1E1WQZ4	Proteína homóloga a la subunidad β del proteosoma
	S4NIK5	Aspartato aminotransferasa		
	A0A0L7L3B1	Proteína ribosomal S25		
	G6D1Y6	Proteína de unión a selenio		
S4NX42	Flotilina-2			
Transporte de calcio			A0A1E1WN47	Calponina
			A0A0G2QMW1	ATPasa transportadora de calcio del retículo endoplasmático

3.5. ENSAYOS DE OVIPOSICIÓN

Al evaluar la capacidad de las hembras de *T. absoluta* para ovipositar sobre distintos sustratos y fuentes de olor al cabo de 72 h desde el inicio del ensayo, se observó que el número de huevos depositados sobre plantas aumentó con el tiempo. Al finalizar los ensayos, se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($F=49,675$; $P<0,001$) y la cantidad de huevos depositada en presencia de plantas de tomate fue mayor que en ningún otro tratamiento, tanto cuando los insectos poseían las antenas intactas como en aquéllos que se les había diseccionado (9,8 huevos por hembra en el primero de los casos y 8,5 en el segundo). Cuando el soporte proporcionado para la oviposición fue una planta de geranio el número de puestas se redujo significativamente con respecto a los dos casos anteriores (2,3 huevos/hembra) (test de Tukey, $P<0,05$). Cuando se evaluó el número de huevos depositado sobre el crepón, se observó que no se produjo ninguna puesta independientemente de la mezcla de volátiles suministrada como fuente de olor. Cabe destacar que en los ensayos en los que las hembras carecían de antenas pero que estaban en contacto directo con plantas de tomate, el número de huevos fue inferior al depositado por hembras con las antenas intactas durante los dos primeros días, produciéndose un gran incremento al tercer día y llegando prácticamente a igualar la cantidad de huevos (test de Tukey; $P=0,946$) (Figura 4.9).

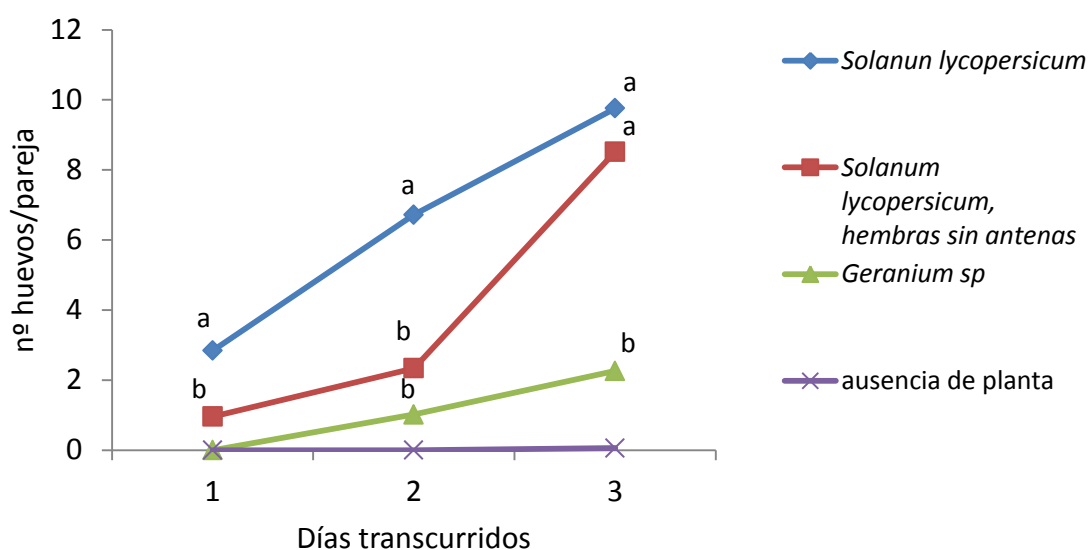


Figura 4.9. Progresión del número total de huevos depositados por hembra en cada uno de los tratamientos durante 3 días. Para un mismo día, distintas letras sobre los puntos de la recta indican existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (test de Tukey, $P<0,05$). Aquellos tratamientos en los que el número de puestas fue igual a cero no fueron tenidos en cuenta a la hora de realizar los análisis estadísticos.

