



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrícolas

CENTRO DE ECOLOGÍA QUÍMICA AGRÍCOLA (CEQA)

INSTITUTO AGROFORESTAL DEL MEDITERRÁNEO (IAM)

TESIS DOCTORAL

“Cuantificación de feromonas en aire y su aplicación en métodos de control de plagas”

Aitor Gavara Vidal

Directores:

Vicente Navarro Llopis

Sandra Vacas González

Jaime Primo Millo

València, Enero de 2021

AGRAÏMENTS

Mai no m'havia plantejat tot el que pots emportar-te al acabar aquesta etapa. Aquest document es només una part de tot allò que he après, però no l'única. No puc negar que durant la realització de la tesi he millorat tant les habilitats personals com les professionals. Però tot açò no haguera sigut possible sense tota la gent que m'envolta.

En primer lloc m'agradaria agrair tota l'ajuda, confiança i paciència per part dels directors de la tesi,

A Vicente Navarro per donar-me l'oportunitat d'iniciar les pràctiques al departament que van suposar, en part, l'inici d'aquest treball acadèmic. Per l'ajuda rebuda en tot moment i per donar resposta a tantes preguntes i inquietuds sorgides al llarg dels diversos experiments realitzats. A més, de per trobar temps, entre l'infern burocràtic que l'envolta, quan he necessitat de la seua ajuda, tant per a resoldre dubtes, fer correccions o afegir-li més tràmits burocràtics.

A Sandra Vacas, per ensenyar-me tot el que sé de cromatografia junt a Ismael, per tot el suport moral i ensenyar-me (o intentar-ho, està casi aconseguit) a tindre paciència i tractar de no traure conclusions desmoralitzants abans de tindre tots els resultats al complet. Per tantes i tantes preguntes respostes, pels consells, les correccions, les recorrecions, les rerecorreccions, etc. i compartir les penes dels problemes amb *trazas*, per totes les hores compartides de despatx.

A Jaime Primo per tota la seua experiència i tots els coneixements compartits i transmesos amb passió, tant els que han sigut útils per a la realització de la tesi com per aquells que, de segur, algun dia ho seran. Per fer-me sentir un més de l'equip des del primer dia i per la seua capacitat de ser clar i concís en les seues puntualitzacions i correccions.

També m'agradaria agrair a tots els companys del CEQA fer-me sentir dintre d'una altra família. A Juan per tots els viatges compartits al camp, la seua ajuda i la seua habilitat creativa en moments de necessitat (he de reconèixer que l'allargador

per al captador que vam necessitar a Venta del Moro va superar les meues expectatives). També per ensenyar-me tantes paraules i expressions valencianes que mai no havia escoltat i fer-me recordar algunes que feia molts anys que no escoltava ("més val l'enterro que l'abuela", crec que es la meua preferida), també per ensenyar-me el poc que sé de pilota. A Ilde per ser l'encarregat de les comandes i dels residus, el director dels informatius del CEQA, tant de les notícies serioses com de les absurdes, el impulsor de la ludopatia, calendari laboral, calendari d'aniversaris (i de recordar el que això comporta), i per la teua ajuda i alegria en els dies durs compartits al camp. A Pilar pels consells i per interessar-se contínuament per la tesi, per formar part del grup del cafè i per donar sempre el seu punt de vista i compartir els seus coneixements de biologia en les converses en les que ens sorgien dubtes tant dispars. De tot s'aprèn. A Ismael per totes les explicacions sobre química rebudes (innumerables) i tota l'ajuda en l'anàlisi de les mostres i sofrir també els problemes de *trazas* així com per l'ajuda i la síntesi del patró intern utilitzat i d'aquells que es van descartar. A Raúl i Javi, per tots els moments compartits dintre del laboratori que comprenen tant suggerències i resolució de dubtes al moment com tots els riures per coses absurdes, tant *memes*, com històries o xafardejos. A Leti, per tota l'ajuda rebuda en la última etapa, tant al camp com al laboratori. A Gara, per compartir les converses més surrealistes i existencialistes que es poden tindre a més de tractar de trobar-li resposta immediata a tot. També a Eva que, encara que fora a l'inici, em va ajudar en tot allò que vaig necessitar i a Ceci que va ser una de les primeres persones en les que vaig compartir laboratori (a pesar de no ser químic!!!). I també a Natalia, que al final si que m'he enrecordat d'afegir-te als agraïments, gràcies per preguntar tant com anava i animar-me quan ho necessitava a més d'ajudarme tant abans de la defensa.

Seria injust no incloure en els agraïments les persones que van fer que m'interessara el camp de la protecció de cultius i de l'entomologia agrícola. Gràcies Josep, Tati i Tina per aquelles classes en les que acudia en tant de gust i per l'oportunitat d'estar un poc temps al vostre laboratori.

Gràcies també a totes aquelles persones que han facilitat i m'han ajudat a realitzar els experiments al camp, especialment, a Pablo Calatayud i Vicent Ferrero del Celler del Roure i Emilio Giménez de Venta del Moro tant per oferir els camps de vinya per als experiments de confusió del corc del raïm com per l'ajuda rebuda. A Clérigues, Pepe i Batiste per totes les facilitats rebudes per a realitzar les captacions de volàtils en el camp d'arròs com per tota la informació rebuda sobre aquest cultiu i sobre l'Albufera. A José Vicente Bolinches per tot el temps que ha invertit en nosaltres i tots els consells rebuts.

Als amics que han estat sempre que he necessitat desconnectar. Gràcies per "perdre" part del teu temps en la portada, Elisa.

I, com no, a la família. En especial als meus pares i als meus germans per suportar tots els meus canvis d'humor dels dies en els que tornava esgotat a casa. I a Ana, sense tu no haguera sigut possible, correctora però sobretot companya d'alegries i plors. Gràcies per l'abraçada que em va permetre continuar.

RESUM

La confusió sexual és el mètode de control de plagues basat en semioquímics que ofereix els millors resultats i té una major acceptació en el mercat. Aquest mètode es basa en l'alliberament de la feromona sexual de l'insecte que es pretén controlar a l'ambient en una quantitat suficient per a provocar un retràs o una reducció de l'aparellament. Els estudis dedicats a l'optimització de la feromona utilitzada, que condiciona en gran mesura el preu de l'ús d'aquesta tècnica, es basen en experiments empírics sobre paràmetres com el número d'emissors utilitzats i la seua distribució, la càrrega inicial de feromona, etc. La quantificació de la feromona en l'aire és un paràmetre més directe i ofereix informació valuosa tant per a realitzar estudis destinats a optimitzar l'ús dels emissors disponibles, com per al desenvolupament de nous dispositius d'emissió amb un menor ús de feromona.

En aquesta tesis s'ha desenvolupat una metodologia que permet la quantificació de la concentració de feromona en aire en condicions reals de camp basada en la captació de volàtils de l'aire i el seu anàlisi mitjançant tècniques de cromatografia de gasos i espectrometria de masses. Mitjançant l'ús d'aquesta metodologia s'ha estudiat la quantitat de feromona en aire al llarg del cicle de cultiu en camps tractats amb confusió sexual per a dos espècies diferents d'importància agronòmica en els cultius de la vinya i de l'arròs, el corc del raïm (*Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller) i el cucat de l'arròs (*Chilo suppressalis* Walker) tractats amb diferents tipus d'emissors. Aquests estudis han servit per a conèixer de quina manera es distribueix la feromona al llarg del temps en relació amb la cinètica dels emissors i quins són els mecanismes implicats en la confusió sexual en condicions reals. A més, també s'ha estudiat la dependència climàtica d'emissors passius en condicions de camp donat que tindrà relació amb la quantitat de feromona en aire i pot repercutir en l'eficàcia del mètode de control.

Els resultats obtinguts en les parcel·les en les que es va instal·lar la confusió sexual contra *L. botrana* mostren que la concentració de feromona en aire va canviant al llarg del cicle de cultiu. A més, s'observa que la coberta vegetal produeix

un efecte també, de manera que la presència d'una massa foliar desenvolupada actua regulant la concentració de feromona en l'aire i permet una distribució més homogènia. Mitjançant la correlació de la velocitat d'emissió amb els paràmetres climàtics, s'ha comprovat que la temperatura i la velocitat del vent són paràmetres determinants i que esta dependència és variable entre diferents tipus d'emissors. D'altra banda, s'ha determinat mitjançant bioassajos electrofisiològics i de comportament que les concentracions de feromona necessàries per a desencadenar mecanismes de confusió no competitiva en mascles de *L. botrana* estaven molt per damunt de les quantificades al camp, per la qual cosa es va concloure que els mecanismes principals que produeixen la confusió sexual en condicions reals són els competitius. En el cas de les captacions realitzades en els arrossars, els valors obtinguts de la concentració de feromona en aire van servir per a estudiar per què amb una col·locació més primerenca dels emissors s'aconseguia un major efecte en el control de la plaga. A més, es va observar que, en aquest cas la concentració de la feromona en aire guardava una relació més estreta amb l'emissió que proporcionaven els emissors de confusió sexual. Aquest fet suporta la hipòtesi de que una massa vegetal densa, menor en els arrossars que en les vinyes, pot protegir a la feromona del seu llavat per l'efecte del vent.

RESUMEN

La confusión sexual es el método de control de plagas basado en semioquímicos que ofrece los mejores resultados y tiene mayor aceptación en el mercado. Este método se basa en la liberación al ambiente de la feromona sexual del insecto al que se pretende controlar en una cantidad suficiente para provocar un retraso o una reducción del apareamiento. Los estudios dedicados a la optimización de la feromona utilizada, la cual condiciona en gran medida el precio del uso de esta técnica, se basan en ensayos empíricos sobre parámetros como el número de emisores utilizados y su distribución, la carga inicial de feromona, etc. La cuantificación de la concentración de feromona en aire es un parámetro más directo y ofrece información valiosa tanto para realizar estudios destinados a optimizar el uso de los emisores disponibles, como para el desarrollo de nuevos dispositivos de emisión con un menor uso de feromona.

En la presente tesis se ha desarrollado una metodología que permite la cuantificación de la concentración de feromona en aire en condiciones reales de campo basada en la captación de volátiles del aire y su posterior análisis mediante técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Mediante el uso de esta metodología se ha estudiado la cantidad de feromona en aire a lo largo del ciclo de cultivo en campos tratados con confusión sexual para dos especies diferentes de importancia agronómica en los cultivos de la viña y del arroz, la polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller) y el barrenador del arroz (*Chilo suppressalis* Walker) tratados con diferentes tipos de emisores. Estos estudios han servido para conocer de qué manera se distribuye la feromona en aire a lo largo del tiempo en relación con la cinética de los emisores y cuáles son los mecanismos implicados en la confusión sexual en condiciones reales. Además, también se ha estudiado la dependencia climática de emisores pasivos en condiciones de campo puesto que tendrá relación con la cantidad de feromona en aire y puede repercutir en la eficacia del método de control.

Los resultados obtenidos en las parcelas en las que se instaló la confusión sexual contra *L. botrana* muestran que la concentración de feromona en aire va cambiando a lo largo del ciclo de cultivo. Además, se observa que la cubierta vegetal produce un efecto tampón, de manera que la presencia de una masa foliar desarrollada actúa regulando la concentración de feromona en el aire y permite una distribución más homogénea. Mediante la correlación de la velocidad de emisión con los parámetros climáticos, se comprobó que la temperatura y velocidad del viento son parámetros determinantes y que esta dependencia es variable entre distintos tipos de emisores. Por otro lado, se determinó mediante bioensayos electrofisiológicos y de comportamiento que las concentraciones de feromona necesarias para desencadenar mecanismos de confusión no competitiva en machos de *L. botrana* estaban muy por encima de las cuantificadas en campo, por lo que se concluyó que los principales mecanismos que producen la confusión sexual en condiciones reales son los competitivos. En el caso de las captaciones realizadas en el arrozal, los valores obtenidos de la concentración de feromona en aire sirvieron para estudiar por qué con una colocación más temprana de los emisores se conseguía un mayor efecto en el control de la plaga. Además, se observó que, en este caso, la concentración de feromona en aire guardaba una relación más estrecha con la emisión que proporcionan los emisores de confusión sexual. Este hecho apoya la hipótesis de que una densa masa vegetal, menor en los arrozales que en la viña, puede proteger a la feromona de su lavado por efecto del viento.

ABSTRACT

Mating disruption is the pest control method with better acceptance in market due to its results. This method is based on the releasing of the pheromone of the target insect into the environment with enough quantity to delay or to reduce their mating. Optimization-pheromone studies, which condition the usage price of this technique, are based on empirical essays about parameters such as the number of dispensers deployed and their distribution, pheromone initial content, etc. Airborne pheromone quantification is a more direct parameter that offers valuable information to do studies to optimize dispenser available use as to develop new dispensers with less pheromone emission.

In this work, a methodology that allows the airborne pheromone quantification in real field conditions has been developed based on volatiles airborne sampling and their later analysis with gas chromatography techniques and mass spectrometry. Using this methodology, the airborne pheromone throughout the crop cycle in mating disruption treated fields against different agronomic important species, the European Grapevine Moth (*Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller) and the Rice Stem Borer (*Chilo suppressalis* Walker), has been studied in vineyards and rice paddies treated with different types of dispensers. These studies have been useful to know how the pheromone is distributed along the time in relation to the dispensers' kinetics and which are the mechanisms involved in mating disruption in real conditions. Moreover, the climatic dependency of the passive dispensers in field conditions has also been studied as it will be related to the airborne pheromone quantity and it can affect the efficacy of the control method.

The results show that the airborne pheromone concentration in mating disruption treated fields against *L. botrana* changes throughout the crop cycle. In addition, it is observed that canopy produces a buffer effect, so the presence of a developed foliage regulates the concentration of the airborne pheromone and allows a more homogeneous distribution. The correlation of emission rate with climatic parameters were useful to check that temperature and wind speed have an influence

on dispensers' emission. On the other hand, with electrophysiological and behavioral bioassays, it was determined that higher airborne concentrations were needed to trigger non-competitive mechanisms in *L. botrana* males. In this way, it was concluded that competitive mechanisms are the ones acting in treated fields

In rice paddies air samplings, airborne pheromone concentration data were used to study why an earlier dispensers' deployment achieved a better effect controlling the pest. Furthermore, it was observed a more direct relationship between airborne pheromone with dispensers' emission. This fact supports the hypothesis that thicker foliage, lesser in rice fields than in vineyards, can prevent pheromone from its washing by wind.

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. El manejo integrado de plagas	3
2. Semioquímicos en el control de plagas	6
2.1 Los semioquímicos.....	6
2.2 Técnicas de identificación e investigación de semioquímicos.....	8
2.2.1 Bioensayos electrofisiológicos.....	9
2.2.2 Bioensayos de comportamiento.....	10
2.3 Técnicas de control de plagas basadas en semioquímicos.....	11
2.3.1 Control indirecto.....	12
2.3.2 Control directo.....	12
3. La confusión sexual	15
3.1 Descripción de la técnica.....	15
3.2 Dispositivos emisores de feromona.....	17
3.2.1 Características del emisor ideal.....	17
3.2.2 Dispositivos y formulaciones comerciales utilizados.....	19
3.3 Mecanismos que producen la confusión sexual.....	21
3.3.1 Mecanismos competitivos.....	21
3.3.2 Mecanismos no competitivos.....	22
4. Medida de semioquímicos en aire	24
4.1 Importancia de la medida de semioquímicos en aire.....	24
4.2 Medida de compuestos orgánicos volátiles en aire.....	25
4.3 Dificultad de la medida de feromona en aire.....	26
4.4 Antecedentes de cuantificación de feromonas en aire.....	27
4.5 Cuantificación de volátiles mediante la captación de muestras de aire.....	28
4.5.1 Captación de la muestra de aire.....	28

4.5.1.1 Técnicas de captación.....	28
4.5.1.2 Materiales o dispositivos para la toma de muestra.....	30
4.5.2 Extracción de la muestra.....	32
4.5.2.1 Extracción mediante disolventes.....	32
4.5.2.2 Extracción sin uso de disolventes.....	33
4.5.3 Concentración y limpieza de la muestra.....	33
4.5.4 Identificación y cuantificación del analito contenido en la muestra.....	34
5. La polilla del racimo de la vid (<i>Lobesia botrana</i>).....	35
5.1 Importancia y daños.....	35
5.2 Distribución geográfica.....	35
5.3 Sistemática.....	37
5.4 Morfología.....	37
5.5 Ciclo biológico.....	39
5.6 Control de la plaga.....	40
5.6.1 Los primeros métodos de lucha.....	40
5.6.2 Control químico.....	40
5.6.3 Control biológico.....	41
5.6.4 Control biotécnico.....	42
6. El barrenador del arroz (<i>Chilo suppressalis</i>).....	44
6.1 Importancia.....	44
6.2 Distribución geográfica.....	44
6.3 Sistemática.....	45
6.4 Morfología.....	46
6.5 Ciclo biológico y daños.....	47

6.6 Control de la plaga.....	48
6.6.1 Control cultural.....	49
6.6.2 Control químico.....	49
6.6.3 Control biológico.....	49
6.6.4 Control biotécnico.....	50
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	53
CAPÍTULO 1 “Airborne pheromone quantification in treated vineyards with different mating disruption dispensers against <i>Lobesia botrana</i>”.....	59
1.1 Introduction.....	62
1.2 Material and methods.....	66
1.2.1 Field Locations and Mating Disruption Systems.....	66
1.2.2 Airborne Pheromone Quantification.....	67
1.2.2.1 Chemicals and Reagents.....	67
1.2.2.2 Heptyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Tridecafluorononanoate (TFN) synthesis.....	68
1.2.2.3 Field Air Sampling.....	68
1.2.2.4 Sample Extraction and Filtration.....	69
1.2.2.5 Pheromone Quantification.....	69
1.2.3 Adsorbed Pheromone on Leaves.....	71
1.2.3.1 Adsorption Capacity and Emission Assays...	71
1.2.3.2 Leaf Sample Extractions.....	72
1.2.4 Release Profiles Studies of the Emission Systems.....	73
1.2.5 Efficacy of the Treatments.....	73
1.2.6 Data Analysis.....	74
1.3. Results.....	75
1.3.1. Airborne Pheromone Quantification.....	75
1.3.2. Pheromone Leaves Adsorption Capacity.....	76

1.3.2.1. <i>Experiment 1</i>	76
1.3.2.2. <i>Experiment 2</i>	77
1.3.2.3 <i>Experiment 3</i>	78
1.3.3 Dispensers Pheromone Release Profile.....	79
1.3.3.1. <i>Passive Dispensers' Release Profile</i>	79
1.3.3.2 <i>Aerosol Devices Profile</i>	81
1.3.4 Population Monitoring.....	82
1.3.5 Crop Damage Prospections.....	83
1.4 Discussion	84
CAPÍTULO 2 “Studies on <i>Lobesia botrana</i> non-competitive disruption mechanisms based on male’s response after pheromone exposure”.....	91
2.1 Introduction	94
2.2 Material and methods	97
2.2.1 Insects.....	97
2.2.2 Moths pheromone exposure.....	97
2.2.3 Airborne pheromone quantification for exposure treatments.....	99
2.2.3.1 <i>Chemicals and reagents</i>	99
2.2.3.2 <i>Quantification of the airborne pheromone in the conditioning chamber</i>	100
2.2.4 Wind tunnel tests.....	101
2.2.5 Electroantennography assays.....	102
2.2.6 Data análisis.....	103
2.3 Results	104
2.3.1 Airborne pheromone concentrations in the exposure treatments.....	104
2.3.2. Wind tunnel assays.....	104
2.3.2.1 <i>Immediately after the exposure</i>	104
2.3.2.2 <i>Twenty-four hours after the exposure</i>	106

2.3.3 EAG assays.....	107
2.3.3.1 Immediately after the exposure.....	107
2.3.3.2 Twenty-four hours after the exposure.....	109
2.4 Discussion.....	111
CAPÍTULO 3 “Influence of climate conditions in <i>Lobesia botrana</i> mating disruption dispensers’ performance”	117
3.1 Introduction.....	120
3.2 Material and methods.....	122
3.2.1 Mating disruption field trials and pheromone dispensers.....	122
3.2.2 Climate data.....	123
3.2.3 Dispenser release kinetic studies.....	123
3.2.4 Population monitoring.....	124
3.2.5 Damage assessments.....	124
3.2.6 Statistical analysis.....	125
3.3 Results.....	126
3.3.1 Population monitoring.....	126
3.3.2 Damage assessments.....	127
3.3.3 Dispensers release kinetics.....	129
3.3.4 Dispensers climate dependency.....	133
3.4 Discussion.....	135
CAPÍTULO 4 “Importance of the early deployment of mating disruption dispensers against the striped rice stem borer assessed with airborne pheromone variations along the crop cycle”	139
4.1 Introduction.....	142
4.2 Material and Methods.....	144
4.2.1 Pheromone dispensers.....	144
4.2.2 Experimental design.....	144

4.2.3 Efficacy of the treatments.....	146
4.2.4 Pheromone release profiles.....	146
4.2.5 Airborne Pheromone Quantification.....	147
4.2.5.1 <i>Field Air Sampling</i>	147
4.2.5.2 <i>Smple extraction and filtration</i>	148
4.2.5.3 <i>Pheromone quantification</i>	148
4.2.6 Data analysis.....	150
4.3 Results	151
4.3.1 Efficacy of the tratments.....	151
4.3.2 Dispenser release profiles.....	152
4.3.3 Airborne pheromone quantification.....	154
4.4 Discussion	155
DISCUSIÓN GENERAL	161
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	179
ANEJO METODOLÓGICO: Desarrollo de una metodología para la cuantificación de feromona en aire	207

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1 Tendencias en la investigación en el campo de la entomología aplicada en la revista “Journal of Economic Entomology”, 1927-1957.....	4
Figura 2. Macho y hembra de <i>Lasiocampa quercus</i>	6
Figura 3 Equipo de electroantenografía.....	10
Figura 4 Túnel de viento.....	11
Figura 5 Trampa utilizada para el seguimiento del vuelo de machos de <i>Lobesia botrana</i>	12
Figura 6 Trampa funnel de trapeo masivo y trampa de atracción y muerte.....	13
Figura 7 Emisor automático de pulverización utilizado contra <i>Lobesia botrana</i> , Emisor pasivo utilizado contra <i>Lobesia botrana</i> , emisor pasivo a bajas densidades utilizado contra <i>Chilo suppressalis</i>	19
Figura 8 Presencia y daños generados por <i>L. botrana</i> en el racimo.....	35
Figura 9 Distribución mundial de <i>Lobesia botrana</i>	36
Figura 10 Huevo, Larva y adulto de <i>Lobesia botrana</i>	38
Figura 11. Componente mayoritario de la feromona de <i>Lobesia botrana</i> , acetato de (E,Z)-7,9-dodecadienilo.....	42
Figura 12 Diferentes tipos de emisores utilizados para la confusión sexual de la polilla del racimo (De izquierda a derecha: Quant Lb Pro, Isonet® L, el dispositivo automático de pulverización Checkmate Puffer Lb y Lobetec).....	43
Figura 13 Distribución mundial de <i>Chilo suppressalis</i>	45
Figura 14 Puesta, Larva y adulto de <i>Chilo suppressalis</i>	47
Figura 15 Síntomas de daño de barrenador en la parte superior de la planta. Larva de barrenador en el interior del tallo.....	48

Figura 16 Componentes de la feromona de <i>Chilo suppressalis</i>	50
Figura 17 Emisor biodegradable para el control del barrenador. Trampa fúnel utilizada para el seguimiento del barrenador.....--...	51

CAPÍTULO 1

Figure C1.1 Mean absolute airborne pheromone concentrations in vineyards treated with passive dispensers and aerosol devices.....	76
Figure C1.2 Mean quantity of pheromone adsorbed on leaf samples, after one aerosol emission.....	77
Figure C1.3 Mean quantity of pheromone adsorbed on leaf samples, after overnight aerosol shooting.....	78
Figure C1.4 Mean quantity of pheromone adsorbed on leave samples collected in actual field conditions.....	79
Figure C1.5 Pheromone release profile of Isonet® L passive dispensers.....	80
Figure C1.6 Pheromone release profile of Checkmate aerosol devices.	81
Figure C1.7 Mean of <i>L. botrana</i> male captures per trap per day throughout the season in the plots with different treatments.....	83

CAPÍTULO 2

Figure C2.1 Assembly scheme of the conditioning setup to expose male moths at different airborne pheromone amounts.....	98
Figure C2.2 Percentage of male moths that showed activation, wing fanning, take off zig-zag flight and reached the source immediately after being exposed to the different treatments.....	105
Figure C2.3 Percentage of male moths that showed activation, wing fanning, take-off, zig-zag flight and reached the source, 24 h after their exposure to the different treatments.....	107
Figure C2.4 EAG signal triggered by the main component of the pheromone in the antenna of male moths immediately after their exposure to the different treatments.....	108
Figure C2.5 EAG signal triggered by 1-hexanol in the antenna of male moths immediately after their exposure to the different treatments.....	109
Figure C2.6 EAG signal triggered by the main component of the pheromone in the antenna of male moths 24 h after their exposure to the different exposure treatments.....	110

Figure C2.7 EAG signal triggered by 1-hexanol in the antenna of male moths 24 h after their exposure to the different exposure treatments.....	110
---	-----

CAPÍTULO 3

Figure C3.1 Mean <i>L. botrana</i> male captures per trap per day throughout the study period of the three trial replicates in the plots with different treatments.....	127
Figure C3.2 Mean percentage of damaged bunches obtained in each treatment in the three damage assessments.....	128
Figure C3.3 Pheromone release profiles of Ampoule dispensers in the three trials.....	130
Figure C3.4. Pheromone release profiles of Rope dispensers in the three trials.....	131
Figure C3.5 Average temperatures (minimum, mean and maximum) and wind speed in the three trial locations of the assay.....	133
Figure C3.6 Mean residual pheromone content of each type of dispenser throughout the crop cycle and monthly average mean temperatures from the three trial replicates.....	135

CAPÍTULO 4

Figure C4.1 Arrangement of the different deployment strategies at each location.....	145
Figure C4.2 Mean <i>C. suppressalis</i> male captures per trap per day of the three trials throughout the crop season with the different mating disruption treatments.....	151
Figure C4.3 Residual pheromone content of Bioselibate CS dispensers installed in May and June.....	153
Figure C4.4 Mean absolute airborne pheromone concentrations in rice field treated with passive dispensers Bioselibate CS.....	155

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Categorías de semioquímicos y ejemplos.....	7
---	---

CAPÍTULO 1

Table C1.1 Optimum values of the MS/MS parameters for each target compound used to quantify <i>L. botrana</i> airborne pheromone.....	70
--	----

Table C1.2 Isonet® L passive dispensers aging. Residual means of pheromone content throughout the time in field.....	80
---	----

Table C1.3 Checkmate aerosol devices pheromone content. Residual means of pheromone content throughout the time in field.....	82
--	----

Table C1.4 Mean percentage of damaged bunches obtained in each treatment in the three damage assessments.....	84
--	----

CAPÍTULO 2

Table C2.1 Optimum values of the MS/MS parameters for each target compound used to quantify airborne pheromone in the conditioning chamber.....	101
--	-----

CAPÍTULO 3

Table C3.1 Initial pheromone content, total pheromone released per dispenser and per ha/day and percentage of residual pheromone at the end of the season.....	132
---	-----

CAPÍTULO 4

Table C4.1. Optimum values of the MS/MS parameters for each target compound to quantify <i>C. suppressalis</i> airborne pheromone.....	149
---	-----

Table C4.2 Mean (\pm SE) of infested plants in one square meter (NIP/m ²) and percentage of attacked plants (%) obtained in each treatment in the three assessments carried out at each trial.....	152
--	-----

Table C4.3 Bioselibate CS dispensers aging. Residual means of pheromone content (mg) throughout the time in field (days), Point values of Figure 2 and the total mean of pheromone used (mg/day/ha). 154

LISTA DE ABREVIATURAS

Bt: *Bacillus thuringiensis* Berliner

COVs: Compuestos orgánicos volátiles

GC: Gas Chromatography

CTD: Captures per trap per day

DMAP: 4-(dimetilamino)-piridina

EAG: Electroantenografía

ECD: Electron capture detector

EGVM: European grapevine moth, Polilla del racimo de la vid

FID: Flame ionization detector

FS: Full Scan (escaneo completo)

GC-MS: Espectrometría de masas acoplada a cromatógrafo de gases

GC-MS/MS: Espectrometría de masas en tandem

LSD: Least significant differences

MIP: Manejo integrado de plagas

MS: Espectrometro de masas/espectrometria de masas

OILB: Organización Internacional de Lucha Biológica

OFN: Octafluoronaftaleno

PUF: Poliurethane foam

RSB: Rice stem borer, Barrenador del arroz

SIM: Selected ion monitoring

SRM: Selective reaction monitoring

TIC: Total ion chromatogram

MD: Mating Disruption

TFN: 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoato de heptilo

1-PT: acetato de 1H-perfluoro-1-tetradecanol

2-TBP: 2-(trifluorometil)benzofenona

Introducción General

Introducción General

1. El manejo integrado de plagas.

A lo largo de la historia de la agricultura, el control de plagas ha sufrido transformaciones muy profundas, pero no es hasta la Segunda Guerra Mundial cuando se produce un punto de inflexión debido al impulso de la industria química. En este momento tuvo lugar el descubrimiento y desarrollo de los insecticidas de síntesis de amplio espectro, y al mismo tiempo se dio un cambio en la mentalidad de los productores, pasando de la concepción del “control” de las plagas, tolerando un cierto nivel de organismos perjudiciales, a su “erradicación”. De esta manera, rápidamente se dejaron de realizar prácticas preventivas utilizadas en el pasado, como la rotación de cultivos y el favorecimiento de los enemigos naturales. Raramente se observaban y analizaban parámetros como el nivel de población o la presencia del insecto plaga, si no que los tratamientos se realizaban de manera sistemática de acuerdo con calendarios preestablecidos (Perkins, 2002; Vives de Quadras, 1988; Flint et al., 1981). El descubrimiento de la alta eficacia de esta nueva clase de insecticidas y el cambio de mentalidad en el control de plagas también se observaron en la investigación, ya que se produjo una reducción de los estudios basados en la comprensión de la biología de los insectos plaga y sus enemigos naturales, dando paso a un incremento considerable de los estudios de eficacia de productos químicos como insecticidas (Figura 1).

