

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

Programa de doctorado de Fisiología  
Bienio 2005-2007

**IDENTIFICACIÓN DE FEROMONAS Y PROTEÍNAS  
IMPLICADAS EN LA PERCEPCIÓN FEROMONAL DE  
LEPIDÓPTEROS PLAGA**

Memoria presentada por Patricia Acín Viu  
para optar al título de Doctor  
con mención europea

Tesis realizada en el Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular del  
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC) bajo la dirección de la Dra.  
Carmen Quero López y la Dra. Glòria Rosell Pellisé

**Directoras**

Dra. Carmen Quero López  
Dept. de Química Biológica y Modelización Molecular  
ICAQ  
CSIC

Dra. Glòria Rosell Pellisé  
Dept. de Farmacología y Química Terapéutica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

**Tutora**

Dra. Isabel Navarro Álvarez  
Dept. de Fisiología  
Facultad de Biología  
Universidad de Barcelona

**Doctoranda**

Patricia Acín Viu

**6. ESTUDIO DE LA COMUNICACIÓN QUÍMICA  
INTRAESPECÍFICA UTILIZADA POR LA ESPECIE  
*Paysandisia archon* (Lepidoptera: Castniidae)**



## 6.1. INTRODUCCIÓN

*Paysandisia archon* (Lepidoptera: Castniidae), es una especie neotropical originaria de Sudamérica, concretamente de Uruguay, Argentina, Paraguay y Brasil. La larva se alimenta de palmeras de los géneros *Phoenix*, *Trithrinax*, *Butia* y *Chamaerops* mayoritariamente, aunque también puede afectar otras especies.

Fue introducida en Europa mediante la importación de palmeras infestadas. En España, posiblemente su introducción comenzó hacia 1992-1993, periodo en el cual se realizaron las primeras importaciones a gran escala de palmeras de la especie *Trachycarpus fortunei* originarias de Argentina<sup>187</sup>. Pero no fue hasta el 2001 cuando por primera vez, se informó de su presencia en Cataluña<sup>188</sup>, concretamente en la provincia de Girona en *T. fortunei*, *Phoenix canariensis* and *Chamaerops humilis*, posteriormente se han observado otras especies afectadas. En junio del 2002 se detectó su presencia en la Comunidad Valenciana, aunque fue declarada oficialmente en mayo del 2003, aquí, sus daños se han extendido igualmente a un gran número de especies. Así mismo, en septiembre del 2003 se hallaron varias palmeras de la especie *C. humilis* con daños en las Islas Baleares, concretamente en Mallorca. Debido a su gran capacidad de migración, es probable que se haya expandido a otros puntos de España, aunque no se haya hecho pública su presencia.

Igualmente, se ha introducido en varias zonas de otros países del sur de Europa como Francia<sup>189</sup> e Italia<sup>190</sup>, debido así mismo a la importación de palmeras infestadas originarias de Argentina, e incluso se ha llegado a advertir en un jardín personal de Sussex (Inglaterra)<sup>191</sup>; en este último caso, a diferencia de los demás la infestación se ocasionó probablemente por la introducción de palmeras infestadas del Sur de Europa.

### 6.1.1. Ciclo biológico

Estudios realizados en laboratorio en los últimos años por Sarto y col., han permitido tener un estudio más detallado de la biología de esta especie, hasta el momento no muy conocida. Así pues, dichas observaciones mostraron que el periodo de incubación del huevo es bastante largo; las larvas eclosionan 12 o 20 días después de la puesta dependiendo de la temperatura. Posteriormente, la larva (Figura 6.1) pasa por nueve estadios larvarios hasta el estadio de prepupa. La duración de la etapa larvaria, incluyendo la de prepupa depende de la duración total del ciclo, de 10,5 meses en larvas con ciclo anual y 18,5 meses con ciclo bianual. Después de varios días en estado de prepupa forman un capullo en cuyo interior se desarrolla la pupa (Figura 6.2). La duración de esta fase es así mismo dependiente de la temperatura, pudiendo llegar a ser de hasta casi 70 días tras los cuales emerge el adulto (Figura 6.3). En Cataluña, donde se ha llevado a cabo estos estudios, el ciclo biológico de esta especie abarca 389 días en especímenes de ciclo anual y 673 días en los de ciclo bianual.



**Figura 6.1.** Larva de *P. archon*



**Figura 6.2.** Capullo y pupa de *P. archon*.



**Figura 6.3.** Adulto de *P. archon*.

Los adultos se encuentran en la naturaleza de mayo a septiembre, con un máximo de población en los meses de junio y julio. Una vez realizada la cópula, la hembra deposita los huevos, alrededor de cien, sobre las fibras de la parte del tronco cercana a la corona de la palmera. Las larvas neonatas se nutren inicialmente de las hojas tiernas y posteriormente se introducen en el tronco de la palmera, donde originan unas galerías que aumentan de diámetro con el tamaño de la oruga, la cual permanece en el interior hasta completar el desarrollo. La duración del ciclo de uno o dos años depende en gran medida del momento en que se haya realizado la oviposición. Si las puestas se depositan a principios de verano el tiempo que necesita la larva para completar su desarrollo es de un año, pero si se realiza con posterioridad, la larva necesita de un periodo mayor para finalizar su formación.

### 6.1.2. Comportamiento

Los datos bibliográficos sobre el comportamiento de esta especie en sus lugares de origen es escaso, los datos mostrados a continuación se basan en una recopilación de estudios realizados por otros autores sobre especímenes introducidos en Europa.

Los adultos son de vuelo diurno. El periodo máximo de actividad se restringe a una franja horaria de 11:00 a 17:00 horas<sup>192</sup>. Los machos son muy territoriales, normalmente, se encuentran posados en hojas cercanas a la corona hasta que sucede el avistamiento de otro espécimen de tamaño similar volando, conespecífico o no, tras el cual comienzan la persecución del mismo. Una vez alcanzado, si el sujeto en sí no es de la misma especie, retornan al sitio de origen. En el caso contrario, el macho continúa la persecución, se trate de un macho o una hembra. El vuelo realizado en ambas situaciones es diferente, siendo más lento si el miembro conespecífico es una hembra. En este último caso, la pareja vuela a una distancia próxima, en las cercanías de la corona de la palmera hasta que se posan. Es entonces cuando el macho realiza un acercamiento hacia la hembra y se realiza la cópula<sup>187</sup>. Estas observaciones realizadas parecen mostrar que existe en primera instancia una localización de tipo visual del sexo contrario. Rasgo común con las mariposas típicas de vuelo diurno, en las cuales la detección de la hembra suele ser mediante la visión. De todas formas, estos datos basados en la observación no se han contrastado con datos experimentales que confirmen la ausencia de la emisión de una feromona de largo alcance o la existencia de algún tipo de comunicación química.

### 6.1.3. Plantas hospedadoras

Como se ha comentado anteriormente, *P. archon* ataca a especies de la familia Arecaceae. En las zonas del Neotrópico, se han encontrado daños en las especies *Trithrinax campestris*, *P. canariensis*, *Butia yatay* y *Butia capitata*, *Latania chinensis* y *Syagrus romanzoffiana*. En Europa, el número de especies afectadas es mayor que en Sudamérica, a este inconveniente se ha de añadir su enorme predilección por la palmera de origen europeo *C. humilis*. Las especies atacadas por *P. archon* incluyen *T. fortunei*, *P. canariensis*, *S. romanzoffiana*, *T. campestris* y *Livistona* sp. como hospedadores comunes con las encontradas en sus zonas de origen, pero el abanico de plantas de las que pueden alimentarse es más amplio, entre ellas, *Washingtonia robusta*, *Washingtonia filifera*, *Phoenix robelenii*, *Phoenix sylvestris*, *Brahea armata*, *Phoenix dactylifera*, etc.

Los daños ocasionados en las diferentes especies son de diversa índole, de severidad leve como la presencia de serrín en el tronco y/o corona a lesiones mayores como la perforación de las hojas (Figura 6.4), la presencia de galerías en el interior de los troncos, deformaciones así como el desecamiento de las palmeras ocasionando la muerte de las mismas (Figura 6.5).



**Figura 6.4.** Daños ocasionados por larvas de *P. archon* en hojas de *P. dactylifera*.



**Figura 6.5.** Muerte de una palmera de la especie *W. filifera* como consecuencia del ataque de *P. archon*.

En sus lugares de origen, las poblaciones de esta especie parece ser que se encuentran controladas por enemigos naturales como pájaros y avispas ichneumónidas. En Europa no existen datos que confirmen la presencia de especies capaces de atacar *P. archon*. Así pues, como medidas de control se ha optado por la utilización de insecticidas de tipo organofosforados durante los primeros estadios larvarios previamente a su introducción en la palmera, así como la quema de las palmeras infestadas.

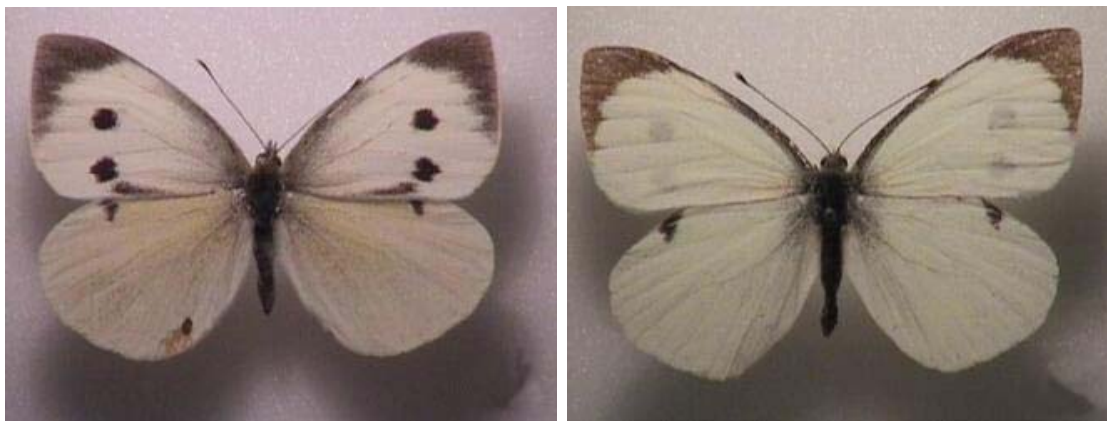


## 6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.2.1. Insectos

Los estudios realizados sobre esta especie comprenden un periodo de seis años (2002-2008), de los cuales, en la presente tesis, se han considerado mayoritariamente los elaborados en los cuatro últimos años, debido a la mayor disponibilidad de individuos así como la diversidad de ensayos ejecutados. Los insectos utilizados durante los dos primeros años, así como los empleados para las pruebas preliminares en años anteriores, provenían de troncos de palmeras cortadas en Girona, los cuales se mantuvieron en jaulas metalizadas en el campus de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los adultos se recogían una vez emergidos y se mantenían en recipientes cilíndricos de plástico a una temperatura de 8-10°C para evitar el deterioro de los insectos ocasionado por la elevada actividad de los mismos así como para prolongar el tiempo de vida. Los adultos utilizados en los dos últimos años provenían de un campo de palmeras infestadas localizado en las inmediaciones del SupAgro INRA en Montpellier, Francia. En este último caso se obtuvieron además de adultos, capullos, los primeros se mantuvieron en recipientes de plástico a 8-10°C de temperatura y los capullos en cajas de plástico con un algodón humedecido en agua, para preservar la humedad, a temperatura ambiente. En ninguno de las dos fases se suministró alimento debido a la inanición observada en estudios anteriores<sup>187</sup>.

Con el objetivo de realizar una comparación con una especie típicamente diurna se eligió como modelo de estudio *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) (Figura 6.6), comúnmente conocida como polilla de la col, debido a la fácil disponibilidad de la misma. El estadio obtenido fueron pupas (Figura 6.7), proporcionadas por la empresa Warwick Insect Technologies Ltd (Warwick, UK). Las pupas se separaron por sexos en cajas de plástico dotadas de un recipiente con algodón humedecido a fin de preservar la humedad así como de agua azucarada para la posterior alimentación de los imagos. Todas ellas se dejaron a fotoperiodo natural a una temperatura de 24°C y 60% HR.



**Figura 6.6.** Hembra (izquierda) y macho (derecha) adulto de la especie *P. brassicae*.



**Figura 6.7.** Pupas hembra y macho de la especie *P. brassicae*.

## 6.2.2. Preparación de extractos

### 6.2.2.1. *Paysandisia archon*: Extractos de adultos y de plantas

Como consecuencia del desconocimiento del tipo de comunicación química empleada en *P. archon* para el reconocimiento entre sexos, así como la zona del insecto responsable de la síntesis y emisión de sustancias atrayentes, se elaboraron extractos de diferentes partes corporales de ambos sexos con el fin de elucidar la existencia de algún compuesto feromonal. El insecto previamente anestesiado con CO<sub>2</sub> se fraccionó con ayuda de un bisturí y unas tijeras en cinco zonas distintas: cabeza, tórax, abdomen, alas y patas y en el caso de las hembras además se extrajo el ovipositor. El disolvente empleado en todos los casos fue hexano y el volumen utilizado fue de 2 mL en los extractos de alas, tórax y abdomen, 1 mL en los de patas y finalmente, en los extractos de cabeza y ovipositor la cantidad de disolvente añadido fue de 200 µL. El tiempo en que las partes corporales estuvieron en contacto con el hexano fue de 3 h, transcurridas las cuales se eliminaron los restos corpóreos y se mantuvieron a -30°C.

Los extractos de plantas se elaboraron con hojas y corteza de la especie *C. humilis*. Las hojas fueron previamente lavadas y una vez evaporado el agua, se procedió a recortar las mismas hasta obtener un peso de 1,5 g al cual se añadieron 10 mL de hexano. Los extractos de cortezas se elaboraron siguiendo el mismo procedimiento.

#### **6.2.2.2. *Pieris brassicae*: Extractos de adultos**

Adultos de ambos sexos de *P. brassicae* se trocearon en diversas partes corporales (tórax, los dos últimos artejos del abdomen y alas) según la metodología empleada en la especie anterior. El disolvente utilizado en la elaboración de los extractos fue hexano y el volumen empleado en la elaboración de los mismos fue de 1 mL y de 200  $\mu$ L en el caso de los dos artejos finales del abdomen en ambos sexos.

#### **6.2.3. SEM**

A nivel macroscópico las antenas de la especie *P. archon* son morfológicamente similares en ambos sexos. Estas estructuras son filiformes, de gran tamaño y acabadas en forma de maza como las típicas mariposas diurnas. Con el fin de realizar un estudio más profundo y detallado de la morfología de las mismas se utilizó un microscopio electrónico de barrido descrito en el apartado 3.2 del capítulo 3, pág. 21. De la misma forma, antenas de ambos sexos de la especie *P. brassicae* fueron sometidas al mismo tipo de estudio.

#### 6.2.4. Recogida de volátiles

Existen varias técnicas para la recolección de volátiles. Una de estas estrategias es la fibra de SPME, utilizada anteriormente como se indica en el capítulo 4 (pág. 55) y que permite identificar los volátiles emitidos por la especie de estudio sin necesidad de utilizar un disolvente que separe los volátiles adheridos a un material absorbente y que posteriormente puede enmascarar dichos compuestos volátiles<sup>193</sup> y sin la presencia de una corriente de aire. En el caso de *P. archon* no pudo utilizarse esta técnica debido a la indisponibilidad de recipientes adecuados para la colocación de la fibra en relación al gran tamaño del insecto. En su lugar, se utilizaron filtros de dos tipos de material; carbón activo y Porapak Q (Supelco) En ambos casos, los insectos se introdujeron en un recipiente denominado cámara de aireación, que en este caso, estaba constituida por un matraz Erlenmeyer de vidrio de 1 L de volumen que contenía un soporte metálico para facilitar el movimiento del insecto. A su vez, el matraz estaba cerrado por una pieza de vidrio con dos salidas, una de ellas conectada a una fuente de aire y la otra en contacto con el filtro del material adsorbente seleccionado mediante la ayuda de tubos de teflón de pequeño tamaño y fijando la unión de cada una de las salidas también con teflón como material aislante (Figura 6.8). Ambos materiales (vidrio y teflón) se utilizan normalmente para la recogida de volátiles debido a su capacidad de no retener los mismos. Para asegurar la pureza del aire utilizado, antes de llegar a la cámara de aireación, pasaba por un recipiente de vidrio con carbón activo en su interior. El flujo de aire utilizado fue de 500 mL/min.



**Figura 6. 8.** Montaje utilizado para la extracción de volátiles.

#### **6.2.4.1. Recogida mediante carbón activo**

El carbón activo es altamente adsorbente, de fácil limpieza y de bajo precio, lo cual le convierte en uno de los materiales seleccionados por excelencia en la recolección de volátiles.

En este ensayo, se colocaron cuatro hembras juntas en las cámaras de aireación conectada al sistema comentado con anterioridad durante tres días a fotoperiodo natural, 16:8 L:D, tras los cuales los volátiles recogidos se eluyeron con 2 mL de hexano como disolvente. Los compuestos extraídos se conservaron en viales de 3 mL a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Este procedimiento se realizó dos veces.

#### **6.2.4.2. Recogida mediante Porapak**

El Porapak es un copolímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno. Este material tiene poca afinidad por el agua pero gran afinidad por los compuestos orgánicos lipofílicos, como es el caso de los compuestos feromonales.

Con el fin de elucidar la existencia así como tipo de comunicación química empleada en esta especie, se situó por separado un adulto de cada sexo así como parejas de un macho y una hembra en cámaras de aireación. El hecho de colocar sólo un individuo fue

debido a que los machos son muy territoriales y al introducir más de uno en el mismo recipiente inducía agresividad y enfrentamiento entre los mismos. Para que los volátiles recogidos en las hembras fueran comparables, el número de adultos utilizado fue el mismo que en los machos. Los insectos se mantuvieron en las cámaras durante 24 y 48 h. El flujo de aire utilizado fue también de 500 mL/min y el número de recolecciones realizadas fue de cuatro en las parejas de machos y hembras, dos de 24 y dos de 48 h y en hembras solas, una de 24 y tres de 48 h. En el caso de los machos se realizaron seis réplicas, una de 24 h y cinco de 48 h.

En todos los casos una vez terminada la recolección de los compuestos volátiles, las cámaras de aireación se sometieron a un intenso lavado de agua jabonosa, agua destilada y etanol. Previamente a la introducción de un nuevo individuo, los recipientes se dejaban a 120°C durante 30 min-1 h para eliminación de cualquier resto adherido a la pared del vidrio.

Este procedimiento no se llegó a realizar en la especie *P. brassicae* debido a que se tiene conocimiento del tipo de comunicación química empleada en la familia Pieridae. En los individuos de esta familia tras una atracción visual, una vez los ejemplares se encuentran a corta distancia, el macho emite sustancias atractivas<sup>194</sup> que permite el reconocimiento intraespecífico por parte de las hembras, permitiendo el acercamiento del macho y la consiguiente cópula, comportamiento común en las especies de ropalóceros<sup>195</sup>.

## 6.2.5. Electrofisiología

### 6.2.5.1. EAG

Durante los primeros años se realizaron ensayos preliminares únicamente con antenas de machos de edad avanzada y sin aclimatar, es decir, la antena provenía de insectos mantenidos en oscuridad a 8-10°C y como agentes estimulantes se utilizaron extractos de 2-3 oviposidores de hembras. Posteriormente en el 2005, los insectos empleados continuaron siendo de edad avanzada (7-23 días de edad) y sin aclimatar. Esta vez, los agentes estimulantes utilizados fueron los extractos corporales de machos y hembras sobre antenas del sexo contrario. El número de antenas utilizadas en ambos casos fue como máximo de cinco salvo en los ensayos en los que se experimentó extracto de oviposidores de hembras sobre antenas de machos en el cual se emplearon nueve antenas de insectos diferentes. En los tres años siguientes los individuos empleados eran jóvenes, desde recién emergidos hasta siete días de edad y aclimatados desde varias

horas a dos días en fotoperiodo natural a temperatura ambiente (24°C). Para acondicionar los insectos, se colocaron de manera individual en recipientes de mayor tamaño consistentes en cajas de plástico con un trozo de papel de filtro alrededor para la sujeción de los insectos y agua azucarada, a pesar de no haberse observado hasta el momento la ingesta de alimento alguno en condiciones naturales<sup>187</sup>. El equipo de EAG utilizado durante los primeros años, fue el descrito en el apartado 3.3.1.1 del capítulo 3, págs. 22-23, el cual fue modificado posteriormente, lo que permitió una actualización y mejora de la señal adquirida (estas modificaciones se hallan igualmente descritas en el apartado 3.3.1.1 del capítulo 3, pág. 23). A lo largo de estos tres últimos años se estudió la respuesta de la antena de ambos sexos no sólo frente a los extractos corporales del sexo contrario sino frente a extractos de palmera y los volátiles extraídos de machos y hembras por separado así como parejas de los mismos. El número de antenas de machos empleados fue como mínimo de 29 correspondientes a diferentes insectos y en el caso de las hembras de 13 antenas también de distintos ejemplares. En la mayoría de los casos debido al gran tamaño de la antena se realizaron dos registros, uno en la parte de la antena correspondiente a la maza y que se denominó distal y la más cercana a la cabeza, basal. Se tomó un volumen de 100 µL de cada extracto y se concentró con ayuda de una pipeta Pasteur hasta aproximadamente 10 µL, que fue el volumen utilizado para todos los agentes estimulantes; el orden en los que se experimentó cada uno de ellos fue de manera aleatoria. Previamente, la antena se estimuló con un blanco, en este caso hexano, que fue el disolvente utilizado en la preparación de todos los extractos. El número de insufladas realizadas con cada agente estimulante fue de tres y a la media resultante de las despolarizaciones se le restó la media obtenida anteriormente con el blanco. El análisis estadístico de los datos se realizó según lo indicado en el apartado 3.3.1.1, pág. 25.