4. DISCUSIÓN

4.1. EL EFECTO DEL ESTADO FISIOLÓGICO SOBRE LA PERCEPCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN ADULTOS DE *T. absoluta*

Los insectos reciben continuamente a través del sistema olfativo un gran número de estímulos del medio que les rodea procedentes de individuos conespecíficos para el apareamiento, fuentes de alimento, lugares de oviposición, y depredadores. La respuesta a este tipo de señales puede verse influida tanto por factores ambientales como por características del propio individuo, como son la experiencia previa y el estado fisiológico de éste (Gadenne et al., 2016). Concretamente, el estado de apareamiento de un insecto se sabe que puede afectar la percepción de la feromona sexual en machos y olores de las plantas en hembras, lo cual ya ha sido descrito en varias especies de polillas (Anton et al., 2007).

Los lepidópteros macho, especialmente polillas, son capaces de detectar pequeñas cantidades de feromona de hembras conespecíficas que se encuentran a grandes distancias e iniciar un vuelo dirigido hacia ellas, aunque esta capacidad de percepción puede verse alterada por la edad y el estado nutricional del individuo, los ritmos circadianos y el apareamiento (Gadenne et al., 2016). Se han llevado a cabo muchos estudios que han evaluado las respuestas de machos, tanto electrofisiológica como comportamentalmente, a la feromona sexual sintetizada por hembras antes y después de haber copulado, siendo muy diversas en las distintas especies de estudio. Los resultados en machos de *T. absoluta* ponen de manifiesto que el apareamiento no tiene un efecto aparente sobre la respuesta antenal en EAG a los componentes de la feromona sexual, ni a la mezcla binaria de ambos, ya que no se observan diferencias significativas entre las antenas de machos vírgenes y copulados. El efecto dosis-dependiente presenta el mismo perfil para ambos grupos, aumentando la despolarización a medida que se aumenta la dosis de los distintos componentes. Se conocen otras especies en las que el apareamiento no parece influir en la respuesta antenal a la feromona sexual femenina (Gadenne et al., 2001), como ocurre en *Cydia pomonella* o *Ectropis oblique*, donde los machos vírgenes y copulados muestran una respuesta en EAG muy similar cuando son estimulados con dichas feromonas (De Cristofaro et al., 2004; Yang et al., 2011). Sin embargo, nuestros resultados son contrarios a los obtenidos con un gran número de especies, en los que la capacidad de respuesta a la feromona sexual femenina sí se ve afectada tras la cópula, produciéndose un descenso notable y pasajero en la respuesta a distintos niveles. En *Copitarsia decolora* los machos que han copulado muestran un descenso en la actividad comportamental y en la respuesta electroantenográfica respecto a individuos vírgenes de la misma especie frente a extractos de glándulas feromonales de las hembras (Reyes et al., 2015). En los machos de *S. littoralis* (Kromann et al., 2014), *Plutella xylostella* (Zhang et al., 2009), *Heliothis virescens* y *Heliothis subflexa* (Soques et al., 2010) también se observa este tipo de inhibición transitoria tras la cópula a nivel olfativo periférico. En *Agrotis ipsilon* también se produce una supresión comportamental a la feromona femenina, pero en este caso está relacionada con un descenso en la sensibilidad de las neuronas del lóbulo antenal debido a la liberación de una serie de neuromoduladores, permaneciendo la sensibilidad antenal inalterada (Duportets et al., 1998; Gadenne et al., 2001). Este periodo de “supresión” se observa no solo en polillas sino también en otros animales, y permite a los machos

recuperar energía tras el apareamiento y restablecer los depósitos de esperma y en las glándulas accesorias, como se ha descrito en *A. ipsilon* (Barrozo et al., 2011). A pesar de que en nuestros ensayos la antena permaneció unida a la cabeza, el electroantenograma únicamente nos permite evaluar la respuesta de los receptores antenales; puede que al igual que en el caso de *A. ipsilon*, se produzcan cambios en niveles superiores del sistema nervioso central. Ensayos complementarios tendrían que realizarse para determinar si el apareamiento influye de alguna manera a otros niveles en la respuesta de machos de *T. absoluta* a la feromona.