El abuso de estos productos insecticidas de amplio espectro produjo en poco tiempo una serie de problemas para los agricultores. En primer lugar, la presión selectiva sobre los organismos produjo el desarrollo de resistencias dificultando enormemente su control. También se produjo la reducción de enemigos naturales presentes en los cultivos, provocando el resurgimiento de plagas que hasta ese momento no habían requerido de un método de control (Metcalf, 1986). La reacción común a esos problemas era el aumento del número de tratamientos y su dosis, agravando considerablemente estos problemas. Además, debido a la toxicidad y a la persistencia de estos productos, se originan problemas sanitarios y

medioambientales, como la bioacumulación. Aunque desde el inicio de su uso ya se habían indicado esta clase de problemas por una minoría, no fue hasta la publicación de “La primavera silenciosa” de Rachel Carson en 1962 cuando cambió su percepción social y se empezó a regular su uso (Flint et al., 1981).

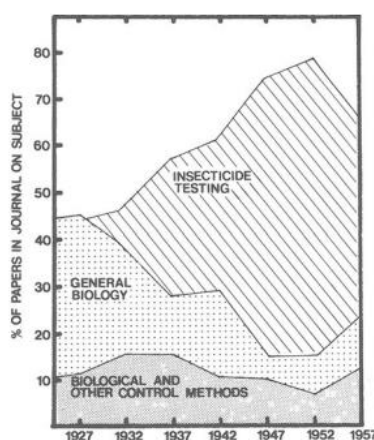


Figura 1 Tendencias en la investigación en el campo de la entomología aplicada en la revista “Journal of Economic Entomology”, 1927-1957 (Fuente: Flint et al., 1981).

A raíz de todos los problemas ocasionados se desarrolló y sentaron las bases del **Manejo Integrado de Plagas (MIP)**, definido por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) en 1977 como: “La aplicación de un conjunto de métodos satisfactorios desde el punto de vista económico, ecológico y toxicológico, dando prioridad al empleo de medios naturales de regulación y respetando umbrales de tolerancia”. Se entiende por “umbrales de tolerancia” el nivel de daños económicos por debajo del cual no está justificado el tratamiento químico. El hecho de tener en cuenta todos los posibles sistemas de lucha, sin excluir el uso de productos químicos, hace que aplicar correctamente este tipo de lucha contra plagas requiera de un conocimiento técnico del ecosistema agrícola, de los efectos secundarios de los tratamientos, del seguimiento de las plagas y del conocimiento de los umbrales a partir de los cuales se ha de intervenir. En la actualidad, este sistema de control se utiliza ampliamente junto a otros sistemas, como el cultivo ecológico, debido al

gran aumento de restricciones sobre los productos fitosanitarios y a un aumento considerable de la sensibilización social, que demanda una actividad agrícola más sostenible y respetuosa con el medio ambiente, además de productos más seguros.

Entre las diferentes técnicas alternativas al uso del control químico que ofrece actualmente la gestión de plagas se encuentran los llamados métodos biotécnicos, que son los métodos de control basados en la alteración de los mecanismos de comunicación y de determinados procesos fisiológicos de los insectos mediante el uso de las sustancias conocidas como semioquímicos. El uso de semioquímicos para el control de plagas es cada vez más habitual debido a las múltiples ventajas que ofrece su uso y que se comentarán más adelante.

2. Semioquímicos en el control de plagas

2.1 Los semioquímicos

Moses Harris ya en su obra *The Aurelian or Natural History of English Insects* (1766) describió cómo coleccionistas de insectos usaban hembras de Bómbix de la encina, *Lasiocampa quercus* (Linnaeus) (Lepidoptera: Lasiocampidae), para atrapar machos de esa misma especie. Un siglo después, J.-H. Fabre, empezó a experimentar con esa misma polilla y con el pavón nocturno, *Saturnia pyri* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Saturniidae). Concluyó que las hembras emitían determinados efluvios que quedaban absorbidos en diferentes sustratos capaces de ser detectados por los machos por sus antenas plumosas. No fue hasta finales del siglo XX, tras el desarrollo de la cromatografía gas-líquido, cuando fue posible identificar los compuestos químicos volátiles utilizados en la comunicación entre los dos sexos de esas polillas (Howse, 1998; Guerrero, 1988). El bombicol, producido por las hembras de la mariposa de la seda (*Bombyx mori* L.), fue el primer atrayente producido por una hembra identificado y caracterizado (Butenandt et al., 1959), precisamente en el mismo año en el que se acuñó el término feromona (Karlson and Butenandt, 1959; Karlson and Lüscher, 1959), neologismo biológico que procede del griego *pherein* (llevar, transportar) y *hormon* (impulso, excitación).



Figura 2. Macho y hembra de *Lasiocampa quercus* (Fuente: ©entomart).

El estudio de este tipo de interacciones y el conjunto de las sustancias químicas en las que se basan es el objeto de la Ecología Química. Los compuestos químicos implicados en la comunicación reciben el nombre de semioquímicos, los

cuales se clasifican como feromonas, cuando la comunicación se produce entre miembros de la misma especie, como en las experiencias explicadas anteriormente, o como aleloquímicos cuando esta comunicación es interespecífica (Whittaker and Feeny, 1971). Así mismo, las feromonas se clasifican en inductoras (con un efecto inmediato y reversible, *releaser effect* en la literatura) o primarias (cuando afecta al desarrollo y el cambio es duradero o incluso irreversible, *primer effect*) (Guerrero, 1988). En general, los semioquímicos se clasifican según los efectos que desencadenan y a quien benefician (Tabla 1).

Tabla 1. Categorías de semioquímicos y ejemplos (Abd El-Ghany, 2019; Vacas, 2011; Howse 1998; Guerrero, 1988).

		Tipos		Ejemplo
Semioquímicos	Feromonas	Inductoras	De alarma, sexuales, agregación...	Bombicol emitido por las hembras de la mariposa de la seda para atraer a los machos
		Primarias	De maduración sexual, desarrollo...	Feromona mandibular de la abeja reina para inhibición del desarrollo de los ovarios de las abejas obreras
	Aleloquímicos	Alomonas	Benefician al emisor	La nicotina de las plantas de tabaco, tóxicas para insectos fitófagos
		Kairomonas	Benefician al receptor	El α -pineno emitido por los pinos junto con el etanol atraen escolítidos como <i>Tomicus destruens</i> Wall
		Sinomonas	Benefician a ambos	Compuestos emitidos por las flores que atraen a polinizadores
		Antimonas	No benefician a ninguno	Algunas plantas producen polen o néctar con sustancias tóxicas para insectos que son poco polinizadores pero que no lo son para otras especies con las que han coevolucionado
		Apneumonas	Emitidas por un material no vivo favoreciendo al receptor y perjudicando a otro	El parasitoide <i>Venturia canescens</i> (Ich.) es atraído a la harina de avena, de la que se alimenta su huésped.

Además, existen sustancias de origen antropogénico, que no existen en la naturaleza, pero que producen un efecto fisiológico o conductual sobre el sistema de comunicación de un insecto en concreto. Estas sustancias normalmente se utilizan para la investigación del sistema olfativo de los insectos (Renou and Guerrero, 2000) y suelen clasificarse como paraferomonas cuando su efecto es

sinergista o mimetiza a la feromona natural, o antiferomona cuando actúan como inhibidores. También hay casos en los que se ha utilizado este tipo de sustancias como base para un método de control de plagas, como el uso del trimedlure para la atracción de machos de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (Domínguez-Ruiz et al., 2008).

En la naturaleza, los compuestos químicos utilizados en la comunicación pueden pertenecer a distintas categorías de las citadas en la Tabla 1, dependiendo del punto de vista desde el que se analice. Por ejemplo, suele ocurrir que la emisión de determinados compuestos por parte de un vegetal que está siendo atacado pueda actuar como alomona tratando de disuadir a fitófagos no especialistas, como kairomona que atrae a los fitófagos especialistas y como sinomona atrayendo a parasitoides. Cuando el *Pinus ponderosa* Douglas ex C.Lawson es atacado por *Dendroctonus brevicornis* LeConte (Coleoptera: Curculionidae) produce terpenos que actúan como una Kairomona ya que actúan de manera sinérgica con las feromonas de agregación atrayendo más individuos atacantes, pero al mismo tiempo estos terpenos actúan como sinomonas ya que atraen a los parasitoides de *D. brevicornis*, *Roptrocerus xylophagorum* (Ratzeburg) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Gullan and Cranston, 1994).

El estudio y la aplicación de los semioquímicos en el control de plagas es de gran importancia debido a que su uso permite interferir o utilizar la comunicación química de los insectos para desarrollar e implementar técnicas de control muy eficaces y con un nulo o muy bajo impacto medioambiental que las hace compatibles con el manejo integrado de plagas y con la agricultura ecológica. Dependiendo del efecto que tenga una sustancia sobre una especie se podrá diseñar una metodología concreta que permita su control.

2.2 Técnicas de identificación e investigación de semioquímicos

Previamente al diseño de técnicas que permiten el uso de semioquímicos para el control de plagas, es importante saber cuáles son los que interfieren en la comunicación de una determinada especie y qué efecto tienen sobre esta.

Existen una serie de metodologías que permiten identificar qué sustancias pueden provocar un efecto sobre la plaga (validando la existencia de receptores para dicha sustancia) y conocer el efecto que puede tener una determinada sustancia, y en qué dosis, en el comportamiento de esa especie (Barbosa-Cornelio et al., 2019):

2.2.1 Bioensayos electrofisiológicos

-Electroantenografía (EAG): Esta técnica fue desarrollada por Dietrich Schneider en 1957 y se basa en la diferencia de potencial producida entre el ápice y la base de la antena debido a la despolarización de los receptores de las antenas como respuesta a un estímulo. Para realizar el experimento de EAG, la antena, que puede utilizarse o bien separada de la cabeza o unida, se coloca entre dos electrodos que son los que registrarán la diferencia de potencial (entre 1 y 20 mV) en el momento en el que el estímulo a estudiar llegue a la preparación a través de una corriente de aire. La diferencia de potencial es amplificada y, posteriormente, procesada por el software correspondiente para ser analizada. Este sistema verifica si existen o no receptores para el compuesto objeto de estudio, pero no asegura que tengan efecto sobre el comportamiento del insecto. Aun así, puede ser de utilidad a la hora de comprobar y elegir entre un grupo de sustancias que puedan tener un efecto haciendo un primer *screening*. Para ello, también existe la posibilidad de conectar la salida de un cromatógrafo de gases de manera que aquello que pasa por la columna se divide mediante una T y pasa tanto por el detector como por el EAG, evitando tener que fraccionar o separar las disoluciones (Barbosa-Cornelio et al., 2019; Howse, 1998).

-Registro de Sensilia única: Al usar la electroantenografía puede ocurrir que solo unas pocas sensilias respondan al componente químico estudiado y que no se genere una respuesta EAG detectable. Este problema se supera mediante el uso del estudio de sensilia única en el que se inserta un microelectrodo a una neurona utilizando un microscopio (Howse, 1998).

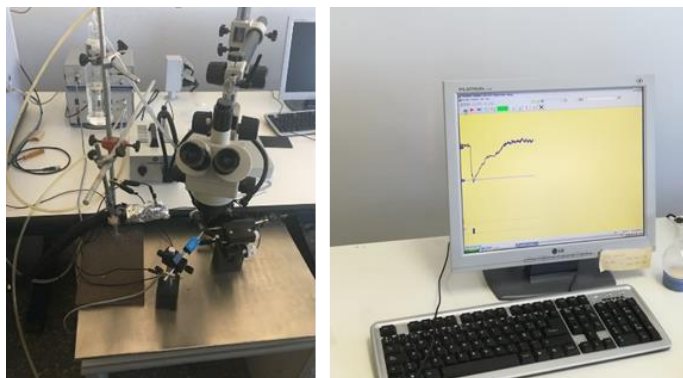


Figura 3 Equipo de electroantenografía.

2.2.2 Bioensayos de comportamiento

Son técnicas que permiten la identificación del comportamiento producido por los compuestos con los que se realizan las pruebas. Las más utilizadas son:

-Olfatometría: La técnica más utilizada es la olfatometría en Y o T. Consiste básicamente en la introducción de dos sustancias en cada una de las bifurcaciones de un tubo (normalmente estímulo y control) y observar hacia qué brazo se desplaza el insecto. Se complementa con una corriente de aire que lleve el estímulo en dirección contraria a la del desplazamiento del insecto. Se suelen utilizar para observar atracción, aunque también pueden ser utilizados para identificar repelencia. Existen variantes con más brazos o bifurcaciones, cosa que permite el estudio de más de un estímulo. También suelen realizarse ensayos en los que los insectos se sitúan sobre una plataforma sin aireación en la que hay dos pocillos separados con los estímulos que se liberan por difusión, de esta manera puede observarse si el insecto presenta atracción por alguno de los estímulos cuando se acerca a él (Barbosa-Cornelio et al., 2019).

-Túnel de viento: En este caso el estímulo es conducido mediante una corriente de aire a través de una cámara con el objetivo de que se cree una pluma de distribución uniforme. En la parte contraria al estímulo se sitúa el insecto bajo unas determinadas condiciones para evaluar su comportamiento respecto a esa pluma (Barbosa-Cornelio et al., 2019). Están pensados específicamente para

insectos voladores que requieren más espacio para su movimiento (Howse, 1998). Para conseguir el vuelo de una determinada especie se suelen necesitar unas condiciones particulares, para ello puede regularse el flujo de aire, la intensidad de luz, etc.

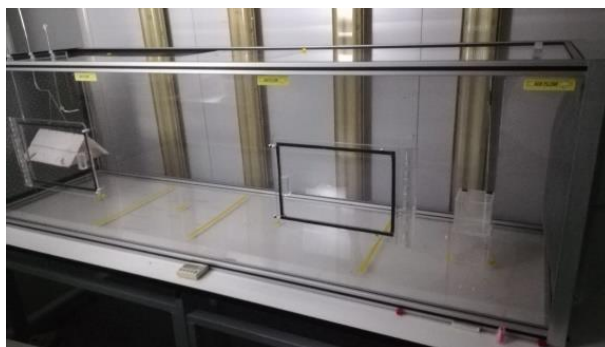


Figura 4 Túnel de viento.

-Movimientos de giro de insectos fijados en el espacio: El insecto, inmovilizado, se sitúa encima de una esfera debajo de un haz de luz infrarroja cuyos movimientos, tras aplicar un estímulo, son controlados de manera que cuando trata de desplazarse se mantiene en la misma posición. Estos movimientos de la esfera son registrados grabando indirectamente los movimientos del insecto (Howse, 1998).

Algunas de estas técnicas, como la EAG y el Túnel de viento, también son utilizadas habitualmente para estudiar si el comportamiento del insecto ha sido afectado tras haber sido sometido bajo determinadas condiciones. Por ejemplo, bajo determinadas concentraciones de un semioquímico en el aire durante un periodo de tiempo. Mediante estos estudios se puede abordar el conocimiento de aquellos mecanismos que actúan sobre la plaga en campo durante el tratamiento, con el objetivo de mejorar y optimizar los dispositivos de emisión.

2.3 Técnicas de control de plagas basadas en semioquímicos

Los semioquímicos pueden utilizarse para el control de plagas de dos maneras diferentes: el control indirecto y el control directo. Aunque se utilizan

diferentes tipos de semioquímicos para el control de plagas es especialmente relevante el papel que tienen las feromonas en este tipo de técnicas.

2.3.1 Control indirecto

El seguimiento o monitoreo de las poblaciones plaga utilizando trampas cebadas con atrayentes químicos es un método ampliamente utilizado debido a su eficacia y su bajo precio. Estas técnicas permiten la detección de una especie plaga, su densidad de población y evolución, la distribución espacial y su estacionalidad permitiendo anticipar la toma de decisiones, ya que puede aplicarse un umbral de intervención o un calendario de tratamientos (Weinzierl et al., 2009; Jones, 1998). La eficacia de esta técnica se incrementa considerablemente cuando se usa una feromona sexual o de agregación como cebo (Abd El-Ghany, 2019).



Figura 5 Trampa utilizada para el seguimiento del vuelo de machos de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae).

2.3.2 Control directo

-Trampeo masivo:

Se basa en la instalación de trampas en una alta densidad cebadas con atrayentes con el objetivo de atrapar el máximo número de individuos y producir una reducción de la población. La forma en la que se atrapa a los individuos depende del tipo de trampa (desde trampas con bases adhesivas hasta otras basadas en recipientes dónde los individuos se quedan atrapados). Esta técnica presenta algunos inconvenientes como pueden ser su coste, debido al número de trampas

necesario, la falta de atracción de hembras si se utilizan feromonas sexuales, o la saturación de las trampas debido a altas poblaciones de insectos, lo que implica realizar un mantenimiento frecuente de las mismas (Abd El-Ghany, 2019; Jones, 1998).

-Atracción y muerte/afectación/esterilización:

Técnica similar al trapeo masivo, aunque en este caso no se trata de retener los individuos de la especie plaga en una trampa si no que se les atrae hacia a un agente de control que los va eliminando de la población. Esta técnica es comúnmente utilizada tanto en campo abierto como en almacenes. El agente de control suele ser un tóxico, que provoque la muerte inmediata del insecto, pero hay otras variantes que pueden ser más ventajosas. Por ejemplo, el uso de hongos entomopatógenos, de manera que un individuo que llega al dispositivo se infecta, no queda retenido y puede a su vez infectar a más individuos de su población de manera horizontal (cóngenere) y vertical (descendencia), aunque en menor medida. Esta variante tiene especial eficacia en aquellas especies que se tienden a agregar. Otra variante es la combinación del atrayente con un agente esterilizante de manera que el macho esterilizado, cuando encuentre a la hembra, transmita la esterilidad. Esta variante tiene la ventaja de ser eficaz para especies para las que no se dispone de un atrayente de hembras eficaz, siempre que se conozca un producto esterilizante capaz de transmitirse a las hembras (Jones, 1998; Abd El-Ghany, 2019).



Figura 6 Trampa funnel de trapeo masivo (izquierda; Fuente: SEDQ Healthy Crops) y trampa de atracción y muerte (Derecha; Fuente: Sutterra)

Existe una modalidad en la que en vez de una trampa se utilizan formulaciones pulverizables de cebo proteína/insecticida, aunque en este caso se pierde la selectividad de la técnica (Abd El-Ghany, 2019; Jones, 1998). A nivel experimental también se han realizado estudios que utilizan una solución viscosa aplicada uniformemente sobre las ramas que contiene piretroides y la feromona como atrayente (Cazacu et al., 2008).

-Estrategia *push and pull* o atracción-repelencia:

Se trata de una técnica cada vez más utilizada en la que se combina un estímulo de atracción (*Push*) con uno de repelencia (*Pull*). Esta técnica requiere de un buen conocimiento de la biología del insecto y de la interacción entre plantas huésped y enemigos naturales, además de las sustancias químicas emitidas por las plantas que pueden resultar interesantes para producir estos efectos (Abd El-Ghany, 2019). Se están haciendo grandes esfuerzos para incorporar feromonas de alarma como repelentes en estas estrategias (Cook et al., 2007). Un ejemplo bastante reciente del uso de esta técnica con resultados eficaces es la combinación de la técnica de atracción y muerte combinada con sustancias disuasorias para la oviposición en *Drosophila suzukii* Matsumura (Wallingford et al., 2017).

-Confusión sexual:

Dado que esta técnica es la base de los estudios desarrollados en la presente tesis, en el siguiente apartado se describe de forma más extensa.

3. La confusión sexual

3.1 Descripción de la técnica

Este método de control se basa en la liberación a la atmósfera de uno o varios componentes de la feromona sexual sintética de una especie con el objetivo de interrumpir la comunicación química provocando que los machos sean incapaces de detectar a las hembras. De esta manera, se consigue la reducción de la cópula y con ello la disminución paulatina de la población de la especie objetivo.

La primera experiencia de esta técnica a gran escala se realizó en *New Hampshire*, EEUU, dónde se realizó una aplicación aérea de la feromona sintética del lepidóptero *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Erebidae), Gyplure, sobre una isla de unas 162 ha (Burgess, 1964). Los resultados de esta experiencia no resultaron un éxito y, posteriormente, se concluyó que el fallo se debió a la presencia de impurezas que enmascararon el efecto de la feromona (Waters and Jacobson, 1965). El primer caso de éxito haciendo uso de esta técnica fue descrito por Gaston et al. (1967) contra *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), en cuyo experimento se inhibió la captura de machos en una parcela en la que se realizó un tratamiento con feromona sintética.

Hoy en día, la confusión sexual se ha convertido en la técnica basada en semioquímicos más extendida para el control de plagas (Witzgall et al., 2018), especialmente de lepidópteros, debido a las ventajas que ofrece. La confusión sexual, debido a su naturaleza, se trata de un método de control preventivo que evita los problemas ocasionados por el uso de insecticidas convencionales, como son la aparición de resistencias, la toxicidad y sus efectos en el medio ambiente. Al basarse en el uso de feromonas, tienen una altísima especificidad evitando efectos secundarios en otros organismos que pueden ser beneficiosos para el control de plagas. Además, son ideales para controlar aquellas plagas que tienen un desarrollo críptico (en el interior del cultivo), difíciles de controlar mediante insecticidas debido al breve periodo de actuación disponible, como pueden ser los minadores y los taladros (Alfaro, 2006; Welter et al., 2005).

A pesar de sus ventajas y de su alta eficacia, esta técnica no está exenta de algunas limitaciones. En primer lugar, es necesario conocer la estructura exacta de la feromona y en caso de ser una mezcla feromonal su composición exacta, teniendo en cuenta que la presencia de impurezas puede anular su efecto (Jones, 1998; Guerrero, 1988) como ocurrió en el primer ensayo realizado con Gyplure explicado anteriormente. Además, en multitud de ocasiones se trata de compuestos químicos inestables con facilidad para isomerizarse en condiciones de campo debido a procesos de fotodegradación, oxodegradación y descomposición térmica (Jones, 1998). A pesar de conocer y poder sintetizar la feromona, esta tiene que ser económicamente rentable y la plaga económicamente importante, ya que hay casos en los que el alto precio de su síntesis las hace inviables. Puede ocurrir que en un futuro se abaraten los costes de producción y pueda ser accesible para los agricultores. Esto es lo que ocurrió en el caso de la feromona de *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) que, a pesar de resultar eficaz, inicialmente su precio no la hacía rentable para su uso en campo (Vacas et al., 2011a), aunque en la actualidad ya existen emisores comerciales disponibles.

Una vez que la feromona se encuentra disponible, se han de tener en cuenta una serie de consideraciones. El uso de esta técnica requiere de un conocimiento detallado de la biología de la plaga (puesto que esta condicionará el momento de instalación de las fuentes de feromona, su duración, el nivel de emisión...), su nivel de población y de las condiciones climáticas del lugar de aplicación (vientos dominantes, temperaturas...). El uso de esta técnica no es eficaz en parcelas pequeñas y, especialmente contra plagas de lepidópteros, su uso debe realizarse en parcelas de varias hectáreas; por ejemplo, algunos autores estiman que la superficie mínima a cubrir en viñedos es de 5-10 ha (Charmillot et al., 1995, Stockel et al., 1994). La necesidad de cubrir áreas relativamente amplias se debe a que puede haber una migración de hembras copuladas desde el exterior hacia el interior de la parcela y producirse el llamado “efecto borde”, por lo que se recomienda, por ejemplo, el refuerzo perimetral con más emisores (Coscollá, 1997). También puede ocurrir que en los bordes de las parcelas la concentración de feromona no alcance

el nivel necesario para que se produzca la confusión sexual. Este efecto borde obliga a que la forma de la parcela sea lo más regular posible, evitando las de forma alargada y estrecha. De hecho, en los territorios en los que se concentran varias explotaciones del mismo cultivo se recomienda su uso colectivo. Cuando se empieza a utilizar, durante los primeros años hay que tener en cuenta que si la presión de plaga es elevada es posible que haya que compaginar la confusión sexual con tratamientos insecticidas (Coscollá, 1997b) con el objetivo de disminuir el nivel de población, ya que su éxito se reduce cuando hay niveles muy altos de población (mayor probabilidad de encuentros casuales). Sin embargo, es ampliamente conocido que el efecto acumulativo de esta técnica reduce paulatinamente las poblaciones, por lo que su eficacia cuando se aplica en años sucesivos es cada vez mayor, ya que actúa cada vez sobre menores poblaciones de la plaga (Lance et al., 2016; Carpenter et al., 1982; Schwalbe and Albright, 1981). Además, en el momento de la transición para iniciar el uso de esta técnica no es descartable la aparición de plagas secundarias que anteriormente eran controladas de manera colateral mediante los tratamientos insecticidas menos específicos (Coscollá, 1997). El estudio de la evolución de las poblaciones de la plaga, utilizando por ejemplo las curvas de vuelo de machos, junto a prospecciones de daño de manera periódica a lo largo del ciclo de cultivo son necesarios para monitorizar su eficacia y detectar posibles fallos.

3.2 Dispositivos emisores de feromona

3.2.1 Características del emisor ideal

Como se ha indicado anteriormente, a la hora de implementar la confusión sexual, se han de tener en cuenta una serie de parámetros, tales como la biología de la plaga, la composición de la feromona y su protección frente a la degradación, las condiciones climáticas, etc. Es por ello que los dispositivos emisores de la feromona deben cumplir una serie de requisitos que aseguren la eficacia de la técnica de control:

-Protección eficaz: el emisor debe proteger y evitar la degradación de la feromona, manteniendo su estructura química hasta su liberación y hasta el final de la vida útil del emisor (Brown and McDonough, 1986). La isomerización de los dobles enlaces presentes en muchas feromonas puede deberse a reacciones fotoquímicas, a la temperatura, hidrólisis inducida por el pH, etc. Por ejemplo, Ogawa (1997) indicó que la falta de estabilidad de las feromonas de *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) y *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) provocó en el pasado problemas en la confusión sexual de dichas especies.