En el caso de la especie *P. brassicae* los insectos utilizados eran de edad comprendida entre uno y tres días, todos ellos sometidos a fotoperiodo normal 16:8 L:D y a temperatura ambiente (24°C). En este caso se estudió la respuesta sólo en la parte antenal distal. El número de antenas empleadas fue de 10 correspondientes a diferentes insectos de ambos sexos, salvo en el caso del extracto de tórax donde tan solo se utilizaron cinco antenas. El volumen utilizado para el blanco y todos los agentes estimulantes, el número de insufladas así como el análisis de datos fueron los mismos que se emplearon en la especie anterior.

### 6.2.5.2. GC-EAD

El sistema de GC-EAD utilizado, al igual que el del EAG, ha sido modificado a lo largo del transcurso de esta tesis, esto ha permitido conseguir una técnica más precisa a la vez que sensible, pudiendo de esta forma visualizar e interpretar la señal adquirida. El principal inconveniente del equipo anterior era la baja sensibilidad tanto del GC como del EAG. La señal del FID (GC) no permitía distinguir de manera definida los compuestos minoritarios de la mezcla inyectada y el ruido de fondo de la señal registrada en el EAG camuflaba la despolarización resultante si ésta no era de gran intensidad.

En el primer año de estudio se utilizaron antenas de insectos de ambos sexos, de edad avanzada y no aclimatados, utilizando como agente estimulante cada uno de los extractos corporales del sexo contrario elaborados con anterioridad. Así mismo, se estudió la respuesta ofrecida por ambas partes antenales frente a los diferentes extractos. El número de antenas empleadas en cada caso fue como mínimo de dos salvo cuando la fuente de estímulo utilizada fue el extracto de oviposidores, donde el número aumentó a 15, en cuatro de ellas se estimuló la zona antenal basal y en las otras once la parte distal. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente: 60°C (1 min), 10°C/min hasta 200°C, 5°C/min hasta 280°C (15 min) y la temperatura del inyector y del detector fueron 230°C y 250°C respectivamente. El volumen utilizado de cada extracto fue 50 µL el cual fue evaporado con ayuda de una pipeta Pasteur hasta aproximadamente 1 µL, inyectado con posterioridad en GC. Cada extracto se inyectó en modo splitless con un tiempo de 0,8 seg.

Cuando se dispuso del nuevo equipo de GC-EAD, se procedió a estudiar la respuesta de las antenas de machos y hembras de *P. archon* frente a: a) volátiles emitidos por cada sexo de manera individual y conjuntamente, b) extractos corporales procedentes del tórax, alas y abdomen de machos y hembras, c) extractos de ovipositor de hembras. La razón primordial de la utilización de extractos corporales provenientes de machos fue básicamente para confirmar la presencia o ausencia de algún compuesto feromonal emitido por el macho que a su vez permitiese el reconocimiento intraespecífico en primera instancia por parte de la hembra pero quizás también de otro macho conespecífico.

Se realizaron varios registros de antenas de insectos jóvenes, desde recién emergidos a siete días de edad, todos ellos mantenidos a fotoperiodo normal así como a una temperatura de 24°C. En el caso de los machos se utilizó un mínimo de tres antenas correspondientes a diferentes insectos para cada agente estimulante utilizado y en las



hembras dos, también provenientes de adultos distintos. La parte antenal estimulada en todos los ensayos realizados fue la distal, extremo de la antena que presenta más sensilas de tipo quimiorreceptor (ver resultados SEM). La columna empleada fue una HP-5 (Agilent Technologies, 30 m x 0,25 mm i.d.) y el programa utilizado fue modificado respecto al empleado con el cromatógrafo anterior, para favorecer una mayor separación de los compuestos cuyo tiempo de retención era al inicio del registro cromatográfico. Este programa comenzaba a 60°C durante 1 min, seguido de una rampa de 5°C/min hasta alcanzar una temperatura de 120°C en la cual permanecía 1 min, tras el cual aumentaba 10°C/min hasta llegar a los 250°C en la que permanecía 10 min. Los diferentes extractos se inyectaron igualmente en modo splitless respetando el tiempo en los que la válvula se mantenía cerrada de 0,8 seg. El volumen utilizado de los distintos extractos fue de 100 µL el cual se concentró posteriormente con ayuda de una pipeta Pasteur hasta obtener un volumen aproximado de 1 µL que fue el volumen inyectado finalmente.

### **6.2.6. Análisis de los extractos corporales y los volátiles emitidos mediante GC-MS**

La identificación de los compuestos encontrados en los diversos extractos realizados con individuos de ambos sexos, así como en los volátiles emitidos por los mismos, se llevó a cabo mediante el equipo de GC-MS indicado en el apartado 4.2.3.2, pág. 54. La columna utilizada para la separación de los distintos compuestos así como para los distintos extractos de oviposidores alas, tórax, abdomen, patas y volátiles de distintos machos y hembras así como juntos, fue una HP-5, descrita anteriormente salvo en el análisis de dos extractos de tres oviposidores, donde la columna empleada fue una ZB-5ms (Zebron, 30 m x 0,25 i.d.). Las muestras se concentraron hasta aproximadamente 20 µL y se inyectó 1 µL en modo splitless por un tiempo de 0,8 segundos. El programa utilizado con las dos columnas fue el mismo que el empleado en GC-EAD, salvo la temperatura final que se fijó a 280°C cuando la columna utilizada fue la ZB-5ms. El número de extractos corporales analizados de machos fue de ocho, excepto los correspondientes al abdomen y patas que fueron cuatro. A su vez se analizaron tres extractos de las distintas partes de hembras. Respecto a los volátiles, la cantidad de extractos examinados fue de cuatro salvo en el caso de los volátiles emitidos por machos, que fueron seis. De cada extracto se extrajeron 50 µL, los cuales fueron concentrados mediante una pipeta Pasteur hasta aproximadamente 1-1,6 µL, que fue el volumen inyectado en GC-MS.

Para reconfirmar los compuestos identificados en los volátiles así como en los extractos, se procedió a la ionización química de estos compuestos y de sus respectivos estándares

sintéticos mediante un espectrómetro de masas Agilent 5973 Network MSD (Agilent Technologies) acoplado a un GC serie 6890 (Agilent Technologies). El gas utilizado para la fragmentación de los diferentes compuestos fue metano a un flujo de 20 mL/min. La columna de GC utilizada fue una HP-5 y el programa el mismo que el empleado en GC-EAD y GC-MS mediante impacto electrónico. Este tipo de ionización es más suave que la anterior lo que permite conocer la masa molecular exacta del compuesto objeto de estudio.

Entre los estándares utilizados, el E2,Z3-18:OH se obtuvo de SEDQ y la mezcla de isómeros de farnesal de Aldrich.

### **6.2.7. Túnel de viento**

Se realizaron cuatro ensayos comportamentales en túnel de viento, dos de ellos se diseñaron de manera que permitiera observar si existía comunicación feromonal a larga distancia y los otros dos, por el contrario para comprobar si era de corto alcance. En los dos primeros se colocó una hembra en un extremo del túnel y un macho en la parte opuesta y se observó el comportamiento manifestado por cada sexo durante un tiempo aproximado de 15 min. En los otros dos experimentos, ambos sexos se pusieron próximos entre sí y se vigiló cada una de las pautas comportamentales durante el mismo tiempo que los ensayos anteriores. Para facilitar la captación de cualquier molécula aromática se introdujo una corriente de aire de aproximadamente 10 cm/seg. Así mismo para mejorar la locomoción de los insectos a lo largo del túnel, se cubrió el suelo con papel de filtro. Las cuatro pruebas se realizaron en condiciones de luz durante una franja horaria entre 13:00-16:00 h. Previamente al comienzo de cada una de las diferentes pruebas, el recinto se limpió con etanol al 70% para eliminar cualquier sustancia contaminante procedente de ensayos anteriores.

### **6.2.8. Estudio de las proteínas antenales expresadas en ambos sexos**

Para el análisis de las proteínas expresadas en las antenas de machos y hembras de *P. archon* se realizaron en primer lugar geles bidimensionales de pH 3-11 NL de 7 cm con el fin de observar la distribución del patrón proteico. Los extractos realizados contenían seis antenas trituradas en un vial eppendorf con ayuda de un pistón en nitrógeno líquido y diluidas en 300 µL de tampón de lisis. El procedimiento seguido para la elaboración de

los diferentes extractos, fue el mismo que el utilizado en el apartado 3.5.1.1.1 del capítulo 3, pág. 34.

Una vez comprobado la distribución total de las proteínas expresadas así como la resolución de los geles de 7 cm, se procedió a elaborar geles de 18 cm de un pH 3-10 al 12,5% de acrilamida. Igualmente el programa de la 1ª dimensión seleccionado, la composición de los geles así como el método de separación de la 2ª dimensión y el de tinción fueron idénticos que los aplicados en los geles realizados con las tres especies de noctuidos estudiadas en el capítulo 5. En *P. archon*, se hicieron un total de ocho geles de cada sexo procedentes de tres extractos antenales diferentes, con el fin de comprobar la reproducibilidad del patrón proteico expresado.

Terminado el análisis comparativo entre todos los geles de los dos sexos, se procedió a recortar, tanto en geles de machos como de hembras, 11 de las manchas localizadas en la zona de bajo peso molecular, alrededor de 20 KDa, comprendida en un rango de pH entre 4 y 6, zona donde normalmente se localizan las OBPs. Posteriormente se digirieron con tripsina y se procedió a hacer un primer análisis por MALDI-TOF MS. Las proteínas que no pudieron ser identificadas mediante esta técnica, se reanalizó el extracto peptídico por LC-MS/MS.

Se efectuó un estudio comparativo no sólo a nivel de sexo sino también a nivel de especie, ya que los geles realizados se compararon con los de la especie *P. brassicae*, utilizada a lo largo de este capítulo como modelo de un lepidóptero de hábitos diurnos. En este caso, una vez se determinó la cantidad de proteínas presentes en las antenas de esta especie, se procedió a elaborar directamente geles de 18 cm. En este caso, los extractos antenales contenían 11-13 antenas trituradas previamente con nitrógeno líquido y un pistón. El polvo resultante se suspendió en 300 µL de tampón de lisis. El procedimiento para la elaboración de los extractos, la separación de las proteínas mediante la 1ª y 2ª dimensión, el porcentaje y composición de los geles así como el método de velado fue idéntico al utilizado en la especie *P. archon*.

En este caso, el número de manchas recortadas fue de 13. Al igual que en *P. archon*, se realizó un primer análisis de los extractos peptídicos resultantes mediante MALDI-TOF MS y las manchas que no pudieron ser identificadas se analizaron por LC-MS/MS.

## 6.3. RESULTADOS

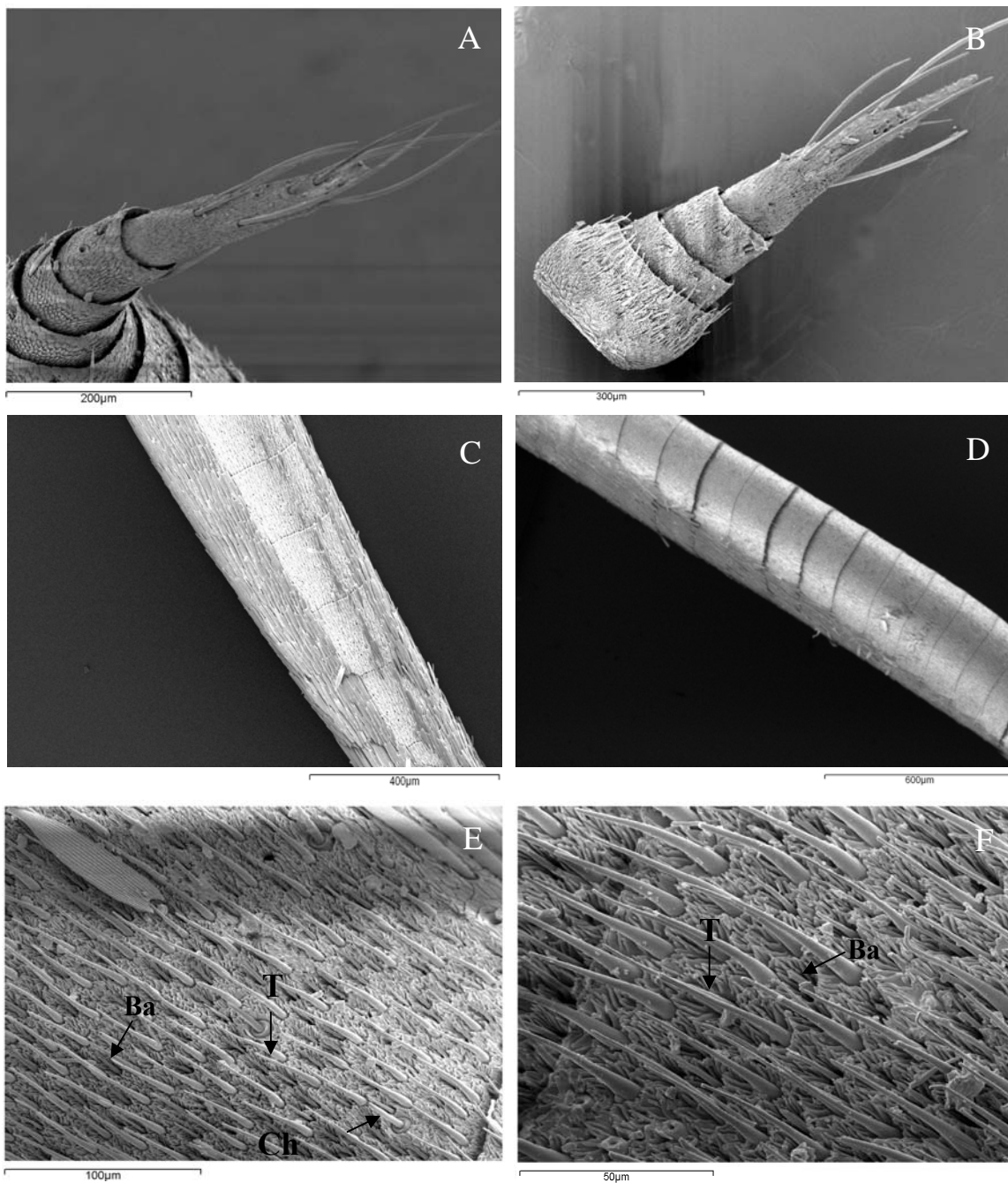
### 6.3.1. Estudio morfológico de la antena mediante SEM

Gracias a la microscopía electrónica de barrido se ha podido apreciar detalles de la antena de *P. archon* apenas distinguibles a simple vista. En su conjunto, la antena apenas muestra diferencias entre sexos, en la zona más distal, la maza, tanto en machos como en hembras, presenta seis sensilas de tipo chaético de gran tamaño (Figuras 6.9 A-B). Seguidamente, la parte ventral que se encuentra expuesta a los diferentes estímulos, está dotada de una rica así como diversa zona sensorial que se extiende a lo largo de la antena (Figuras 6.9 C-D), cada vez con una menor superficie hasta llegar al extremo fijado a la cabeza, parte basal. Esta parte está completamente recubierta por escamas y las sensilas encontradas son básicamente de tipo chaético. Este patrón de escamas y sensilas chaéticas se repite a lo largo de la zona dorsal, contraria a cualquier fuente de estímulos.

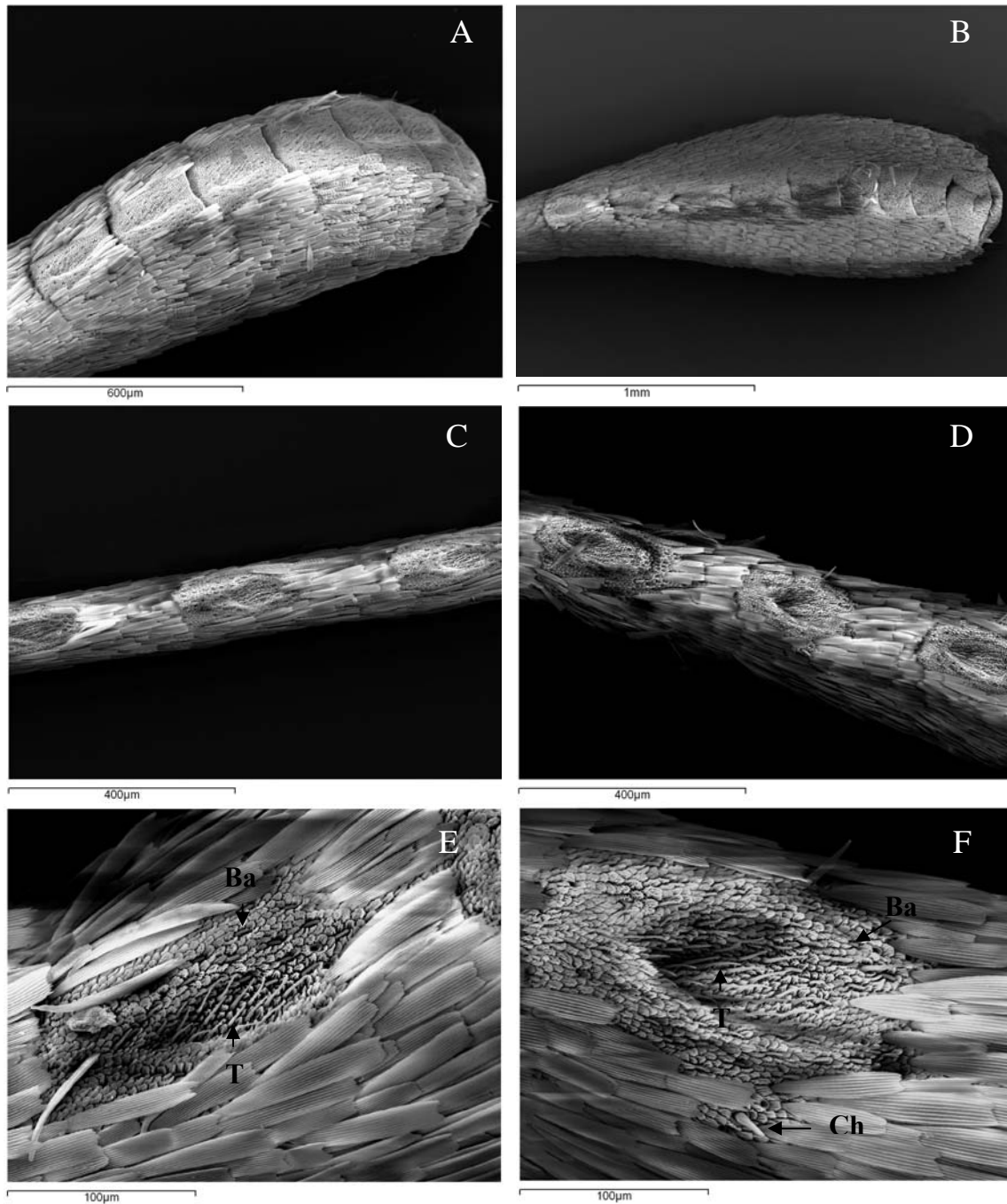
En ambos sexos se han observado cuatro tipos de sensilas, lo cual no descarta la existencia de alguna clase que no se encuentre localizada en el segmento antenal estudiado. De estos cuatro modelos de sensilas, el más abundante es el tipo tricoideo, sensilas, largas y delgadas, con una función olfativa. Estas sensilas se hallan distribuidas por toda la superficie sensorial. Los otros tres tipos de sensilas halladas en esta zona han sido, basicónicas y chaéticas (Figuras 6.9 E-F) y aurículas (Sarto, V., comunicación personal). La distribución de los diferentes tipos es similar en ambos sexos, encontrándose ampliamente repartidas por toda la parte ventral. Así mismo, se han encontrado sensilas de tipo chaético distribuidas entre las escamas de la zona dorsal y final de la antena, estas sensilas parece ser que poseen una función no sólo mecanorreceptora sino que a su vez podrían estar relacionadas con funciones quimiosensoriales de contacto<sup>25</sup>. Respecto a los otros dos tipos de sensilas, basicónicas y aurículas, en un estudio más profundo de las antenas de esta especie se encontró un mayor número de ambas estructuras en las hembras (Sarto, V., comunicación personal). A ambos tipos de sensilas se les atribuye por lo general una función olfativa, relacionada posiblemente con la captación de volátiles de plantas<sup>196, 197</sup>.