Sin embargo, cuando los machos de *T. absoluta* fueron sometidos a exposiciones intermitentes de feromona a lo largo del tiempo, sí se apreciaron diferencias significativas en el patrón de respuestas electroantenográficas de machos vírgenes y copulados. Se sabe que la experiencia previa con una determinada fuente de olor puede provocar cambios comportamentales en los circuitos neuronales e incluso a niveles de transcripción génica. Uno de los aspectos más estudiados es el cambio en la sensibilidad antenal que se produce, provocando en ocasiones un descenso de la respuesta a ese estímulo (habitución) o un aumento (sensibilización). En *S. littoralis* se ha estudiado ampliamente este fenómeno (Anderson et al., 2003; Anderson et al., 2007; Guerrieri et al., 2012; Quero et al., 2014; López et al., 2017) y se ha comprobado que la sensibilidad a la feromona sexual de los machos aumenta trascurrido un tiempo después de haber sido expuestos previamente a ésta. En *T. absoluta* se ha observado algo parecido en EAG, siendo la respuesta a tiempo cero inferior que la obtenida con la misma dosis en el estudio dosis-respuesta, en el que los machos ya habían sido expuestos previamente a otras dosis de feromona. La respuesta al TDTA se incrementó sucesivamente en todos los tiempos a los que se realizaron mediciones. En *S. littoralis*, se ha comprobado que este incremento de la sensibilidad periférica tras una exposición previa está ligado a cambios en la expresión génica que se traducen en un aumento del número de receptores que se expresan en la antena (Guerrieri et al., 2012), y a reorganizaciones estructurales en el lóbulo antenal, principalmente en el complejo macrogglomerular (Anderson et al., 2007; Guerrieri et al., 2012). Aunque en machos de ambos estados se observó este aumento, fue más pronunciado en los que habían copulado previamente, con diferencias significativas a partir de los 24 min desde la primera exposición. Al final del experimento, los valores medios de respuesta de los machos vírgenes fueron menores que los de los copulados. Este mayor aumento en machos que se han apareado previamente podría deberse al hecho de que al haber tenido un apareamiento exitoso y contacto con las hembras (recompensa) muestren una mayor “motivación” al responder a la feromona sexual que los machos vírgenes (Menzel, 1993; Anderson et al., 2003; Anderson et al., 2007).

La aparente ausencia de efecto del estado fisiológico sobre la capacidad de responder a la feromona en *T. absoluta* en un principio, y la mayor capacidad de respuesta de los machos copulados trascurrido un determinado tiempo podría deberse a que en esta especie los individuos de ambos sexos pueden copular varias veces a lo largo de su vida, incluso en días consecutivos, por lo que el periodo refractario en machos y hembras es muy breve o no existe. La explicación que Lee y col. (2014) dieron a este comportamiento fue el rápido metabolismo del espermatóforo cedido por el macho en la bolsa copulatrix de la hembra de *T. absoluta*. Se sabe que las hembras reciben nutrientes durante la transmisión del esperma, lo que permite

umentar su capacidad reproductora, como se ha observado en *Pieris napi* (Stjemholm & Karlsson, 2000), por lo que las hembras que se aparean varias veces tienen un mayor éxito reproductivo que aquéllas que solo lo hacen una vez. Por esta razón, las hembras de *T. absoluta* favorecerían la degradación del espermatóforo en menos de 24 horas acortando el periodo entre cópulas, mientras que los machos se verían obligados a copular de manera continua para asegurar así su propia descendencia (Lee et al., 2014).