-Tiempo de vida útil: Un buen emisor debe tener un tiempo de vida largo que proteja al cultivo durante el periodo en el que la plaga pueda afectarlo, sin necesidad de reposición. Esta característica dependerá de otros parámetros (Ogawa, 1997) como la carga inicial de feromona, el nivel de emisión, la dependencia de las condiciones climáticas, el material, etc.

-Emisión constante, lo más próxima a orden cero: Esta es una característica importante que deben tener los emisores para optimizar el uso de feromona y que abarque todo el periodo de afectación de la plaga. Hay que evitar una gran emisión al inicio que disminuya gradualmente en poco tiempo (Hummel et al., 2013; Muñoz-Pallarés et al., 2001; Ogawa, 1997,). De acuerdo con esto, emisiones de tipo exponencial serían las menos deseables (Vacas, 2011).

-Independencia de las condiciones ambientales: un emisor que consiga emitir la misma cantidad de feromona independientemente de la temperatura ambiental asegura una emisión constante, prolongando su vida útil y evitando que se emita grandes cantidades de feromona en los momentos más cálidos del día que no suelen coincidir con los de máxima actividad de las plagas. La velocidad de viento es un factor que también puede afectar a la velocidad de emisión. Un emisor ideal, para reducir el uso de feromona, debería emitir proporcionalmente a la velocidad del viento cuando ésta es baja pero menos con vientos fuertes ya que en estos momentos no suele producirse el vuelo (Ogawa, 1997).

-Uso de materiales biodegradables: la fabricación de emisores de feromona con este tipo de materiales los convierte en ideales puesto que, tras su uso cuando ya se ha liberado la feromona, no suelen retirarse del campo debido a los costes de su retirada manual (Hummel et al., 2013; Femenia, 2010).

3.2.2 Dispositivos y formulaciones comerciales utilizados

Los emisores actualmente en uso no cumplen todas las características de un emisor ideal, pero cumplen su objetivo con mayor o menor eficacia. A lo largo de los años se han desarrollado diferentes tecnologías para emitir la feromona al ambiente con el objetivo de producir la confusión sexual, entre las que distinguimos básicamente: (1) el uso de dispositivos o puntos de emisión instalados a altas densidades y que emiten poca feromona (ng o μg por hora), de manera que su emisión es uniforme a lo largo de la superficie de cultivo; o (2) el uso de dispositivos instalados a muy bajas densidades que emiten mucha feromona (mg por hora), la cual se distribuye por acción del viento (Miller and Gut, 2015).



Figura 7 Emisor automático de pulverización utilizado contra *Lobesia botrana* (Izquierda), Emisor pasivo utilizado contra *Lobesia botrana* (Centro) y emisor pasivo a bajas densidades utilizado contra *Chilo suppressalis* (Izquierda).

Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente estos tipos de emisores:

-Emisores pasivos de colocación manual: Se trata de emisores que, o bien contienen la feromona y la emiten a través de sus paredes de materiales poliméricos, o están impregnados con la misma. En este caso se trata de emisores colocados a una alta densidad, 250-1000 por hectárea, de manera manual y con

una emisión relativamente baja. Su principal inconveniente es la mano de obra necesaria para su instalación. En este caso, resulta importante la investigación de materiales biodegradables para evitar los residuos generados ya que no suelen retirarse (Lucchi et al., 2018a; Miller and Gut, 2015; Cardé, 2007; Cardé and Minks, 1995).

-Formulaciones pulverizadas: Proporcionan una distribución de la feromona densa y homogénea a lo largo del cultivo. En algunas de estas formulaciones, la feromona está encapsula en polímeros con un tamaño del orden de micras (Doane, 1999). Su aplicación representa más de un millón de puntos de emisión por hectárea, con una emisión de 20 a 100 gramos de feromona que se emite en un periodo de 3 o 4 semanas (Miller and Gut, 2015; Cardé, 1975;). Por otro lado, presenta una serie de inconvenientes como la corta duración del tratamiento, el efecto de lavado causado por las lluvias, la degradación de la feromona debido a la radiación solar y el alto coste que puede suponer, ya que en el caso de que la plaga tenga un periodo de actividad largo se requiere de más de una aplicación (Cardé, 2007).

-Emisores aplicados mecánicamente o hembra-equivalentes: Son puntos de emisión como gotas cerasas o fibras huecas microcapilares, diseñados para emitir la feromona a un nivel similar al que lo hacen las hembras. El desarrollo y uso de este tipo de emisión presenta una serie de inconvenientes, como son la baja adherencia al follaje, el poco tiempo de emisión y la poca resistencia a las lluvias tras su aplicación aérea o mecánica (Stelinski, 2008).

-Mesoemisores: Son también emisores de colocación manual, pero con una carga inicial y un nivel de emisión superior. De esta manera se pretende reducir el número de emisores por hectárea y con ello la mano de obra (Light, 2016; Alfaro et al., 2009).

-Megaemisores o dispositivos automáticos de pulverización: Se basan en la emisión mecánica de la feromona utilizando dispositivos programables en los que previamente se introduce un aerosol que contiene la feromona diluida en un

propelente. Sus principales ventajas son el bajo número de emisores por hectárea que se han de instalar (de 2 a 5) debido a su alta emisión (mg/h), la posibilidad de programar los disparos en los momentos de actividad de la plaga y la mayor protección de la feromona frente a las condiciones ambientales (Benelli et al., 2019; Lucchi et al., 2018a; Vacas et al., 2016).

3.3 Mecanismos que producen la confusión sexual

A lo largo de los años se han realizado numerosos estudios para explicar de qué manera se produce la confusión sexual en campo. Este tipo de estudios han tratado y tratan de explicar que mecanismos son los implicados. El conocimiento de estos mecanismos resulta de interés para la optimización del uso de la feromona, reduciendo el coste de esta técnica o haciéndola posible en plagas en las que aún no ha podido ser implementada. Los mecanismos que producen la confusión sexual pueden clasificarse en dos grandes categorías: mecanismos competitivos y mecanismos no competitivos (Miller and Gut, 2015).

3.3.1 Mecanismos competitivos

Los mecanismos competitivos engloban todos aquellos en los que la confusión sexual tiene lugar sin que haya una alteración que produzca un efecto fisiológico sobre el macho ni la hembra, ni una alteración de la naturaleza física o química de la señal feromonal, de manera que el macho no está realmente incapacitado para detectar a la hembra o a una fuente de feromona. En este caso, lo que ocurre en líneas generales es que emisores y hembras compiten por la atracción del macho y, por lo tanto, cuando la confusión se consigue mediante este tipo de mecanismos, el efecto será dependiente de la densidad de plaga. Dentro de esta categoría encontramos:

-Atracción competitiva (pistas falsas): La multitud de puntos de emisión evita que el macho sea capaz de detectar a la hembra. Este mecanismo es el que actúa principalmente en el caso de utilizar emisores pasivos de colocación manual, mediante los cuales los machos son atraídos hacia ellos, compitiendo con las hembras.

-Alopatría inducida: En este caso la atracción del macho hacia las fuentes de emisión es duradera en el tiempo, de manera que los machos se mantienen, de alguna manera, separados físicamente de las hembras. En campos tratados con megaemisores o dispositivos automáticos de pulverización se ha constatado una mayor cantidad de machos cerca del dispositivo (McGhee, 2014a; McGhee, 2014b).

-Paro inducido (*induced arrestment*): Se produciría cuando los machos reducen de manera considerable su desplazamiento debido al efecto de la feromona en el ambiente (Miller and Gut, 2015).

3.3.2 Mecanismos no competitivos

Son todos aquellos en los que se produce un efecto fisiológico sobre el macho o la hembra, o se ha producido una alteración en la señal química. Cuando participan este tipo de efectos, la confusión es independiente del nivel de población de la plaga; es decir, la confusión se desencadenará incluso con poblaciones altas. De esta categoría forman parte diferentes mecanismos:

-Desensibilización: Se ha de mostrado que dosis prolongadas y/o elevadas de feromona pueden provocar o bien una adaptación de los receptores presentes en las antenas (adaptación periférica), o la habituación del sistema nervioso central (habituación), de manera que se suprime o se reduce considerablemente la percepción de la feromona por parte del macho.

-Alocronía inducida: Se produce cuando, debido a la emisión de feromona, el comportamiento reproductivo de los machos se adelanta, de manera que cuando las hembras empiezan a emitir la feromona, los machos ya no responden. Aunque se ha demostrado en pocas ocasiones, Cardé et al. (1998) pudieron observarlo con ensayos de túnel en campo con *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae).

-Reducción del llamamiento o apareamiento: En algunas especies se ha demostrado que cuando las hembras han sido sometidas a concentraciones altas de su feromona puede reducirse tanto la cantidad de feromona emitida, como el

tiempo de emisión, además de disminuir el apareamiento (Kuhns et al., 2012; Gökçe et al., 2007).

-Camuflaje o enmascaramiento: Debido a la emisión de feromona en el ambiente, puede ocurrir que se forme una nube feromonal que desdibuje la pluma de emisión tanto de las hembras como de los emisores, produciendo que el macho sea incapaz de seguirla y acercarse a su origen. Cuando la composición de la feromona emitida se corresponde con la de la hembra se habla de camuflaje. En cambio, cuando la composición que provoca este efecto difiere de la emitida por la hembra se habla de enmascaramiento (uso de mezclas feromonales incompletas).

-Desequilibrio sensorial: Se produce cuando, a pesar de que el macho no se ve afectado fisiológicamente, hay compuestos en el ambiente que anulan el efecto de los compuestos emitidos por la hembra interfiriendo en la respuesta natural del macho. Ejemplos de compuestos que podrían producir este efecto sobre la señal serían la presencia de isómeros que no aparecen en la feromona natural, análogos de la feromona con grupos funcionales diferentes, etc.

4. Medida de semioquímicos en aire

4.1 Importancia de la medida de semioquímicos en aire

El uso de los semioquímicos para el control de plagas está ampliamente extendido y en continuo desarrollo debido a las amplias ventajas que ofrecen. La confusión sexual mediante el uso de feromonas es el método más utilizado contra muchas especies y suele ser la técnica de mayor aceptación entre los métodos de control basados en semioquímicos debido a su eficacia y, en general, a su menor coste respecto a los métodos basados en la atracción. A pesar de estas altas eficacias, la reducción de su coste y su mejora sigue siendo necesaria para incrementar su uso en las especies en las que ya está disponible y para aquellas en las que el principal impedimento para su uso se basa en motivos económicos.

El coste de la implementación de esta técnica de control suele estar limitado principalmente por el precio de la propia feromona, es decir, el coste de su síntesis (Vacas et al., 2011a; Welter et al., 2005). Es por ello por lo que suele buscarse la máxima eficiencia en su uso, tratando de obtener los niveles óptimos de control que conlleven el uso de la menor cantidad de feromona posible. La mayoría de estos estudios suelen realizarse de una forma muy empírica basándose en medidas indirectas como el daño tras el tratamiento, número de emisores, carga inicial, distribución de emisores, etc. (Alfaro et al., 2009; Vassiliou, 2009; Epstein et al., 2006; Knight, 1995; Schwalbe and Mastro, 1988).

La cuantificación de la feromona en aire y su distribución en el campo puede aportar información valiosa mediante la cual poder determinar si se está desaprovechando o si está mal distribuida a lo largo del campo de cultivo. Además, puede permitir el estudio y la determinación de los mecanismos que provocan la confusión sexual en el insecto diana. Toda esta información podría llegar a utilizarse, no solo para optimizar su uso, sino para el desarrollo de emisores, ya que conociendo la cantidad de feromona a la cual se produce la confusión sexual, puede optimizarse la carga inicial y la cinética de emisión de los mismos.

La cuantificación de feromona en aire puede ser también útil para conocer la concentración de feromona en aire presente a diferentes distancias de un punto de emisión, pudiendo utilizar estos datos en la mejora de técnicas más costosas como el trapeo masivo (Alfaro, 2006). Conocer la cantidad de feromona presente en el ambiente puede correlacionarse con el nivel de emisión de los dispositivos, permitiendo establecer con más información una distribución inicial de emisores o trampas, reduciendo el número de ensayos requeridos para su utilización. Esto supondría un ahorro considerable de tiempo puesto que dichos ensayos de prueba error son costosos y de larga duración ya que se deben realizar al menos durante una campaña del cultivo.

La medida de semioquímicos en aire puede también tener usos interesantes en el campo del estudio del medioambiente y la reducción de los impactos que tienen numerosas actividades sobre el mismo. Recientemente, dentro del campo de la ecotoxicología se han descrito numerosos casos en los que se describe lo que se ha denominado como el efecto “infoquímico” (Klashka, 2008), término que describe el impacto de volátiles procedentes de actividades antropogénicas sobre la comunicación química de los seres vivos.

4.2 Medida de compuestos orgánicos volátiles en aire

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) comprenden un gran grupo de compuestos químicos contaminantes en el aire atmosférico, que incluyen los hidrocarburos gaseosos o con alta volatilidad a temperatura ambiente, cuyo origen puede ser natural o antropogénico. Los que se pueden encontrar con mayor abundancia son metano, tolueno, n-butano, isopentano, etano, benceno, n-pentano, propano y etileno (MITECO, 2020). De los más de 500 compuestos orgánicos clasificados como COVs, más de 80 se han clasificado como nocivos y algunos como cancerígenos (Król et al., 2010a).

Los efectos que pueden provocar estos compuestos sobre los seres vivos y el medio ambiente hacen necesario el conocimiento de su concentración en el aire para evaluar su calidad y tratar de reducir su presencia. Debido a los impactos que

pueden provocar existe mucha información referente a las técnicas empleadas para medir su concentración. Toda esta información puede ser utilizada para el desarrollo de una metodología que permita la cuantificación de semioquímicos en aire. Por ejemplo, hay numerosos estudios en los que se describe la metodología utilizada para cuantificar, por ejemplo, la cantidad de dioxinas, furanos y otros compuestos aromáticos policíclicos (PACs) presentes en el aire, sustancias que pueden presentarse a niveles de femtogramos por metro cúbico (Ahad et al., 2020; Li et al., 2008; Abad et al., 2007; Lohmann y Jones, 1998). También pueden encontrarse trabajos científicos en los que se describe la presencia de sustancias en aire a niveles similares a los que se encuentran las feromonas, como la cantidad de nicotina, cafeína y sustancias estupefacientes en grandes ciudades, a niveles de picogramos y nanogramos por metro cúbico (Pal et al., 2013; Cecinato et al., 2012), así como la presencia de, por ejemplo, naftaleno en el ártico (Drotikova et al., 2020) o la presencia en el aire de metilsiloxanos volátiles (VMSs) (Ahrens et al., 2014). En muchos de estos casos, la toma de muestras se realiza mediante captaciones de volátiles con equipos de alto volumen en los que los compuestos volátiles se adsorben en diferentes tipos de materiales como espuma de poliuretano, resinas de distintas superficies específicas y tamaños de poro, carbón activo, etc., para posteriormente realizar su extracción y cuantificación mediante análisis químico con equipos de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Existe numerosa literatura científica en la que se hacen revisiones extensas sobre la captación y la medida de sustancias en aire ambiente (Forbes, 2020; Pandey et al., 2011; Demeestere et al., 2007; Kumar and Viden, 2007; Harper 2000).

4.3 Dificultad de la medida de feromona en aire

Al igual que para muchos de los COVs, uno de los mayores inconvenientes a la hora de diseñar una metodología que permita su cuantificación es la baja concentración de estas sustancias en el ambiente. En el caso concreto de las feromonas, el problema se intensifica, ya que además de presentarse en muy bajas concentraciones, la estructura química de las feromonas carece de rasgos diferenciales de importancia que permitan distinguir las de otras sustancias

orgánicas que pueden encontrarse en el aire. Su estructura suele basarse en una cadena de carbonos que puede presentar alguna saturación y un grupo funcional que suele ser un alcohol, un aldehído o un éster (Alfaro, 2006). Esto hace que muchas de las feromonas de cadena lineal sean difícilmente separables de hidrocarburos lineales presentes en la atmósfera y que suponen un ruido de fondo que suele estar en niveles superiores al de las señales que nos proporcionan las feromonas.

Para superar estos inconvenientes hace falta disponer de equipos de captación de alto volumen y equipos de cromatografía de gases-masas con gran sensibilidad y selectividad.

4.4 Antecedentes de cuantificación de feromonas en aire

Tres técnicas diferentes han sido descritas y utilizadas para la medida de feromonas en aire. Dos de ellas pertenecen a la categoría de ensayos electrofisiológicos (EAG y registro de sensilia única) y la tercera consiste en el análisis químico de muestras de aire previamente captadas (Karg and Sauer, 1995).

El desarrollo de equipos de EAG portátiles que pudieran ser utilizados en campo se produjo a finales de los años 80 (Sauer et al., 1992; Baker and Hayness, 1989). Baker y Hayness (1989) obtuvieron los primeros electroantenogramas en campo, mostrando la respuesta electrofisiológica del macho a la feromona de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) presente en campo, pero se encontraron con las limitaciones de movilidad de un equipo de estas características. Fueron Sauer y sus colaboradores (1992) quienes describieron un equipo portátil suficientemente manejable para realizar estudios más elaborados de la concentración de feromona en aire en campos de cultivo.

Aunque es cierto que mediante un EAG portátil puede conseguirse información de manera rápida con bastante sensibilidad, el uso de esta técnica presenta varios inconvenientes. Uno de ellos es la complejidad que presentan los montajes de las antenas, que requieren tener cierta habilidad y llevan aparejados problemas de reproducibilidad. Además, el tiempo de vida útil de una antena cortada

no suele sobrepasar los minutos y puede que no todos los insectos utilizados tengan la misma sensibilidad al estímulo debido a diversos factores como su edad o su estado. La presencia de otros componentes en la matriz ambiental puede también producir estímulos que interaccionen con el de la feromona. Además de las dificultades anteriores, hay que tener en cuenta que utilizando esta metodología solo se pueden obtener valores relativos, dada la alta dificultad de hacer un calibrado de la señal. Aunque pueden ser utilizados a la hora de realizar comparaciones entre medidas (van der Pers and Minsk, 1998; Witzgall et al., 1996; Sauer et al., 1992), pueden no ser igual de útiles para tratar de correlacionar parámetros como el nivel de emisión y la cantidad de feromona en aire. Algunas de las limitaciones de la EAG portátil pueden superarse con el uso del registro de sensilia única, ya que elimina el efecto que pueden ocasionar otros estímulos en el registro de la señal (Sauer et al., 1992). El problema es que en este caso la preparación se vuelve más costosa y además existe el mismo problema de calibrado y de obtención de medidas absolutas.

La forma más directa para la medida de la concentración de feromonas en el aire es mediante el análisis químico de muestras de aire previamente captadas. Las diferentes técnicas de captación de volátiles se explican en el siguiente apartado.

4.5 Cuantificación de volátiles mediante la captación de muestras de aire.

A modo de síntesis, el procedimiento para la cuantificación de volátiles en aire consiste en los siguientes pasos: (1) captación, (2) extracción, (3) concentración y limpieza y, (4) análisis químico de la muestra.

4.5.1 Captación de la muestra de aire

4.5.1.1 Técnicas de captación

Las principales técnicas para la captación de muestras de aire son (Król et al., 2010; Yusà et al., 2009):

-Captación pasiva: Método de muestreo para la recogida de muestras de aire sin la ayuda de una bomba. Las sustancias químicas se depositan adsorbidas o absorbidas en un sustrato. Es un método barato y simple que no requiere de

electricidad para su funcionamiento, por lo que puede utilizarse en lugares donde no se dispone de una fuente de energía. Sin embargo, su uso suele requerir de muestreos muy prolongados en el tiempo (desde semanas hasta meses) y su uso puede ser ineficaz para volátiles presentes a muy bajas concentraciones, además de ser muy dependiente de la temperatura y de la velocidad del viento. También proporcionan valores relativos, difícilmente correlacionables con las concentraciones reales por la dificultad del calibrado.

-Captación dinámica o activa: El aire pasa a través de un prefiltro y un cartucho de material adsorbente gracias a un bombeo activo. El prefiltro retiene las partículas sólidas mientras que los volátiles son retenidos en el material adsorbente. Dependiendo del volumen de aire que sean capaces de movilizar, los captadores se clasifican como: de bajo volumen (0-3,6 m³/h) o de alto volumen (13-30 m³/h). En el caso de los captadores de alto volumen, su principal ventaja es la gran cantidad de aire que permiten tratar, acortando los tiempos de muestreo y la efectividad de la captación. Sin embargo, la necesidad de energía eléctrica en el lugar de la toma de muestra puede resultar un factor limitante. Además, sobre todo en el caso de los captadores de alto volumen, su transporte y montaje pueden ser problemáticos.

En las captaciones realizadas de forma dinámica o activa cobra especial importancia conocer si tras el periodo de tiempo que ha durado la captación de volátiles, ha habido una fuga del analito de interés por la parte inferior del tubo/cartucho adsorbente, efecto conocido con el nombre de *breakthrough*. Debido a la dificultad de evitar este efecto en este tipo de muestras, diversos autores consideran aceptable este efecto (que no afecta de manera significativa al resultado obtenido) siempre que el valor resultante de la ratio entre la cantidad de analito en la parte inferior y la cantidad de analito total no supere un valor establecido. Como ratios mínimas aceptables se describen aquellas cuyos valores no sobrepasaban 0,20 - 0,33 (Bidleman and Tysklind, 2018; Peters et al., 2000; Hart, et al., 1992).

Por lo tanto, los sistemas de captación dinámica de alto volumen parecen los ideales para la captación de sustancias presentes a muy bajas concentraciones en

aire. El hecho de poder captar grandes volúmenes de aire en tiempos más o menos razonables hacen que la cuantificación de los semioquímicos sea posible (Alfaro, 2006).

Materiales o dispositivos para la toma de muestra

Los materiales o dispositivos utilizados para captar los analitos que contiene la muestra de aire son variados. Hay que tener en cuenta que se trata de una elección decisiva puesto que el material adsorbente o el dispositivo utilizado debe ser capaz de atrapar aquello que se pretende analizar. Además, una buena elección puede facilitar el análisis posterior de la muestra. Entre las diferentes alternativas encontramos (Kosikowska and Biziuk, 2010; Król et al., 2010; Yusà et al., 2009):

-Cartuchos adsorbentes: cuando se utilizan captadores de volátiles, tanto de alto como de bajo volumen, se utilizan cartuchos que se rellenan con una sustancia adsorbente en la que se fijarán los volátiles cuando el aire muestreado los atraviese. Como paso previo se pueden utilizar filtros de partículas de fibra de vidrio o de fibra de cuarzo. En ellos se depositan las partículas sólidas de la corriente de aire antes de que este pase por el material adsorbente.

Los materiales adsorbentes utilizados deben cumplir una serie de requisitos: no degradar los analitos adsorbidos ni producir compuestos de degradación propios, deben mantenerse libres de contaminación antes y después de la toma de muestra y, por último, deben de retener poco el agua, evitando futuros problemas para el análisis de las muestras (Dewulf and van Langenhove, 1997). Entre los adsorbentes utilizados podemos encontrar (López et al., 2017; Król et al., 2010; Yusà et al., 2009; Alfaro, 2006):

- Carbón activado: Es un adsorbente ampliamente utilizado en captaciones dinámicas. Es un adsorbente muy poroso capaz de adsorber sustancias de bajo peso molecular logrando su estabilidad durante un periodo de tiempo muy prolongado.

- Carbones negros grafitizados (GCB's): Son adsorbentes muy termoestables capaces de retener un gran número de compuestos orgánicos, que se presentan en forma porosa.
- Polímeros porosos: Ideales para los compuestos volátiles y semivolátiles, con una gran superficie de adsorción y mucha estabilidad térmica. Suponen una ventaja respecto al carbón activado, puesto que son hidrófobos ya que la humedad puede provocar la pérdida de algunos analitos apolares.
- Espuma de poliuretano (PUF): Adsorbente utilizado de manera común para el muestreo de volátiles en aire. Son espumas que se pueden encontrar en una variedad de tamaños y densidades. Pueden ser utilizadas en muestreos realizados tanto en bajo como en alto volumen.

-Canister: Se trata de recipientes herméticos cuyo interior se encuentra a vacío (Dewulf and van Langenhove, 1997). Las muestras de aire pueden ser introducidas al abrir el canister a presión atmosférica sin el uso de una bomba. Utilizando esta metodología se hace necesaria la pre-concentración de la muestra tomada en el canister mediante, por ejemplo, un adsorbente o una trampa criogénica. El material más habitual utilizado para los canisters es el acero inoxidable. Pese a permitir la toma de muestras sin necesidad de un punto de energía cercano, presentan varios inconvenientes como la limpieza para su reutilización y su volumen limitado, ya que los más habituales no tienen más de 6 L de capacidad lo que los hace poco útiles para la cuantificación de sustancias en el aire que se presentan a muy bajas concentraciones (Król et al., 2010; Alfaro, 2006; Wang and Austin 2006; Woolfenden, 1997).

-Bolsas de muestra: En este caso la muestra de aire se introduce dentro de bolsas de fluoruro de polivinilo (Tedlar), teflón o polietilentereftalato (Nalofan). Entre las ventajas del uso de estas bolsas se encuentran su bajo precio, la variedad de volúmenes que se pueden captar que van desde 0,5 hasta cientos de litros y la posibilidad de ser reutilizadas tras un correcto tratamiento. Entre los inconvenientes se encuentran la imposibilidad de ser utilizadas para grandes volúmenes de aire, se

perforan con facilidad aumentando la posibilidad de fugas, y la inestabilidad que presentan algunos volátiles en su interior. El contenido de humedad del aire también puede ser problemático por lo que existen variantes con doble capa o incluso triple capa (Król et al., 2010; Mochalski et al.; 2009; Clariou, 2006;).

4.5.2 Extracción de la muestra

A la hora de separar la muestra del sustrato adsorbente en el que se ha realizado la captación de volátiles, existen dos técnicas de uso generalizado: la extracción mediante disolventes y la desorción térmica.

Extracción mediante disolventes

Es la manera en la que se desprende la muestra del sustrato en el que permanecía adsorbida al atravesar el adsorbente con un disolvente. En la elección del disolvente es importante utilizar uno que solubilice el analito y que no degrade o extraiga componentes del material adsorbente. Hay que evitar en lo posible el efecto matriz, es decir, que la matriz adsorbente contamine la muestra. Teniendo en cuenta todo esto, existen principalmente tres formas de extracción: maceración, Soxhlet y extracción con disolventes a presión.

-Maceración: Consiste en introducir el material adsorbente en un recipiente con el disolvente. Esta técnica presenta el inconveniente de representar periodos largos de tiempo para la extracción de determinados productos e incluso alcanzar una baja eficiencia (De Castro and Priego-Captote, 2010). Con el objetivo de acelerar el proceso se le suele añadir agitación o aumentar la temperatura si es posible. Además, existe la posibilidad de aumentar la velocidad y la eficiencia de extracción con el uso de ultrasonidos o de microondas (Kosikowska and Biziuk, 2010).

-Extracción mediante Soxhlet: La extracción mediante Soxhlet es la técnica más ampliamente utilizada (De Castro and Priego-Capote, 2010). Entre las ventajas que tiene el uso de esta técnica están su bajo coste y la facilidad de uso, la eficacia de extracción ya que la muestra se somete repetidamente (dependiendo del número de ciclos) al disolvente limpio en caliente y evita tener que realizar un filtrado de la

disolución obtenida puesto que permanece separada del material adsorbente. Los principales inconvenientes de esta técnica son los largos tiempos de extracción, la posible degradación de compuestos termolábiles y la cantidad de disolvente utilizado, que suele ser alta (Castro and Priego-Captote, 2010).