La antena de *P. brassicae*, de menor tamaño que la especie anterior, se encuentra igualmente acabada en forma de maza. Al igual que en el resto de lepidópteros estudiados, existen dos zonas claramente diferenciadas, la dorsal rica en escamas y la ventral en sensilas. En esta especie, la zona sensorial va disminuyendo a lo largo de la

antena, hasta quedar reducida a pequeñas zonas sensilares claramente definidas, rodeadas completamente por escamas (Figuras 6.10 A-D), así hasta llegar al extremo fijado a la cabeza. El patrón sensilar hallado en estas zonas se repite en todas las antenas observadas, siendo similar en ambos sexos. Los tipos de sensilas encontrados corresponden a cuatro tipos: tricoidea, basicónica, chaéticas y en menor medida coelocónica (Figuras 6.10 E-F), estos datos coinciden con los estudios realizados por otros autores con anterioridad<sup>198</sup>. En *P. brassicae* así como en *P. archon*, las sensilas tricoideas son de menor tamaño que las observadas en lepidópteros nocturnos.



**Figura 6.9.** Imágenes de SEM de antenas de machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) de adultos de *P. archon*. A-B) Extremo distal de una antena donde se aprecian seis sensilas chaéticas, C-D) Parte antenal central de una antena, en medio se observa la zona sensorial, rodeada a ambos lados por escamas, E-F) Ampliación de la zona sensorial de la parte central de una antena, en la cual se aprecian diferentes tipos sensoriales, T: Sensila tricoidea, Ba: Sensila basicónica, Ch: Sensila chaética.

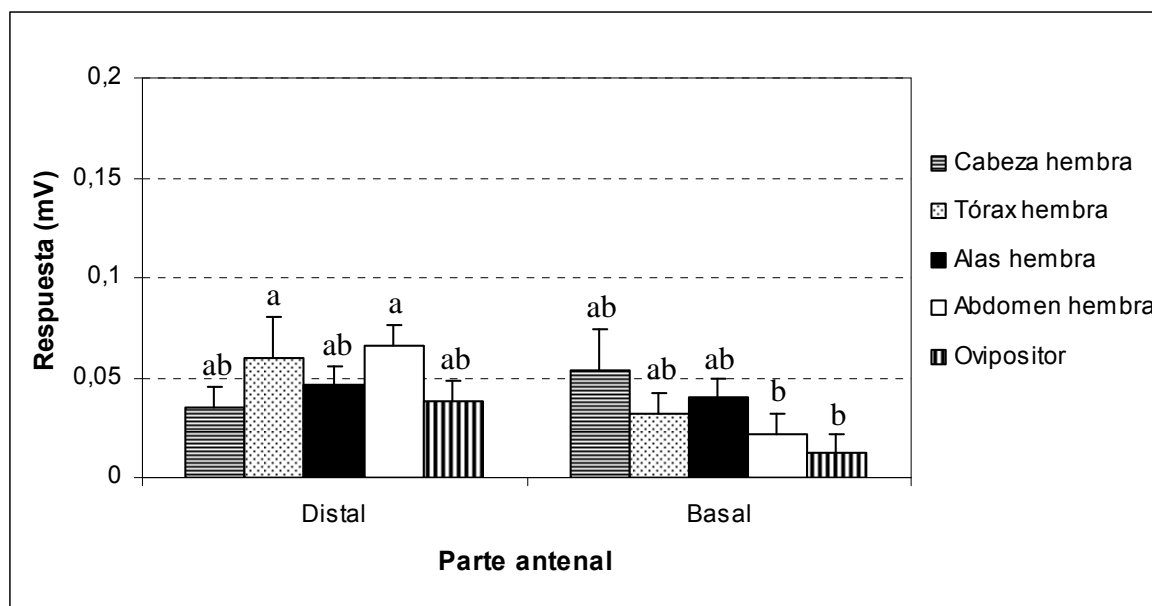


**Figura 6.10.** Imágenes de SEM de antenas de machos (columna izquierda) y hembras (columna derecha) de adultos de *P. brassicae*. A-B) Extremo distal de una antena donde se aprecian la zona central rica en sensilas, rodeada a ambos lados de escamas, C-D) Parte antenal central de una antena, a lo largo de la misma se aprecia cómo la zona sensilar queda reducida a pequeñas zonas del centro completamente rodeadas por escamas, E-F) Ampliación de una zona sensilar de la parte central de una antena, en la cual se aprecian diferentes tipos sensilares; T: Sensila tricoidea, Ba: Sensila basicónica. Ch: Sensila chaética.

## 6.3.2. Análisis de la respuesta antenal mediante bioensayos

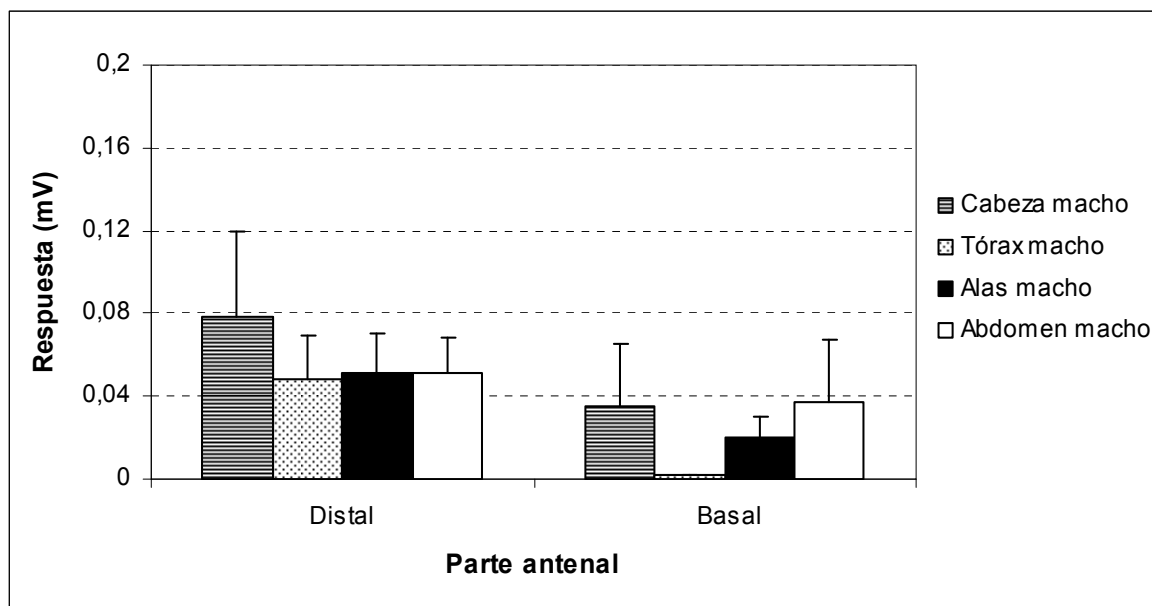
### 6.3.2.1. Electroantenografía

En estudios preliminares en los que se había utilizado extractos de oviposidores de hembra sobre antenas de machos en EAG se observó una respuesta mínima frente a los mismos en las tres partes antenales estimuladas, siendo el extremo distal (la maza) la que ofreció una respuesta más alta ( $0,03 \pm 0,01$  mV) en comparación con el centro y base de la antena. En los ensayos realizados con posterioridad donde se utilizaron diferentes extractos de partes del insecto, tanto de machos como de hembras, como agente estimulante, se observó igualmente que, independientemente del sexo la respuesta era de baja intensidad, por lo general  $< 0,01$  mV. A su vez, no se apreciaron diferencias significativas en la respuesta de ambas partes antenales, distal o basal entre sí ni tampoco frente a los diferentes extractos corporales utilizados como agentes estimulantes (Figuras 6.11 y 12).



**Figura 6.11.** Respuesta en EAG de cinco antenas de diferentes machos de *P. archon* estimulados con extractos de diferentes partes corporales de hembra. Las barras de error corresponden al error típico. Las respuestas antenales con distintas letras son significativamente diferentes (ANOVA; t de Student,  $P < 0,05$ ).

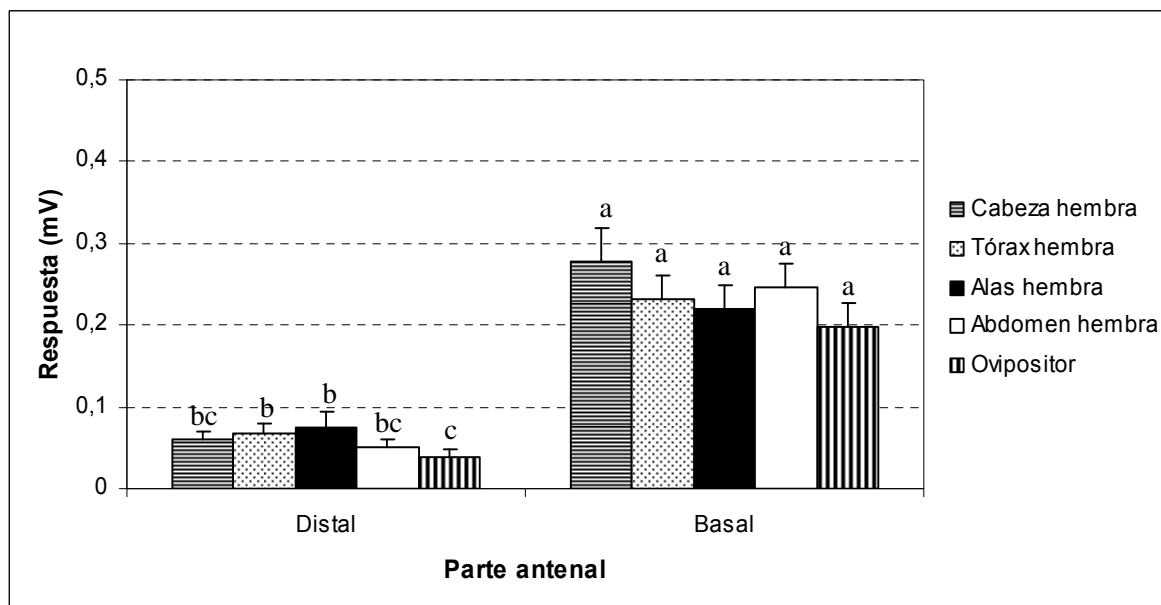




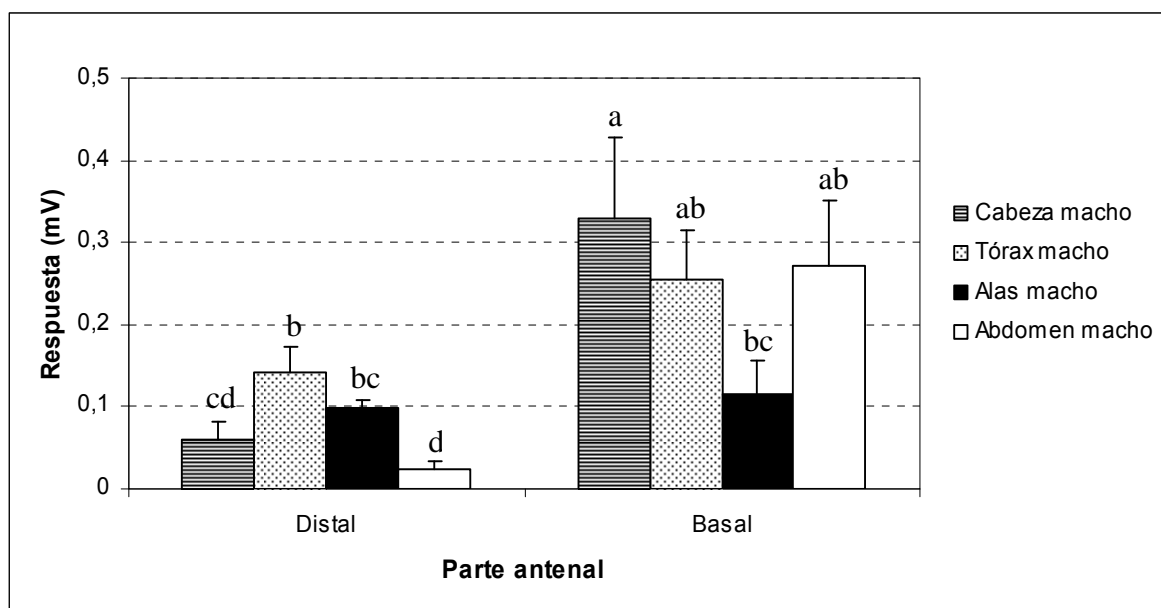
**Figura 6.12.** Respuesta en EAG de 4-8 antenas de diferentes hembras de *P. archon* estimuladas con extractos de diferentes partes corporales de macho. Las barras de error corresponden al error típico. No existen diferencias significativas entre las respuestas antenales (ANOVA; t de Student,  $P < 0,05$ ).

No obstante cabe destacar que los individuos utilizados eran de edad avanzada, entre siete y 23 días, no sujetos a un fotoperiodo natural, es decir, los insectos se encontraban a una temperatura de 8°C hasta el momento de iniciarse las pruebas, sin haberlos sometido previamente a un periodo de aclimatación. Con el fin de comprobar si la baja respuesta adquirida podría deberse a ambos factores, es decir, a la edad del adulto estudiado así como al estado de actividad reducida del insecto como consecuencia de la baja temperatura, en los ensayos realizados con posterioridad, los insectos utilizaron fueron de corta edad, desde recién emergidos a siete días de edad y sometidos a fotoperiodo natural durante varias horas.

En estas condiciones, la respuesta antenal en insectos jóvenes fue diferente entre ambas partes antenales, habiendo una diferencia significativa entre los extremos distal y basal en ambos sexos. La respuesta de la parte distal seguía siendo por lo general  $< 0,1$  mV mientras que el extremo de la antena fijada a la cabeza (basal), mostraba una despolarización de tres a cinco veces mayor que el distal en machos y hasta cuatro veces más intensa en hembras (Figuras 6.13 y 14).



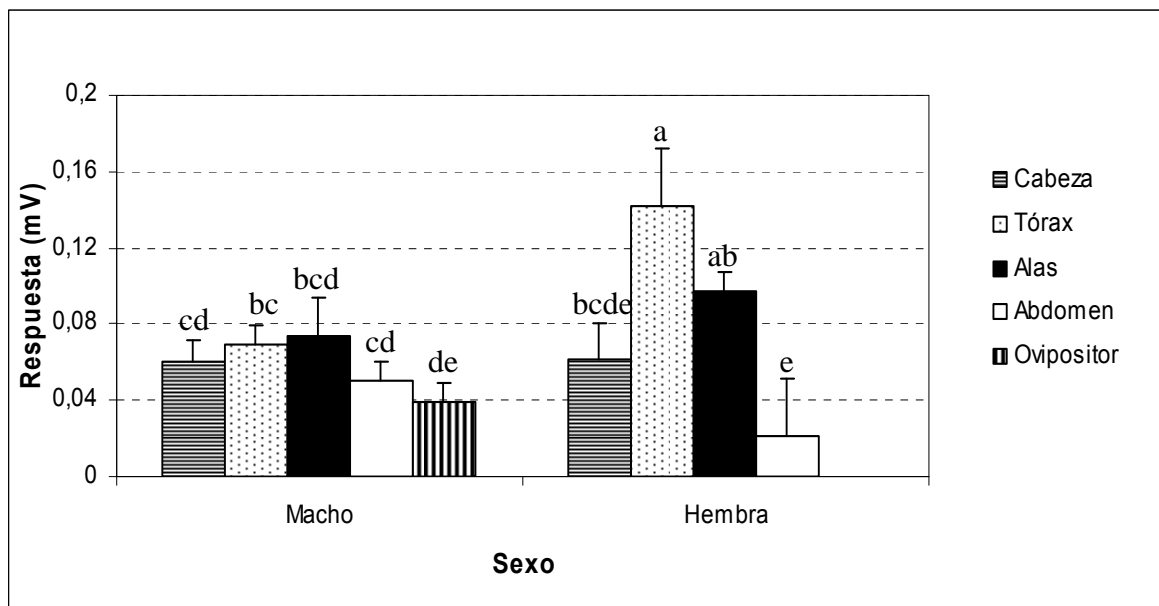
**Figura 6.13.** Respuesta en EAG de 18-30 antenas de diferentes machos de *P. archon* de 0-7 días de edad estimulados con extractos de diferentes partes corporales de hembra. Las barras de error corresponden al error típico. Las respuestas antenales con distintas letras son significativamente diferentes (ANOVA, t de Student,  $P < 0,05$ ).



**Figura 6.14.** Respuesta en EAG de 9-13 antenas de diferentes hembras de *P. archon* de 0-7 días de edad estimuladas con extractos de diferentes partes corporales de macho. Las barras de error corresponden al error típico. Las respuestas antenales con distintas letras son significativamente diferentes (ANOVA, t de Student,  $P < 0,05$ ).

Analizando los resultados adquiridos se observó como la respuesta correspondiente a la zona basal, incrementaba en función del tiempo, siendo máxima frente al último agente estimulante utilizado independientemente del mismo. Por esta razón, sólo se consideró relevante la respuesta ofrecida por la parte antenal distal en ambos sexos.

Por otro lado, la respuesta de la parte antenal distal en machos fue prácticamente similar frente a todos los extractos de las distintas partes corporales de la hembra, siendo especialmente relevante la despolarización de baja magnitud presentada frente al extracto de oviposidores. Por el contrario, en hembras, se apreció una mayor respuesta frente a los extractos correspondientes al tórax y alas de macho, siendo la despolarización frente al primero significativamente diferente frente a los extractos de cabeza y abdomen y aunque similar estadísticamente al de alas, la respuesta obtenida fue ligeramente mayor (Figura 6.15).



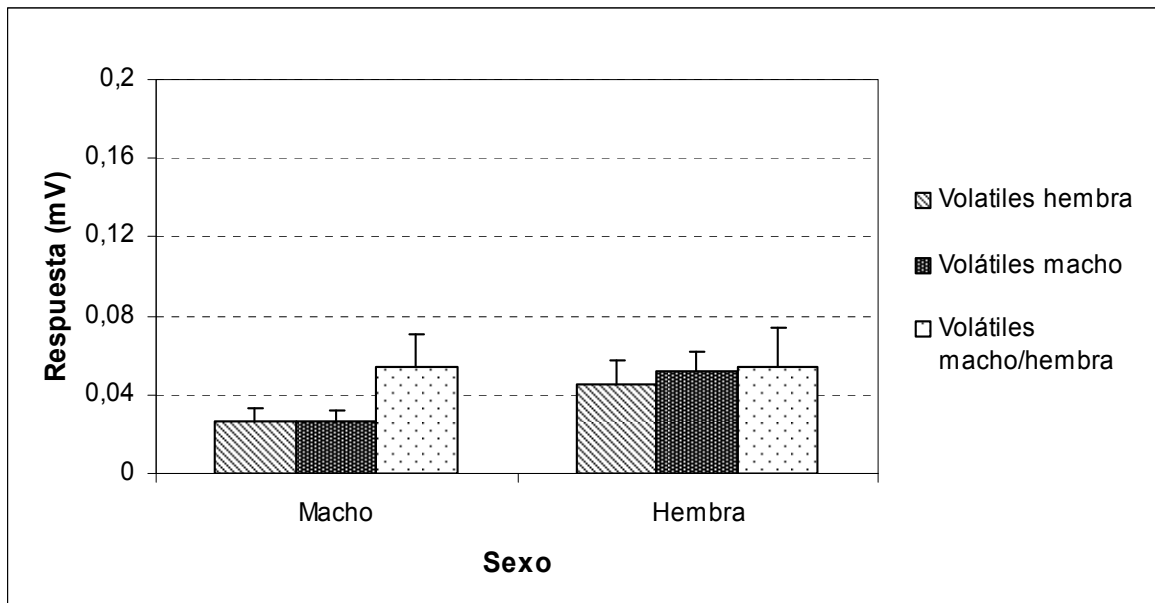
**Figura 6.15.** Respuesta en EAG de 9-30 antenas de diferentes machos y hembras de *P. archon* de 0-7 días de edad estimuladas con extractos de diferentes partes corporales del sexo contrario. Las barras de error corresponden al error típico. Las respuestas antenales con distintas letras son significativamente diferentes (ANOVA, t de Student,  $P < 0,05$ ).