Por otro lado, se ha evaluado la respuesta electroantenográfica de las hembras de esta especie a su propia feromona, ya que si bien se han desarrollado estudios en los que se evalúa la respuesta de los machos poco se sabe de la capacidad de las hembras para responder a ella. Al evaluar la respuesta en EAG, observamos que las hembras de *T. absoluta*, tanto vírgenes como copuladas, son capaces de responder a dosis tan bajas como 1 ng de cualquiera de los componentes de su feromona y a la mezcla binaria, aunque sólo un porcentaje muy pequeño de las hembras puede hacerlo. Aunque este porcentaje aumenta a medida que incrementamos la dosis respondiendo la totalidad de ellas a 10 µg de feromona, no se aprecia un incremento significativo en la amplitud de la despolarización hasta esta dosis, aunque alcanzando un valor medio muy inferior a los observados en machos. En un estudio reciente se ha demostrado que los tipos de sensilas capaces de detectar feromonas se encuentran presentes en ambos sexos de *T. absoluta*, aunque son más numerosas en las antenas de machos (Bawin et al., 2017), lo cual explicaría la mayor capacidad de respuesta de éstos. Se conocen varias especies en las que este fenómeno ocurre. Por ejemplo, las hembras de *T. ni* muestran respuesta en EAG (Grant, 1970) e incluso se ven atraídas por trampas cebadas con su propia feromona (Mitchell et al., 1972). Las hembras de *Choristoneura fumiferana* también son capaces de percibir su propia feromona en EAG, aunque manifiestan comportamientos distintos a los de los machos (Palanaswamy & Seabrook, 1978). En *S. littoralis*, se han llevado a cabo diversos estudios de electroantenografía que han corroborado también la capacidad de las hembras para responder a su feromona y la presencia en sus antenas de receptores idénticos a los de los machos de la misma especie (Nesbitt et al., 1973; Ljungberg et al., 1993). Varios estudios han demostrado que esta capacidad de “autodetección” es beneficiosa para las hembras y las dota de una herramienta para evaluar la densidad de población y modificar su comportamiento en casos necesarios para evitar una gran competencia intraespecífica (Cruz & Eizaguirre, 2015). El estado fisiológico de las hembras de *T. absoluta* no afecta a esta “autodetección feromonal”, ya que la respuesta en ambos casos es prácticamente idéntica. La capacidad de detectar su propia feromona tiene distintas implicaciones biológicas en especies diferentes, y así los estudios llevados a cabo con *C. fumiferana* demostraron que la feromona sexual actuaba como estimulante de la oviposición y de la dispersión (Palanaswamy & Seabrook, 1978), mientras que en *T. ni* se observó que aumentaba los niveles de agregación incrementando con ello las oportunidades de apareamiento (Birch, 1977). Estudios más recientes (Harari et al., 2011) muestran que la autodetección de hembras vírgenes de su feromona afecta al periodo de llamada, al número de huevos depositados y a la supervivencia. Hasta el momento, no se conocen qué efectos tiene la percepción de su propia feromona en *T. absoluta* y sería necesario llevar a cabo otra serie de ensayos para averiguarlo.

A lo largo de este capítulo también se ha evaluado la capacidad de las hembras para responder a cuatro de los volátiles mayoritarios presentes en las hojas de tomate, principal hospedador de *T. absoluta*. Los insectos son capaces de discernir sustancias volátiles procedentes de sus plantas hospedadoras dentro de una amplia variedad de olores presentes en el entorno y dirigir su vuelo hacia ellas, y como en el caso de la percepción de las feromonas, existe una amplia variedad de especies en las que el estado reproductivo, entre otros factores, puede afectar a la recepción olfativa de los olores de los hospedadores y el procesamiento de la respuesta, alterando incluso el comportamiento del insecto. Observamos, tanto en hembras vírgenes como copuladas de *T. absoluta*, que todos los volátiles de hojas de tomate de manera aislada y la mezcla de todos ellos provocan una respuesta dosis dependiente en EAG, aumentando la amplitud de la despolarización a medida que aumentamos la dosis. Como ocurría en la respuesta a la feromona de los machos, no se aprecian diferencias significativas entre hembras vírgenes y copuladas. Se han llevado a cabo un gran número de estudios sobre diferentes especies, y no se ha podido determinar un patrón único de respuesta, que puede ser variable incluso dentro de la propia especie. Por ejemplo, en un estudio similar realizado con adultos de *C. pomonella*, tanto vírgenes como copulados, se observó que los adultos no mostraron diferencias en su respuesta antenal al (E,Z)-2,4-decadienoato de etilo, compuesto presente en las peras y considerado atrayente de ambos sexos (De Cristofaro et al., 2004). Como en nuestro caso, parece que la percepción olfativa a los compuestos ensayados no se ve influenciada por la cópula. Por otro lado, se conocen casos en los que el apareamiento aumenta la sensibilidad antenal a estos compuestos, como en *Dioryctria abietivorella* (Shu et al., 1997), *P. xylostella* (Reddy & Guerrero, 2000), *Lobesia botrana* (Masante-Roca et al., 2007) y *Cnaphalocrocis medinalis* (Sun et al., 2014); y otros en los que esta sensibilidad a los olores de las plantas disminuye, como en *Vitacea polistiformis* (Pearson & Schal, 1999). En el caso de *S. littoralis* se han obtenido resultados contradictorios en este tipo de estudios. Martel y col. (2009) llegaron a la conclusión de que el apareamiento comprometía seriamente la sensibilidad antenal, produciéndose una reducción drástica en ella; mientras que el equipo dirigido por Kromann (2014) concluyó que la cópula no afectaba la sensibilidad olfativa a olores de las plantas. Recientemente, un nuevo estudio ha demostrado que el estado fisiológico en última instancia sí afecta a la preferencia de hospedador de esta especie, pasando de buscar aquellos hospedadores que sirven como fuente de alimento al adulto (*Syringa vulgaris*) a los que son óptimos para ovipositar y alimentar a la descendencia (*Gossypium hirsutum*) una vez que se ha producido el encuentro sexual (Saveer et al., 2016). Este fenómeno también se ha descrito en otros órdenes, como por ejemplo en los dípteros *C. capitata* (Jang, 1995) y *D. melanogaster* (Kubli, 2003).