-Extracción con disolventes a presión: Se basa en el uso de disolventes manteniéndolos a una temperatura alta acelerando la extracción, pero a una presión en la que se mantiene al disolvente por debajo de su punto de ebullición asegurando una extracción rápida y segura. Los parámetros principales que se tienen en cuenta para su uso son el disolvente utilizado (polaridad y punto de ebullición), la temperatura y el tiempo (Kosikowska and Biziuk, 2010). Frente a la extracción con Soxhlets presenta como ventajas principales su rapidez y el ahorro de disolvente.

Extracción sin uso de disolventes

-Desorción térmica: Se basa en el uso del flujo de un gas inerte como el helio a una temperatura elevada a través de un tubo de muestra, de manera que los compuestos captados en la muestra de aire se desorben. La muestra en este caso entra directamente al sistema de análisis cromatográfico (Alfaro, 2006). Al no utilizar disolventes, se evitan los pasos intermedios entre la extracción y el análisis, y se reduce el efecto matriz (Kosikowska and Biziuk, 2010), pudiendo aumentar el límite de detección. Cuando se hace uso de los canister o las bolsas, la muestra puede concentrarse criogénicamente y después introducirse directamente en el equipo de cromatografía por calentamiento balístico. Es un método comúnmente utilizado para cuantificación de volátiles en aire a concentraciones más altas (Kosikowska and Biziuk, 2010).

4.5.3 Concentración y limpieza de la muestra

Una vez se ha extraído el adsorbente, la disolución que se obtiene tiene que ser concentrada para su posterior análisis en los equipos de cromatografía. Para ello, se utiliza de manera habitual el evaporador rotatorio o la evaporación de la disolución aplicando una corriente suave de un gas inerte como el nitrógeno. Además, hay casos en los que se requiere la eliminación de la muestra de aquellos

componentes de la matriz que puedan dificultar su posterior análisis. Para ello es útil realizar una elución previa de la muestra por cromatografía en columna convencional.

4.5.4 Identificación y cuantificación del analito contenido en la muestra

Dada la volatilidad de las feromonas parece claro que la técnica de cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) es la más adecuada para su cuantificación, además de la altísima sensibilidad que proporciona. Esta tecnología puede utilizarse en modo de escaneo completo (*full scan*, FS) o en modo de monitoreo selectivo de iones (*selected ion monitoring* (SIM)). El modo FS actúa analizando un rango amplio de masas, obteniendo un cromatograma de iones totales (TIC) y el espectro de masas completo para cada pico cromatográfico, lo que permite la identificación del compuesto. En cambio, el modo SIM consigue aumentar significativamente la sensibilidad en la detección de compuestos conocidos, al estrechar considerablemente el rango de masas que se monitorizan, o incluso trabajar con una única masa. Aunque el trabajo de Alfaro (2006) consiguió medidas de concentración de feromona en aire utilizando esta técnica, en ocasiones no proporcionaba un nivel de sensibilidad y selectividad suficiente. Con los equipos actuales de espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) o de triple cuadrupolo, se consigue aumentar estos parámetros debido a la posibilidad de utilizar el modo de monitoreo selectivo de reacción (*selective reaction monitoring*, SRM). En estos equipos, el uso de un detector de tripe cuadrupolo permite la detección del ion procedente de la fragmentación del compuesto de interés (ion precursor), así como de uno o varios iones procedentes de la fragmentación secundaria del mismo (iones producto). Para ello, en primer lugar, es necesaria la elección de un ion procedente de la sustancia a analizar y la posterior elección del ion o de los iones más abundantes procedentes de la fragmentación del ion precursor, a lo que llamamos transición. Con ello lo que se consigue es una gran selectividad, eliminando ruido de fondo y aumentando extraordinariamente la sensibilidad.

5. La polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana*)

5.1 Importancia y daños

La polilla del racimo de la vid, *Lobesia botrana* (Denis & Shiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae), es una plaga considerada clave de la viticultura debido al impacto que puede ejercer sobre el cultivo. Aunque es cierto que hay varias especies de polillas (tortricidos) que ataquen al viñedo, *L. botrana* es, con diferencia, la causante de los mayores daños sobre este cultivo (Coscollá, 1997). Los daños producidos por este organismo sobre el cultivo son tanto directos, perforación de bayas por parte de las larvas cuando se alimentan, como indirectos ya que estos orificios son una vía de entrada de patógenos como *Botrytis cinerea* (Persoon: Fries) (Sclerotiniaceae) que provocan la podredumbre del racimo (Ioriatti et al., 2011; Coscollá, 1997). Se trata de una especie muy polífaga ya que se ha descrito que las larvas pueden alimentarse sobre viña y otras cuarenta especies pertenecientes a más de 27 familias como Vitaceae, Oleaceae, Rosaceae, Grossulariaceae, Berberidaceae y Cornaceae (Ioriatti et al., 2011; Thiéry and Moreau, 2005; Stavridis and Savapoulou-Soultani, 1998), plantas típicas en condiciones climáticas de países de la cuenca mediterránea.



Figura 8 Presencia y daños generados por *Lobesia botrana* en el racimo.

5.2 Distribución geográfica

Lobesia botrana es una especie originaria de la región paleártica donde está ampliamente distribuida. Fue descrita por primera vez en el año 1776 por Denis y Schiffermuller en Austria sobre *Daphne gnidium* L. (Malvales: Thymelaeaceae), aunque no se detectó su presencia en viñedos hasta principios del siglo XIX, cuando

empezó a extenderse rápidamente por Alemania y Suiza. A principios del siglo XX se detectó en Francia y en el norte de África, concretamente en Argelia. Su presencia en África central se asume derivada de una introducción accidental provocada por la entrada de material vegetal (Coscollá, 1997).



Figura 9 Distribución mundial de *Lobesia botrana* (Fuente: CABI, 2020).

En el pasado se creía su presencia en Japón registrada por Matsamura (1931) pero en una revisión posterior se descartó asumiendo que se trataba de una identificación errónea (EPPO, 2020; Falck and Karsholt, 1998).

En el caso de América su detección es mucho más reciente. Se detectó en viñedos de Chile en el año 2008 y en Argentina en 2010. En Estados Unidos, concretamente en California, se detectó en el año 2009 (Varela et al., 2010) aunque tras la implementación de un programa de erradicación y de no observar ninguna captura de machos adultos de la polilla desde 2014, en 2016 se consideró erradicada (Schartel et al., 2019).

En España se detectó con carácter de plaga a principios de ese mismo siglo en Cataluña y rápidamente se extendió por toda la península. Su incidencia es especialmente preocupante a lo largo de toda la zona mediterránea (Cataluña, Comunidad Valenciana y Murcia), Extremadura, Aragón, La Rioja, y Andalucía, especialmente en Cádiz y Almería, mientras que en el norte y el centro de la península tiene una importancia escasa dónde no suele realizarse ningún

tratamiento específico (Coscollá, 1997). Su presencia en las Islas Canarias no ha sido confirmada, pero sí que lo ha sido en el caso de las Islas Baleares (Torres-Vila, 2006; Torres-Vila, 2000).

5.3 Sistemática

La sistemática de la polilla del racimo, *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller), ha sufrido a lo largo del tiempo un número considerable de modificaciones. Actualmente, su clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera
Superfamilia	Tortricoidea
Familia	Tortricidae
Subfamilia	Olethreutinae
Tribu	Lobesiini
Género	<i>Lobesia</i>
Especie	<i>botrana</i>

Debido a las continuas modificaciones de su sistemática se conocen un número considerable de denominaciones tanto genéricas como específicas. *Tortrix botrana* fue la primera denominación realizada por sus descubridores, Schiffermüller y Denis en 1776.

En cuanto a su nombre común, el más utilizado en España es el de “polilla del racimo” aunque también recibe otros nombres como “polilla de las uvas”, “gusano de las uvas”, etc. En La Comunidad Valenciana y Cataluña su denominación más común es “cuc del raïm” o “corc del raïm”. En inglés se le denomina “European Grapevine moth” (Coscollá, 1997).

5.4 Morfología

Lobesia botrana es una especie polivoltina, ya que presenta de dos a cuatro generaciones en un mismo año dependiendo de las condiciones climáticas, y holometábola, pasando por las fases de huevo, larva, crisálida y adulto o imago (Coscollá, 1997):

Los huevos de *L. botrana* tienen una forma más bien elipsoidea de unos 0,8 por 0,6 mm, de aspecto translucido con reflejos irisados. Al final de su desarrollo puede observarse claramente la cabeza de color negro de la larva.

Las larvas emergen con una longitud de 1 mm con la cápsula cefálica marrón y el cuerpo de color blanquecino, pasa por cinco estadios diferentes alcanzando hasta 1 cm y un color verdoso-amarillento antes de empezar la metamorfosis. La crisálida es marrón oscuro de unos 6 mm de longitud por 1,5 mm de anchura y suele presentarse envuelta por un capullo sedoso que la protege.

Los adultos tienen un tamaño de unos 6 mm de longitud y unos 12 mm de envergadura y son de color marrón claro jaspeado. Durante el día permanecen inactivos y resguardados en las partes sombreadas de la planta. Tienen una actividad crepuscular iniciando su actividad al final del día, aunque se puede dar un vuelo al amanecer. Tras 2 o 3 días desde la emergencia son sexualmente maduros produciéndose la cópula durante los vuelos crepusculares en los que el macho se dirige hacia la hembra atraídos por la emisión de su feromona sexual.



Figura 10 Huevo (izquierda; Fuente: Todd M. Gilligan and Marc E. Epstein, TortAI: Tortricids of Agricultural Importance, USDA APHIS PPQ), larva y adulto (centro y derecha; Fuente: Todd Gilligan, Screening Aids, USDA APHIS PPQ) de *Lobesia botrana*.

Como en los adultos no se aprecia un dimorfismo sexual muy claro, a pesar de que el tamaño de los machos es algo menor y son mucho más activos que las hembras, el sexaje para realizar experimentos en el laboratorio se puede realizar con las pupas ya que presentan una serie de diferencias entre las cuales destacan: (1) el número de segmentos abdominales desde la punta del abdomen hasta el segmento en el que se sitúa el ala, de 4 en el caso del macho y de 3 en el caso de

la hembra; (2) la posición y la forma de la hendidura genital, ya que el orificio genital del macho se encuentra entre dos prominencias y situado en el VIII esternito abdominal y en el caso de la hembra en el IX; y (3) la longitud de las antenas, que en la pupa es mayor en el caso de los machos (CABI, 2020; Steinitz et al., 2016).

5.5 Ciclo biológico

El ciclo de la polilla empieza con el primer vuelo de los adultos procedentes de las crisálidas invernantes en diapausa situadas en la corteza de las viñas o en los restos y hojarasca que permanecen en el suelo. A lo largo del tiempo y con el aumento progresivo de las temperaturas se produce una eliminación gradual de la diapausa que finaliza con la emergencia primaveral de los adultos generando el primer vuelo de esta especie. Aunque las fechas son variables, dependiendo de las condiciones climáticas, este primer vuelo, en nuestras condiciones climáticas, suele producirse entre el mes de marzo y el mes de mayo. La puesta generada durante el primer vuelo se sitúa generalmente sobre las corolas de las flores y en menor medida sobre los brotes y las hojas. De los huevos emergen las larvas que se desplazan hasta alcanzar un botón floral del que se alimentan. A continuación, se desplazan por varios botones florales provocando su unión mediante hilos sedosos conformando los glomérulos, dónde se protegen para pupar.

El segundo vuelo se produce normalmente en los meses de junio y julio tras la emergencia de las crisálidas de la primera generación. La puesta de huevos durante este segundo vuelo se realiza ya sobre granos o bayas más desarrolladas, aunque todavía inmaduras, que serán el alimento de las larvas de la segunda generación.

El desarrollo y pupado de estas larvas de segunda generación determinan el tercer vuelo de la plaga que se sitúa entre los meses de agosto y septiembre. Los daños provocados por la tercera generación procedente del tercer vuelo pueden llegar a ser mucho más severos, puesto que los racimos están finalizando su maduración y hay mayor probabilidad de que se originen podredumbres debido a la entrada de hongos fitopatógenos.

En algunas regiones más cálidas puede llegar a producirse un desarrollo completo de la tercera generación provocando un cuarto vuelo que carece de importancia ya que, tras la vendimia, las larvas carecen de alimento y además se desarrollará en unas condiciones climáticas desfavorables. Por ese motivo este cuarto vuelo suele recibir el nombre de “vuelo suicida”.

5.6 Control de la plaga

5.6.1 Los primeros métodos de lucha

A principios y a lo largo del siglo XIX el control de la plaga era modesto y poco eficaz y se basaba en técnicas más rudimentarias contra cada uno de sus estadios con el objetivo de disminuir el impacto de la plaga.

En el caso de las pupas, se utilizaban técnicas como el descortezado de las cepas mediante rascadores, el escaldado de las mismas con agua hirviendo o vapor a presión, la quema de azufre sometiendo la cepa al SO₂ desprendido y el embadurnamiento de cepas con leche de cal o sulfato de cobre (Torres-Vila, 1995). En el caso de los adultos, se intentaban controlar mediante trampas de luz utilizando velas, alcohol, etc., o trampas alimenticias con melazas en fermentación. Las larvas trataban de eliminarse manualmente, mediante aplastamiento cuando se sitúan en las inflorescencias en primera generación, o cortando las bayas afectadas en la segunda y tercera generación. Además, se utilizaban métodos culturales que pueden seguir siendo utilizados en la actualidad, como la poda y el deshojado, tratando de ventilar el interior de la planta y de favorecer el efecto negativo de la radiación solar directa sobre los huevos, o el adelantamiento de la cosecha para evitar una incidencia desmesurada de la plaga aun renunciando a ciertos niveles de maduración (Coscollá, 1997).

5.6.2 Control químico

A finales del siglo XIX empezó a realizarse un control químico más elaborado con el uso de insecticidas de origen natural como el pelitre, la nicotina o la rotenona que precedió a los insecticidas minerales a principios del siglo XX. A finales de este

siglo, con el surgimiento de los insecticidas de síntesis, estos sustituyeron prácticamente a todas las otras técnicas de control, pero debido los problemas ocasionados y a las nuevas normativas mucho más restrictivas, el uso de estos productos se ha racionalizado en la actualidad.

Además, los productos insecticidas utilizados se han ido sustituyendo por productos más selectivos y menos tóxicos como, por ejemplo, nuevos neurotóxicos como las espinosinas y las oxitodiacinas, o reguladores del crecimiento (IGRs) como tebufenocida y metoxifenocida (Ioriatti et al., 2011; Coscollá, 1997). Actualmente, se encuentran autorizados diversos insecticidas como abamectina, clorantaniliprol y varios pertenecientes a la familia de los piretroides como cipermetrina, acrinatrina, y lambda cialotrina (MAPA, 2020).

5.6.3 Control biológico

Existen estudios en los que se consiguió cierto control de la plaga utilizando parasitoides del género *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) mediante sueltas aumentativas (Abd El-Monsef, 2004; Hommay et al., 2002). También hay experiencias con el uso de los himenópteros pteromálicos *Dibrachys affinis* Masi y *Dibrachys cavus* (Walker), parasitoides generalistas que afectan tanto larvas como a pupas, aunque su falta de selectividad los hace poco viables para el control biológico (Ioriatti et al., 2011; Dergachev, 1995). Un parasitoide que se ha visto muy eficiente y que es frecuente en los viñedos europeos es el himenóptero *Campoplex capitator* Aubert (Hymenoptera: Ichneumonidae), mostrando ratios de parasitismo elevadas, aunque la dificultad de su cría masiva impide su uso para realizar sueltas (Xuéreb and Thiéry, 2006; Xuéreb and Thiéry, 2004).

Los depredadores presentes en el viñedo suelen ser muy polífagos, entre los cuales se pueden incluir arácnidos, míridos, crisópodos, sírfidos, etc. (Thiery et al., 2018; Sentenac, 2011). También hay diversos estudios en los que se habla de fomentar el control biológico mediante las aves y los quirópteros insectívoros ya presentes en el ecosistema (Sentenac and Rusch, 2017; Barbaro et al., 2017). Debido a la variedad de especies beneficiosas que pueden estar presentes en el

ecosistema se recomienda la utilización de técnicas que mantengan o incrementen la diversidad presente en el viñedo como sería el caso del uso de infraestructuras ecológicas (Franin et al., 2016).

El principal bioplaguicida utilizado contra la polilla del racimo debido a su eficacia es el basado en la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner ssp. (Bt) pero también se ha descrito el uso de hongos entomopatógenos de diferentes géneros como *Spicaria*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Citromyces* y *Stemphylium* (Coscollá, 1997).

5.6.4 Control biotécnico

La identificación del componente principal de la feromona de *L. botrana*, acetato de (*E,Z*)-7,9-dodecadienilo, se produjo en los años 70 (Roelofs et al., 1973). Posteriormente, se fueron identificando otros compuestos procedentes de extractos de las glándulas de las hembras que también provocaban actividad actuando de manera sinérgica junto al componente principal como el (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-ol y el acetato de (*Z*)-9-dodecenilo (Arn et al., 1988).

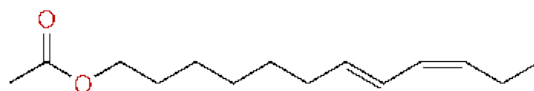


Figura 11. Componente mayoritario de la feromona de *Lobesia botrana*, acetato de (*E,Z*)-7,9-dodecadienilo.

Estos descubrimientos permitieron el desarrollo de la técnica de la confusión sexual contra la polilla del racimo de la vid. Aunque en un principio se obtuvieron resultados poco consistentes (Roehrich and Carles, 1977), el desarrollo de la confusión sexual para *Eupoecilia ambiguella* (Hübner) (Lepidoptera: Tortricidae), especie relacionada estrechamente con la polilla del racimo de la vid, produjo que una década más tarde se implementara con éxito para esta plaga (Ioriatti et al., 2011). Todos los métodos de control directo utilizados actualmente contra *L.*

botrana, así como para su seguimiento están basados en el uso del componente principal de su feromona (Vacas, 2011). Actualmente, debido a la alta eficacia conseguida por la técnica de la confusión sexual y a todas sus ventajas, la superficie de viñedos en Europa en la que se usa esta técnica de control ha alcanzado valores próximos a las 249.000 ha de las cuales unas 76.000 ha se sitúan en España (Lucchi et al., 2018b). En la actualidad los métodos de emisión más utilizados para conseguir la confusión sexual son los emisores pasivos y los emisores automáticos de pulverización.



Figura 12 Diferentes tipos de emisores utilizados para la confusión sexual de la polilla del racimo (De izquierda a derecha: Quant Lb Pro, Isonet® L, el dispositivo automático de pulverización Checkmate Puffer Lb y Lobetec).

6. El barrenador del arroz (*Chilo suppressalis*)

6.1 Importancia

Chilo suppressalis Walker es una de las principales plagas del arroz en las principales zonas productoras del mundo (Chen et al., 2011; Alfaro et al., 2009; Zibae et al., 2009; Jiang and Cheng, 2003). Es una especie polífaga que se ha observado en más de 40 especies de plantas pertenecientes a 6 familias diferentes. Las poaceas, tanto silvestres como cultivadas, son los huéspedes preferidos. Entre los cultivos en los que produce problemas, a parte del arroz, se encuentra la caña de azúcar, el maíz, el trigo, el sorgo y el mijo (Batalla, 1999a Khan et al., 1991). Las pérdidas ocasionadas por este lepidóptero pueden llegar a ser muy importantes, desde alrededor de un 5% hasta un 100% citado en algunas zonas de Japón (Cho et al., 2005). En las zonas productoras valencianas se ha descrito que, antes del uso de la confusión sexual como método de control podía causar entre un 10 y un 25% de pérdidas (Jimenez y et al., 1992), actualmente con este método de control los daños producidos no superan el 2% (Vacas et al., 2016).

6.2 Distribucion geográfica

Chilo suppressalis, originaria del Extremo Oriente (Ramoneda, 1988), se encuentra presente en la mayor parte de los países asiáticos productores de arroz como Bangladés, Camboya, China, India, Indonesia, Irán, Iraq, Japón, Corea, Lao, Malasia, Myanmar, Nepal, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka, Taiwan, Tailandia y Vietnam. En Oceanía se ha detectado su presencia en Australia y en Papua Nueva Guinea. En América del Norte se ha identificado en los Estados Unidos. En este país su presencia alcanza niveles más altos especialmente en Hawaii. En el caso de Europa se ha descrito su presencia en Francia, Hungría, Portugal, Rusia y España (EPPO 2020). En el continente africano existieron citas de su presencia en Egipto, Malawi y Zanzíbar (Tanzania), aunque no se confirmó, en el caso de Egipto se piensa que se debieron a una identificación errónea, confundiéndolo con *Chilo agamemnonk* (Bleszynski, 1970).



Figura 13 Distribución mundial de *Chilo suppressalis* (Fuente: CABI, 2020).

En España se detectó por primera vez en València en 1933, aunque no fue hasta 1935 cuando empezó a presentarse con carácter de plaga y a necesitar medidas de control (Gómez-Clemente, 1940; Jiménez et al., 1992). A partir de ese momento continuó su expansión encontrándose ya en las provincias de Tarragona, Huesca y Girona y, ocasionalmente, en Badajoz y Sevilla (Ramoneda, 1988).

6.3 Sistemática

La clasificación taxonómica de *C. suppressalis* es la siguiente:

Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera
Superfamilia	Pyraloidea
Familia	Crambidae
Subfamilia	Crambinae
Tribu	Chilini
Género	<i>Chilo</i>
Especie	<i>suppressalis</i>

El nombre común más utilizado en España es el de “barrenador del arroz” aunque también recibe otros nombres como “taladro del arroz” o “piral” y en las zonas de la Comunidad Valenciana y Cataluña, “cucat” es la denominación más común (Alfaro, 2006; Eixarch and Fornós, 2006). En la literatura científica en inglés se le denomina como “Rice stem borer” o “Striped rice stem borer”, o también debido a su origen, “Asiatic rice borer”.

6.4 Morfología

Chilo suppressalis es una especie polivoltina y holometábola, con un número de generaciones variable dependiendo de las condiciones climáticas. Se ha descrito que en las zonas más cálidas de Asia puede desarrollar entre una y cinco generaciones (Hou et al., 2010). En nuestras condiciones suele generar hasta tres generaciones (Batalla, 1999b). Los estadios presentes durante su desarrollo se pueden identificar por las siguientes características (Eixarch and Fornós, 2006; Batalla, 1999b; Gomez-Clemente, 1940):

-Los huevos son amarillentos con una forma más bien elíptica con unas dimensiones aproximadas de 0,5 mm de ancho y 0,8 mm de largo y se encuentran agrupados formando placas irregulares y planas en el envés de las hojas.

-Las larvas son de color ocre y al final de su desarrollo pueden alcanzar los 26 mm de longitud. El número de fases larvarias es variable, mientras que en zonas con clima más templado tiene entre 5 y 6, puede llegar a 9 en las zonas más cálidas. Tienen 5 líneas longitudinales (3 dorsales y 2 laterales) muy características de color más oscuro que se utilizan para su identificación en campo, La capsula cefálica es negra tras la emergencia, pero marrón en el resto de estadios. Su aparato bucal masticador es potente y tienen 3 pares de patas torácicas y 4 pares de pseudopatas abdominales.

-Las crisálidas suelen aparecer protegidas por un capullo sedoso y son de color anaranjado que va oscureciendo a lo largo de su desarrollo. Tienen entre 9 y 13 mm de tamaño y presentan cierto dimorfismo sexual apreciable, sobre todo, en la huella del orificio genital.

-Los adultos son de color amarillento. Un elemento característico son 7 puntos negros que aparecen en el borde de las alas anteriores, además los palpos labiales forman dos apéndices prolongando la cabeza. Existe cierto dimorfismo sexual en esta especie. En primer lugar, mientras que los machos tienen un tamaño comprendido entre 20 y 24 mm de envergadura alar, las hembras son más grandes pudiendo alcanzar los 28 mm. En segundo lugar, la coloración de las alas de los

machos es más oscura que el de las hembras y, por último, los últimos segmentos abdominales, nueve y diez para los machos y ocho, nueve y diez para las hembras, están modificados por unas estructuras internas que forman la genitalia.

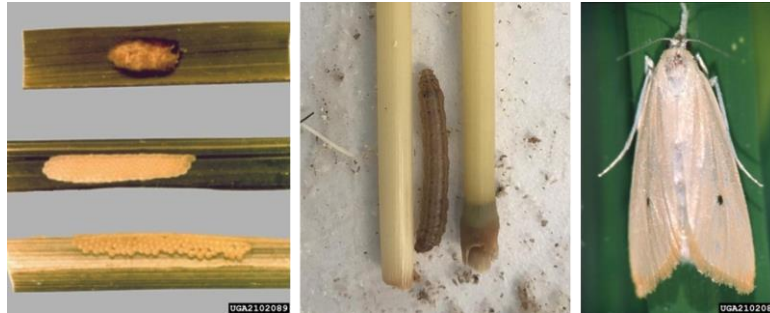


Figura 14 Puesta (izquierda; Fuente: International Rice Research Institute), larva (centro) y adulto (derecha; Fuente: International Rice Research Institute) de *Chilo suppressalis*.

6.5 Ciclo biológico y daños

En los arrozales de la Comunidad Valenciana el ciclo biológico del barrenador presenta dos generaciones bien definidas durante el ciclo de cultivo del arroz y una tercera generación que es incompleta. Las larvas entran entonces en diapausa cuando se acorta el fotoperiodo y se reducen las temperaturas, coincidiendo con el final de la campaña del arroz y cuyos adultos emergerán al principio de la campaña siguiente (Serrano et al., 1994). Las larvas invernan en el interior de los tocones y en la vegetación de marjal colindante a los campos de cultivo.

El primer vuelo del barrenador se produce desde finales de mayo hasta finales de junio y se corresponde a los adultos que proceden de la generación invernante coincidiendo con el inicio del desarrollo del arroz. El tiempo de vida de los adultos se sitúa entre los 4 y los 7 días iniciando su actividad en el atardecer, durante la noche y hasta el amanecer. Durante el día permanecen en reposo en zonas sombreadas en las partes bajas de las plantas. El apareamiento se produce tras la detección, por parte del macho, de la feromona emitida por la hembra.

La puesta se produce entre 24 y 48 horas tras la cópula y puede alargarse durante 2 o 4 días en los que la hembra deposita los huevos formando una

agrupación en forma de placa que puede contener hasta 200 (Eixarch and Fornós, 2006; Batalla, 1999b). La eclosión de estos huevos suele producirse prácticamente de manera simultánea. Las larvas se desplazan hacia la base del limbo de la hoja mientras se alimentan y se introducen entre el tallo y la vaina y se alimentan en el interior del tallo. A lo largo de su desarrollo se desplazan en busca de más alimento hasta que forman la crisálida, de manera que pueden observarse en un campo infestado rodales con varias plantas debilitadas y hojas cloróticas (Batalla, 1999b).



Figura 15 Síntomas de daño de barrenador en la parte superior de la planta (Izquierda). Larva de barrenador en el interior del tallo (Derecha).

El segundo vuelo se produce entre julio y agosto coincidiendo con los distintos estados fenológicos de la planta del arroz. En el caso de esta generación las larvas no se alimentan del limbo foliar si no que se introducen directamente entre la vaina y el tallo de las partes superiores de las plantas. El daño en la planta se debe al daño producido consecuencia de la alimentación de las larvas que produce la destrucción de los sistemas aeríferos y vasculares interrumpiendo el transporte de nutrientes a la panícula. Estas larvas forman las crisálidas a finales de agosto dando lugar a la tercera y última generación de la temporada puesto que sus larvas entraran en hibernación hasta la próxima temporada (Batalla, 1999b).