Como consecuencia de la baja respuesta observada en EAG por parte de las antenas de machos frente a los extractos de oviposidores, se realizó un estudio complementario con los volátiles recogidos de hembras mediante la utilización de filtros de carbón activo con el fin de corroborar los resultados adquiridos con anterioridad así como confirmar la inexistencia de una feromona de largo alcance emitida por la hembra.

En un primer ensayo, se utilizaron cuatro antenas de diferentes machos, las cuales se estimularon con los volátiles de hembras recogidos con carbón activo, la respuesta media obtenida en este ensayo fue  $0,04 \pm 0,01$  mV, de igual magnitud que la obtenida en ensayos anteriores tras la estimulación con extracto de oviposidores.

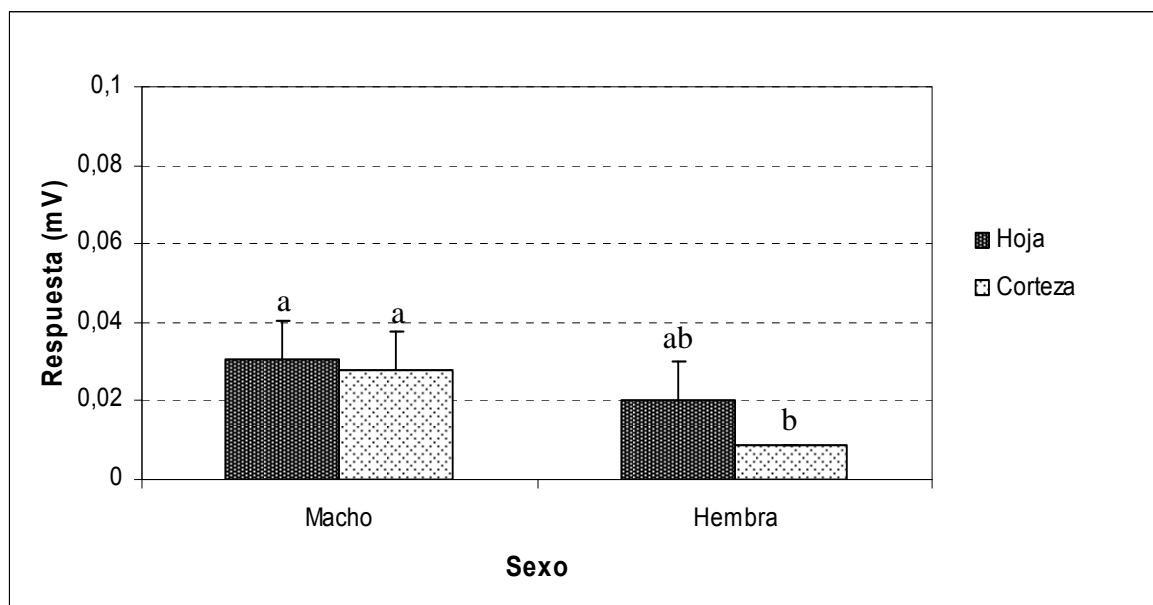
No obstante, debido al desconocimiento de la existencia de algún compuesto atrayente en machos, se procedió a realizar una segunda tanda de ensayos en EAG utilizando como agente estimulante los volátiles extraídos no sólo de hembras, sino también de machos, así como de ambos sexos juntos mediante la extracción con otro tipo de material, como es el Porapak. Con estos experimentos se tenía como fin el comprobar si la respuesta de las hembras continuaba siendo mayor frente a los volátiles emitidos por los machos así como la baja intensidad de la despolarización de las antenas de machos frente a los de hembras.

Tal y como se aprecia en la figura 6.16, la respuesta registrada en antenas de hembras frente a los diferentes volátiles fue ligeramente mayor que en machos aunque no estadísticamente significativa. Así mismo, no se observó ninguna diferencia sobresaliente respecto a ninguno de los extractos en ambos sexos. De estos resultados cabe resaltar la baja respuesta antenal de machos frente a los volátiles extraídos en hembras, de igual magnitud que la observada frente a los volátiles de macho.



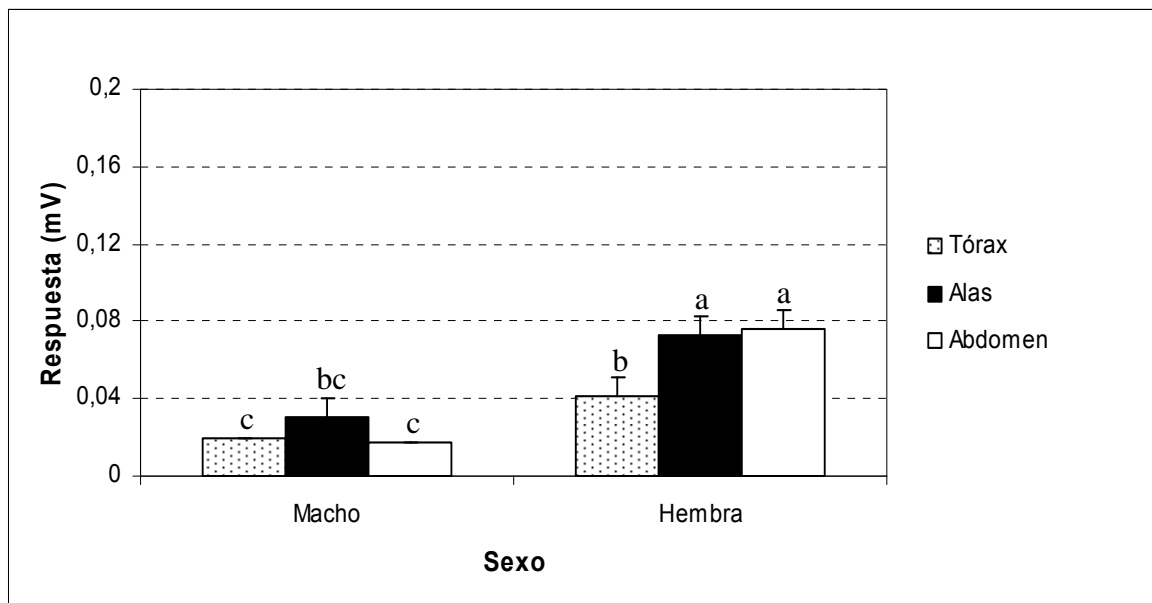
**Figura 6.16.** Respuesta en EAG de 6-11 antenas de diferentes machos y hembras de *P. archon* de 0-7 días de edad estimuladas con volátiles de hembras y machos juntos así como separados. Las barras de error corresponden al error típico. No existen diferencias significativas entre las respuestas antenales (ANOVA; t de Student,  $P < 0,05$ ).

En general, las hembras son las encargadas de encontrar un lugar adecuado para la oviposición utilizando muchas veces para dicho fin factores de tipo químico. Sin embargo en los ensayos de EAG en los que se utilizaron extractos de hoja y corteza de una planta hospedadora, *C. humilis*, como agente estimulante, se observó que la respuesta de las hembras frente a los diferentes extractos fue generalmente de menor magnitud que la del sexo opuesto aunque sin diferencias significativas cuando se estimularon con extractos de hojas (Figura 6.17). De estos resultados cabe resaltar una menor respuesta general por parte de las hembras frente a los extractos de palmera en comparación con la observada ante algunos extractos corporales del sexo contrario.



**Figura 6.17.** Respuesta en EAG de 8-16 antenas de diferentes machos y hembras de *P. archon* de 0-7 días de edad estimuladas con extractos de hojas y corteza de *C. humilis*. Las barras de error corresponden al error típico. Las respuestas antenales con distintas letras son significativamente diferentes (ANOVA, t de Student,  $P < 0,05$ ).

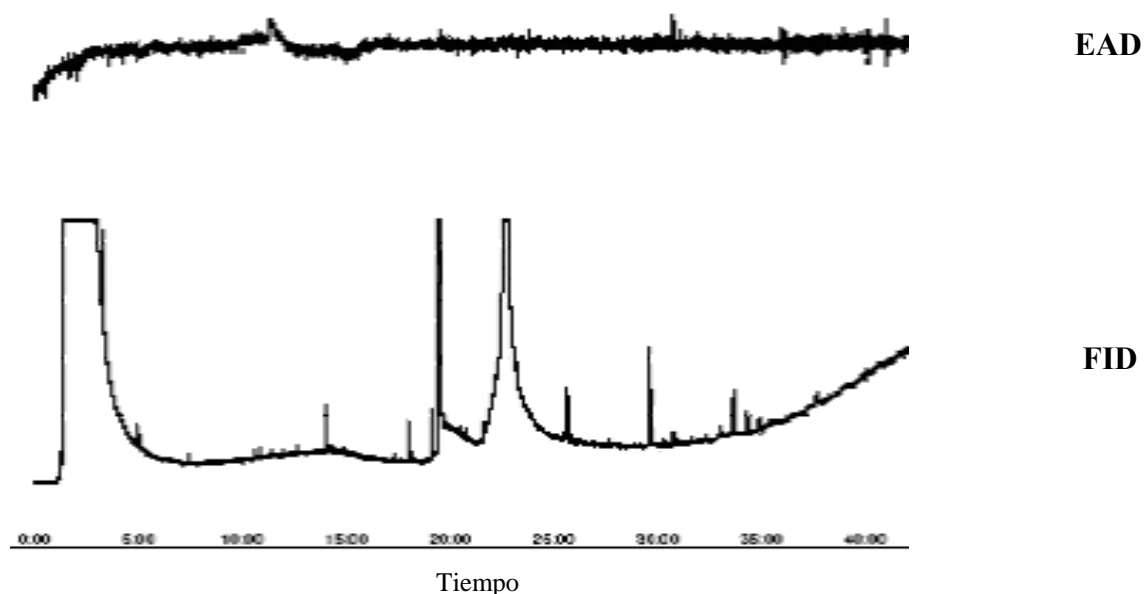
Por otro lado, los resultados obtenidos con antenas de machos y hembras de *P. brassicae* se asemejan a los observados en *P. archon*. Por lo general la despolarización es de baja magnitud,  $< 0,1$  mV, además, tal y como se observa en la figura 6.18 la intensidad de la respuesta de la antena de hembra es mayor que la del macho, al igual que en *P. archon*. No obstante, a pesar de que se conoce que los machos de la familia Pieridae emiten sustancias atrayentes por las alas<sup>199</sup>, en este caso, no se observaron diferencias significativas en la respuesta antenal de hembras frente a los extractos provenientes del abdomen y alas de macho.



**Figura 6.18.** Respuesta en EAG de 5-10 antenas de diferentes machos y hembras de *P. brassicae* estimuladas con extractos del sexo contrario. Las barras de error corresponden al error típico. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, t de Student, P < 0,05).

### 6.3.2.2. GC-EAD

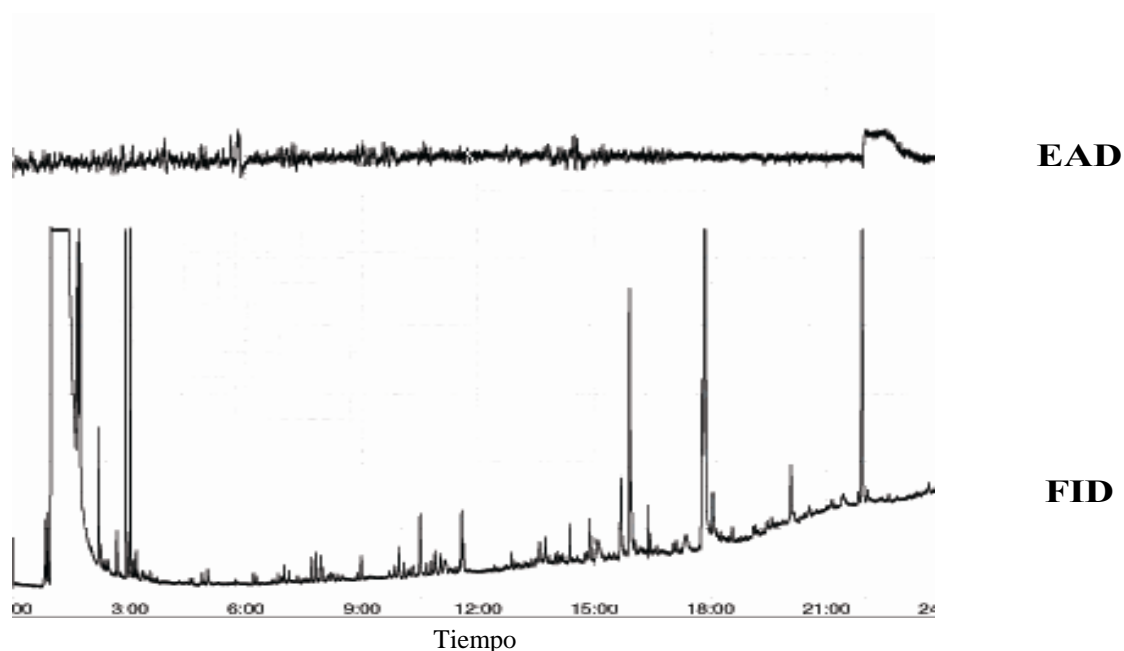
Los primeros ensayos realizados en GC-EAD con insectos de edad avanzada que no habían sido aclimatados dieron resultados negativos. No se observó respuesta de ninguno de los dos sexos frente a los diversos extractos del sexo contrario utilizados. En la figura 6.19 se puede observar uno de los registros de GC-EAD de una antena de macho estimulada con un extracto de tres oviposidores de hembras. El registro muestra una ausencia total de respuesta activa frente a cualquiera de los compuestos encontrados en dicho extracto.



**Figura 6.19.** Registro de GC-EAD de una antena de macho de *P. archon* utilizando como agente estimulante un extracto de tres oviposidores.

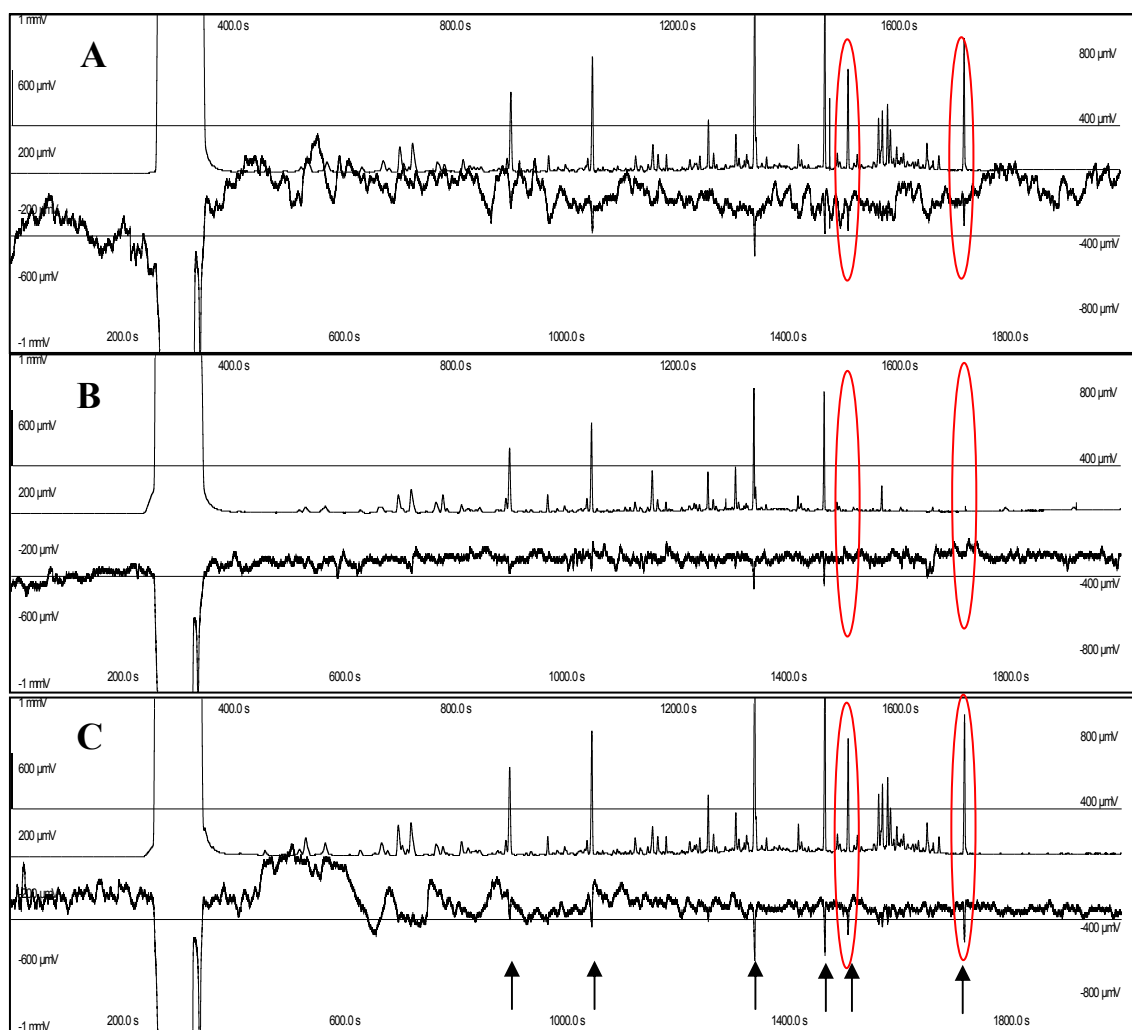
La falta de respuesta antenal observada, al igual que en EAG, pudo ser debida al estado físico de los adultos así como la poca sensibilidad de la técnica, que sin embargo es idónea para observar la respuesta de lepidópteros típicamente nocturnos cuya respuesta antenal frente a la mezcla feromonal es de alta intensidad. Sin embargo, a pesar de una mejor visualización de la parte del FID, como consecuencia de la instalación de un nuevo cromatógrafo, así como la utilización de insectos más jóvenes a la par de aclimatados, la parte correspondiente al EAG continuó sin mostrar ninguna respuesta apreciable cuando se utilizó como agente estimulante los volátiles de hembras recogidos mediante filtros de carbón activo frente a antenas de machos (Figura 6.20).



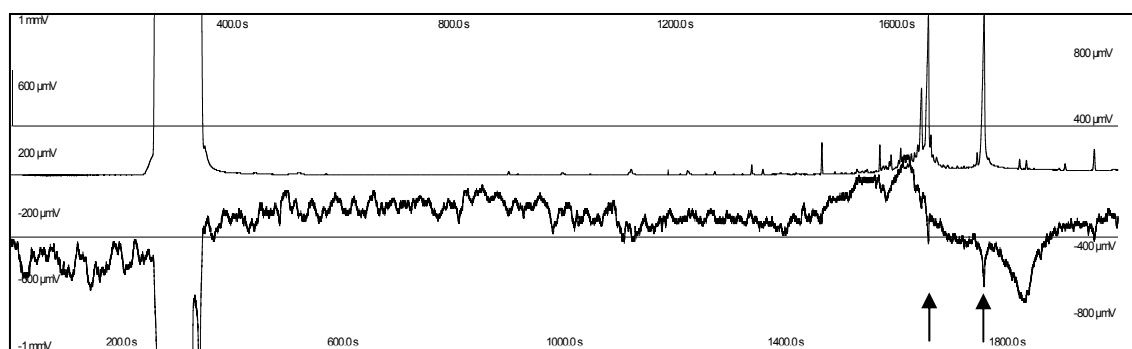


**Figura 6.20.** Registro de GC-EAD de una antena de macho de *P. archon* frente a los volátiles extraídos de cuatro hembras mediante filtros de carbón activo.

Finalmente la modificación del aparato de captación de señal así como el software del EAG (descritos en el apartado 3.3.2.1) permitió cambiar la escala de la respuesta antenal adquirida, pudiendo observar de esta forma cualquier mínima despolarización. Esta mejora de la técnica permitió al fin discernir una pequeña despolarización antenal frente a varios de los compuestos hallados en algunos extractos. Al estudiar la respuesta antenal de machos frente a los volátiles extraídos de machos y hembras mediante filtros de porapak se pudo observar seis despolarizaciones de baja intensidad coincidente con seis picos diferentes de la parte correspondiente al GC. Comparando los registros de GC-EAD correspondientes a los volátiles emitidos de hembras y machos por separados, cuatro de los seis picos activos coincidían entre sí, pero había dos, frente a los cuales el macho presentaba cierta respuesta, que se encontraban únicamente en los volátiles de machos y no de hembras (Figura 6.21). Por otro lado, se observaron dos pequeñas despolarizaciones frente a los dos picos de mayor intensidad hallados en los extractos de ovipositor de hembra (Figura 6.22).