Cabría esperar que las hembras copuladas, las cuales necesitan un lugar para ovipositar, fueran más sensibles a las señales procedentes de la planta hospedadora (Anton et al., 2007) como se ha comprobado en numerosas especies, sin embargo, esto no ha sido observado en nuestro estudio, donde al menos los compuestos mayoritarios no provocan este efecto. En un estudio llevado a cabo por Proffit y su equipo (2011), se observó que las hembras copuladas eran las únicas atraídas por plantas de tomate en experimentos de túnel de viento, esto es lógico si tenemos en cuenta que la supervivencia de las larvas dependerá de la elección de la fuente de alimento que realice la hembra adulta (Awmack & Leather, 2002). Los resultados obtenidos en

EAG no nos conducen a estas conclusiones, bien porque los compuestos ensayados no son los responsables de desencadenar esta respuesta comportamental, o bien porque los procesos que desencadenan este cambio comportamental se da a niveles superiores de integración de la información sensorial. Sólo la respuesta electroantegráfica no es suficiente para determinar si el grado de atracción al hospedador es mayor en un tipo u otro de hembras, por lo que otros ensayos deberían llevarse a cabo.

Los ensayos de oviposición realizados en este capítulo pueden servir para arrojar luz a esta cuestión. El olor característico de las hojas de las plantas hospedadoras de *T. absoluta* es debido a la presencia de terpenoides volátiles que según algunos autores inducen en hembras copuladas el vuelo orientado hacia la fuente emisora, seguido de un posterior aterrizaje y la puesta de huevos (Proffit et al., 2011; Caparros-Megido et al., 2014). Nuestros resultados parecen indicar que no solo las señales químicas juegan un papel fundamental en la selección del hospedador, sino que otros factores pueden influir en esta decisión. Al evaluar el número de huevos dejados por parejas de esta especie sobre distintos tipos de soportes y fuentes de olor, el mayor número de huevos depositado es sobre plantas de tomate, siendo también muy alto cuando a las hembras se les había extraído las antenas, lo cual pone en evidencia que éstas poseen otros mecanismos, además del sentido del olfato, para reconocer a su hospedador idóneo. Otros autores también coinciden en señalar que las hembras no solo se guían por señales olfativas de la planta, sino también por señales químicas de contacto y señales visuales para la oviposición (Olsson et al., 2006; Awmack & Leather, 2002; Costa et al., 2009). Nuestros ensayos también pusieron de manifiesto la capacidad de esta especie de poner huevos sobre otras plantas que nada tienen que ver con el tipo de plantas que infestan, como son las plantas de geranio, aunque la cantidad de huevos fue inferior a la depositada en plantas de tomate. En las pruebas en las que solo fueron expuestas a los compuestos volátiles característicos de las hojas de tomate de forma natural o sintética no depositaron huevo alguno. A pesar de que el sentido del olfato juega un papel central en este proceso, el contacto con la superficie de la planta parece ser determinante. Las hembras de *T. absoluta* ovipositan mayoritariamente en las hojas de la planta de tomate (Coelho & França, 1987; Torres et al., 2001) mostrando preferencia por las hojas del tercio superior de la planta para ovipositar donde la densidad de tricomas es mayor impidiendo la presencia de parásitos (Faria et al., 2008). El hecho de ovipositar sobre geranio puede ser debido a la pilosidad de las hojas o a no disponer de otro sustrato sobre el que depositarlos en ausencia de planta de tomate.