6.6 Control

La lucha contra el barrenador en la Comunidad Valenciana desde su introducción puede dividirse en cuatro etapas en las que se ha producido una evolución en los métodos de control. Esta evolución en el control de la plaga ha sido

motivada con la necesidad de aumentar su eficacia y con el objetivo de reducir el impacto de su control sobre el medio ambiente (Alfaro, 2006). En el cultivo del arroz, la reducción del impacto medioambiental se hace especialmente importante debido a que, por sus características, se desarrolla sobre humedales con gran riqueza ecológica. En el caso de la Comunidad Valenciana, la mayor parte del cultivo del arroz se realiza en zonas del parque natural de la Albufera de València.

6.6.1 *Control cultural*

Durante la primera etapa de lucha contra el barrenador (1933-1950), en los primeros momentos en los que se presentaba como plaga, su control se basaba en el uso de técnicas culturales con un nulo o poco impacto ambiental, pero con bajas eficacias. Las técnicas utilizadas tenían como objetivo reducir la población de la generación invernante mediante la destrucción de sus refugios (paja, rastrojos y tocones) ya sea mediante la quema o la inundación de los campos (Gómez-Clemente, 1940).

6.6.2 *Control químico*

La segunda y la tercera etapa de la lucha contra el barrenador coinciden con la disponibilidad de insecticidas clorados y fosforados, con los que podía conseguirse un control eficaz de la plaga. Primero mediante su aplicación individual, por parte de los productores (1950-1965), y posteriormente de forma colectiva, mediante los Servicios Oficiales de Protección de Cultivos (1965-1980). Esta evolución tuvo lugar tras adquirir un mejor conocimiento de la biología de la plaga, como la determinación de las fechas de vuelo de los adultos y el uso de un sistema de seguimiento de la plaga basado una red de monitoreo con trampas luminosas. Con ello se consiguió un avance en el control de la plaga, pero se provocó un desequilibrio ecológico considerable (Batalla, 1999b).

6.6.3 *Control biológico*

En la Comunidad Valenciana, se realizó un intento de lucha biológica en los años 50 utilizando colonias del parasitoide *Trichogramma minutum* Riley sin resultados satisfactorios (Batalla, 1999a). A finales de los 70, se estableció un

programa de actuación contra el barrenador en la provincia de València para el desarrollo de la lucha biológica, pero tras un estudio del complejo parasitario presente no se obtuvo ningún ejemplar parasitado (Jimenez et al., 1992). En ese estudio también se citaron especies parásitas cuya introducción podría ser exitosa, pero en la actualidad no se han llevado a cabo más avances en este sentido.

En los países asiáticos, a pesar de que la primera variedad de arroz transgénica con *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) se generó en China en 1993, no se permitió la producción con ese tipo de variedades hasta el 2009 debido a las preocupaciones por posibles impactos ecológicos (Wang et al., 2016).

6.6.4 Control biotécnico

La que podría considerarse la cuarta etapa en el avance de la lucha contra el barrenador en la Comunidad Valenciana fue iniciada con el uso de la técnica de confusión sexual en el año 1988, tras el éxito de unos experimentos realizados a principios de la década (Casagrande, 1993; Beevor et al., 1980; Beevor et al., 1977). Esta lucha se basaba en el uso de emisores de PVC, Selibate®CS (Agrisense BCS Ltd., Pontypridd, UK) (Casagrande, 1993) que contenían los tres componentes de la feromona de *C. suppressalis*, (*Z*)-11-hexadecenal, (*Z*)-13-octadecenal y (*Z*)-9-hexadecenal.

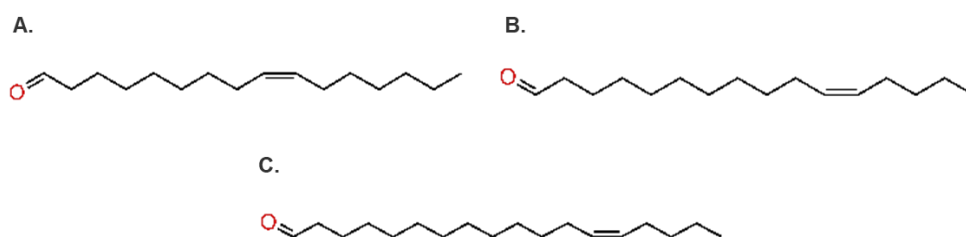


Figura 16 Componentes de la feromona de *Chilo suppressalis*. (A. (*Z*)-9-hexadecenal, B. (*Z*)-11-hexadecenal y C. (*Z*)-13-octadecenal).

En un primer momento se estableció que el número de estos emisores para conseguir buenos resultados se situaba en 100 por hectárea. En las campañas del 2004 y del 2005, tras realizar unos ensayos en los que se compararon las eficacias de 3 densidades diferentes (39, 31 y 25 em/ha), se confirmó que podía reducirse cantidad necesaria sin comprometer la eficacia a 39 em/ha y que utilizando 25 em/ha ya se observaba un aumento significativo del nivel de plaga (Alfaro et al., 2006). En esos momentos la confusión sexual se compaginaba con tratamientos aéreos, primero con insecticidas fosforados más selectivos y más adelante con tebufenocida, un IGR poco tóxico. Estos tratamientos se realizaban siempre y cuando se superaban los umbrales de tratamiento y en los momentos adecuados, que se establecían mediante la red de monitoreo basada en trampas de tipo embudo cebadas con un emisor de feromona sexual y una pastilla de dichlorvos (DDVP) (Alfaro, 2006).



Figura 17 Emisor biodegradable para el control del barrenador (Izquierda). Trampa *funnel* utilizada para el seguimiento del barrenador (Derecha).

El año 2006 fue el primero en el que no se realizó ningún tratamiento químico en la provincia de València. Con el objetivo de evitar el impacto ambiental debido al residuo que queda en campo de los emisores de confusión, en las campañas de 2005 y 2006 se realizó un ensayo a dos densidades (14 x 14 m y 16 x 16 m) de un nuevo formulado sobre un soporte biodegradable (Figura 15) que verificó la eficacia respecto el emisor estándar (Alfaro et al., 2006).

En el caso del Delta del Ebro, el control del barrenador se ha basado en las dos últimas décadas en el uso del trapeo masivo mediante el uso de la feromona como atrayente complementado por tratamientos químicos cuando se supera el umbral de daños (Palència and Ramoneda, 2004). Sin embargo, en los últimos 2 años ha tomado especial importancia la confusión sexual también en esta zona. Esto es debido a la aparición en el mercado de mesoemisores que permiten la colocación de los mismos a lo largo de los bordes de las parcelas sin tener, por lo tanto, que colocarlos dentro de las zonas inundadas.

Objetivos y justificación

Objetivos y justificación

La medida de la cantidad de feromona en aire en campos tratados con confusión sexual puede ser de gran importancia para mejorar el conocimiento sobre el funcionamiento de los diferentes tipos de emisores y, por tanto, su eficacia en tratamientos contra plagas. Asimismo, puede ser una herramienta útil para elucidar los mecanismos que producen la confusión sexual y contribuir a la mejora y el diseño de nuevos emisores. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo son:

1. Desarrollar una metodología para la cuantificación de feromona en aire en campos tratados con emisores de confusión sexual.

Como se ha indicado en la introducción, son varios los parámetros a los que hay que prestar atención a la hora de desarrollar una metodología para la cuantificación de volátiles en aire. En el Anejo metodológico incluido en el presente trabajo se detalla el proceso dinámico de desarrollo seguido, partiendo de una metodología preliminar establecida en condiciones controladas. Esta metodología se fue adaptando a los diferentes problemas que surgieron debidos a la propia naturaleza de la feromona a cuantificar, a la matriz ambiental y a la mitigación del efecto *breakthrough*. Las pruebas preliminares de captación se realizaron con la feromona de *Aonidiella aurantii* Maskell (Homoptera: Diaspididae), tanto en captaciones de interior como en condiciones de campo, por ser un modelo con el que ya se trabajaba en nuestro centro de investigación. Posteriormente, la metodología se aplicó a la cuantificación de feromona en aire en parcelas tratadas con confusión sexual contra *Lobesia botrana* y *Chilo suppressalis*.

2. Conocer si hay diferencias en la cantidad de feromona en aire en campos de cultivo tratados con diferentes tipos de emisores de confusión sexual.

La confusión sexual de la polilla de la vid, *Lobesia botrana*, se aplica principalmente mediante emisores pasivos instalados manualmente, pero cada vez es más habitual el uso de dispositivos automáticos de pulverización a densidades

considerablemente menores (500 emisores/ha vs. 4 dispositivos/ha). El estudio de las diferencias en la concentración de feromona en aire que proporcionan estas dos tecnologías de emisión puede aportar información que ayude a optimizar el uso de la feromona y a estudiar los mecanismos que desencadenan la confusión sexual.

3. Conocer si las concentraciones de feromona presentes en el aire pueden desencadenar mecanismos no competitivos de confusión sexual en lepidópteros.

Se conocen numerosos ejemplos en los que se han conseguido desencadenar mecanismos de confusión sexual no competitivos en machos de lepidópteros sometiéndolos en condiciones de laboratorio a una alta concentración de su feromona. Una vez se han obtenido valores absolutos de la concentración de feromona en aire en campos de cultivo (viñedos), es interesante conocer si esas concentraciones son capaces de desencadenar estos mecanismos en el organismo diana (*L. botrana*), puesto que dicha información puede ser relevante para el conocimiento del modo de acción de los distintos tipos de emisores utilizados.

4. Estudiar el papel de la cubierta vegetal en la regulación de la concentración de feromona en el campo de cultivo

En la literatura se cita en ocasiones que la cubierta vegetal puede adsorber la feromona del ambiente y actuar como reservorio, pero no se conoce en qué medida este efecto es significativo y qué impacto puede tener en la concentración de feromona en aire. Esta información es de interés tanto para el diseño de emisores como para optimizar su distribución en campo.

5. Estudiar la dependencia climática de emisores pasivos utilizados para el control de *Lobesia botrana* por confusión sexual.

Una de las mayores ventajas que ofrecen los dispositivos automáticos de pulverización frente a los emisores pasivos de colocación manual es la independencia de su emisión respecto a las condiciones climáticas. El estudio de la dependencia climática de la emisión de dos dispositivos pasivos utilizados en la

actualidad en condiciones reales de campo permitirá explicar si esta dependencia es significativa o si, por el contrario, para los emisores actuales esta dependencia no compromete su eficacia. Además, con esta información se podrá conocer si la variación en la cantidad de feromona en aire en campos en los que se han instalado emisores pasivos puede deberse, en parte, a esta dependencia.

6. Relacionar la cantidad de feromona en aire a lo largo del ciclo de cultivo del arroz con la cinética de los emisores de confusión sexual para optimizar la fecha de colocación de los mismos.

La lucha contra el barrenador del arroz, *Chilo suppressalis*, en la Comunidad Valenciana se aplica en toda la superficie de cultivo mediante la colocación de emisores pasivos. Es habitual detectar el tercer vuelo de la plaga en la zona, por lo que es posible que los emisores utilizados pierdan eficacia de inhibición de capturas al final de la campaña. Por este motivo y para ajustar el uso de la feromona, sería importante saber a qué generaciones habría que dar prioridad de control a la hora de instalar los emisores: antes del primer vuelo, para controlar la salida de las poblaciones invernantes o antes del segundo vuelo, para controlar la generación más tardía. El estudio simultáneo de las cinéticas de emisión y la medida de feromona en aire, relacionadas con la eficacia de los tratamientos de confusión pueden aportar información que ayude a mejorar la técnica

Capítulo 1

“Airborne pheromone quantification in treated vineyards with different mating disruption dispensers against *Lobesia botrana*”

Airborne pheromone quantification in treated vineyards with different mating disruption dispensers against *Lobesia botrana*

Published in: Gavara, A., Vacas, S., Navarro, I., Primo, J., & Navarro-Llopis, V. (2020). *Insects*, 11(5), 289.

Abstract. Mating disruption (MD) is widely used against the European grapevine moth (EGVM), *Lobesia botrana* (Denis and Schiffermüller; Lepidoptera: Tortricidae), by installing passive dispensers or aerosol devices. The present work reports a new sampling and quantification methodology to obtain absolute data about field airborne pheromone concentration based on air samplings and sensitive chromatographic-spectroscopic methods. Samplings were performed in fields treated with passive dispensers or aerosol devices at different moments throughout the crop cycle to study how they act and how the disruption is triggered. Moreover, pheromone adsorption and releasing capacity of vine leaves were studied to elucidate their role in the disruption. Although both types of dispensers were effective in limiting the damage inflicted by EGVM, they performed differently and provided different airborne pheromone concentration profiles. Results also proved that leaves were able to adsorb and release part of the airborne pheromone acting as subsequent and additional pheromone sources. This fact could explain the different concentration profiles. Moreover, our results suggest that lower pheromone emission than that of the current passive dispensers still could provide an adequate performance in the field. Competitive mechanisms involved in MD using both dispensers, the dynamics of the airborne pheromone throughout the time and the importance of the canopy are discussed.

1.1 Introduction

Mating disruption (MD) is widely used as an environmentally friendly pest control method in economically important crops due to its high effectiveness, specificity and the lack of toxic residues on fruit, in contrast to the conventional methods based on the use of pesticides (Lucchi et al., 2018a; Witzgall et al., 2010). Nevertheless, the higher cost of mating disruption compared with the traditional control in some crops is sometimes detrimental for its implementation (Kovanci, 2017; Gordon et al., 2005; Williamson et al., 1996; Knight, 1995). For this reason, the studies focused on the optimization of the pheromone used, quantity and releasing mode, are essential to reduce the implementation costs of this technique and make it more available to growers. This fact is of great importance to introduce MD to control those species for which the cost of implementation is too high to be assumed by the growers and to optimize the use of pheromone for those that are already controlled by MD.

Once mating disruption is proven effective against a pest, the pheromone cost is crucial for the implementation of this technique. The final cost of mating disruption depends on pheromone production costs (Welter et al., 2005; Vacas et al., 2011a), which are related to: (1) chemical synthesis and economies of scale, (2) the quantity of pheromone needed and (3) the pheromone emission rate and the number of dispensers required per hectare. All these parameters are related to the biology of the target pest and the mechanisms that trigger the mating disruption. In general, mating disruption may be governed by different mechanisms acting almost simultaneously but there is usually a principal mechanism responsible for the disruption. These mechanisms can be classified as competitive or non-competitive. In the case of competitive disruption, males, females, and their signals have no impairments, therefore, females compete with the artificial pheromone sources (dispensers) and the efficacy of the treatment will depend mainly on pest density. On the other hand, when non-competitive disruption is acting, the signal, males or

females are impaired since the beginning of sexual activity, making the efficacy pest-density-independent (Miller and Gut, 2015).

Hand applied passive dispensers are traditionally the most commonly employed devices to implement mating disruption as a pest control technique (Lucchi et al., 2018b; Witzgall et al., 2010; Witzgall et al., 2008; Gut et al., 2004). They consist of little containers of plastic materials filled or impregnated with the pheromone, which is released passively through their walls. These dispensers are deployed at high densities of more than 250 units/ha (Lucchi et al., 2018b; Altindisli et al., 2016; Miller and Gut, 2015). Using this type of dispenser, competitive attraction seems to be the main mechanism acting in disrupted fields (Miller et al., 2006). Alternatively, automatic aerosol devices are being increasingly used with good efficacy against many moth pests (Lucchi et al., 2018b, McGhee et al., 2014; McGhee, 2014; Stelinski et al., 2007). They are mechanical devices connected to a pressurized metal can, which is loaded with an appropriate formulation of the pheromone, a diluent, and a propellant, usually an inert gas. These devices can be programmed for releasing equal amounts of the formulation containing the pheromone via emissions at regular time intervals when moths are active. Unlike passive dispensers, these devices are deployed at very low densities (2-5 units/ha) due to their high pheromone release (Miller and Gut 2015). Non-competitive disruption triggered by desensitization of males along their wide plumes was an explanation of their performance (Welter et al., 2005), although a competitive mechanism cannot be dismissed and most current studies report that males are drawn away from females towards the pheromone sources in a mechanism called “induced allopatry” (Miller and Gut, 2015; McGhee, 2014).

The European grapevine moth (EGVM), *Lobesia botrana* (Denis and Schiffermüller; Lepidoptera: Tortricidae), is a key pest in vineyards, which has been traditionally controlled using mating disruption (Wilson and Daane, 2017; Vacas et al., 2011b;) by employing hand applied passive dispensers at high densities (500 or, more recently, 250 units on average per hectare) providing a continuous emission of (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate (Lucchi et al., 2018b; Altindisli et al., 2016;

loriatti and Lucchi, 2016; loriatti et al., 2011). Currently, growers can disrupt EGVM using either passive pheromone dispensers or aerosol devices to apply mating disruption against EGVM. In this pest, the efficacy of aerosols is scarcely reported in the scientific literature but with promising results (Benelli et al., 2019; Lucchi et al., 2018b). In addition, these studies highlighted three inherent advantages of this technique: the lower number of dispensers per hectare needed, the reduction of labor costs and the reduction of plastic disposal compared with passive dispensers.

Despite the effectiveness reported for both types of dispensers, the reduction of their cost and improvement of their efficacy are still necessary to increase the use of mating disruption. For this reason, better knowledge of the mode of action of each one must be accurately studied. Most of the studies performed on different pests are based on empirical and indirect measurements of the efficacy based on parameters such as fruit injury levels, dispenser load, distribution, etc. (McGhee et al., 2016; Alfaro et al., 2009; Vassiliou, 2009; Epstein et al., 2006; Knight, 1995; Schwalbe and Mastro, 1988). The quantification of airborne pheromone concentrations present in the field, the study of pheromone distribution from the time of their releasing and the interaction with the canopy could offer an interesting approach with valuable information to improve the efficacy of pheromone-releasing systems (Arn and Louis, 1997).

Unfortunately, there is scarce information regarding airborne pheromone concentrations due to the difficulty of its quantification. Three techniques were described in the past to measure airborne pheromone (Karg and Sauer, 1995): (1) field electroantennography (EAG) measurements, (2) single sensillum recordings and (3) air sampling by collecting airborne volatiles on filters and their chemical analysis. Field EAG offers more instantaneous and quick measurements that allow studying temporal and spatial pheromone fluctuations. However, data obtained with these methods could be misinterpreted due to the interaction of pheromone and host-plant detection, differences between individual antennae and the lack of linearity of the detector (Sauer et al., 1992). Moreover, this procedure needs precise calibrations due to the complexity of the environmental matrix and insect fitness, and

it also depends on a proper handling of insect preparations. Single sensillum recordings have the advantage of the elimination of other semiochemicals effect in the signal. However, it is more difficult to carry out than field EAG due to the fragile and laborious preparation of the antennae, besides not being effective for the interpretation of the signal when a pheromone blend triggers an insect response. There are works that attempted to study airborne pheromone concentration in fields treated against EGVM using field EAG in the 1990s (Sauer and Karg, 1998; Karg and Sauer, 1997; Karg and Sauer, 1995; Sauer et al., 1992). In these experiments, they were capable to obtain relative data to see differences in airborne pheromone concentration by studying different parameters such as different seasons (spring and summer), height of dispensers deployment, their density, presence of developed foliage, distance from the center of the plot, etc., but they had several difficulties due to the field EAG drawbacks.

Air sampling followed by chemical analysis of collected samples for pheromone quantification is a technically feasible method that can provide the most accurate and absolute data about airborne pheromone concentration in treated fields. However, it provides time-averaged data because relatively long sampling periods are needed to detect the minute quantities of pheromone collected (Karg and Sauer, 1995). The low detection level thresholds required were, in the past, the main difficulty for these measurements, but currently, due to the lower limits of detection achieved by analytical instruments, an accurate quantification of airborne substances is possible. Many methods have been developed to detect environmental and health-damaging substances at very low concentrations, i.e., dioxins and furans are quantified in air at concentrations of femtograms (10^{-15} g) per cubic meter (Li et al., 2008; Abad et al., 2007; Lohmann and Jones, 1998). Airborne psychotropic substances were quantified at nanograms (10^{-9} g) per cubic meter in different Italian cities (Cecinato et al., 2012) as an example of substances at similar concentration levels to airborne pheromones. These quantifications can be achieved with high volume collectors, effective adsorbents, and more sensitive chromatographic and spectroscopic methods such as gas chromatography coupled

with triple quadrupole mass spectrometers (GC-MS/MS). Although there are many protocols for quantifying environmental and health damaging substances, the similarities of pheromone chemical structures with organic compounds present in the environmental matrix and the lack of characteristic functional groups still make their identification and quantification more difficult.

In this work we have developed a method that allowed us to successfully quantify airborne concentrations of EGVM pheromone in vineyards treated with two commercial releasing systems: passive dispensers and aerosol devices. These quantifications have been performed in three different moments throughout the vineyards crop cycle for both types of dispensers, while comparing their efficacy. In addition, foliar samples of these treated vineyards were taken to analyze their pheromone content and check their role as subsequent and additional pheromone sources. All the data collected has been employed to discuss the operating mode of both dispensers and the competitive mechanisms governing the mating disruption of the EGVM with each pheromone emission system.

1.2 Materials and Methods

1.2.1 Field Locations and Mating Disruption Systems

Studies were conducted between March and October 2018 in vineyards for winery trained onto trellises. The experiment was a complete block design with two locations (Location 1 and Location 2) and three treatments within each site. Location 1 was located in Venta del Moro (València, Spain; UTM coordinates 39.482608, -1.318822) with a plantation pattern of 2.5 m × 1.5 m (cultivar Bobal) and Location 2 in Moixent (València, Spain; UTM coordinates 38.808779, -0.815917), also with a plantation pattern of 2.5 m × 1.5 m (cultivar Monastrell). The three different treatments included at each location were: (1) Isonet[®] L (MD treatment with the passive dispensers Isonet[®] L (Shin-Etsu Chemical Co., Tokyo, Japan) at a density of 500 dispensers/ha); (2) Checkmate (MD treatment with the aerosol devices CheckMate[®]Puffer[®] LB (Suterra LLC, Bend, OR, USA) at a density of 4 dispensers/ha) and (3) untreated control

(UTC), without any type of treatment against EGVM. None of the fields of either location received any additional insecticide or fungicide application. The three treatments were applied at each location by delimiting 2 ha regular areas. The UTC areas were located 500 m upwind from the MD treatments at each site. The aerosol devices were installed following the manufacturer instructions and programmed to release the pheromone via emissions each quarter hour from 18:00 h to 06:00 h.

Male flight was monitored weekly at both locations from 21 March 2018 and the MD treatments were not deployed until the first catch was detected at any location, which was near the end of April. Then, the dispensers were set on 24 April 2018 at Location 1 and on 23 April 2018 at Location 2.

1.2.2 Airborne Pheromone Quantification

1.2.2.1 Chemicals and Reagents

All solvents and chemical reagents used (HPLC and Synthesis grade, respectively) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reactions were carried out under a nitrogen atmosphere with dry solvents, unless otherwise noted. Solvents were dried under standard procedures. All purchased chemicals were used without further purification. Macherey-Nagel Silica gel 60 F254 TLC plates (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain) were used for analytical thin layer chromatography (TLC) technique. Plates were visualized by using a UV lamp or using an appropriate stainer (p-anisaldehyde in ethanol/aqueous $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ or 10% solution of phosphomolybdic acid in ethanol and heat as developing agents).

(*E,Z/E*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate was supplied by Ecología y Protección Agrícola S.L. (Carlet, València, Spain). A high purity standard of (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate (ca. 95%) was obtained after purification of the supplied sample by gravity column (silica gel containing 10% of AgNO_3 ; eluent: 3% Et_2O /hexane), which had spectroscopic properties identical to those described in the literature (Cahiez et al., 2017).

Due to the abundance of pheromone structurally related compounds in air collected samples, a straight chain fluorinated hydrocarbon ester (heptyl

4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoate), was selected as an internal standard in order to improve both sensitivity and selectivity for MS/MS method optimization. See the next section for experimental details

1.2.2.2 Heptyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9- Tridecafluorononanoate (TFN) synthesis

To a solution of 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoic acid (500 mg, 1.3 mmol) in dichloromethane, oxalyl chloride was added. After 60 min of continuous stirring, the solvent was removed under vacuum. The residue was re-dissolved in dry dichloromethane (DCM) (15 ml) and 1-heptanol (0.26 mL, 1.5 mmol) followed by triethyl amine (0.31 ml, 3 mmol) were sequentially added at room temperature, and the resultant solution was refluxed for 24 h. After this period, 15 ml of DCM were added and the solution was successively washed with HCl (1M, 20 ml), NaHCO₃ (sat., 20 mL), brine (15 ml) and dried with anhydrous MgSO₄. The solution was filtered and the residue was purified by column chromatography (silica gel; eluent: 1 % Et₂O/Hexane) to yield heptyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoate (281 mg, 45 %), as a colorless oil. MS (70 eV, m/z): 393 (10%), 375 (40%), 373 (5%), 132 (10%), 98 (30%), 83 (15%), 70 (100%), 69 (70%), 57 (90%) and 56 (90%).

1.2.2.3 Field Air Sampling

Air sampling was carried out with a high-volume air sampler (CAV-A/Mb, MCV, Barcelona, Spain) provided with an adsorbent sandwich composed by alternate layers of 20 g/L polyurethane foam (MCV, Barcelona, Spain) and adsorbent resin (XAD-2, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The sandwich structure was designed according to literature (López et al., 2017; Zaranski et al., 1991) and preliminary laboratory experiments.

The air samples of the Isonet treatment were taken at Location 1, whilst the air samples of the Checkmate treatment were taken at Location 2 due to the availability of electrical supply for the air sampler in nearby field warehouses. From that electrical source, an extension cord was connected in order to place the high-volume air sampler in the center of each treated area. Samplings of each treatment were carried out during three different plant growth phenological stages (BBCH

scale) according to Lorenz et al. (1994) throughout the crop cycle: (1) 4 samples after dispensers setting at BBCH 00-15 (May–June) for both, Checkmate and Isonet treatments; (2) 4 samples for Checkmate treatment and 3 samples for Isonet L treatment at the middle of the crop cycle at BBCH 68-75 (last week of July and first of August) and (3) 3 more samples for each one of both types of dispensers at the end of the crop cycle, before the harvest BBCH (81-89; between 11 and 27 September 2018). Samplings were initiated at 12:00 h and the sampling time was established at 48 h with a flow of 15 m³/h to cover two nights because of the aerosol devices activity. Once the samples were collected, the different parts of the sandwich were stored individually in a freezer at 3 °C in airtight bags until their extraction. Due to the long sampling periods (48 h/sampling), we were not able to perform replicates for each treatment and phenological stage at both locations. For example, the first and the last samples for the same phenological stage would be taken about 15 days apart, too far in time to be comparable.

1.2.2.4 Sample Extraction and Filtration

Foam-resin adsorbent sandwiches were extracted using a 250 mL Soxhlet apparatus, bringing 300 mL of hexane to boil for 6 h obtaining approximately 15 Soxhlet cycles. Each extract was concentrated up to 5 mL using a rotary evaporator set at 30 °C and finally to 1 mL, blown down with a gentle stream of nitrogen. Then, the samples were cleaned up through a gravity column (0.5 cm × 15 cm) packed, from bottom to top, with a glass wool plug and 500 mg of silica gel pre-eluted with hexane. The column was sequentially eluted with hexane (5 mL) and 2% Et₂O/hexane (12 mL), collecting three fractions of 5 mL. Fractions two and three containing the pheromone were concentrated up to ca. 0.5 mL in a 2 mL GC screw-cap vial (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain) blown down with a gentle stream of nitrogen. Occasionally, the column was rinsed with 100% Et₂O in order to corroborate the complete elution of the pheromone from samples.