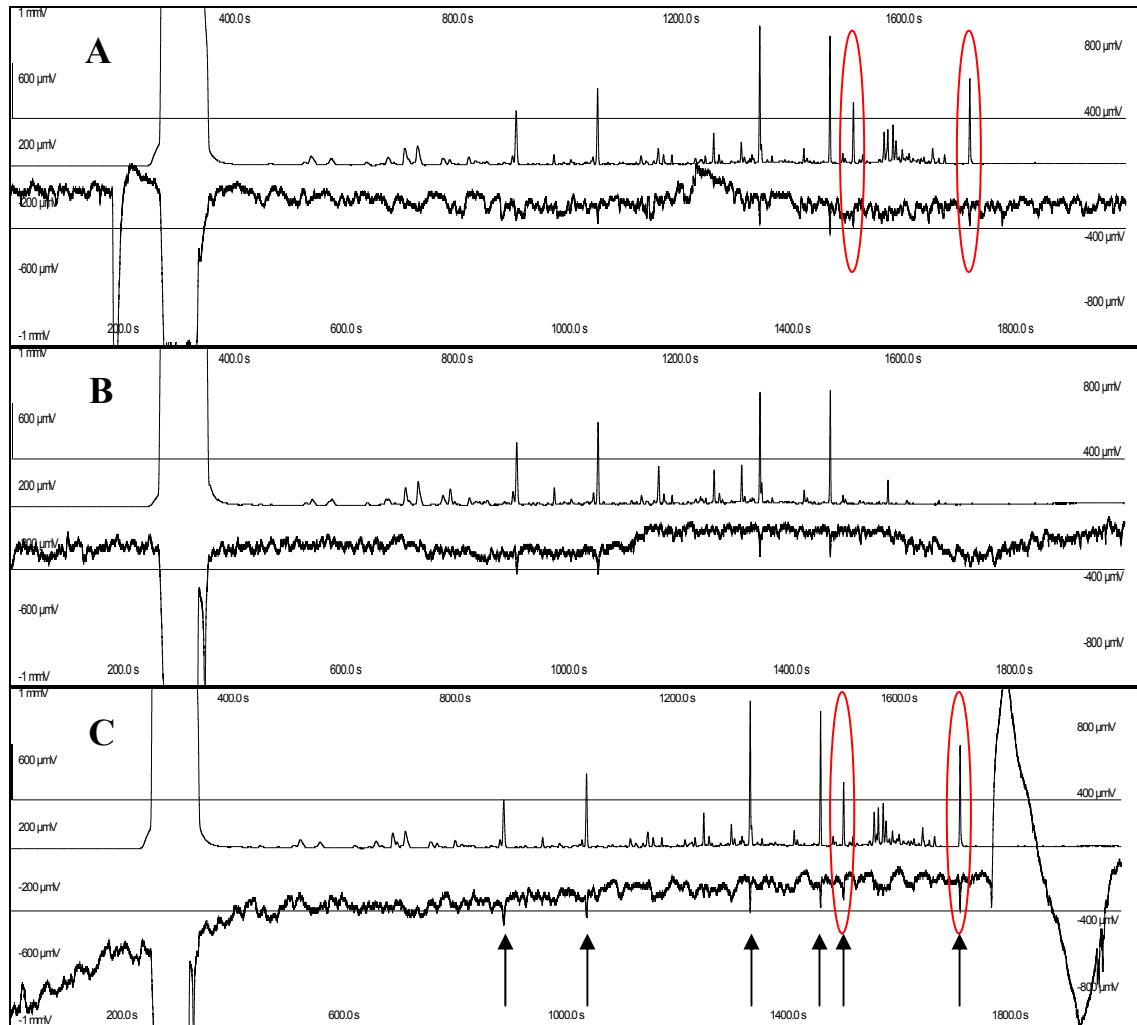


**Figura 6.21.** Registros de GC-EAD de tres antenas de machos de *P. archon* frente a volátiles recogidos con filtros de Porapak emitidos por: A) macho y hembra juntos, B) hembra, C) macho. Con una elipse se indican los compuestos emitidos por machos, no encontrados en los volátiles de hembras y con una flecha negra aquellos picos del cromatograma capaces de provocar una respuesta antenal.



**Figura 6.22.** Registro de GC-EAD de una antena de macho de *P. archon* frente a un extracto de ovipositor de hembra. Indicados con flechas se señalan los dos picos desencadenantes de una respuesta en la antena de macho.

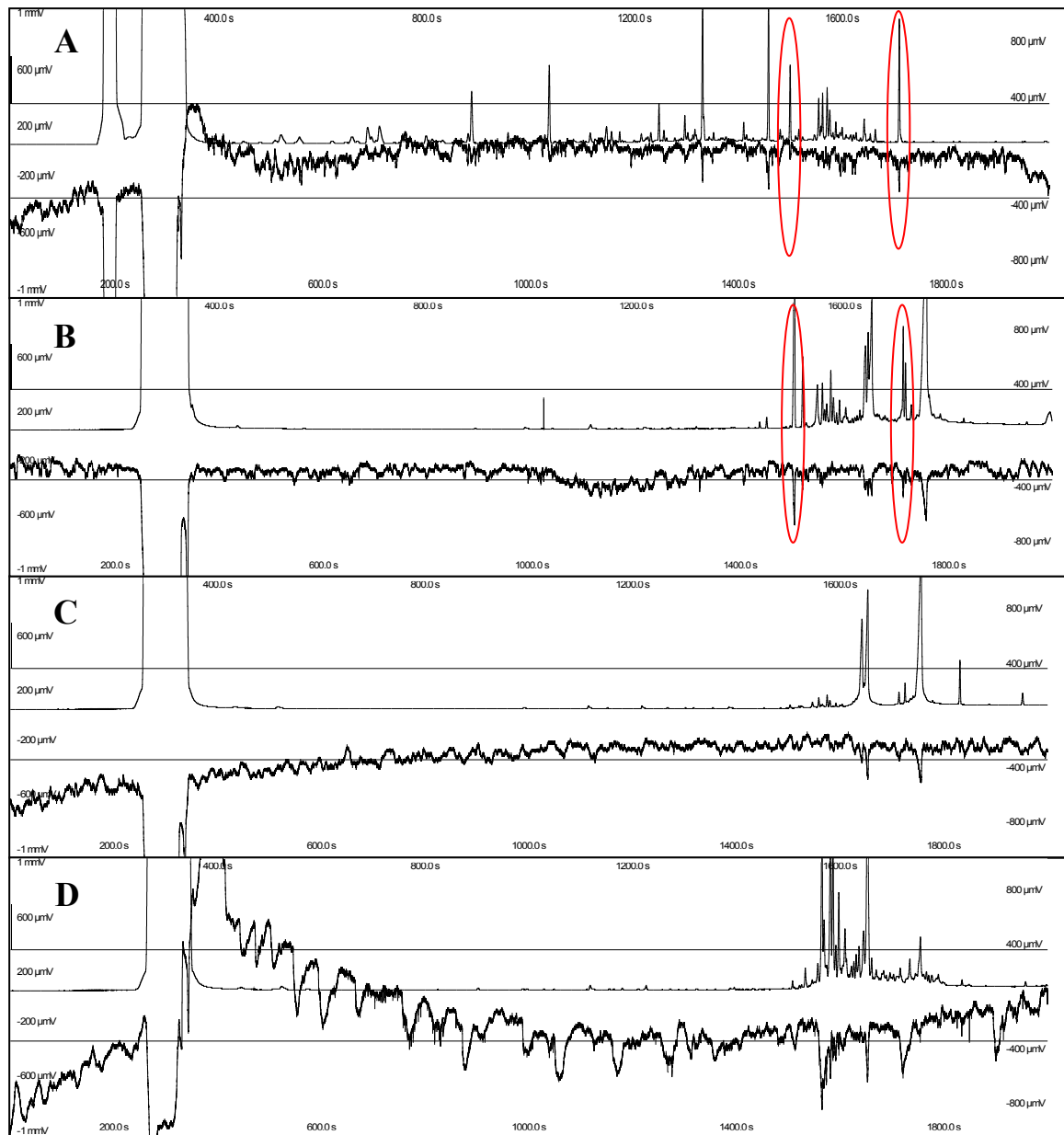
Igualmente, en las pruebas realizadas con antenas de hembras frente a volátiles de ambos sexos, se advirtieron seis respuestas coincidentes con seis picos diferentes del cromatograma, los mismos que los observados en los machos (Figura 6.23).



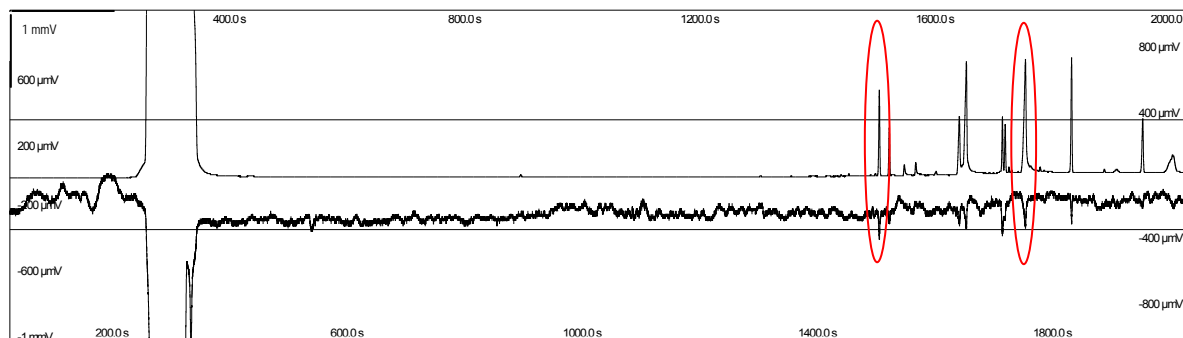
**Figura 6.23.** Registros de GC-EAD de tres antenas de hembras de *P. archon* frente a los volátiles recogidos con filtros de Porapak emitidos por: A) macho y hembra juntos, B) hembra, C) macho. Con una elipse se indican los compuestos emitidos por machos, no encontrados en los volátiles de hembras y con flechas se señalan los picos del cromatograma capaces de provocar una respuesta antenal.

Con el fin de determinar qué parte corporal del macho era responsable de la emisión de dichos compuestos, se estudió la respuesta de antenas de diferentes hembras frente a distintos extractos de tórax, alas y abdomen de machos, que como se comentó con anterioridad son responsables generalmente de la emisión de sustancias químicas para el reconocimiento intraespecífico. Una vez analizados los diferentes registros, se observaron varias respuestas frente a diversos compuestos hallados en los tres extractos, aunque sólo en el correspondiente a las alas de macho podía apreciarse los dos picos encontrados en los volátiles de machos y ausentes en los de hembras (Figura 6. 24).

A su vez, de acuerdo a los registros de GC-EAD realizados con antenas de machos se pudo observar cómo los machos eran capaces de responder no sólo a los dos picos hallados en los volátiles de machos, sino también a estos mismos compuestos presentes en los extractos de alas de insectos del mismo sexo (Figura 6.25).



**Figura 6.24.** Registros de GC-EAD de cuatro antenas de hembras de *P. archon* frente a: A) volátiles de macho, B) alas de macho, C) tórax de macho, D) abdomen de macho. Con una elipse se indican los compuestos emitidos por machos, no encontrados en los volátiles de hembras.



**Figura 6.25.** Registro de GC-EAD de una antena de macho de *P. archon* frente a un extracto de alas de macho. Indicados con una elipse roja se señalan los dos picos encontrados en los volátiles de macho que a su vez son desencadenantes de una respuesta antenal.

### 6.3.2.3. Túnel de viento

En ninguno de los cuatro ensayos realizados, se pudo visualizar ninguna pauta de comportamiento decisiva que permitiera la elucidación del tipo de comunicación química empleada en esta especie. Los insectos permanecieron inmóviles la mayor parte del tiempo, pudiéndose apreciar tan sólo un acercamiento de un macho a una hembra congénere, pero sin exponer ninguna muestra de atracción y por supuesto ningún intento de cópula.

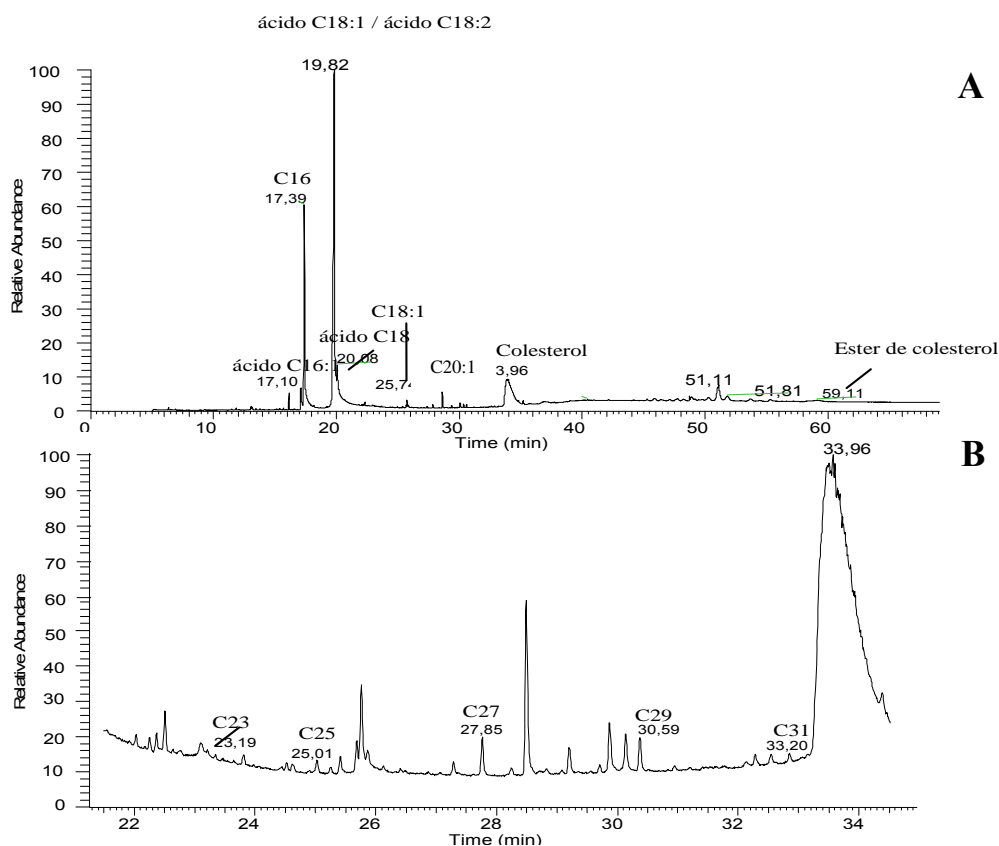
### 6.3.3. GC-MS

Debido a la presencia, en los diversos extractos, de varios picos capaces de desencadenar más de una respuesta en las antenas de ambos sexos en GC-EAD y la ausencia de una despolarización de mayor intensidad frente a los dos picos únicamente encontrados en los volátiles y alas de macho, se procedió al análisis posterior de cada uno de estos compuestos mediante espectrometría de masas.

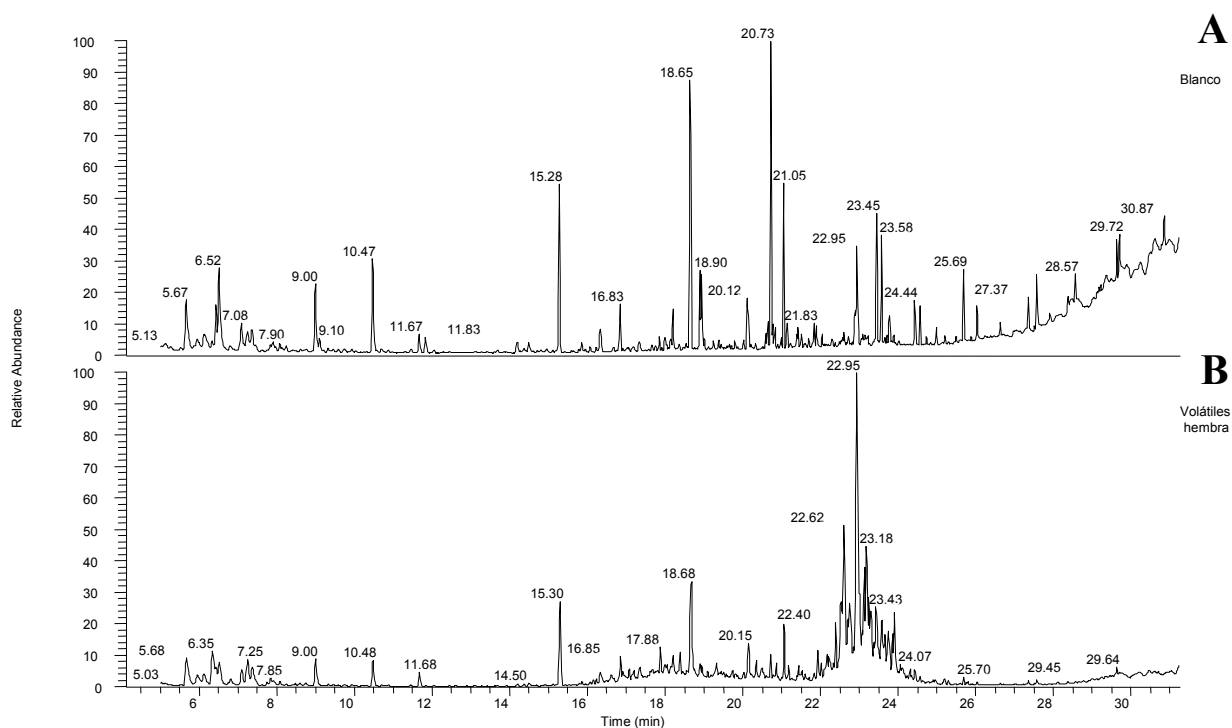
### 6.3.3.1. Análisis de las sustancias químicas emitida por la hembra

Para confirmar la ausencia de una feromona sintetizada y emitida por parte de la hembra se analizaron en primer lugar los extractos de oviposidores así como los volátiles de hembras extraídos mediante filtros de carbón activo. En ningún caso se encontraron componentes feromonales. Los compuestos hallados en los extractos de oviposidores fueron ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, saturados o con 1 ó 2 insaturaciones, hidrocarburos de cadena larga:tricosano ( $C_{23}$ ), pentacosano ( $C_{25}$ ), heptacosano ( $C_{27}$ ), nonacosano ( $C_{29}$ ) y hentriacontano ( $C_{31}$ ) así como colesterol y ésteres de colesterol (Figura 6.26). Resultados similares se hallaron en otra especie de la misma familia, *Castnia licus*, en la cual, además de ácidos grasos ( $C_{16}$ - $C_{18}$ ), se encontraron hidrocarburos de 21 a 31 carbonos<sup>200</sup>.

Respecto a los volátiles obtenidos mediante carbón activo, al compararse los cromatogramas resultantes de los volátiles de cuatro hembras con un blanco realizado bajo las mismas condiciones, apenas se encontraron diferencias entre los mismos, los picos que se observan en el cromatograma de los volátiles, no apreciables en el blanco, se tratan básicamente de contaminaciones (Figura 6.27).



**Figura 6.26.** Cromatogramas correspondientes a un extracto de 3 ovipositores de *P. archon* en hexano. A) Imagen del cromatograma completo, B) Ampliación de la zona comprendida entre 21-35 min del cromatograma.