4.2. PRODUCCIÓN DE FEROMONA EN HEMBRAS DE *T. absoluta*

Al igual que en el caso de la percepción, en varias especies de polillas se ha puesto de manifiesto que la biosíntesis de la feromona sexual se encuentra regulada e influida por un gran número de factores tanto extrínsecos (temperatura, fotoperiodo y presencia de plantas hospedadoras) como intrínsecos (edad, apareamiento y factores endocrinos, como el PBAN y la hormona juvenil) (Delisle et al., 2000; Rafaeli, 2016). La presencia de la planta hospedadora es fundamental para los insectos fitófagos y su influencia puede manifestarse tanto a nivel fisiológico como comportamental, por ejemplo, algunos insectos adquieren a través de la dieta compuestos de la planta que posteriormente serán utilizados como feromonas sexuales o precursores de ésta (Landolt & Phillips, 1997). En otros casos se ha comprobado que los

volátiles de la planta hospedadora son capaces de estimular la síntesis de la feromona sexual y su posterior emisión; de esta manera las hembras son capaces de coordinar la reproducción con la disponibilidad de alimento para la descendencia frenando la producción y liberación de feromona hasta la localización de un hospedador apto (Rania et al., 1992; Groot and Visser, 2001). Además, el estado fisiológico también influye en el comportamiento reproductor de los insectos, no solo a nivel de percepción de olores como ya ha sido discutido con anterioridad (Anton et al., 2007), sino también en la producción de feromona (Yamane & Yasuda, 2014). Cuando evaluamos la influencia de la presencia de planta hospedadora y el estado de apareamiento en la producción de feromona en hembras de *T. absoluta*, observamos que la ausencia de hospedador disminuyó drásticamente la producción de feromona en hembras vírgenes, al igual que ocurre en hembras copuladas pero de forma menos acusada. Estos resultados demuestran que la presencia de la planta juega un papel fundamental en esta especie para desencadenar la síntesis de feromona, lo cual también ha sido descrito en *H. zea*, donde la percepción de algunos de los volátiles de la planta hospedadora por parte de las hembras, como el etileno, desencadena la producción de la feromona y produciendo solo trazas en ausencia de la planta hospedadora (Rania et al., 1992). Un fenómeno similar se ha descrito en *Helicoverpa phloxiphaga* y algunas especies del género *Yponomeuta* (Rania et al., 1988; Hendrikse & vos-Bunnemyer, 1987). Fuera del orden Lepidoptera, la estimulación de la síntesis de feromona por la planta hospedadora también se ha descrito en hembras de *Dendroctonus brevicomis* (Curculionidae, Coleoptera), en este caso tras su ingestión (Hughes & Renwick, 1977).

Al analizar el contenido proteico global de las glándulas feromonales no se observaron diferencias cuantitativas, siendo muy similar para todos los tratamientos. En cuanto al análisis de expresión diferencial, se identificaron un gran número de proteínas de las cuales un pequeño porcentaje se expresaron de forma diferencial. En todas las glándulas sometidas a diferentes condiciones se identificaron varias proteínas relacionadas con el proceso de transcripción y traducción, además de numerosos enzimas implicados en la biosíntesis de los compuestos feromonales, como enzimas relacionadas con la β -oxidación de los ácidos grasos, desaturasas, ácido graso-acil reductasa y acetiltransferasas, previamente encontradas en glándulas feromonales de otras especies de insectos (Jurenka & Roelofs, 1989; Rania, 1993; Antony et al., 2009). Entre las proteínas identificadas en las muestras glandulares no se han detectado péptidos correspondientes a PBAN o la hormona juvenil, que juegan un papel fundamental en la reproducción de individuos adultos (Rania, 1993; Touhara & Prestwich, 1993). Sin embargo, sí se han identificado distintas AMP ciclasas en todos los tipos de glándulas, además de proteínas involucradas en el transporte de calcio y otras relacionadas con el transporte, transducción y señalización de este ion como calmodulina, calreticulina y calponina, que estarían involucradas en el incremento de los niveles de calcio en el interior de la glándula como parte de la cadena de reacciones desencadenadas por la acción de PBAN (Rafaeli et al., 1993; Rania, 1993; Peter et al., 1995), además de una enzima epóxido hidrolasa de hormona juvenil, sobreexpresada en hembras vírgenes sin plantas, que participa en la inactivación de dicha hormona (Touhara & Prestwich, 1993).