1.2.2.5 Pheromone Quantification

Ten microliters of an internal standard solution of TFN were added to the abovementioned fraction containing the pheromone for the final chemical analysis

and quantification. Each extract was then analyzed using a TSQ 8000 Evo triple quadrupole MS/MS instrument operating in SRM (selected reaction monitoring) mode using electron ionization (EI +), coupled with a Thermo Scientific™ TRACE™ 1300 GC. All injections were made onto a ZB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) fused silica capillary column (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). The oven was held at 60 °C for 1 min then was raised by 10 °C/min up to 110 °C, maintained for 5 min, raised by 3 °C/min until 150 °C and finally raised by 35 °C/min up to 300 °C held for 5 min. The carrier gas was helium at 1.5 mL/min.

For each target compound —TFN and the main component of EGVM pheromone, (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate— the MS/MS method was optimized by selecting the precursor ion and the product ions that provided the highest selective and sensitive determinations (Table 1). TFN transition 2 and EGVM transition 3 were the ones employed to obtain the chromatographic areas. In the case of EGVM signal, the other transitions were monitored for confirmatory purposes to have increased selectivity when several peaks appear near to the pheromone peak retention time.

Table C1.1 Optimum values of the MS/MS parameters for each target compound used to quantify *L. botrana* airborne pheromone.

	Transition	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (eV)
TFN	1	375.0	263.0	10
	2	393.0	373.0	5
EGVM pheromone (main component)	1	79.1	77.0	10
	2	93.1	77.0	10
	3	164.2	79.0	15
	4	164.2	94.1	5

The amount of pheromone and the corresponding chromatographic areas were connected by fitting a linear regression model, $y = a + bx$, where y is the ratio between pheromone and TFN areas and x is the amount of pheromone.

The percentage of pheromone recovery after the extraction was checked by spiking known pheromone concentrations to a sandwich previously exposed to the same procedure of air sampling in pheromone-free places and, thus, containing environmental matrix. The chemical analysis showed a mean pheromone recovery rate of 92.8% in the case of the polyurethane foam layers and 99% of resin XAD-2 layers.

1.2.3 Adsorbed Pheromone on Leaves

1.2.3.1. Adsorption Capacity and Emission Assays

The potential of vine leaves for airborne pheromone adsorption was explored in an experimental plot in Experiment 1 and 2, and later in the commercial field conditions of Location 2 (Experiment 3).

In Experiment 1, a single aerosol emission was made 2 m away from vine leaves—simulating the distance between two rows in a vineyard. Then, 8 g of leaves in the emission influence area were randomly collected immediately (09:00 h) and 4 h, 8 h and 24 h after application. The collected leaf samples were extracted to quantify their pheromone content and to study the release profile. This experiment was replicated 4 times in different points along the vine row (with at least 4 m between emissions) and at different days (2–3 days between emissions).

In Experiment 2, an aerosol installed 2 m away from vine leaves, and 2.5 m from the ground level with the same installation instructions as in field conditions, was programmed to deliver emissions every 15 min from 18:00 h to 06:00 h. Then, 8 g of leaves were collected at three different times: 09:00 h, 13:00 h and 17:00 h (3, 7 and 11 h, respectively, after the last emission), and their pheromone content was quantified. Four replications of this experiment were conducted in previous non-treated areas, at different points along the vine row separated by at least 4 m among the emissions. Moreover, each repetition was done at intervals of 2–3 days.

Once the potential for pheromone adsorption was demonstrated, Experiment 3 was carried out in real field conditions in mid-August at Location 2. Given that passive dispensers are evenly distributed along the fields, leaves were sampled only

in the center of this field. However, as the aerosols were deployed along the perimeter of the fields, we decided to sample leaves randomly in the border —along the row where the aerosol was installed— and in the center of the field (70 m from the closest aerosol device) to check differences. Each sample consisted of 8 g of leaves, and three replicates were taken in all cases. All samples were taken at 12:00 h, 6 h after the last puffer emission.

1.2.3.2 Leaf Sample Extractions

Each 8 g sample was soaked in 300 mL hexane inside a 500 mL round-bottom flask. Each flask was partially immersed in an ultrasonic bath for 30 min and the hexane extract was filtered and concentrated using a rotary evaporator up to 1.5 mL. The solution was transferred to an eppendorf to be centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The supernatant was recovered, and to ensure the complete extraction of the pheromone the residue was re-extracted with 1 mL of hexane. Both solutions were concentrated separately, under a gentle nitrogen stream, up to 0.5 mL and first analyzed by gas chromatography using a flame ionization detector (GC-FID) in a Clarus 500 GC (PerkinElmer Inc. Wellesley, MA) using *n*-dodecane as an internal standard. All injections were made onto a ZB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column (Phenomenex Inc., Torrance, CA), held at 100 °C for 1 min and then, raised by 25 °C/min up to 250 °C and maintained for 3 min. The carrier gas was helium at 1.5 mL/min. The amount of pheromone and the corresponding chromatographic areas were connected by fitting a linear regression model, $y = a + bx$, where y is the ratio between pheromone and *n*-dodecane areas and x is the amount of pheromone. The samples that had a pheromone concentration below the quantification limit of the GC-FID were analyzed using a TSQ 8000 Evo triple quadrupole mass spectrometer (GC-MS/MS) coupled with a Thermo Scientific™ TRACE™ 1300 GC. These analyses were performed as described previously in Section 1.2.2.5. Moreover, the leaves were re-extracted and analyzed to ensure the absence of pheromone in the samples' residues. Commercial pheromones are usually mixtures of (*E,Z/E*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate. The initial proportion observed between geometrical

isomers remained constant along the different measurements, showing no isomerization to the more stable (*E/E*) isomer during this period.

1.2.4 Release Profiles Studies of the Emission Systems

In parallel with the field trials, the pheromone release profiles of the different systems were studied.

Additional passive dispensers were simultaneously aged in nearby areas at Location 1 for approximately 150 days to obtain their release kinetic in a similar way than other studies (Vacas et al., 2010). Four dispensers were taken from the field each month and their residual pheromone content was extracted and quantified by GC-FID, using the same capillary column and conditions described above in Section 1.2.3.2. For residual pheromone extraction, each dispenser was cut in pieces and soaked in 25 mL dichloromethane, inside a 50 mL glass centrifuge tube, for 2 h with magnetic agitation. Residual (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate contained in the extracts was then measured by GC-FID, using *n*-dodecane as an internal standard. Occasionally, the dispensers were re-extracted to verify the complete extraction of the pheromone.

In the case of the aerosol devices, pheromone release was estimated by the gravimetric method. Six devices were monthly weighted with a scale at Location 2. According to the composition label of the aerosols used, the pheromone is present as a 9.11% w/w. The amount of pheromone released over a period was calculated after applying that percentage to the weight differences.

1.2.5 Efficacy of the Treatments

The efficacy of the MD treatments was checked according two parameters: the captures per trap per day (CTD) —to obtain the male flight curves— and the percentage of infested bunches, obtained with crop damage assessments carried out after each male flight peak.

For capture monitoring purposes, four delta traps baited with a “Grapemone” lure (OpenNatur, Lleida, Spain) and provided with a sticky base were set in the center of each treatment (70 m apart in a square arrangement) in both locations (inside the vine canopy at 1 m above the ground). Although weekly revision of captures provides more robust data on the population dynamics and pest pressure, in this occasion, population was monitored fortnightly in the MD-treated and untreated fields just to evaluate the catch suppression efficacy of each type of MD dispenser compared with the untreated control plots. The Grapemone lures were replaced every 42 days, as a period of efficacy ensured by the manufacturer. The absence of catches in MD plots was considered a necessary condition for MD success.

In addition, crop damage assessment gave the final proof for the treatment efficacy. For this purpose, at least 200 bunches were inspected in 50 vines surrounding each delta trap in each plot in both locations to quantify damaged bunches after each male moth flight peak. In the first assessment a flower cluster was considered damaged when nests, larvae, or pupae were found. In the second and the final assessments a bunch was considered damaged when nests, eggs, larvae, or pupae were found in the visual inspection.

1.2.6 Data Analysis

All the statistical analyses were performed using SPSS v. 16 (Armonk, NY, USA).

The analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Fisher’s least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$ was used to study the differences observed in the absolute airborne pheromone concentrations found throughout the crop cycle in each MD treatment. The analysis was applied to these data without transformation, as they fulfilled the homoscedasticity requirements and the residuals of the ANOVA fitted a normal distribution. In the case of the leave adsorption

experiments, data was normalized prior to the ANOVA using \sqrt{x} to fulfill the homoscedasticity and normal distribution requirements.

In the case of population monitoring and crop assessments data a multi-factor ANOVA followed by post-hoc Fisher's least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$ was done. Population monitoring data (male captures per trap and day, CTD) were analyzed after data normalization using the data transformation reported by Stelinski et al. (2007), $\ln(x+1)$, to fulfill homoscedasticity requirements and normal distribution of ANOVA residuals. These analyses were applied to the whole capture data set and also for each flight peak separately. Data from each crop damage assessment (percentage of damaged bunches) were subjected to the angular transformation $\arcsin(\sqrt{x})$, prior to the multi-factor ANOVA.

1.3. Results

1.3.1. Airborne Pheromone Quantification

Field volatile collections and the following chemical analysis showed that airborne pheromone concentrations throughout the season varied depending on the MD treatment deployed (Figure 1). The mean concentration obtained with the Isonet dispensers was 4.84 ng/m^3 in May and the quantity increased up to 42.20 ng/m^3 in the middle of the crop cycle, significantly differing from the initial concentration ($F = 30.739$; $df = 9, 2$; $P < 0.001$). Finally, the last sampling highlighted a decrease in the concentration up to the initial levels of 4.76 ng/m^3 . By contrast, the mean pheromone concentration obtained with Checkmate dispensers was 0.44 ng/m^3 at the beginning of the season. This concentration also increased significantly ($F = 44.273$; $df = 10, 2$; $P < 0.001$) in the middle of the crop cycle (22.34 ng/m^3). Then, the airborne pheromone concentration with Checkmate dispensers was maintained until the end of the trial in the last sampling period (30.83 ng/m^3 ; Figure 1).

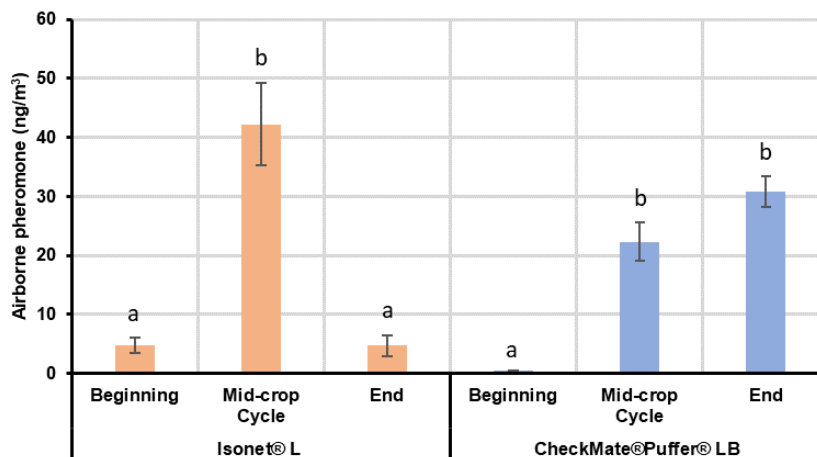


Figure C1.1 Mean (\pm SE) absolute airborne pheromone concentrations (ng/m^3) in vineyards treated with passive dispensers (Isonet® L) and aerosol devices (CheckMate® Puffer® LB). Air samples were collected at three moments during the crop cycle: (1) the beginning of the crop cycle (second week of May to middle June), (2) in the middle of the crop cycle (last week of July–first week of August) and (3) at the end of the crop cycle (second to third week of September). Data of each type of dispenser were analyzed separately by applying an ANOVA followed by the Fisher least significant difference (LSD) test ($P < 0.05$). Bars labeled with different letters for each type of dispenser are significantly different.

The main difference between both releasing systems is that Checkmate Puffer Lb maintained a similar level of airborne pheromone from the middle to the end of the crop cycle, whilst the Isonet® L airborne concentration decreased at the end of the crop cycle similar to levels recorded at the beginning of the crop cycle.

1.3.2. Pheromone Leaves Adsorption Capacity

1.3.2.1. Experiment 1

Immediately after the single aerosol emission, the total amount of pheromone quantified on leaves was $312.4 \mu\text{g}/\text{g}$, which decreased significantly up to $38.7 \mu\text{g}/\text{g}$ in just 4 h after the application (Figure 2; $F = 48.995$; $df = 3, 15$; $P < 0.001$). This amount represented approximately a decrease of almost 88% of the initial content. Then, this content kept on reducing, but at a slower rate, up to $8.3 \mu\text{g}/\text{g}$ in the third sample taken at 17:00 h (8 h after the application). Finally, the last sample taken 24 h after the application showed $5.6 \mu\text{g}/\text{g}$. Thus, the quantified values suggest that vine

leaves can release the previous adsorbed pheromone probably acting as an alternative pheromone releasing sources or regulators for the airborne pheromone concentrations.

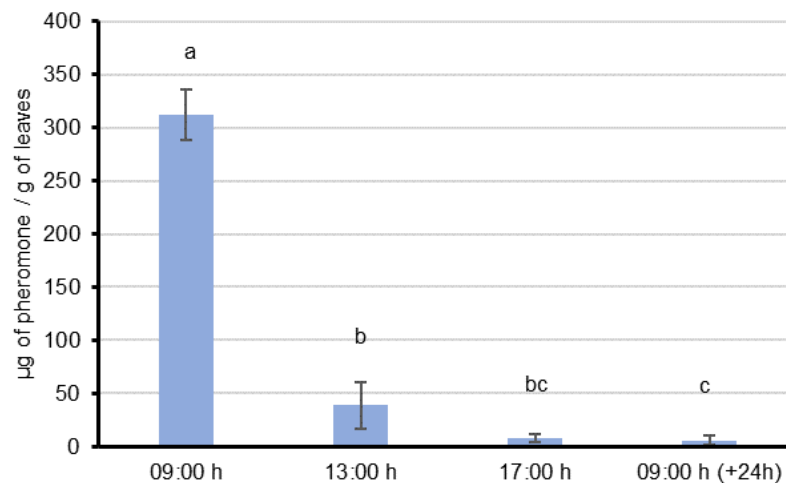


Figure C1.2 Mean (\pm SE) quantity of pheromone (μg pheromone/g leaves) adsorbed on leaf samples of Experiment 1, after one aerosol emission. Bars labeled with different letters are significantly different, ANOVA followed by the Fisher LSD test ($F = 48.996$; $df = 3, 15$; $P < 0.001$).

1.3.2.2. Experiment 2

When leaves were treated throughout the evening-night, despite the different mean amounts quantified (383 $\mu\text{g/g}$, 239.9 $\mu\text{g/g}$ and 177.6 $\mu\text{g/g}$, 3 h, 7 h and 11 h after the last emission, respectively), these were not significantly different (Figure 3; $F = 0.560$; $df = 2, 13$; $P = 0.587$). We observed high variability in the different samples for every treatment, as can be observed in the wide error bars of Figure 3. This could be possibly explained by the different leaf position on the plant and the difficulties to establish an “aerosol action area” due to the irregularity and diffusion of the plume and the wind effect. Despite the lack of statistical support, data suggest a similar decreasing trend to that observed in Experiment 1 (Figure 2). Connecting the mean amounts of pheromone with the time passed after the last emission by fitting a linear

regression model, $y = a + bx$, ($y = 390.89 - 28.61 x$; $R^2 = 0.91$), the mean pheromone emission from leaves could be established at $28.61 \mu\text{g/h}$.

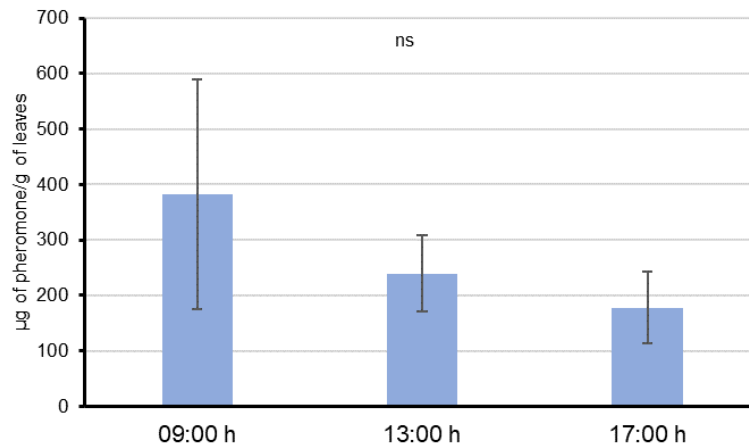


Figure C1.3 Mean (\pm SE) quantity of pheromone ($\mu\text{g pheromone/g leaves}$) adsorbed on leaf samples of Experiment 2, after overnight aerosol shooting (from 18:00 to 6:00). Bars labeled with different letters are significantly different, ANOVA followed by the Fisher LSD test ($F = 0.560$; $df = 2, 13$; $p > 0.05$).

1.3.2.3 Experiment 3

When leaf samples were taken in the commercial vineyard treated with MD at Location 2, the results indicated that leaves adsorbed similar mean quantities of pheromone ($0.07 \mu\text{g/g}$) when taken in the center of the plots treated either with aerosols or passive dispensers ($F = 1.285$; $df = 2, 8$; $P = 0.343$; Figure 4). In the border of the aerosol-treated plot, this quantity reached a mean of $0.14 \mu\text{g/g}$, although this measure had a high variability—the sample collected closest to the aerosol reached $0.26 \mu\text{g/g}$, while the furthest contained only $0.06 \mu\text{g/g}$ —.

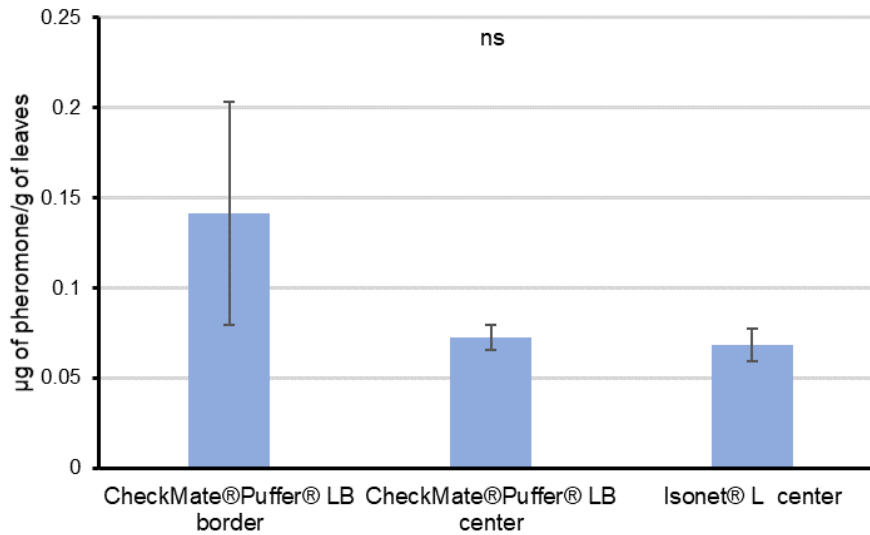


Figure C1.4 Mean (\pm SE) quantity of pheromone (μg pheromone/g leaves) adsorbed on leaf samples of Experiment 3, collected in actual field conditions at Location 2: along the row where Checkmate devices were deployed (aerosol devices border), 70 m away from the aerosols row (aerosol devices center) and at the center of the Isonet passive dispensers treated field (passive dispensers center). Bars labeled with different letters are significantly different, ANOVA followed by the Fisher LSD test ($F = 1.287$; $df = 2, 8$; $p > 0.05$).

1.3.3 Dispensers Pheromone Release Profile

1.3.3.1. Passive Dispensers' Release Profile

The quantified residual pheromone contents of the Isonet® L dispensers fitted the linear regression profile depicted in Figure 5 until the end of the growing season (140 days), when their useful life started to deplete. This means that pheromone load decreased at a constant rate and the slope of the resulting equation gives a mean pheromone release rate of about 1.2 mg/day/dispenser. Thus, the total amount of pheromone emitted was estimated at 526.29 ± 76.30 mg/day/ha from May to September (Table 2). Then, the release rate decreased in the period from early September to mid-October (from 140 to 180 days) up to one third of the previous level (22,685 mg/day/ha).

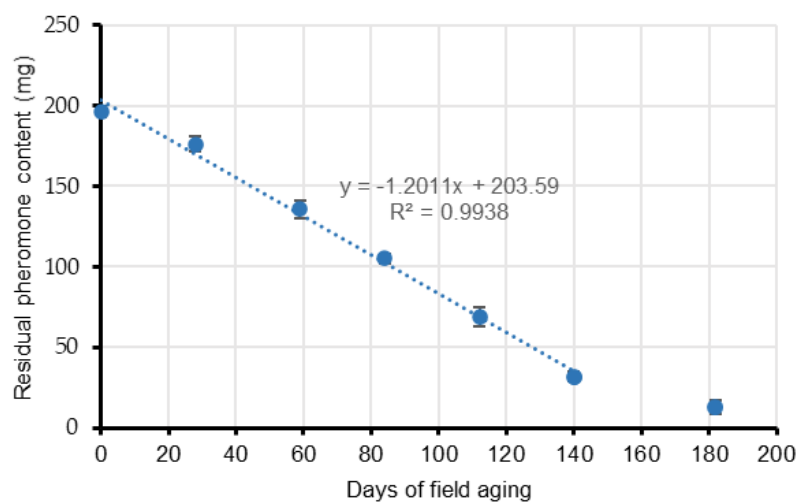


Figure C1.5 Pheromone release profile of Isonet® L passive dispensers, as residual mean pheromone load (mg) contained in the dispensers vs. the time of field exposure (days). Release kinetics fitted the linear model given by the equation.

Table C1.2 Isonet® L passive dispensers aging. Residual means of pheromone content (mg) throughout the time in field (days). Point values of Figure 5 and the total mean of pheromone used (mg/day/ha).

Days in Field (d)	Pheromone Content (mg)	Dispensers /ha	Pheromone Emission (mg/day/ha)
0	196.02 ± 3.39		-
28	176.04 ± 4.74		356.71
59	135.82 ± 5.58		648.67
84	105.08 ± 2.92	500	614.85
112	68.81 ± 5.69		647.80
140	31.68 ± 3.03		662.89
182	12.63 ± 4.03		226.85
Mean			526.29 ± 76.30

1.3.3.2 Aerosol Devices Profile

The resulting release profile of the Checkmate aerosol devices also fitted the linear equation depicted in Figure C1.6, which means a significantly constant mean release rate of 0.15 g/day/dispenser and a total pheromone emission of 602.49 ± 37.15 mg/day/ha (Table C1.3). In this case, aerosols did not show a decrease in their emission, in comparison to the passive dispensers, because of the dispenser' nature.

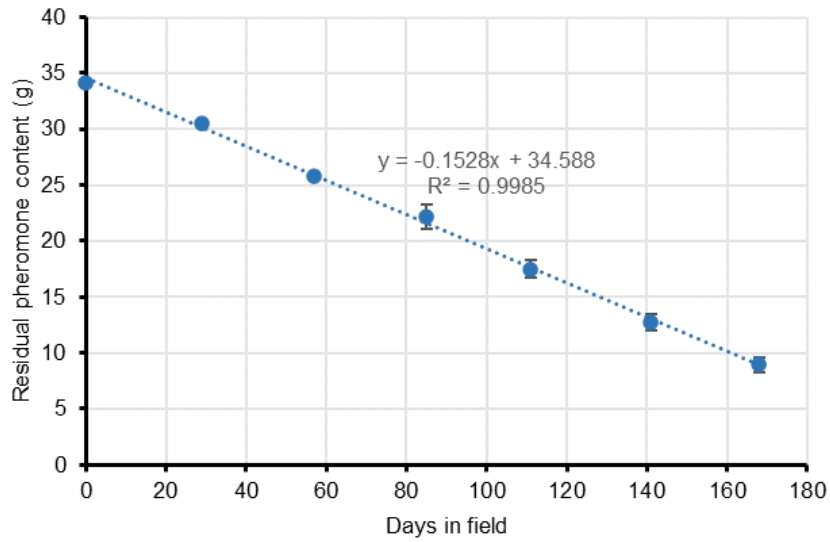


Figure C1.6 Pheromone release profile of Checkmate aerosol devices, as residual mean pheromone load (mg) contained in the dispensers vs. the time of field exposure (days). Release kinetics fitted the linear model given by the equation.

Table C1.3 Checkmate aerosol devices pheromone content. Residual means of pheromone content (mg) throughout the time in field (days). Point values of Figure 6 and the total mean of pheromone used (mg/day/ha).

Days in Field (d)	Weigh (g)	Pheromone Content (9.11% w/w; g)	Devices/ ha	Pheromone Emission (mg/day/ha)
0	375.25 ± 0.75	34.19 ± 0.07		-
29	334.75 ± 0.75	30.50 ± 0.07		508.90
57	282.75 ± 1.70	25.76 ± 0.16		676.74
85	243.75 ± 12.09	22.21 ± 1.10	4	507.56
111	191.83 ± 8.66	17.48 ± 0.79		727.63
141	139.83 ± 8.11	12.74 ± 0.74		631.63
168	98.16 ± 7.53	8.94 ± 0.69		562.48
			Mean	602.49 ± 37.15

1.3.4 Population Monitoring

Male catches per trap and day (CTD) recorded throughout the assay (Figure 7) were low at both locations and not significantly different between them ($F = 1.684$; $df = 71, 1$; $P = 0.20$), which suggests that the infestation level of both locations was similar. These low catches can be explained due to the use of mating disruption against EGVM in these areas during the last years.

The mean captures recorded in each flight were statistically similar ($F = 0.115$; $df = 71, 2$; $P = 0.89$). In addition, both MD treatments significantly reduced moth captures compared to the UTC ($F = 12.124$; $df = 71, 2$; $P < 0.001$).

During the first flight, no male captures were recorded in the Isonet® L treatments. However, despite a 60% mean inhibition of male catch in the Checkmate treatments, it was not statistically different from the UTC ($F = 4.282$; $df = 23, 2$; $P = 0.09$). Captures obtained in both MD treatments were also not significantly different ($P = 0.29$). No male captures were recorded during the second flight at either location with the MD treatments, highlighting the high efficacy performed by both type of dispensers. During the third flight ($F = 11.961$; $df = 23, 2$; $P < 0.001$), a statistically

significant catch reduction was obtained with both dispensers, Isonet® L ($P < 0.001$) and Checkmate ($P = 0.001$) against the UTC treatments, but they did not significantly differ between them ($P = 0.945$).

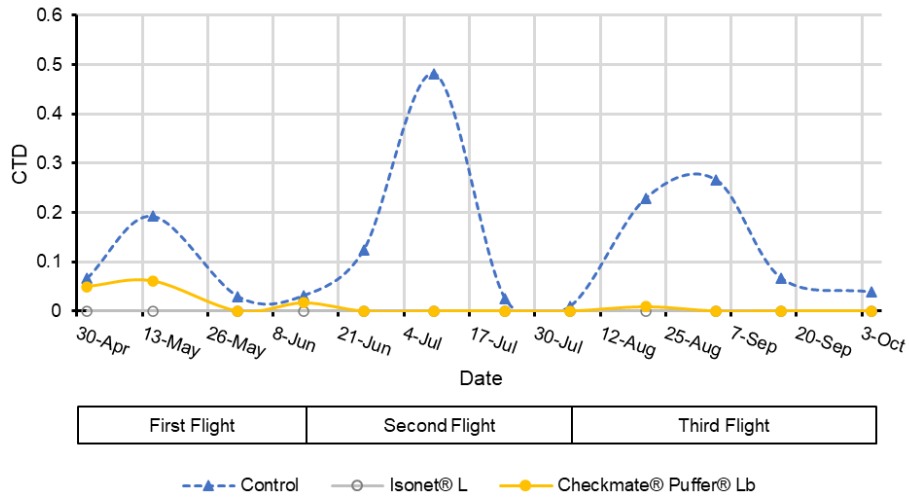


Figure C1.7 Mean of male captures per trap per day (CTD) throughout the season at Location 1 and 2 in the plots with different treatments.