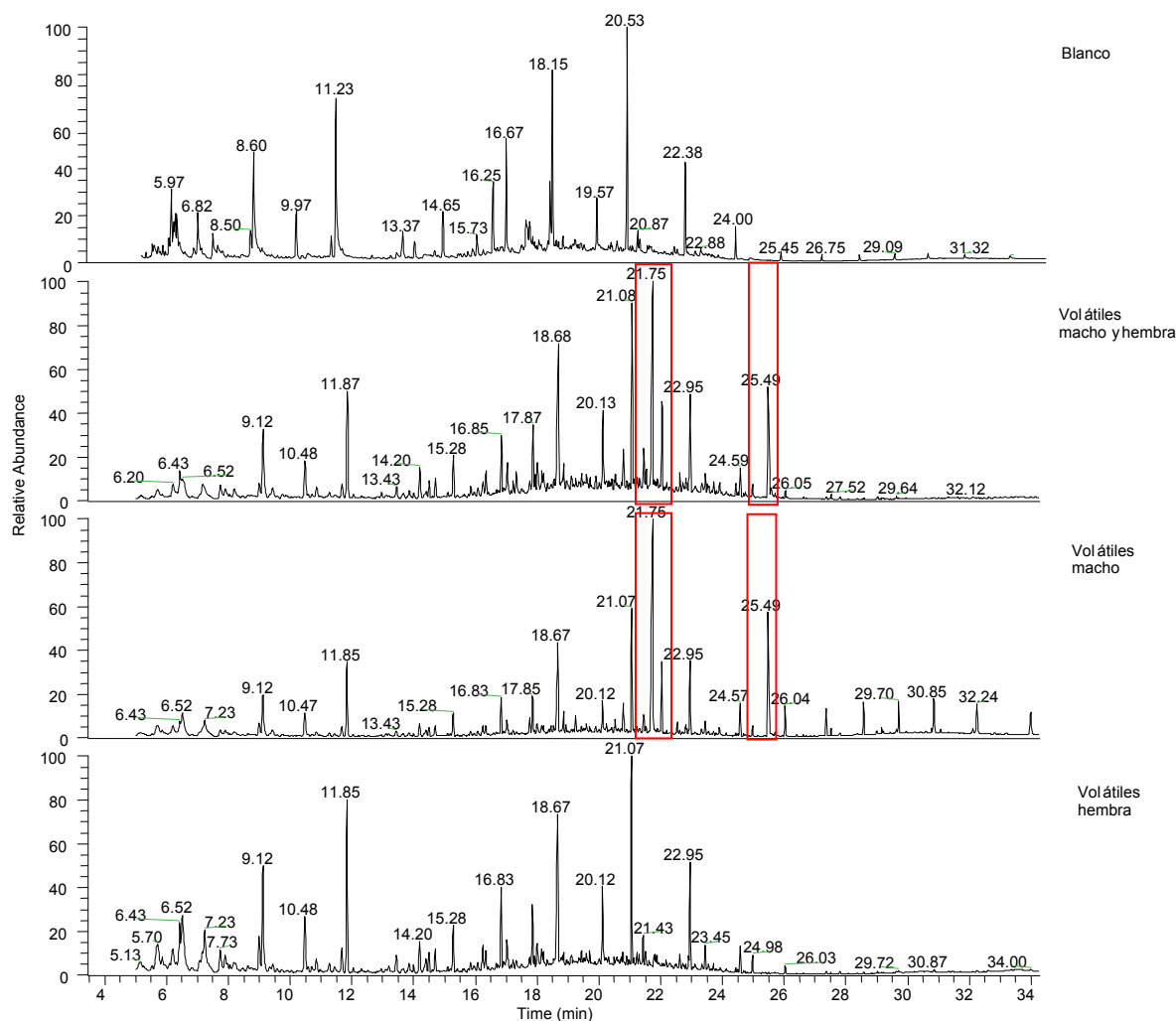
**Figura 6.27.** Cromatogramas de volátiles recogidos por filtros de carbón activo. A) Blanco, B) Volátiles de cuatro hembras de *P. archon*.



### 6.3.3.2. Análisis de las sustancias químicas emitidas por el macho

Ante la ausencia de un posible compuesto feromonal en las hembras, se procedió a analizar en GC-MS los distintos volátiles recogidos en ambos sexos por separado así como juntos por medio de filtros de porapak, comparando los cromatogramas resultantes con los del blanco realizado en las mismas condiciones.

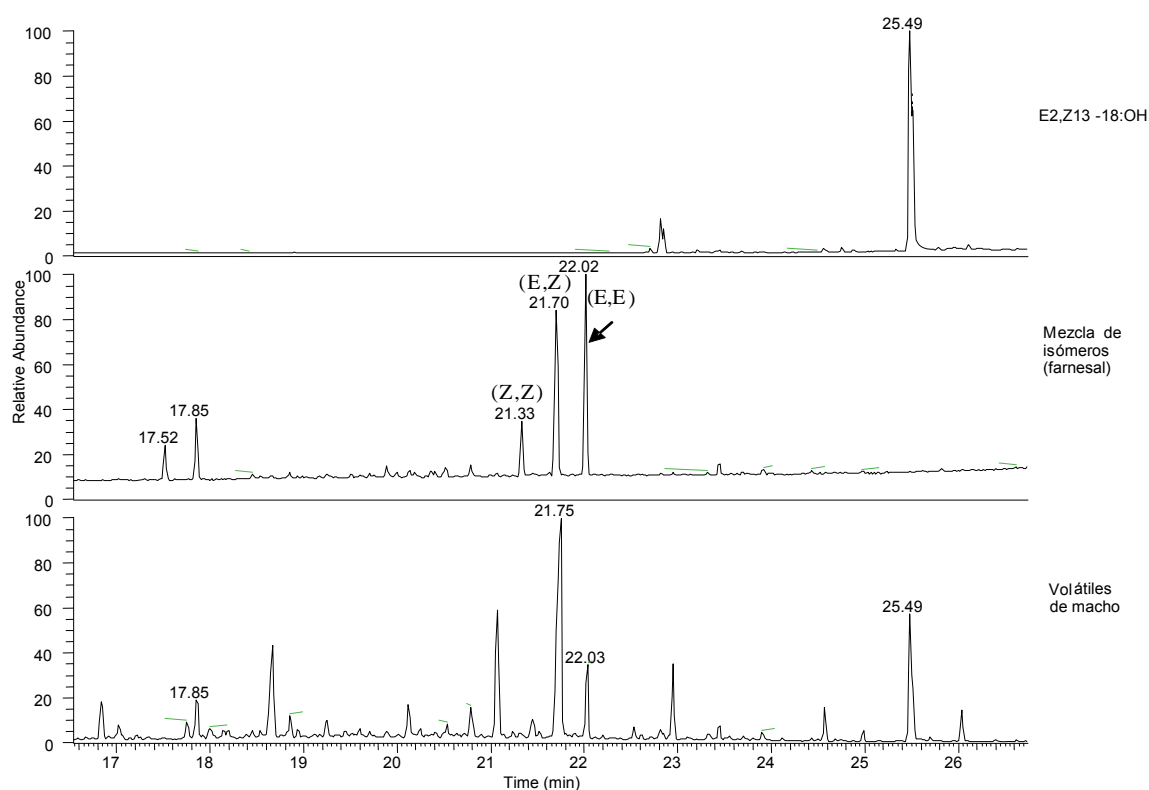
Tal y como se había observado en los ensayos de GC-EAD, al comparar los distintos cromatogramas entre sí, se observó más de un pico en los volátiles emitidos cuando los dos sexos estaban juntos así como por los machos individualmente que no se apreciaban en los de las hembras, pero en este caso gracias a la mayor sensibilidad del equipo de GC-MS se observaron tres picos en vez de dos (Figura 6.28). Por otro lado, los cuatro picos que desencadenaron respuesta en GC-EAD en machos y hembras, es decir, los correspondientes a los tiempos de retención 9.12, 11.87, 18.68 y 21.08 en los cromatogramas de volátiles se encontraron igualmente en el blanco así como en los volátiles de hembras. Comparando los espectros de masas se observó que poseían el mismo patrón de fragmentación. El pico con el tiempo de retención 9.12 correspondía al nonanal, el 11.87 al decanal y los compuestos en los minutos 18.68 y 21.08 se identificaron como ciclopolsiloxanos, pudiendo tratarse de una contaminación del sistema de recogida o del mismo material de los filtros, en este caso, porapak; donde cetonas aromáticas, alcoholes así como otros artefactos se han identificado de eluciones con solventes de este material<sup>201</sup>.



**Figura 6.28.** Cromatogramas de los volátiles recogidos de ambos sexos por separado así como de adultos juntos de *P. archon*. Los tiempos de retención del cromatograma correspondiente al blanco difieren ligeramente del resto ya que éstos fueron inyectados en días diferentes. En rojo aparecen señalados los tres picos encontrados únicamente en los volátiles de macho así como macho y hembras juntos.

De los tres picos encontrados en los volátiles de machos así como en macho y hembra juntos, el espectro de masas perteneciente al pico con el tiempo de retención 21.75 se asemejaba al compuesto (*E,Z*)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienal, comúnmente conocido como *E,Z*-farnesal. El correspondiente al minuto 22.95 coincidía en gran medida con el compuesto (*E,E*)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienal, es decir el farnesal con isomería *E,E*, finalmente el pico con un tiempo de retención de 25.49 presentaba un espectro de masas similar al (*E,Z*)-2,13-octadecadienol. Este último compuesto, aparecía en la gran mayoría de volátiles de machos solos así como junto a hembras, aunque la proporción del mismo era muy variable.

Una vez comparados los espectros de masas de los tres picos con los de estándares sintéticos correspondientes a una mezcla de isómeros de farnesal, *Z,Z*, *E,Z* y *E,E* y el compuesto *E2,Z13-18:OH*, se observó que tanto los tiempos de retención como los espectros de masas seguían siendo altamente similares salvo el correspondiente al tiempo de retención 21.70 (Figura 6.29), ya que el espectro de masas no era completamente coincidente con el estándar *E,Z*-farnesal, por ello, se comparó con otros isómeros encontrados en la bibliografía<sup>202</sup>, resultando ser el isómero *Z,E*-farnesal. Tal y como se muestra en la figura 6.30 los espectros de masas de los tres picos de los volátiles de machos coinciden con los del *Z,E*-farnesal, *E,E*-farnesal y *E2,Z13-18:OH*. Igualmente, el patrón de fragmentación mediante ionización química de los estándares y los tres compuestos coincidieron entre sí.



**Figura 6.29.** Cromatogramas de estándares sintéticos y volátiles de un macho de *P. archon* recogidos durante 48 horas.

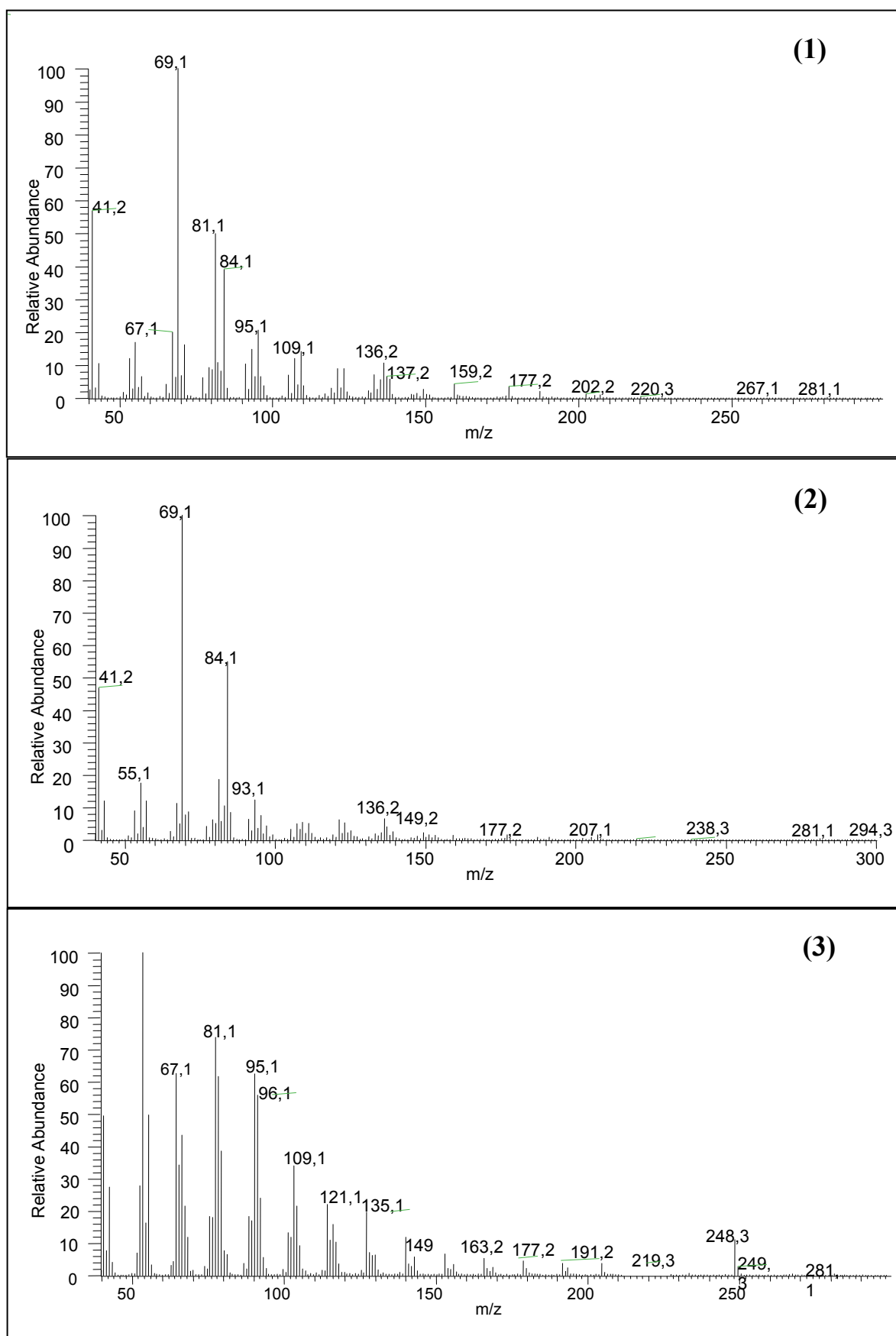
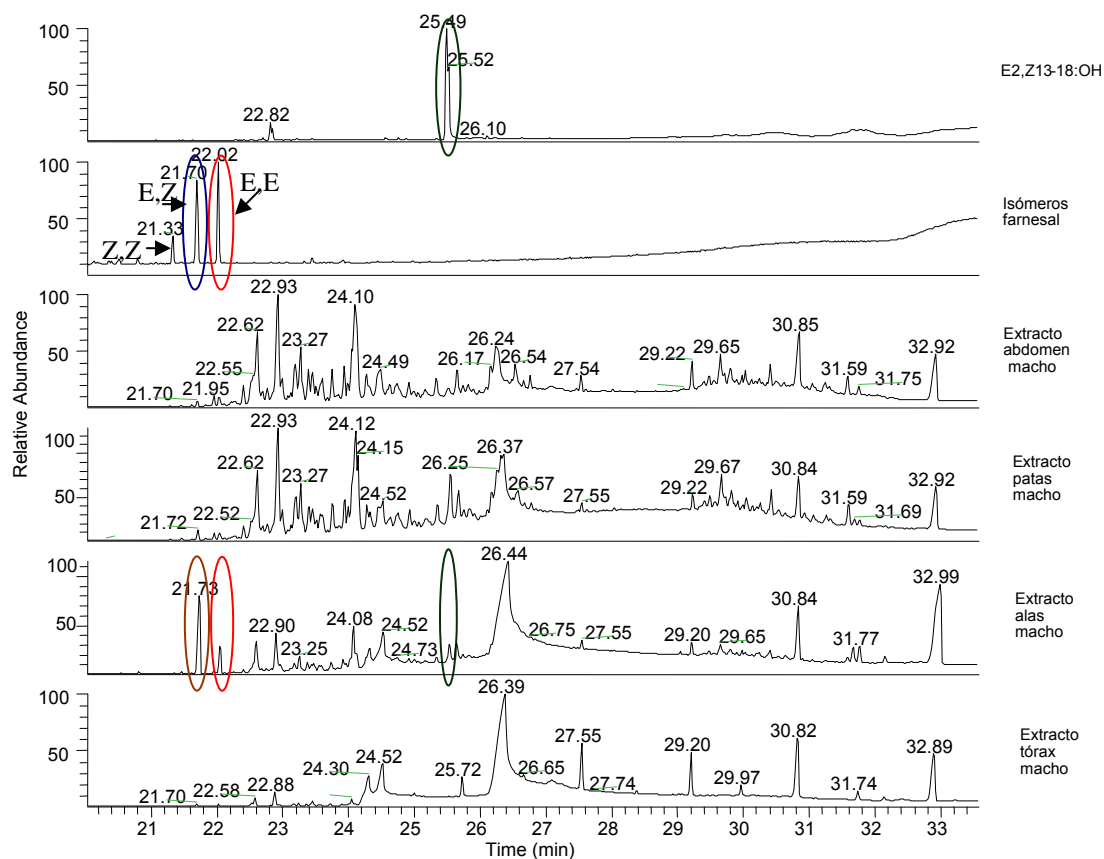


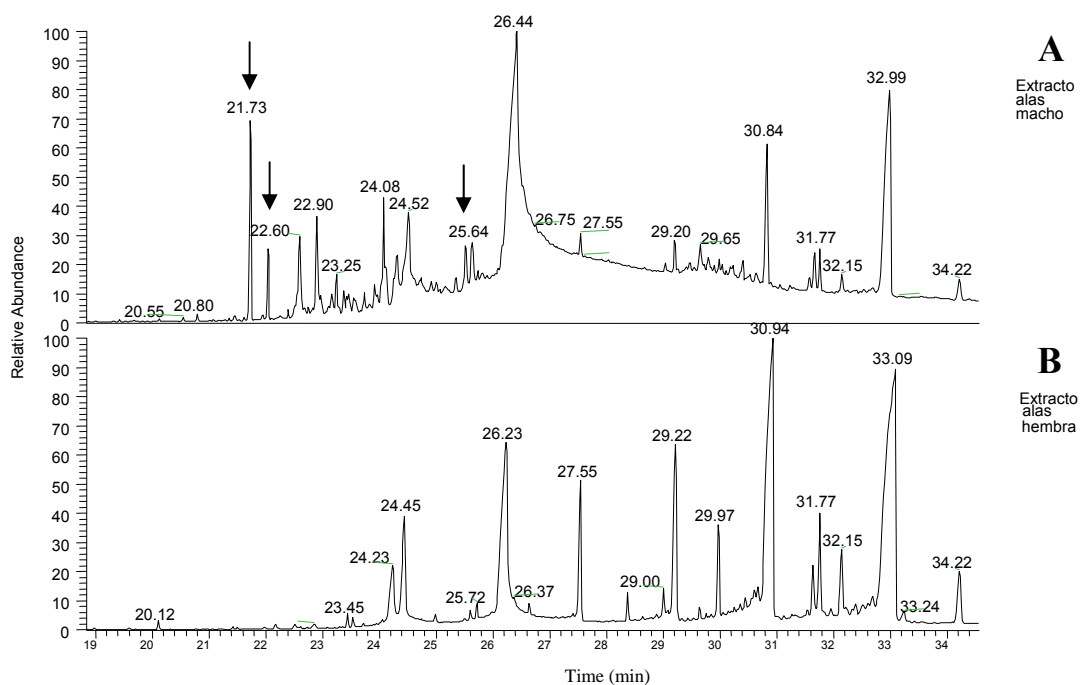
Figura 6.30. Espectros de masas del (1) *Z,E*-farnesal, (2) *E,E*-farnesal y (3) *E2,Z13-18:OH*.

Los ensayos realizados en GC-EAD permitieron determinar qué la parte corporal de los machos encargada de la emisión de dos de los compuestos encontrados en los volátiles, eran las alas, sin embargo no pudo distinguirse el tercer compuesto hallado en los cromatogramas anteriores, el correspondiente al *E,E*-farnesal. Por esta razón, se analizaron diversos extractos no sólo de las alas sino también de tórax, patas y abdomen del macho para confirmar la presencia o ausencia de este último compuesto en alguna de las otras partes corporales. En la figura 6.31 se observa la presencia de los tres compuestos casi exclusivamente en las alas de machos. La aparición de los picos de pequeño tamaño equivalentes a los dos isómeros del farnesal en el resto de extractos podría ser debido a una contaminación por parte de las alas al resto del cuerpo.

Igualmente, tras la comparación de los distintos extractos corporales de machos con los correspondientes a las hembras, sólo se hallaron diferencias en los extractos de alas, donde se apreció en las hembras una ausencia de los tres compuestos encontrados en machos (Figura 6.32).



**Figura 6.31.** Cromatogramas de los extractos de abdomen, patas, alas y tórax de macho, comparados con cuatro patrones;  $E_2,Z_{13-18}:OH$  y  $(Z,Z)$ ,  $(E,Z)$  y  $(E,E)$ -farnesal.