De todas las proteínas diferenciales encontradas en todos los tipos glandulares, 27 posiblemente estarían implicadas en procesos de transcripción y traducción, y 8 eran enzimas posiblemente relacionadas con la síntesis de los componentes feromonales. Llama la atención la mayor cantidad del trieno y dieno feromonal en glándulas de hembras copuladas en ausencia de planta, lo que contrasta con otros estudios llevados a cabo en hembras de lepidópteros en los que se ha observado una reducción pasajera de la síntesis de feromona tras la cópula para redistribuir el gasto energético e invertirlo en otros procesos, como por ejemplo en la maduración de oocitos. Esto es lo que como ocurre en *H. armigera*, lo cual ha sido relacionado con un incremento en los niveles de hormona juvenil tras la cópula que provoca la posterior inhibición de la producción de feromona, reducción de los niveles de transcripción y de proteínas receptoras de PBAN (Delisle et al., 2000; del Mazo-Cancino et al., 2004; Rafaeli, 2016). A primera vista, en *T. absoluta* esta inhibición de la síntesis feromonal tras el apareamiento no parece ocurrir puesto que la cantidad de feromona por glándula es superior en hembras copuladas que en vírgenes en la mayoría de los casos. La mayor cantidad de feromona podría ser debida a cambios en los mecanismos de emisión de feromona y no a la falta de inhibición del proceso biosintético. Se sabe que las plantas hospedadoras no solo son capaces de estimular la biosíntesis, sino también la liberación de feromona, como se ha demostrado en *Antheraea polyphemus* (Riddiford, 1967; Riddiford & Williams, 1967), *Homeosoma electellum* (McNeil & Delisle 1989) y algunas especies del género *Yponomeuta* (Hendrikse & Vos-Bunnever, 1987). Sin embargo, Yamane y Yasuda en 2014 en trabajos realizados sobre *Trigonotylus caelestialium* pusieron de manifiesto que la producción de feromona continuaba en las hembras copuladas debido a la presencia de machos y que los niveles de emisión eran muy inferiores a los de las hembras vírgenes al menos durante dos días después del apareamiento, lo cual provocaba una acumulación de feromona en la glándula aunque la producción fuera inhibida tras el apareamiento (Yamane & Yasuda, 2014). Esto podría dar una explicación a lo observado en *T. absoluta*, donde la producción en las hembras que han copulado recientemente continuaría debido a la presencia de los machos y la capacidad de esta especie de aparearse varias veces a lo largo de su vida. Cuando las condiciones son óptimas y las hembras pueden percibir toda la información que les proporciona la planta a través de la olfacción y el tacto, la producción se dispara en hembras copuladas y vírgenes debido a la información extra obtenida de la superficie de la planta y de los volátiles captados de ésta (Riddiford, 1967; Riddiford & Williams, 1967; Landolt & Phillips, 1997), asegurando la cópula. Una posible explicación a la mayor concentración de feromona en hembras vírgenes con respecto a las copuladas en presencia de planta es una redistribución del gasto energético después de la cópula para invertirlo en otros procesos, como se ha descrito en *H. zea* (Delisle et al., 2000; del Mazo-Cancino et al., 2004; Rafaeli, 2016). Nuevos estudios enfocados a conocer cuándo ocurre la emisión de feromona y los mecanismos que la regulan podrían ayudarnos a esclarecer y dar otra posible explicación a este fenómeno.