1.3.5 Crop Damage Projections.

The effect of location was significant only on the last assessment ($F = 4.551$; $df = 71, 1$; $P = 0.04$), when damage levels increased, especially in the UTC. Specifically, the mean percentage of infested bunches was 35% at Location 1, whereas this value decreased to 14.5% at Location 2.

As it is summarized in Table 4, damage assessments carried out in the UTC plots showed an average of about 5% of affected bunches during early and mid-summer (assessments 1 and 2). However, just before the harvest (assessment 3), this value increased up to high levels, exceeding 20%.

The damage was significantly reduced using both MD dispensers compared to the UTC treatment damage (Table C1.4). Moreover, the percentage damage was not significantly different between the MD treatments in all the assessments done throughout the crop cycle. Thus, both types of dispensers were proven effective,

reducing crop damage by 96.97% in the case of Checkmate dispensers and 86.87% in the case of Isonet® L dispensers compared to the UTC.

Table C1.4. Mean (\pm SE) percentage of damaged bunches obtained in each treatment in the three damage assessments carried out at Location 1 and 2.

Assessment ¹	Damage (%) ²			Comparisons	Stats ³		
	Control (C)	CheckMate Dispensers (CM)	Isonet Dispensers (I)		F	df	p
1	5.00 \pm 1.19	1.00 \pm 0.53	0.75 \pm 0.53	C-CM *	24.009	71, 2	<0.001
	(n = 400)	(n = 400)	(n = 400)	C-I *			<0.001
				CM-I			0.331
2	4.39 \pm 0.66	0.91 \pm 0.49	0	C-CM *	14.753	71, 2	<0.001
	(n = 430)	(n = 420)	(n = 420)	C-I *			<0.001
				CM-I			0.539
3	24.75 \pm 6.64	0.75 \pm 0.37	3.25 \pm 1.60	C-CM *	15.058	71, 2	<0.001
	(n = 400)	(n = 400)	(n = 400)	C-I *			<0.001
				CM-I			0.781

¹Damage assessments were performed after the first, second and third male flights.

²Percentage of damaged bunches. ³Results of the statistical analysis (ANOVA test, at $p < 0.05$), statistical differences are marked with asterisks.

1.4 Discussion

Despite its low concentration and the complexity and diversity of substances present in the environment (Wehrenfennig et al., 2013), in this work, we developed a new methodology capable of quantifying airborne pheromone concentrations. Due to the increasing concerns about the impact of semiochemicals into the environment (Klaschka, 2008), this methodology could also be useful to detect and quantify their presence and elucidate potential consequences. In our case, this methodology has allowed the detection of different airborne pheromone concentrations throughout the season between aerosol and passive dispensers' treated plots.

Although portable EAG can help to understand the variations of airborne pheromone along the day and their dynamics in front of episodes as winds, dispensers' distribution, etc. (Sauer and Karg, 1998; Karg and Sauer, 1995; Karg and Sauer, 1997; Sauer et al., 1992), it does not provide absolute data. Despite the large sampling periods required (48 h), our results provide actual pheromone concentration measures that can be related with the efficacy of mating disruption treatments (expressed as male flight) providing valuable information for a better understanding of how the pheromone remains in the field and to reduce pheromone wasting. Moreover, it may help to establish a relationship with dispenser characteristics to improve their density and emission and so reducing the cost of implementation of the technique.

The results from the field air collections and quantifications showed differences between the two systems tested for the mating disruption of EGVM. In the case of the passive dispensers, lower mean quantities of airborne pheromone were detected at the beginning of the crop cycle, whereas the concentration reached a maximum in the middle of the cycle during summer, which, among other factors explained below, highlights the dependency on temperature of their release kinetics (Hebert et al., 2006) as can be seen in their emission rates. Similar results were obtained in relative data by Karg and Sauer (1997) in which significant differences were found between EAG measurements done in spring and summer, showing lower EAG signals in the spring studies. Later in the season, the concentration values decreased at the end of the crop cycle, coinciding with the end of the dispensers' lifespan. The concentration profile was quite different in the aerosol devices treated area, showing a minimum mean concentration at the beginning of the crop cycle, and maintaining higher quantities for the rest of the season. In both cases, the initial low quantity of pheromone detected could be explained by the lack of a developed canopy. When the canopy is scarce, the wind velocity increases and consequently the pheromone may be washed away. In this regard, it has been reported that foliage is able to act reducing the convection air streams keeping the pheromone in the crop environment (Karg and Sauer, 1997; Uchihama, 1988). This effect could explain why

the mean pheromone concentrations detected in the aerosol treated areas at the beginning of the season are lower than those achieved with the passive dispensers. The latter system does not stop emitting pheromone during the day and is able to maintain a certain airborne pheromone concentration despite the lack of plant foliage. However, aerosol devices are designed to release the pheromone only at programmed intervals during the evening–night. Thus, airborne pheromone is not continuously supplied, making this system more sensitive to pheromone washing. This phenomenon agrees with the lower male flight inhibition (first flight) achieved in the aerosol devices treated areas, as shown by our monitoring data and, also, by other technical reports (Boselli, 2014; Espadas et al., 2009). The high number of passive dispensers installed per hectare makes the competitive attraction ‘females-dispensers’ possible, preventing males from female finding. In contrast, the low density of pheromone sources in the case of aerosols and the lack of canopy might lead the pheromone to the soil, where the degradation could be triggered as described by Shaver (1983).

The highest mean airborne pheromone concentration was obtained in the second volatile sampling (July) with both emission systems coinciding with the highest mean temperatures. When these samplings were performed, all vines had a well-developed canopy, supporting the hypothesis of the role of the canopy in regulating field air streams. Moreover, several studies describe leaves as pheromone sources (by adsorption and release) (Schmitz, 1997a; Karg et al., 1994; Noldus et al., 1991; Wall et al., 1981), based on the reported adsorption of the pheromone components on their waxy surfaces (Noldus et al., 1991). However, their interaction with the airborne pheromone only was studied in a few cases (Benelli et al., 2019; Girling et al., 2013; Suckling et al., 2007). This “adsorption-releasing” mechanism and their interaction with the airborne pheromone is supported by the results of our experiments. When the aerosol was shooting over the vines during the whole night (Experiment 2), leaves sampled 3 h after the last emission still had 383.1 µg/g in their surface. Then, a decreasing trend in the quantity of pheromone was observed throughout the day, suggesting that pheromone is released from the leaf

surface at an estimated rate of about 28.6 µg/h per gram of leaves. This value is comparable with those obtained in similar studies done by McGhee (2014), in which 15 apple leaves receiving five emissions from a CM MIST emitted codlemone at 4 µg/h in apple orchards. In our Experiment 1, we also observed that this release rate could be higher immediately before the aerosol emission, as the quantified amounts of pheromone decrease from 312 to 38 µg/g in 4 h (approximately 68 µg/h). Despite the lack of detection of degradation products of the pheromone in the leaf experiments, leaves are not probably free of these degradation processes as they are also exposed to climate conditions, as it occurs on the soil. These adsorption-releasing dynamics are not exclusive of the aerosol devices system, as the leave samples collected in the area treated with passive dispensers (Experiment 3) showed similar quantities of pheromone (70 ng/g) than those collected in the aerosols area. Considering that the quantity of pheromone emitted by *L. botrana* females has been estimated near 0.3 ± 0.1 ng/h, as a maximum in the first hour of the scotophase (Anfora et al., 2005), and the amount of pheromone adsorbed on leaves and their proved dynamics, our data supports that vine leaves could imply countless pheromone point sources capable of competing with females.

During the second sampling (end of July), the airborne pheromone concentration was significantly higher in the area treated with passive dispensers than in the aerosols plot. Taking into account that the canopy is acting in both MD treatments and the release profiles of both systems are similar; this difference can be attributed to the distribution of the pheromone sources. Given that the volatile collections are performed in the center of each plot, it is possible that the passive dispensers ensure a better airborne pheromone distribution inside the plot. Nevertheless, the airborne pheromone concentrations obtained in both MD treatments provided effective disruption levels (total male capture inhibition compared to control plots).

When the end of the crop cycle was near (September), airborne pheromone concentration with the passive dispensers dropped to initial levels, which agrees with their reduced mean emission rate (526.29 mg/day/ha vs. 226 mg/day/ha) coinciding

with the end of their lifespan. At this moment, the quantity of pheromones emitted by the dispensers is too low and the adsorbing and post-releasing mechanism of the leaves is not able to compensate airborne concentrations because the adsorption-release dynamics of the leaves might be too quick (Sauer and Karg 1998; Karg and Sauer, 1997). On the contrary, aerosols were able to maintain high airborne pheromone concentrations because their emission is programmed.

The distribution of the quantified airborne concentrations throughout the crop cycle suggests that the plant canopy is not a requirement to achieve disruption when using passive dispensers. However, it helps keeping the pheromone within the field area by reducing pheromone washing, distributing the pheromone more uniformly and increasing the number of pheromone sources along the crop, and thus improving the competitive mechanisms of disruption. On the contrary, the automatic aerosol system is somewhat canopy-dependent. As obtained in the Experiment 3, leaves randomly sampled in the center of the plot treated with aerosols significantly contained the same amount of pheromone than those from the center of the passive dispensers' plot. This might explain how mating disruption works when installing aerosols, as leaves may be acting as additional point sources within the vineyards. Moreover, the variability in the data quantified in samples from the border of the aerosol plots, highlighted by the wider error bars, might respond to a gradient of pheromone content according to the distance to an aerosol. The nearer the leave samples from an aerosol device, the higher the pheromone quantified from those leaves. This progression in the amount of pheromone adsorbed on the leaves according to distance would be the result of the plumes generated by the aerosols, which can reach more than 460 m long and 90-150 m wide as Welter et al. (2005) outlined. In this way, the nearest vines of the aerosol devices would act as high releasing dispensers during the periods between the emissions. These results support the reported theory of induced allopatry in which males are attracted to the pheromone sources following an increasing concentration of pheromone when using aerosol devices (Miller and Gut, 2015; McGhee, 2014; McGhee et al., 2014). At the

same time, leaves loaded gradually along the distance would act as temporary plumes between aerosol emissions.

Taking into account male flight inhibition values in our trials and the different pheromone airborne concentrations found, we might estimate that the lowest airborne pheromone concentration in which male flight was effectively disrupted could match the mean concentration found in vineyards treated with passive dispensers at the beginning of the growing season, approximately 5 ng/m³. The inhibition values would confirm that mating disruption might be not properly performing as such in our assays with pheromone concentration of approximately 0.5 ng/m³. Further trials would be necessary to reduce this range of values and determine an optimal pheromone concentration in air. Considering competition as the main mechanism acting in mating disruption treated fields and leaves acting as countless pheromone sources, overcoming this concentration could result in pheromone wasting. Nevertheless, different pest populations and different conditions such as climate, vineyard shape, pheromone distribution along the field, etc., may affect the results and this could be considered in further trials.

Capítulo 2

“Studies on *Lobesia botrana* non-competitive disruption mechanisms based on male’s response after pheromone exposure”

“Studies on *Lobesia botrana* non-competitive disruption mechanisms based on male’s response after pheromone exposure”

Abstract. The role of non-competitive mechanisms in mating disruption of European Grapevine Moth, *Lobesia botrana* (Dennis and Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae), was studied by exposing males to different airborne pheromone concentrations for various intervals prior to evaluate their behavioral response. By using different types of dispensers, male moths were exposed to three different increasing pheromone concentrations for 1, 3 and 24 hours. The airborne pheromone present in all treatments was accurately quantified using gas chromatography equipment to compare these data with actual airborne pheromone concentrations under field conditions. The effect of pheromone exposure on *L. botrana* males was studied in wind tunnel and electroantennogram assays, immediately and 24 h after the exposure period. Results showed that the reduction of response to the pheromone depended on the dose and the duration of the treatment, but the lowest dose tested, hardly produced desensitization. These results support the hypotheses that the most important mechanisms of mating disruption are the competitive ones and that the non-competitive ones only may become relevant very close to dispensers of pheromone. Our results support the hypothesis of cross-adaptation to other chemical stimuli in the moths pre-exposed to their pheromone although more studies are needed to draw stronger conclusions.

2.1 Introduction

The European Grapevine Moth (EGVM), *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae), is a key pest widespread along wine producing areas with particular impact in southern Europe. The damage associated with this pest is produced after larvae feeding on grapes and following susceptibility to fungus infections, such as *Botrytis cinerea* (Persoon: Fries) (Sclerotiniaceae) (Ioriatti et al., 2011). This pest has been traditionally managed with pesticides, but given the rising awareness about their detrimental and toxic effects on human health and the environment, the use of more environmentally friendly control strategies such as Mating Disruption (MD) is gaining importance (Ioriatti et al., 2011; Witzgall et al., 2010). This technique is based on the release of the main component of the EGVM sex pheromone, (*E,Z*)-7,9-dodecadienyl acetate (Roelofs et al., 1973; Buser et al., 1974) to the crop environment to prevent mating of the target specie (Ioriatti et al., 2011). This pest control strategy is being used over more than 249,000 ha of vineyards in Europe due to its high efficacy (Lucchi and Benelli, 2018).

Until recently, MD was reached by using only hand-applied passive dispensers, which consist of small plastic containers filled or impregnated with the pheromone, deployed in the field at high densities of more than 200 dispensers/ha (Lucchi et al., 2018b; Miller and Gut, 2015). However, another type of dispensers as the automatic aerosol devices, have demonstrated similar efficacy at very low densities, 2-5 units/ha (Gavara et al., 2020; Benelli et al., 2019; Miller and Gut, 2015). These devices consist of programmable pheromone releasing systems charged with an aluminum can loaded with the main component of the pheromone (Benelli et al., 2019). Hand-applied dispensers release the pheromone passively through their walls or narrow channels at substantially constant rates, but they are somewhat dependent on climate conditions. In contrast, aerosol devices release the pheromone via programmed shots making this system independent from the external conditions (Benelli et al., 2019).

The mechanisms involved in MD against pests are classified as competitive or non-competitive mechanisms. In the case of the competitive mechanisms, males are able to respond to the females' signal because there are not impairments in its physiology, the signal or in the females' physiology. In this case, disruption is a result of the competition between females and pheromone dispensers and the pest density is an important factor in the success of the technique. Non-competitive mechanisms result from any signal, female or male physiological impairments, and include among others: (1) desensitization, which includes sensory adaptation of the peripheral level and habituation of the response in the central nervous system; and (2) camouflage, when a female's plume becomes imperceptible because of its mixing with the released plume (Rumbo and Vickers, 1997; Sanders, 1996; Cardé and Minks, 1995). In the case of non-competitive mechanisms, disruption is pest-density-independent, due to the lack of the detection of males to females. In field conditions, although there is one main mechanism, pest populations are being affected simultaneously by different MD mechanisms (Miller and Gut., 2015). Therefore, greater understanding of the mechanisms governing mating disruption under field conditions should guide development of pheromone dispensers with improved efficacy and reduced cost (Gordon et al., 2005; Williamson et al., 1996). Moreover, in depth understanding the mechanisms and their relative importance could lead to greater standardization of MD product comparisons (Judd et al., 2005).

Sensory adaptation has not been demonstrated in all insect orders but, in the case of Lepidoptera, it is described as a disrupting mechanism in many studies under laboratory conditions. However, its role is not clear in MD treated fields due to the high pheromone concentrations needed to disrupt males by these mechanisms (Suckling et al., 2018; D'Errico et al., 2013; Stelinski et al., 2005a; Judd et al., 2005; Stelinski et al., 2003a; Stelinski et al., 2003b; Stelinski et al., 2002; Schmitz et al., 1997b). Although competitive attraction by false-trail following seems to be the main mechanism acting in fields treated with hand applied passive dispensers (Miller et al., 2006a; Miller et al., 2006b), there are studies highlighting that false-trail following could be ineffective without other mechanism acting in conjunction (Cardé et al.,

1998; Mafra-Neto and Baker, 1996; Sanders, 1995). These same studies conclude that sensory adaptation could be the last mechanism acting when males are very close to the dispensers.

In particular for the EGVM, competitive disruption was demonstrated to be the main factor for an effective mating disruption. The competition between females and dispensers increases together with the dispensers' pheromone dose, whereas camouflage was demonstrated to be one mechanism that possibly acts near the dispensers (Schmitz et al., 1997b; Schmitz et al., 1995a; Schmitz et al., 1995b). As regards the non-competitive mechanisms, Schmitz et al. (1997b) excluded their effect in field conditions despite their demonstration at very high doses in laboratory assays. Nevertheless, Trimble and Marshall (2010) pointed out the impossibility to examine the relationship between these processes and the airborne pheromone concentration due to the lack of an accurate control of the emission sources as seen in Schmitz et al. (1997b), in which pheromone amounts were not quantified with absolute data.

The use of current chromatographic and spectroscopic techniques could allow a better correlation of the airborne pheromone quantification data with the results obtained in field experiments in which these non-competitive mechanisms can be demonstrated. Recently, the airborne pheromone concentration present in vineyards treated with MD against EGVM were successfully quantified for two different releasing systems, hand applied passive dispensers and automatic aerosol devices. This study provided absolute data on pheromone concentration at different moments throughout the crop cycle, highlighting the occurrence of seasonal variations (Gavara et al., 2020). In this way, the importance of the mechanisms involved in the abovementioned two releasing systems can be studied and their efficacy in field conditions assessed.

Previous laboratory assays aimed at elucidating the role of non-competitive mechanisms in treated fields have been performed by conditioning males with presumed high airborne pheromone concentrations but, in many cases, with

conditioning durations no longer than 60 min and without precise data of the airborne concentrations (Judd et al., 2005; Stelinski et al., 2005a; Stelinski et al., 2005b; Stelinski et al., 2003a; Stelinski et al., 2003b). However, it is still unexplored whether longer durations of conditioning, as moths suffer in MD treated fields, could increase the disrupting effect at different airborne pheromone concentration levels. For this purpose, in this study the response of EGVM males subjected to different treatments combining different airborne pheromone concentrations and conditioning times, was studied by means of electroantennography and wind tunnel assays done immediately and 24 hours after the treatment.

2.2 Material and methods

2.2.1 Insects

Lobesia botrana individuals used in these experiments came from the laboratory colony established in our facilities at Universitat Politècnica de València (València, Spain), fed on semisynthetic diet —based on grape juice, crushed dried vine leaves, brewer's yeast, wheat germ, and corn flour in a 6:2:1:1:1 ratio— in a climatic chamber. Individuals were kept under 18:6 (L:D) photoperiod at 22 °C and 70% RH. Assays were made with 3-4 days old adult males, kept separated from females in different chambers. Due to the lack of accentuated sexual dimorphism in adult stage, sexing and selection of males were made in the pupal stage differentiating their morphological characteristic features such as the genital opening and the antennae length through binocular.

2.2.2 Moths pheromone exposure

Male moths were kept, in 1.3 L glass chambers, isolated from the environment in which different pheromone airborne concentrations were supplied (conditioning chamber, Figure C2.1). To reach such air concentrations, the glass chamber with males was joined upstream to a smaller glass chamber in which different passive dispensers were introduced. An air compressor (Jun-air Intl. A/S, Norresundby, Denmark) coupled with an AZ 2020 air purifier system (Claind Srl, Lenno, Italy) was connected upstream to the dispenser pre-chamber to provide a 20 mL/min

ultrapurified airflow. Downstream the conditioning glass chamber, a Pasteur pipette loaded with 400 mg Porapak-Q cartridge was connected to collect and quantify the pheromone emitted at known intervals.

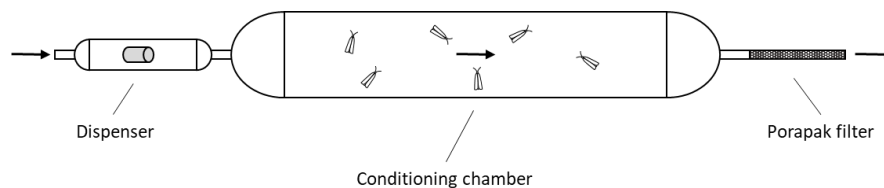


Figure C2.1 Assembly scheme of the conditioning setup (dispenser pre-chamber, conditioning chamber and Porapak filter) to expose male moths during the experiment at different airborne pheromone amounts. Arrows mark the flow direction.

The different doses tested were obtained from three different types of passive dispensers: (Lobetec) commercial passive dispensers employed for mating disruption in vineyards (Lobetec, SEDQ SL, Barcelona, Spain); (Septum) commercial rubber septa monitoring dispensers Grapemone (OpenNatur, Lleida, Spain); and (Vial) experimental dispenser, which consisted of 4 mL low-density polyethylene (LDPE) tubes (5 cm and 1.4 cm in diameter; Kartell, Fisher Scientific, Madrid, Spain) loaded with 50 mg cotton impregnated with 30 mg pheromone. These experimental dispensers were prepared to obtain an intermediate emission level between mating disruption and monitoring dispensers. Once prepared, these dispensers were aged for 24 h in a laboratory fume hood to stabilize its emission rate.

The different treatments tested resulted from combining two parameters, airborne pheromone quantity —determined by the different dispensers— and time of exposure. Thus, groups of 10 male moths were exposed to each of the three doses for 1, 3 and 24 hours, which means a total of nine treatments. Each conditioning treatment was replicated so many times to have the necessary males for the bioassays ($n = 20$ for wind tunnel tests and $n=10$ for EAG assays).

Before each treatment, the experimental assembly was let to equilibrate with the same airflows and dispensers for 24 h to saturate the bonding sites of the glass chamber ensuring a balance exchange of pheromone molecules. In this way, when the males were introduced and the different exposure times were performed, all the pheromone released reached the Porapak filter. This procedure was confirmed in preliminary tests for every type of dispenser and allowed obtaining constant amounts of airborne pheromone into the glass chamber.

Following a similar procedure reported by Miller and Gut (2015), to test potential physiological impairments caused by the pheromone exposure treatments, the response of male moths to pheromone was studied by wind tunnel assays and electroantennography (EAG) tests, immediately and 24 h after their exposure. During those 24 h before the biological tests, males were kept in a pheromone-free atmosphere, in the same conditions as those described for the stock colonies and isolated from females.

2.2.3 Airborne pheromone quantification for exposure treatments

2.2.3.1 Chemicals and reagents

All solvents and chemical reagents used (HPLC and Synthesis grade, respectively) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). A straight chain fluorinated hydrocarbon ester —heptyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoate (TFN)—, was selected as an internal standard for airborne pheromone quantification to improve both sensitivity and selectivity for the MS/MS method optimization. TFN was synthesized according to the methods described in Chapter 1.

(*E,Z/E*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate was supplied by Ecología y Protección Agrícola S.L. (Carlet, València, Spain). High purity standard of (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate (ca. 95 %) was obtained after purification of the supplied sample by gravity column (silica gel containing 10 % of AgNO₃; eluent: 3 % Et₂O/Hexane), which had spectroscopic properties identical to those described in the literature (Cahiez et al., 2017).

2.2.3.2 Quantification of the airborne pheromone in the conditioning chamber

Given that hourly collected pheromone amounts in the Porapak filters for some dispensers were below the detection limits, the airborne pheromone quantifications were performed during the 24 h exposure treatments for each type of dispenser by triplicate.

After the treatment, the Porapak filters were eluted with 20% Et₂O/Hexane (12 mL) to recover the pheromone collected during the 24 h period. Each solution was concentrated up to ca. 1.5 mL using a rotary evaporator set at 30 °C, and finally to 0.5 mL in a 2-mL GC screw-cap (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain) blown down with a gentle stream of nitrogen.

Ten- μ l of an internal standard solution of TFN were added to the solution for the final quantification. The samples were analyzed using a TSQ 8000 Evo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) triple quadrupole MS/MS instrument operating in SRM (selected reaction monitoring) mode using electron ionization (EI+), coupled with a Thermo Scientific™ TRACE™ 1300 GC. All injections were made onto a ZB-5 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 mm) fused silica capillary column (Phenomenex Inc., Torrance, CA). The oven was held at 60°C for 1 min then raised at 10°C/min up to 110°C, maintained for 5 min, raised at 3 °C/min until 150 °C and finally raised at 35 °C/min up to 300 °C held for 5 min. The carrier gas was helium at 1.5 mL/ min.

For each target compound —TFN and the main component of EGVM pheromone, (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate—, the MS/MS method was optimized by selecting the precursor ion and the product ions that provided the highest selective and sensitive determinations (Table C2.1). TFN transition 2 and EGVM transition 3 were the ones employed to obtain the chromatographic areas. In the case of EGVM signal, the other transitions were monitored for confirmatory purposes to have selectivity increased when several peaks appear near to the pheromone peak retention time.

Table C2.1 Optimum values of the MS/MS parameters for each target compound used to quantify airborne pheromone in the conditioning chamber.

	Transition	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Product Ion (<i>m/z</i>)	Collision Energy (eV)
TFN	1	375.0	263.0	10
	2	393.0	373.0	5
EGVM pheromone (main component)	1	79.1	77.0	10
	2	93.1	77.0	10
	3	164.2	79.0	15
	4	164.2	94.1	5

The amount of pheromone and the corresponding chromatographic areas were connected by fitting a linear regression model, $y = a + bx$, where y is the ratio between pheromone and TFN areas and x is the amount of pheromone. Data obtained were divided by the total air volume that went through the conditioning chamber during the treatment to obtain the airborne pheromone concentrations as mg or μg per m^3 .

2.2.4 Wind tunnel tests

To prove physiological impairments in males generated by their previous pheromone exposure, their ability of plume odor detection was evaluated in wind tunnel tests. A plexiglass wind tunnel (63 x 63 x 215 cm, Analytical Research Systems, Gainesville, FL, USA) was housed in a climatic room, kept at 22 °C, 70% RH, and lit at 10 lux with a lamp. Charcoal filters in the terminal section of the tunnel and a centrifugal fan in the opposite part allowed the aspiration and filtration of the air flow set at 2 m/s.

A Delta trap (Biagro SL, València, Spain) provided with a sticky base and baited with a monitoring pheromone dispenser was placed at the end of the flight section as a pheromone stimulus. The pheromone dispenser consisted of a commercial rubber septum Grapemone lure (OpenNatur, Lleida, Spain), typically used as a field monitoring dispenser releasing the main component of the EGVM

pheromone. A 30 cm plexiglass stand, as the takeoff area to release males, was placed at the opposite end, 120 cm downwind the trap.

Males were individually placed in glass tubes (7 cm length and 3 cm diameter), with both ends capped with muslin pieces, for 20 min in the same room of the wind tunnel for their acclimatization. Then, still confined in the tube, they were transferred to the tunnel stand and maintained there for 2 min for their acclimatization before starting their activity. After 2 min, the muslin was removed and male behavior responses to the pheromone stimulus were observed and recorded. The pheromone stimulus remained inside the tunnel from the beginning of the acclimatization to the end of the experiment. Males not showing any response in the next minute were accounted as inactive. When there was any type of behavior after their release, the males were accounted as active and were observed during two extra-minutes. Moth behavior was scored for wing fanning, take off, zig-zag flight and reach the source. Reaching the source included landing on the delta trap surface or sticking over the base. Twenty different males were tested for each of the treatments on different days and from different generations.

2.2.5 Electroantennography assays

Electroantennography (EAG) assays were carried out to determine if there was any reduction on the response of male moths pre-exposed to the different pheromone treatments. For this purpose, male moths were slightly numbed into test tubes placed in an ice bath to excise their heads, keeping the antennae attached to extend their lifespan. Between two and five terminal segments of the antenna were also removed with a scalpel (Schmitz et al., 1997b). Silver wire electrodes were used, previously impregnated with salt free hypoallergenic electrode gel (Spectra 360, Parker Laboratories, Inc., Fairfield, NJ, USA) to increase the electrical contact. The back of the head was set on the reference electrode and the distal part of the antenna was set on the recording electrode.