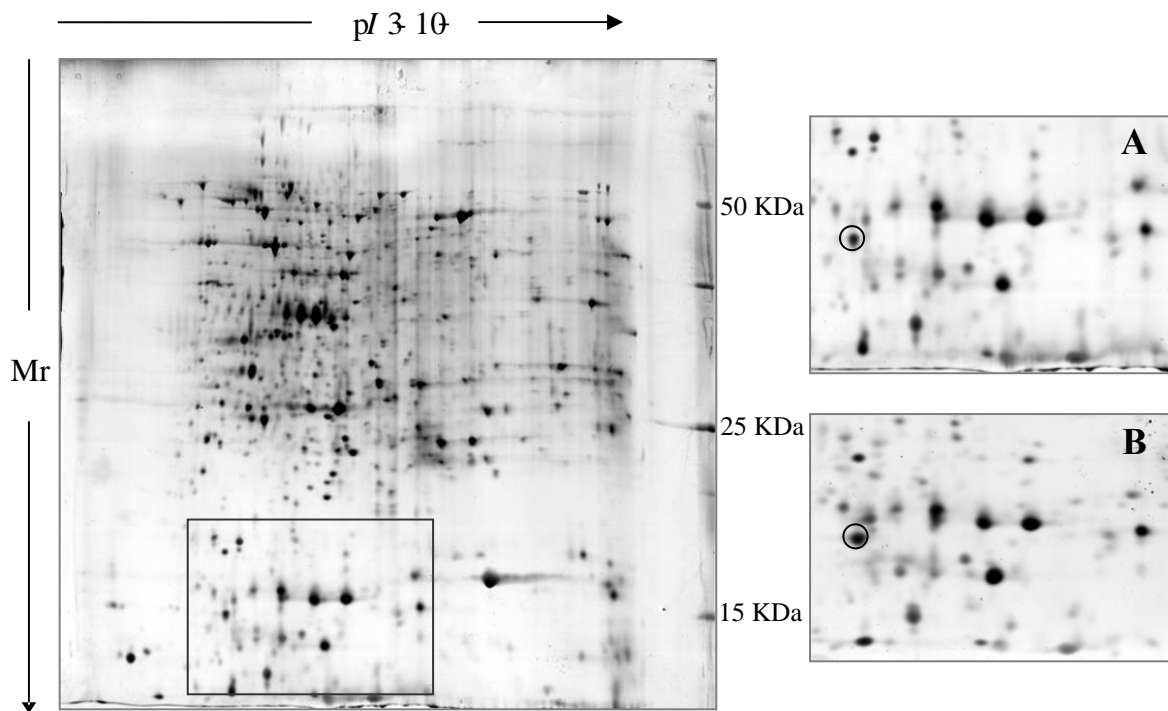


**Figura 6.32.** Cromatogramas de extractos de alas de *P. archon* correspondientes cada uno a: A) machos, B) hembras. Con una flecha aparecen señalados los tres compuestos hallados en machos.

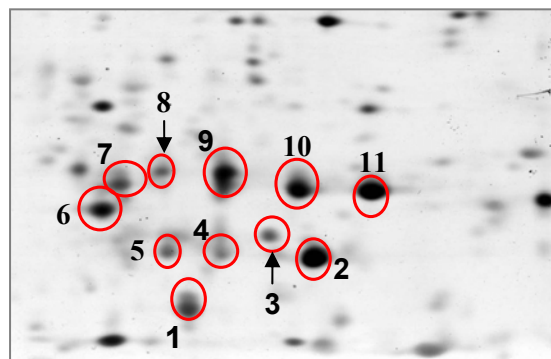
### 6.3.4. Análisis de las proteínas expresadas en las antenas de machos y hembras

Estudios realizados con anterioridad en especies típicamente nocturnas han demostrado la presencia de ambos tipos de OBPs (PBPs y GOBPs) así como una diferencia en la expresión de las mismas en ambos sexos (ver resultados capítulo 5). Sin embargo, el conocimiento que se posee de las proteínas olfativas expresadas en las antenas de lepidópteros diurnos es escaso. Aunque el tipo de localización de la pareja está basado principalmente en la visión, la gran mayoría de especies utilizan posteriormente señales químicas a modo de reconocimiento intraespecífico. Por ello, cabe pensar que, por lo general, exista la expresión de ambos tipos de OBPs aunque quizá con un diferente nivel de expresión que el observado en mariposas nocturnas. Así mismo podría darse una menor expresión de las GOBPs, ya que en muchos casos los receptores responsables de la detección de los volátiles de la planta hospedadora como de otros aleloquímicos para la posterior oviposición, se encuentran localizados en los tarsos de las hembras<sup>203, 204</sup>.

En todos los geles realizados se consideró exclusivamente la zona de bajo peso molecular donde se encuentran localizadas las OBPs (<25 KDa y 4-7 pI). Tras el análisis correspondiente, tan sólo una mancha se consideró diferencial, la cual se encontró con un ligero mayor grado de expresión en hembras. El resto de manchas se expresaban prácticamente de manera similar en ambos sexos (Figura 6.33). La mancha diferencial así como varias manchas localizadas alrededor, en total 11 manchas, se recortaron previamente a su digestión y posterior identificación (Figura 6.34). La gran mayoría de ellas, no pudieron ser identificadas mediante MALDI-TOF MS y tuvieron que ser analizadas con posterioridad mediante LC-MS/MS. En total, siete de las nueve analizadas por LC-MS/MS pudieron ser identificadas de novo y dos mediante MALDI-TOF MS por homología con el espectro de masas de otras proteínas que habían sido secuenciadas previamente. Tan solo dos, las correspondientes a la manchas denominadas como **1** y **3** no pudieron ser identificadas. Siete de las manchas identificadas, se determinaron como precursores de la proteína 20 de la cutícula de la pupa por homología al de la especie de lepidóptero *M. sexta*, una (**6**) se identificó como GOBP2 igualmente por homología con la especie *Plutella xylostella* (Tabla 6.1) y finalmente la mancha **2** como CRABP también por homología con *P. xylostella*.



**Figura 6.33.** Imagen de un gel bidimensional de 18 cm, 3-10 pH de un extracto antenal de macho de *P. archon*. La zona donde se localizan las OBPs aparece marcada con un recuadro. En el margen derecho se observa una ampliación de esta zona en ambos sexos: A) machos, B). hembras. La mancha marcada con un círculo es la única diferencial entre ambos sexos.



**Figura 6.34.** Imagen de un gel bidimensional de un extracto antenal de *P. archon* donde se señalan las manchas recortadas y digeridas con tripsina para su posterior análisis.



**Tabla 6.1.** Proteínas identificadas en *P. archon* mediante espectrometría de masas.

Mancha	Proteína	Mr/pI		Secuencia por LC-MS/MS	Especie	Nº acceso
		Teor <sup>1</sup>	Exp <sup>2</sup>			
2	CRABP <sup>3</sup>	15/6.4	14/6.0	AIGVGLITR ELKKDGDNFV LVTSSSTFK SVCTFEGNT LK	<i>P. xylostella</i>	BAD26694
4	PCP <sup>4</sup>	18/4.9	14/5.5	AAGPEGA AVTAEGGFSFR	<i>M. sexta</i>	Q8T635
5	PCP	18/4.9	12/5.4	AAGPEGA AVTAEGGFSFR	<i>M. sexta</i>	Q8T635
6	GOBP2	18/5.1	14/4.8	EDFEVVHR	<i>P. xylostella</i>	AAG50015
7	PCP	18/4.9	15/5.0	APGPEGPAVTAEGGFSYR	<i>M. sexta</i>	Q8T635
8	PCP	18/4.9	15/5.2	-	<i>M. sexta</i>	Q8T635
9	PCP	18/4.9	15/5.5	APGPEGPAVTAEGGFSYR	<i>M. sexta</i>	Q8T635
10	PCP	18/4.9	15/5.8	APGPEGPAVTAEGGFSYR FENVNNGDGTyr	<i>M. sexta</i>	Q8T635
11	PCP	18/4.9	15/6.2	-	<i>M. sexta</i>	Q8T635

<sup>1</sup> Teor.: Teórica

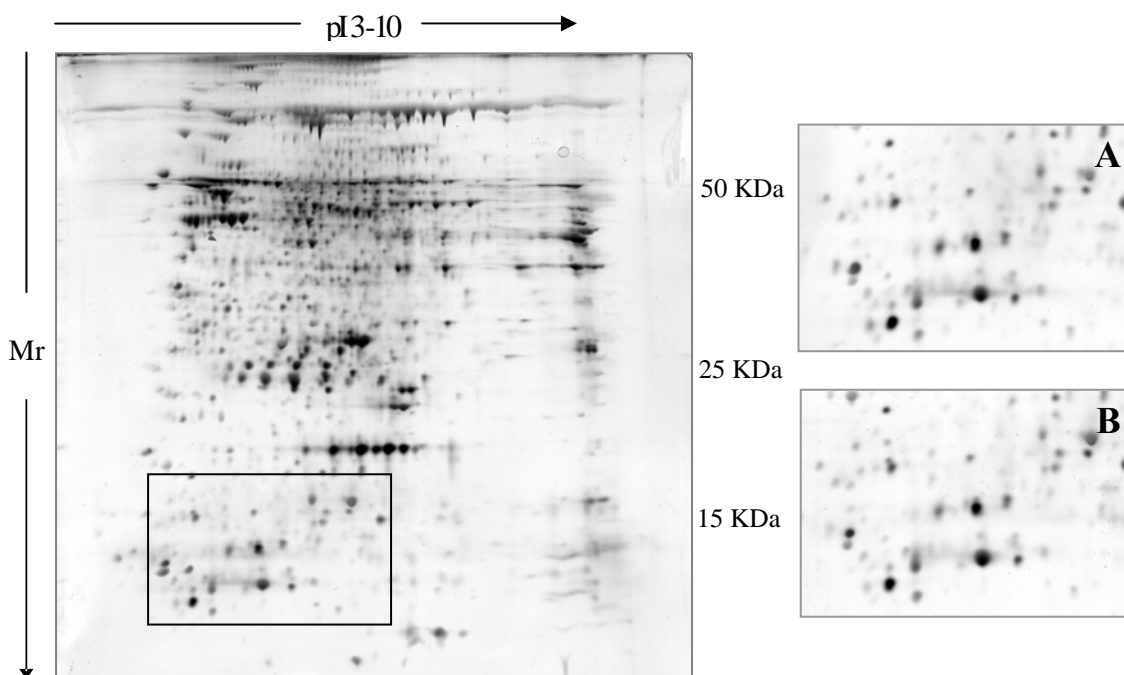
<sup>2</sup> Exp.: Experimental

<sup>3</sup> CRABP: Proteína de unión al ácido retinoico celular.

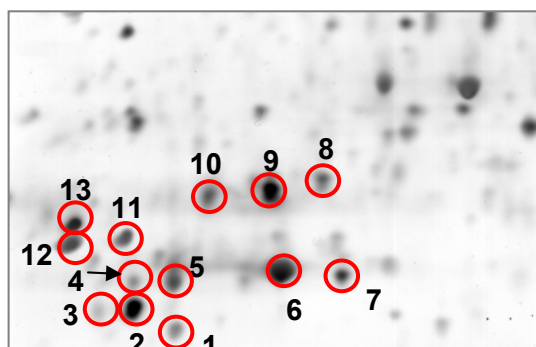
<sup>4</sup> PCP: Proteína cuticular pupal

En el caso de la especie diurna *P. brassicae*, se siguió el mismo procedimiento que en *P. archon*. De los geles resultantes, tan sólo se analizó la parte de bajo peso molecular comprendida entre pH 4 y 7. Una vez realizado el análisis diferencial se observó la ausencia de manchas diferenciales en esta zona entre ambos sexos (Figura 6.35). Aún así se recortaron y digirieron con tripsina 13 manchas (Figura 6.36) con el fin de observar qué proteínas se expresaban en la zona donde generalmente se localizan las OBPs en un lepidóptero nocturno.

Mediante el análisis por MALDI-TOF MS, ninguna de las manchas pudo ser identificada, no sólo por no encontrarse en la base de datos sino en muchos casos los espectros obtenidos de la fragmentación de los péptidos eran muy pobres en iones propios de la proteína, hallándose camuflados por los correspondientes a la tripsina o en su defecto queratinas. De las 13 manchas recortadas, tan sólo seis (**1**, **6**, **7**, **9**, **10** y **12**) pudieron ser reanalizadas por LC-MS/MS, de las cuales, únicamente tres pudieron ser identificadas; la **7** como profilina, proteína de unión a la actina<sup>205</sup>, la **9** como proteína de unión a ácido graso 1 (FABP1) y la **10** como proteína cuticular de la pupa (Tabla 6.2).



**Figura 6.35.** Imagen de un gel bidimensional de 18 cm, 3-10 pH de un extracto antenal de macho de *P. brassicae*. La zona donde se localizan las OBPs aparece marcada con un recuadro. En el margen derecho se observa una ampliación de esta zona en ambos sexos: A) machos, B) hembras.



**Figura 6.36.** Imagen de un gel bidimensional de un extracto antenal de *P. brassicae* donde se señalan las manchas recortadas y digeridas con tripsina para su posterior análisis.

**Tabla 6.2.** Proteínas identificadas en *P. brassicae*. mediante espectrometría de masas

Número mancha	Nombre	Mr/pi		Secuencia peptídica	Especie	Nº acceso (GenBank)
		Teor. <sup>1</sup>	Exp. <sup>2</sup>			
7	Profilina	14/5,9	11/5,8	YLYLSGTDR	<i>B. mori</i>	Q68HB4
9	FABP <sup>3</sup>	15/6,4	13/5,4	MVSEENFDDFLK	<i>H. armigera</i>	ACB54950
10	PCP <sup>4</sup>	19/4,1	13/5,1	APGPEGPAVTAEGGFSYR	<i>M. sexta</i>	Q8T635

<sup>1</sup> Teor.: Teórica

<sup>2</sup> Exp.: Experimental

<sup>3</sup> FABP: Proteína de unión a ácidos grasos

<sup>4</sup> PCP: Proteína cuticular pupal

## 6.4. DISCUSIÓN

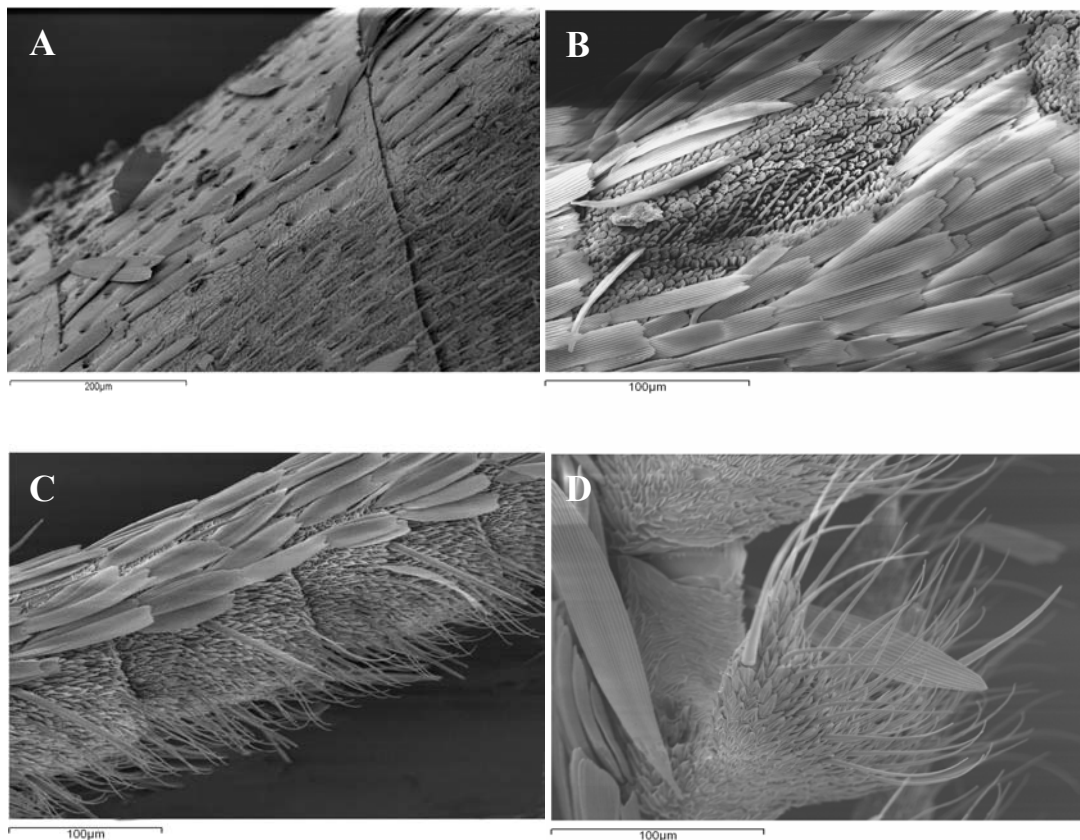
La gran adaptación de *P. archon* en nuestro país, el ataque a varias especies de palmeras con predilección por *C. humilis*, la única palmera europea natural, así como su gran capacidad de migración, hace necesario un control de esta especie a fin de evitar su expansión. Nuestro objetivo principal se basaba en la elucidación de la mezcla feromonal emitida por las hembras de esta especie como medida alternativa a la utilización de insecticidas de tipo químico, sin embargo los resultados obtenidos a lo largo de su estudio se alejan en gran medida del propósito inicial.

*P. archon* pertenece a la familia Castniidae, incluida dentro del superorden Sesiodea, el cual incluye tres familias, Sesiidae, Brachodidae y Castniidae (Anexo 9.5). Todos ellos presentan, en su mayoría, costumbres diurnas. Las hembras de las dos primeras familias, emiten feromonas de largo alcance para atraer a los machos conespecíficos pero se desconoce el comportamiento sexual de los Cástnidos. Ante los pocos datos bibliográficos acerca de la comunicación química de esta familia, los primeros ensayos se centraron en la búsqueda de una feromona de largo alcance, que al igual que los otros dos grupos, fuera emitida por la hembra.

La morfología de las antenas, los resultados negativos adquiridos en las distintas pruebas electrofisiológicas con antenas de macho, así como la ausencia de un compuesto feromonal en los extractos de ovipositor o volátiles emitidos por la hembra, indican la inexistencia de una feromona de largo alcance emitida por esta última y por lo tanto, la presencia de un tipo de comunicación atípica dentro del grupo de las polillas.

Las observaciones realizadas por SEM muestran una antena bastante dispar de las observadas en otras especies de lepidópteros típicamente nocturnos estudiados a lo largo de esta tesis (capítulo 5), donde los machos presentan una gran superficie sensilar de tipo tricoideo de largo tamaño capaz de detectar pequeñas cantidades de feromonas a varios kilómetros de la fuente de emisión. En *P. archon* no sólo se observa una disminución en cuanto al tamaño de las sensilas tricoideas, sino que además en hembras, aparentemente la longitud de las mismas es mayor que en machos. La reducción de la superficie sensilar en el macho, podría estar relacionada con una habituación a la vida diurna de tal forma que hubiera perdido la capacidad de percibir componentes feromonales a larga distancia. Con el fin de corroborar esta hipótesis se realizó un estudio comparativo con una especie de hábitos típicamente diurnos como *P. brassicae*.

*P. brassicae* se encuentra incluida dentro del grupo rhopalocera o mariposas verdaderas. Los ropalóceros se basan primeramente en la visión para localizar a un miembro conoespecífico. Una vez se encuentran relativamente cerca, utilizan feromonas de atracción a corta distancia, por lo que el sistema de detección feromonal no es tan sensible como el de las polillas macho<sup>40</sup>. Comparando las antenas de ambas especies, *P. archon* y *P. brassicae*, se observa una semejanza en la forma de la antena, ambas acabadas en una maza, carácter típico de las mariposas verdaderas (superfamilia Papilionidea) y de los denominados “skippers” (superfamilia Hesperioidea), razón por la que se clasificó en un principio a los cástnidos dentro de los rhopalocera. A su vez, la superficie sensilar, en especial de tipo tricoideo se encuentra reducida, no existiendo mucha diferencia entre ambos sexos (Figura 6.37).

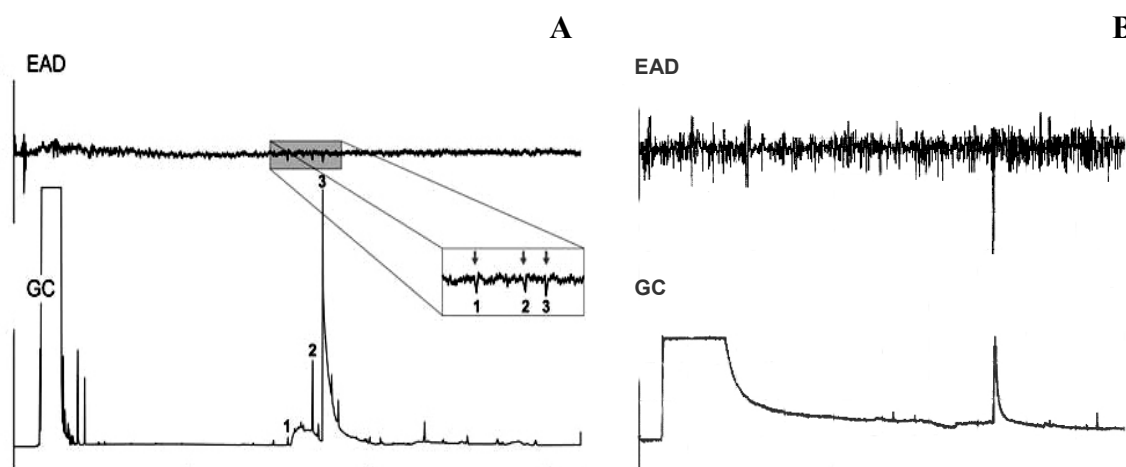


**Figura 6.37.** Comparación de la zona sensilar de las antenas de machos de cuatro especies de lepidópteros con diferentes hábitos diurnos. A) *P. archon*, B) *P. brassicae*, C) *S. littoralis*, D) *S. nonagrioides*.

Igualmente, la respuesta antenal observada en EAG difiere mucho de la adquirida en especies típicamente nocturnas estudiadas con anterioridad (apartados 5.3.2.6 y 5.3.3.3. del capítulo 5) donde la magnitud de la despolarización se encontraba en torno a 1 mV. En general, la respuesta antenal ofrecida por *P. archon* es aproximadamente 10 veces menor, siendo ligeramente mayor en hembras. La baja sensibilidad de la respuesta antenal de machos frente a los extractos de oviposidores o volátiles emitidos por hembras parece indicar la ausencia de algún compuesto feromonal activo sintetizado por la hembra. Esta hipótesis se ve reforzada ante la homogeneidad de los resultados adquiridos frente a todos los extractos ensayados, sin observarse una respuesta significativamente diferente ante ninguno de ellos. Sin embargo, la mayor respuesta de las hembras frente a los extractos de tórax y alas de macho en relación al resto de extractos y volátiles ensayados, así como la mayor intensidad de la despolarización en comparación con la correspondiente al macho, parece indicar la existencia de algún compuesto activo emitido por alguna de las dos partes corporales del macho. Esta parte podría ser el tórax, puesto que la respuesta antenal ofrecida frente al mismo fue mayor que con el resto de extractos. Aunque el hecho que la hembra de *P. brassicae*, no responda de manera significativa al extracto de alas de macho, sabiendo que esta zona corporal es la encargada de emitir sustancias atrayentes durante la cópula en la familia Pieridae<sup>199</sup>, podría ser consecuencia de la baja intensidad de respuesta de los receptores antenales, debido a una menor sensibilidad del sistema de percepción que en especies de hábitos nocturnos. Esto hace difícil la determinación del extracto más activo mediante la técnica del EAG en especies diurnas.

Gracias a las modificaciones del equipo de GC-EAD se pudo observar no sólo la presencia de varios compuestos emitidos únicamente por el macho, sino también la pequeña respuesta antenal frente a los mismos. Sin embargo la presencia en ocasiones de sólo uno de los dos compuestos diferenciales observados en los volátiles de machos, la ausencia de una despolarización de mayor intensidad frente ellos, así como la capacidad de desencadenar una respuesta antenal más o menos activa por parte de otros compuestos presentes en el resto de extractos, puso en duda la actividad de dichos compuestos. Sin embargo, el análisis posterior de cada uno de los picos activos mediante GC-MS por impacto electrónico e ionización química permitió la identificación de tres compuestos feromonales, el *E,E*-farnesal, el cual debido a su poca abundancia no se apreciaba en GC-EAD, su isómero *Z,E*-farnesal y el *E2,Z13-18:OH*, presentes en los volátiles de machos, machos y hembras juntos y en las alas de los machos, pero no así en hembras. El resto de compuestos activos en GC-EAD provenían probablemente de contaminaciones del sistema de recogida de aire o del propio material utilizado para la

adsorción de volátiles. Se ha demostrado en varias especies que la variación en la cantidad así como proporción de los compuestos feromonales, está en relación con la edad del insecto así como el momento del día en el que se realiza la recogida de volátiles<sup>206</sup>. En nuestro caso, hubo veces donde no pudo ser controlada la edad del insecto, ya que muchos de ellos provenían del campo, esto explicaría la variación en la emisión del compuesto *E2,Z13-18:OH*, no presente en todos los extractos de volátiles analizados. Igualmente la baja intensidad de respuesta frente a los compuestos emitidos por los machos puede ser debido principalmente a que se trate de sustancias con función atrayente a corto alcance, utilizadas generalmente por los machos de especies diurnas, aunque también en algunas especies de polillas, durante el cortejo<sup>207</sup>. La función de estos compuestos es mostrar a la hembra la calidad del macho, estimulando así la cópula<sup>208</sup>. La baja actividad observada en EAG en *P. archon* (0,2 mV) es similar a la descrita en otras especies diurnas como *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae) en la cual los tres compuestos activos hallados en las alas de machos, desencadenaban una despolarización en antenas de hembras de baja magnitud (0,12 mV)<sup>209</sup> que contrasta con la gran sensibilidad observada en machos de especies nocturnas (1,5 mV) (Figura 6.38).



**Figura 6.38.** Registro en GC-EAD de una hembra diurna y un macho de hábitos nocturnos frente a componentes feromonales emitidos por el otro sexo, A) Respuesta antenal de una hembra de *B. anynana* (Nymphalidae) frente a tres compuestos feromonales del macho, B) Respuesta de una antena de macho de *S. littoralis* (Noctuidae) frente al compuesto mayoritario emitido por la hembra.

Por otro lado, se ha observado cómo los machos de *P. archon* son capaces también de responder a estos tres compuestos con una intensidad similar a las hembras, observando así que existe un reconocimiento intraespecífico entre los dos sexos. En la mayoría de estudios realizados en otras especies se ha visto igualmente una respuesta antenal por parte de los machos a la feromona emitida por otro macho intraespecífico, por lo general

comparable con la respuesta antenal de las hembras o incluso menor que la ofrecida por estas últimas<sup>210-212</sup>. Aunque existen excepciones, ya que en machos de algunas especies esta respuesta es de mayor magnitud<sup>213</sup>. Una de las funciones que se atribuye a la percepción de feromonas masculinas por parte de machos de la misma especie es precisamente la inhibición del comportamiento sexual de congéneres del mismo sexo<sup>214, 215</sup>, de importancia relevante en especies territoriales<sup>216</sup>. Los datos existentes en la bibliografía sobre el comportamiento de la especie *P. archon*, afirman que los machos son precisamente muy territoriales, revoloteando pequeñas áreas y volviendo al mismo sitio de origen a la espera de algún objeto volador, no necesariamente coespecífico, al que persiguen inmediatamente una vez haya entrado en su "territorio"<sup>187</sup>. Este comportamiento parece ser similar al observado en otras especies de la familia Castniidae<sup>217</sup>. Sin embargo se desconoce si en *P. archon* estos compuestos inhiben el comportamiento de atracción en otros machos debido a la ausencia de ensayos comportamentales que demuestren dicha función.

La síntesis feromonal en los machos no es tan conocida como la de las hembras. Muchos machos de varias familias de lepidópteros, como Arctiinae (Noctuoidea), Danaidae e Ithomiinae (Rhopalocera), acumulan sustancias de las plantas hospedadoras en estadio de larva, como defensa para los predadores<sup>218</sup>. Estas sustancias pueden ser posteriormente utilizadas como precursores de compuestos feromonales<sup>219, 220</sup>. Este podría ser el caso de los compuestos *E,E* y *Z,E* farnesal emitidos por el macho de *P. archon*. Ambos isómeros son compuestos normalmente presentes en plantas de las familias Orchidaceae o Cactaceae entre otras, pero se desconoce la presencia de los mismos en la familia Palmae, grupo hospedador de la que se alimentan las larvas de *P. archon*. A pesar de no encontrarse identificados los volátiles emitidos por los géneros que sirven normalmente de hospedador de esta especie, sí lo están otros géneros de la misma familia, presentando cierta similitud entre los mismos. Entre los volátiles que se han logrado identificar se encuentra el *E,E*-farnesano y el *Z,E*-farnesano, de los cuales podría sintetizarse el *E,E* y el *Z,E*-farnesol que darían lugar a los aldehídos respectivos, que son los compuestos emitidos por el macho de *P. archon*. Entre los insectos capaces de emitir estas sustancias se encuentra una especie de lepidóptero, *Corcyra cephalonica* de la familia Pyralidae, donde la hembra produce una feromona de larga distancia, pero a su vez, curiosamente, el macho emite por las alas una feromona para atraer a las hembras. Los análisis realizados sobre extractos de alas delanteras de machos de esta especie revelaron que las sustancias atractivas que emitía el macho eran *E,E*-farnesal y su isómero *Z,E*-farnesal<sup>221</sup>, tal y como ocurre en *P. archon*. Por otro lado el farnesal es a

su vez un precursor de la hormona juvenil 3 (HJ3), la cual actúa en varias especies como activador del PBAN, promotor de la síntesis feromonal<sup>132</sup>.

El alcohol *E*<sub>2</sub>,*Z*<sub>13</sub>-18:OH se trata de un compuesto encontrado en la mezcla feromonal de hembras de varias especies de la familia Sesiidae, los cuales presentan una composición feromonal altamente conservada donde tan sólo se han identificado el acetato de (*Z,E*)-3,13-octadecadienilo (*Z*<sub>3</sub>,*E*<sub>12</sub>-18:Ac), el acetato de (*Z,E*)-2,13-octadecadienilo (*Z*<sub>2</sub>,*E*<sub>13</sub>-18:Ac), el acetato de (*Z,Z*)-3,13-octadecadienilo (*Z*<sub>3</sub>,*Z*<sub>13</sub>-18:Ac) y el acetato de (*Z,Z*)-2,13-octadecadienilo (*Z*<sub>2</sub>,*Z*<sub>13</sub>-18:Ac) con sus correspondientes alcoholes<sup>222</sup> y el (*E,Z*)-2,13-octadecenal (*E*<sub>2</sub>,*Z*<sub>13</sub>-18:Al)<sup>223</sup>. En la mayoría de especies estudiadas, las feromonas emitidas por los machos difieren de las de las hembras, sin embargo, existen otras donde alguno de los compuestos feromonales del macho coincide con los de las hembras. En la especie *Anticarsia gemmatalis* (Noctuidae) por ejemplo, los machos emiten de las escamas abdominales el compuesto (*Z,Z,Z*)-3,6,9-heneicosatrieno, compuesto feromonal también emitido por las hembras<sup>224</sup>. Igualmente el *Z*<sub>9</sub>-14:Ald, uno de los compuestos de la mezcla feromonal de hembras de *H. virescens* (Noctuidae), lo emite el macho<sup>225</sup>.

La emisión de compuestos feromonales por parte del macho para posiblemente atraer a la hembra conespecífica en la especie *P. archon* concuerda con las observaciones realizadas por algunos autores<sup>192</sup> pero contradice las hipótesis propuestas por otros, que según las observaciones y experimentos realizados, sugieren la existencia de una feromona emitida por parte del extremo abdominal de la hembra, capaz de atraer a machos localizados a cierta distancia<sup>226</sup>. No obstante, los ensayos de electrofisiología realizados así como los análisis de GC-MS parecen demostrar lo contrario. A estos resultados cabe añadir las observaciones realizadas en túnel de viento, donde no se apreció ningún comportamiento de atracción por parte de ambos sexos así como cópula. Aunque debido a la territorialidad y a los rápidos y vigorosos vuelos de estos insectos, se requieren grandes áreas para poder observar alguna cópula, tales como jaulas de gran tamaño o invernaderos<sup>187</sup>, por ello la gran dificultad de determinar la capacidad de atracción de los tres compuestos identificados.

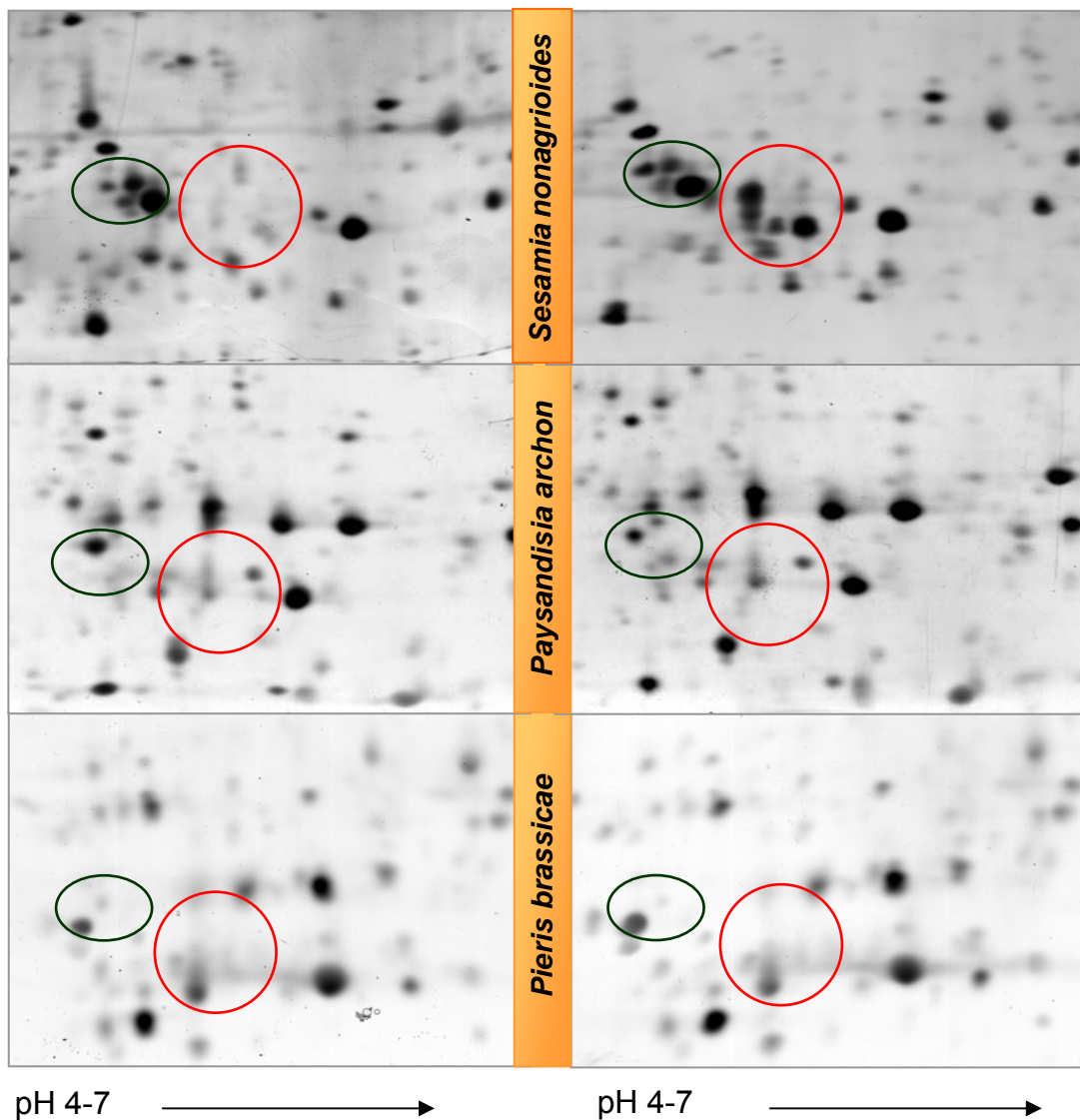
Finalmente el estudio de las proteínas expresadas en las antenas de ambos sexos de *P. archon* nos ha permitido observar la diferencia existente entre el patrón proteico de las típicas polillas nocturnas con la consiguiente similitud a especies de hábitos diurnos (Figura 6.39). En las antenas de las polillas se han encontrado tanto PBPs como GOBPs pero hasta el momento no se han realizado estudios sobre la expresión de las proteínas antenales en mariposas. Los análisis realizados en la especie *P. brassicae* han demostrado una disparidad en las proteínas expresadas respecto al patrón proteico



expresado en especies nocturnas, ya no sólo el número de proteínas localizadas en la zona de bajo peso molecular (15-25 KDa y 4-7 pI) donde se hallan las OBPs, siendo éste muy bajo, sino en las proteínas identificadas, donde no se ha llegado a identificar ninguna OBP. Tan sólo se ha identificado una proteína de unión a ácidos grasos (FABP1), proteína de la familia de las lipocalinas cuya función principal es la de transportar ligandos hidrofóbicos. Por esta razón posiblemente desempeñe una función similar a la PBP en cuanto a unión y transporte de moléculas. A su vez, el mismo grado de expresión en ambos sexos podría estar relacionado con la capacidad tanto de machos como de hembras de captar compuestos feromonales. Estudios realizados en EAG con antenas de *Pieris napi*, utilizando como agente estimulante citral, sustancia emitida por el macho, demostraron una diferencia en la sensibilidad de antenas de ambos sexos frente a esta sustancia, siendo mayor en hembras, pero existiendo, aunque en menor magnitud cierta respuesta frente al mismo compuesto, en machos<sup>227</sup>. En los ensayos de EAG realizados con antenas de macho de *P. brassicae* tan sólo se probaron extractos provenientes de hembras, pero no de machos, con lo que la sensibilidad de los receptores antenales frente a las sustancias atractivas emitidas por el mismo sexo podría ser equivalente al de la hembra. Numerosos estudios han demostrado cómo las mariposas utilizan estímulos visuales y/o la percepción de sustancias químicas a través del contacto con los tarsos con la superficie de las hojas para la selección de un lugar adecuado para la oviposición<sup>203, 228-230</sup>. Puesto que las hembras son las encargadas de encontrar un lugar adecuado para la oviposición, la ausencia de una proteína antenal identificada como GOBP en *P. brassicae*, podría explicarse por su capacidad de quimiorrecepción en los tarsos de las patas delanteras. Igualmente, el patrón proteico encontrado en las antenas de *P. archon* es similar al hallado en *P. brassicae*, a pesar de que las proteínas identificadas no han sido exactamente las mismas, el número de proteínas expresadas en la zona donde generalmente se localizan las OBPs es escaso en ambas especies, no habiéndose identificado ninguna PBP, aunque sí una GOBP2. El mayor grado de expresión en hembras de *P. archon* se pensó en un principio que podría estar relacionado con la función de las mismas de encontrar un sitio adecuado para la oviposición, aunque la respuesta de tan baja magnitud obtenida en EAG, no superior a la mostrada por los machos frente a extractos de *C. humilis*, contradujo esta hipótesis. Por otro lado, estudios realizados por otros autores han demostrado que la GOBP2 puede presentar afinidad por varios tipos de moléculas olorosas. Tal es el caso de la GOBP2 de *A. polyphemus*, la cual se comporta de manera similar a la PBP, aunque con un sitio de unión del ligando más permisivo, esto le permitiría unir un amplio rango de moléculas olorosas con afinidad moderada. A estos datos cabe añadir la elevada afinidad de la GOBP2 recombinante de *M. sexta* frente al análogo del compuesto feromonal mayoritario

de *A. polyphemus*, cuya unión al compuesto feromonal es desplazada solamente por la presencia de altos niveles de volátiles de planta<sup>181</sup>. Por esta razón, la GOBP2 hallada en *P. archon* podría tal vez permitir la unión preferente de moléculas de feromona, lo que explicaría la mayor respuesta observada en EAG en antenas de hembras frente a extractos de macho en comparación con los de la planta hospedadora. De todas formas, sería necesario un estudio más detallado que incluyera un análisis de la expresión de proteínas halladas en los tarsos de las hembras a fin de comprobar si existe, como en otras especies, alguna proteína quimiorreceptora implicada en la percepción de volátiles de la planta hospedadora por contacto, no encontrado en los machos<sup>231</sup>.

Por otra parte, el gran número de proteínas identificadas como proteínas cuticulares de la pupa, en realidad son proteínas provenientes de la cutícula de la antena, de extremada rigidez en comparación con otras especies de lepidópteros estudiadas. La ausencia de una identificación concluyente en esta especie es debido a la inexistencia de una base de datos de proteínas de *P. archon*. Esto hace necesario la comparación de las secuencias peptídicas de la proteína analizada con otras de especies cercanas que en ocasiones permite una identificación muy cercana a la de la proteína estudiada.



**Figura 6.39.** Comparación de la zona de bajo peso molecular correspondiente a extractos antenales de machos y hembras de tres especies de lepidópteros con distintos hábitos diurnos. Señaladas con círculos aparecen las zonas donde se sitúan generalmente las OBPs. La columna de la derecha representa los machos y la de la izquierda las hembras.