One side of a glass elbow-sized tube (L-tube) was placed at less than 2 cm distance from the antenna previously connected. The other side of the L-tube was

connected to a Tygon hose (Saint-Gobain SA, Courbevoie, France) through which a wet and carbon-filtered airflow of 50 ml/min⁻¹ passed, delivered by a Syntech CS-55 stimulus controller (Ockenfels Syntech GmbH, Kirchzarten, Germany). A pore-sized opening in the elbow part of the L-tube was used to introduce the tip of a Pasteur pipette previously charged with a 1 cm² piece of filter paper impregnated with each stimulus. The evaluation of the EAG responses to each stimulus was recorded with a Syntech IDAC 2 acquisition controller and the GC-EAD 32 (v 4.3) software was employed for data recording and acquisition (Ockenfels Syntech GmbH, Kirchzarten, Germany).

Every single antenna was stimulated with the following stimuli: (1) clean air (clean piece of paper inside the pipette), to ensure the correct adjustment of the antenna and to avoid mechanical responses—a correct adjustment was confirmed with the absence of response, ca. 0 mV—; (2) 1-hexanol (98%), by impregnation of the filter paper piece with 5 µl of a 0.001 mg/ml solution in *n*-hexane; and (3) (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-yl acetate by impregnation of the filter paper piece with 5 µl of a 0.001 mg/ml solution in *n*-hexane. The stimuli were triggered with an air push through the pipette (50 ml/min, 0.5 s), in which the sample was volatilized in such a way reaching the antennae preparation. Every stimulus was carried out with a different Pasteur pipette and a different piece of filter paper to avoid contaminations and mixed responses. The time between the different stimulus was about 60 s. Male antennae barely responded to 5 µl of *n*-hexane in previous experiments. Each male moth was tested only once. Data registered was the maximum potential triggered by the stimuli (mV). Ten antennae replicates were performed for every treatment with different males from different generations.

2.2.6 Data analysis

Statistical analyses were performed using SPSS v. 16 (Armonk, NY, USA) software. In the case of the study of each behavioral feature in the wind tunnel tests—activation, wing fanning, take off, zig-zag flight and reach the source—, analyses were done using a χ^2 test to find statistical differences ($P < 0.05$) among the different treatments immediately and 24 hours after the exposures. The analysis of variance

(ANOVA), followed by post-hoc Fisher's least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$, was used to study the differences observed among the EAG results. All the ANOVA analyses were applied to these data without transformation, as they fulfilled the homoscedasticity requirements and the residuals fitted normal distributions.

2.3 Results

2.3.1 Airborne pheromone concentrations in the exposure treatments

After Porapak filter extractions, the subsequent chemical analysis of their pheromone content showed that the mean airborne pheromone concentrations provided by each type of dispenser were: (Lobetec) $1.95 \pm 0.24 \text{ mg/m}^3$, (Vial) $7.44 \pm 1.83 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ and (Septum) $1.97 \pm 0.44 \text{ } \mu\text{g/m}^3$.

2.3.2. Wind tunnel assays

Data obtained from the wind tunnel tests were expressed as the percentage of male moths performing the different actions registered. Eighty percent of the control moths were scored for activation, wing fanning and take off. Zig-zag flight was observed for 50 % of the control moths, whereas only 40 % finally reached the source (Figures C2.2 and C2.3).

2.3.2.1 Immediately after the exposure

The different exposure treatments applied to male moths only had moderate effects on their activation (Figure C2.2). The exposure treatments with Septum showed the highest proportion of active moths without any differences against control treatment ($P > 0.05$); however, this value decreased significantly to less than 50% when moths were exposed to Lobetec dispensers for 3 and 24 h ($\chi^2 = 3.956$, $P = 0.047$ and $\chi^2 = 5.227$, $P = 0.022$ respectively).

Changes in wing fanning activity were similar to those recorded for the activation. Moths' activity was reduced after exposure to Lobetec dispensers, to 40%, 20% and 25% when exposed for 1, 3 and 24 h, respectively, compared to non-treated moths ($\chi^2 = 6.667$, $P = 0.01$; $\chi^2 = 14.400$, $P < 0.001$ and $\chi^2 = 12.130$, $P <$

0.001). Septum and Vial treatments did not perform statistical differences against non-treatment ($P > 0.05$).

Regarding the take-off parameter, male moths started to behave significantly different to control immediately after being exposed to Vial dispensers for 3 and 24 h, reducing their response by 50 % ($\chi^2 = 5.227$, $P = 0.020$ and $\chi^2 = 3.956$, $P = 0.047$). The most significant differences were obtained by exposing males to Lobetec dispensers, regardless of the time of exposure ($\chi^2 = 6.667$, $P = 0.01$; $\chi^2 = 14.400$, $P < 0.001$ and $\chi^2 = 8.286$, $P = 0.004$ for 1, 3 and 24 hours respectively) reducing their response up to even 20 % of the tested males. Septum treatment did not affect male's take off ($P > 0.05$).

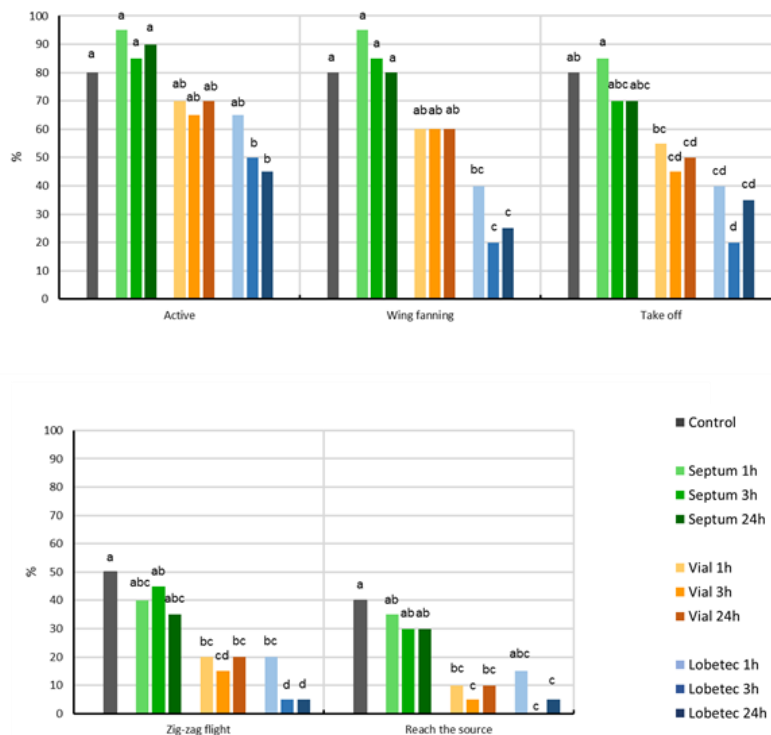


Figure C2.2 Percentage of male moths that showed activation, wing fanning, take off zig-zag flight and reached the source immediately after being exposed to the different treatments. For each parameter, bars labelled with different letters show significant differences among treatments (χ^2 test, $P < 0.05$).

In the case of moths that performed orientation flight to the pheromone source and the typical zig-zag flight of many lepidopteran species (Figure C2.2), the results were similar to those showed for the take-off parameter without statistical differences in Septum treatment against control ($P > 0.05$). However, significant differences were observed when males were exposed to Vial dispensers in front of the naïve ones, reducing their response from 50% to ca. 20%, regardless of the time of exposure ($\chi^2 = 3.956$, $P = 0.047$; $\chi^2 = 5.584$, $P = 0.018$ and $\chi^2 = 3.956$, $P = 0.047$, respectively for 1, 3 and 24 h treatment duration). In the case of the exposure to the higher pheromone concentration (Lobetec) during the longer times of exposure (3 and 24 h), the percentage of moths performing this behavior significantly decreased to the lowest values, less than 10% ($\chi^2 = 10.157$, $P = 0.001$ for both treatments).

Forty percent of the control moths finally reached the pheromone source (Delta trap), and Septum exposure did not statistically differ from control treatment ($P > 0.05$). This value started to significantly decrease immediately after male exposure to Vial dispensers ($\chi^2 = 4.800$, $P = 0.028$; $\chi^2 = 7.025$, $P = 0.008$ and $\chi^2 = 4.800$, $P = 0.028$, respectively for 1, 3 and 24 h stimulus duration), whereas the lowest values were observed after exposure to Lobetec dispensers during 3 and 24 hours, 0 and 5 % of the moths, respectively ($\chi^2 = 10.000$, $P = 0.002$ and $P = 0.028$; $\chi^2 = 7.025$ respectively).

2.3.2.2 *Twenty-four hours after the exposure*

When treated moths were kept under a free-pheromone environment for 24 h, their behavior responses in the wind tunnel experiments were the same as those displayed by the naïve moths for all the parameters studied (Figure C2.3).

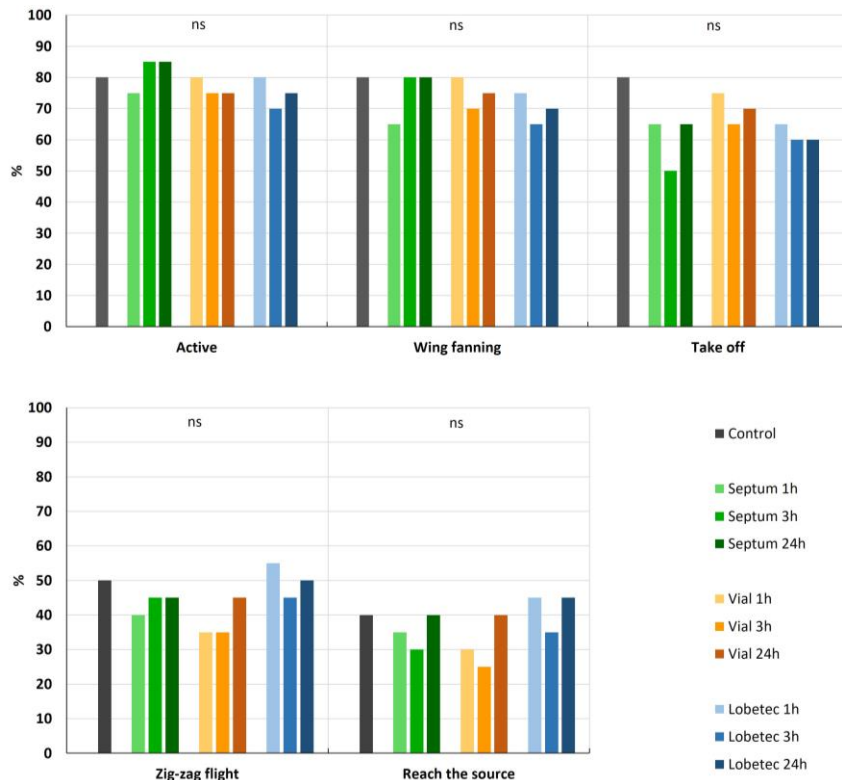


Figure C2.3 Percentage of male moths that showed activation, wing fanning, take-off, zig-zag flight and reached the source, 24 h after their exposure to the different treatments. For each parameter, bars labelled with different letters show significant differences among treatments (χ^2 test, $P < 0.05$).

2.3.3 EAG assays

2.3.3.1 Immediately after the exposure

Immediately after exposure, the different treatments had significant effects ($F = 19.133$, $df = 99,9$, $P < 0.001$) on the EAG signals triggered by the main component of the EGVM pheromone (Figure C2.4). Specifically, the exposure of male moths to Septum dispensers did not significantly affect their EAG responses compared to those displayed by control moths, regardless of the time of exposure ($P > 0.05$ in all three cases), although the 1 h treatment differed significantly from the 24 h exposure ($P < 0.01$). When moths were conditioned with Vial dispensers for 1 h, antennae

response was not significantly altered compared with control moths ($P > 0.05$); however, the treatments with Vial dispensers during 3 and 24 h reduced significantly the response ($P < 0.01$), showing values lower than 3.53 mV (reductions of above 29%). The maximum reduction in the EAG signals (83% reduction compared to the control, with only 0.84 mV) was reached by the treatments with Lobetec dispensers, regardless of the time of exposure ($P > 0.05$).

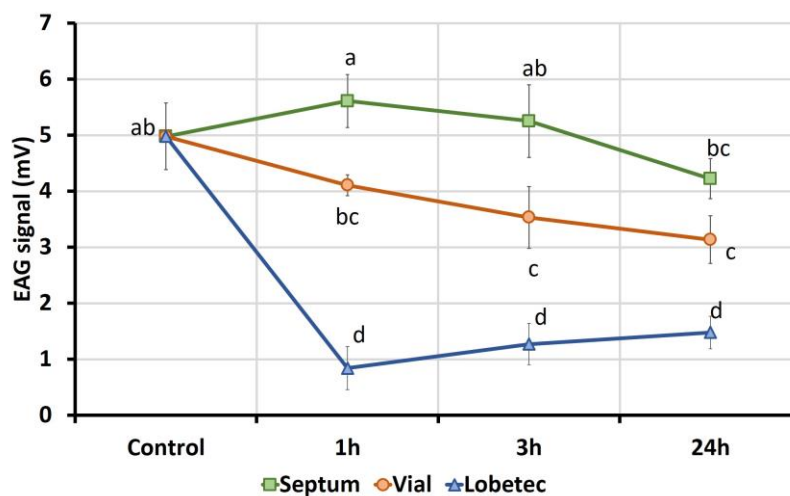


Figure C2.4 EAG signal (mV) triggered by the main component of the pheromone in the antenna of male moths ($n=10$) immediately after their exposure to the different treatments: Septum, Vial and Lobetec dispensers for 1, 3 and 24 h. Different letters indicate significant differences among treatments (ANOVA LSD test, $P < 0.05$).

Similar results were obtained in the case of the responses triggered by 1-hexanol (Figure C2.5). Olfactory detection was not significantly affected when male moths were exposed to treatments with Septum or Vial dispensers, when compared to the control ($P > 0.05$). However, highly significant reductions were observed with treatments with Lobetec dispensers ($P < 0.001$), reaching EAG signal reductions higher than 67%, up to 0.34 mV.

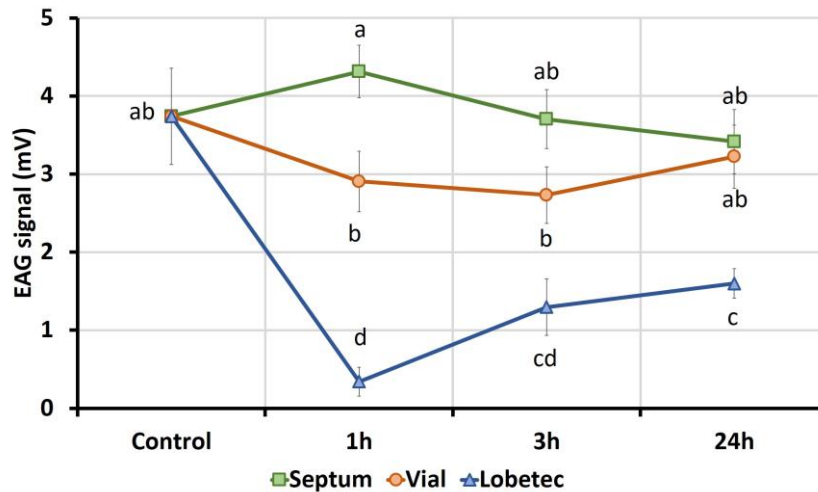


Figure C2.5 EAG signal (mV) triggered by 1-hexanol in the antenna of male moths ($n=10$) immediately after their exposure to the different treatments: Septum, Vial and Lobetec dispensers for 1, 3 and 24 h. Different letters indicate significant differences among treatments (ANOVA LSD, $P < 0.05$).

2.3.3.2 Twenty-four hours after the exposure

In general, when male moths were kept for 24 h in a free-pheromone environment after the exposure treatments, EAG responses recovered to control levels. For the pheromone stimulus (Figure C2.6), EAG responses 24 h after every treatment were completely recovered, not significantly differing from those of control moths ($F = 1.770$, $df = 99, 9$, $P > 0.05$). Nevertheless, males exposed to Lobetec treatments displayed the lowest registered values, which significantly differed in some cases to those of the treatments with Septum or Vial dispensers (Figure C2.6).

For the 1-hexanol stimulus (Figure C2.7), some treatments still had a significant effect on the EAG responses ($F = 5.652$, $df = 99, 9$, $P < 0.05$). Whilst the males exposed to all the treatments done with Septum and Vial dispensers responded similarly to control moths ($P > 0.05$), those treated with Lobetec during 1 and 24 h kept lower values ($P < 0.05$) —1.67 mV and 1.38 mV, respectively, representing 55.35% and 63.11% of signal reduction compared to control—.

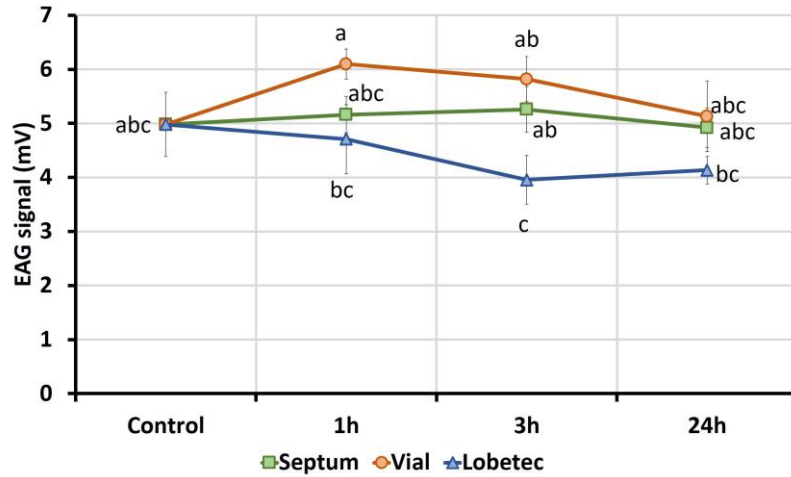


Figure C2.6 EAG signal (mV) triggered by the main component of the pheromone in the antenna of male moths (n=10) 24 h after their exposure to the different exposure treatments: Septum, Vial and Lobetec dispensers for 1, 3 and 24 h. Different letters indicate significant differences among treatments (ANOVA LSD, $P < 0.05$).

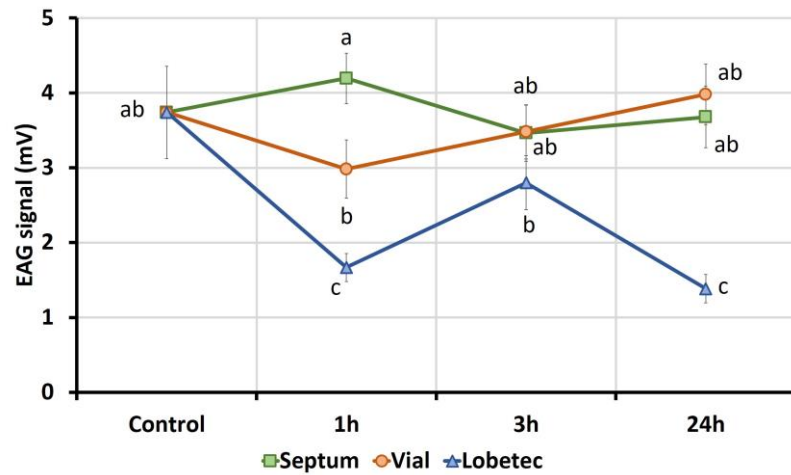


Figure C2.7 EAG signal (mV) triggered by 1-hexanol in the antenna of male moths (n=10) 24 h after their exposure to the different exposure treatments: septum, LDPE and Lobetec dispensers for 1, 3 and 24 h. Different letters mean statistical differences among treatments (ANOVA LSD, $P < 0.05$).

2.4 Discussion

The results of this study support the conclusions of previous works reporting desensitization as a non-competitive mating disruption mechanism that can be triggered in EGVM with high amounts of pheromone (Schmitz et al., 1997b), as occurs for other lepidopteran species (Suckling et al., 2018; D'Errico et al., 2013; Judd et al., 2005; Stelinski et al., 2005a; Stelinski et al., 2002; Stelinski et al., 2003a; Stelinski et al., 2003b; Schmitz et al., 1997b). However, the pheromone concentrations tested here and in the aforementioned papers are still high and hardly reached in field conditions, attending to previous airborne pheromone concentration studies (Gavara et al., 2020).

Our wind tunnel assays showed that the exposure of males to certain pheromone concentrations during different time periods significantly affected moth behavior immediately after being treated, by reducing the percentage of individuals that responded to standard conditions. Whilst there are studies in which only activation and wing fanning have been used to detect signs of habituation in male behavior (Suckling et al., 2018; Bartell and Lawrence, 1973), our results highlight the importance of studying further parameters in the time-sequenced behaviors, such as taking flight in the direction of the stimulus, the oriented zig-zag flight and especially the arrival to the pheromone source. In fact, the most important effects have been observed in the final phases of the oriented behavior. This supports the conclusion obtained by Kuenen and Baker (1981) who claimed that merely measuring “activity” could not be sufficient to study these non-competitive mechanisms.

Our results showed that the exposure to the highest pheromone dose (1.95 mg/m³ with Lobetec MD dispensers) immediately incapacitates male moths to orient themselves and reach the pheromone source, at the same time that produced the lowest EAG responses. The longer the exposure times, the more significant the effect on the behavior. By contrast, the lower doses tested performed differently. Whilst the treatment with 7.44 µg/m³ (Vial dispensers) was able to immediately disrupt males preventing them from orienting their flight and reaching the source, the concentration of 1.97 µg/m³ (Septum dispensers) was not enough to produce this

effect. This suggests that the amount of airborne pheromone capable to disrupt non-competitively EGVM male moths would be between this range of concentrations. These results agree with the lower EAG responses triggered by the main component of the pheromone when males were exposed to concentrations of 1.95 mg/m³ (regardless of the period of exposure) or 7.44 µg/m³ (for 3 or more hours), suggesting that peripheral adaptation is the mechanism acting, in this case, immediately after male pre-exposure.

In other studies, pheromone dose has been reported as a dependent parameter increasing peripheral adaptation (Judd et al., 2005; Stelinski et al., 2005a; Stelinski et al., 2003a; Stelinski et al., 2002; Schmitz et al., 1997b), whilst the time of exposure to this dose has been studied in few cases. Judd et al. (2005) carried out experiments pre-exposing *Cydia pomonella* (L.) to its pheromone (codlemone) and they found that pre-exposure duration seemed to have more effect on reducing the responsiveness than the dose itself. In our results, this dependency of time can also be seen since the effects of the treatments with Septum and Vial on EAG responses are higher as the time of exposure increased.

Schmitz et al. (1997b) studied non-competitive mechanisms of EGVM through two different experiments. In the first one, the release of previously conditioned male moths, using a commercial MD dispenser during 3 and 8 h, reduced significantly the recapture. In the second experiment, an EAG assay was used to register antennae stimulations before, during and 6 min after the exposure to different pheromone flow levels using a rubber septum dispenser. The results of the latter showed significant reductions using the higher pheromone flows and a very quick recovery, reaching 70% of the pretreatment amplitude response after 5 min. To explain the apparent contradiction of both experiments —EAG assays demonstrated a very quick recuperation, whilst the release and recapture experiment did not trap male moths several hours after their conditioning— the authors concluded that different mechanisms were acting in these experiments. The smaller response was produced by peripheral adaptation in the EAG assays, whilst habituation of the central nervous system participated in the release-recapture field assay. Despite this logical

statement, no EAG assays were done to corroborate habituation and reject long lasting peripheral adaptation in the field assay as suggested by Miller and Gut (2015) in a more recent publication. Moreover, the different dispensers used in both experiments could lead to very different levels of pheromone concentration and thus, results could not be comparable. Despite the confirmed existence of non-competitive mechanisms and their effects in laboratory conditions, the high amounts of pheromone needed are hardly reached in field conditions. An indirect but effective proof was reported in the study of Schmitz et al. (1997b), in which EGVM males exposed in treated vineyards for 8 h did not show differences in recapture trials against control males in non-treated orchards.

Our results support that, in the case of the moth releasing experiment, long-lasting peripheral adaptation could be the acting mechanism —such as it has been demonstrated for several tortricid species e.g. *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Stelinski et al., 2003a; Stelinski et al., 2003b), *Pandemis pyrusana* Kearfott (Stelinski et al., 2005a) and *C. pomonella* (Judd et al., 2005; Stelinski et al., 2005a)—. Despite the lack of statistical differences among the different treatments in our EAG assays, when responses were evaluated 24 h after the treatment, the lower signals showed by the moths pre-exposed to the highest pheromone concentration may suggest a gradual recovery. However, further assays are needed to ensure that pre-exposed moths do not present habituation in periods shorter than 24 h in the pheromone-free atmosphere to proof our hypothesis and reject firmly the past results.

The plateau of peripheral adaptation to the main pheromone component in EGVM was reached with the 7.44 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ treatment between 1 and 3 h exposure periods but the strongest effects (80% of EAG signal inhibition) were obtained with the highest dose (1.95 mg/m^3) only after 1 h of exposure. Stelinski et al. (2003b) determined a plateau after over 15 min of treatment with 36 ng of pheromone/ml (ca. 36 mg/m^3), reducing about 60 % the EAG signal for the tortricid *C. rosaceana*. They hypothesized that not all the receptors adapt completely because of the

biological disadvantage for males to become completely anosmic to its pheromone, something that needs to be proved.

Recent studies based on volatile collections and chemical analysis have allowed the determination of the absolute airborne pheromone quantities present in fields treated with mating disruption (Gavara et al., 2020). Accordingly, the average maximum amount of pheromone detected in vineyards treated with passive dispensers at mid-crop-cycle was of about 40 ng/m³, which is, by far, lower than the concentration needed to trigger the non-competitive mechanisms in laboratory conditions (at least 7 µg/m³, as observed in the present work). Thus, the average airborne pheromone concentration found in treated fields is insufficient to disrupt moths non-competitively, but these mechanisms still could be acting when moths are near the dispensers. Stelinski et al. (2004 and 2005b) observed brief approximations to passive dispensers by different tortricid moths for no longer than 30 s. These low durations could not allow habituation as acting mechanism near the dispensers. Nevertheless, Kuenen and Baker (1981) observed instantaneous antennal peripheral adaptation doing EAGs in a continuous exposure to pheromone without long-term effects in the noctuid *Trichoplusia ni* (Hübner) males. Moreover, Cardé et al. (1998) suggested habituation of male pink bollworm moths after close contact with Isomate 'rope' dispensers using field flight tunnels. These data could indicate that, in treated fields, near the dispenser, males could experience this instantaneous and short-duration peripheral adaptation. This mechanism could also be promoted in the field due to the already demonstrated canopy-pheromone interaction, which can be especially relevant when employing aerosol devices for the mating disruption treatment (Gavara et al., 2020). Leaves have been proven to adsorb and post-release part of the pheromone emitted by the dispensers in treated fields; thus, due to the higher amounts of pheromone emitted by the aerosol devices, the leaves near them could release high amounts of pheromone in a short period of time. These results reconfirm the Stelinski et al. (2003a) contribution, who claimed that non-competitive mechanisms can be triggered under field conditions when low-density and high-releasing dispensers, such as aerosols, are used. Moreover, these

arguments also agree with experiments reported by Welter et al. (2005) in which, after uniform releases of sterile codling moth males, no moths were trapped in front of an aerosol device. In similar experiments done by McGhee (2014) the same effect was seen; after a release of codling moth males, 2.5x more males were trapped upwind than downwind.

Interestingly, we also found in our assays a reduction of the 1-hexanol EAG amplitudes—which, in principle, was used as a control substance—in the same extent as the pheromone results. A similar effect was also observed in other studies. D’Errico et al. (2013) demonstrated a cross adaptation produced when *Grapholita molesta* (Busck) males were exposed to one component of their pheromone inducing sensory adaptation for this one and for the other two components. Moreover, there were lower responses to a control stimulus (ethanol) but they attributed this effect to a reduction of the vitality of the antenna due to the very high amounts of stimuli employed. In a similar way, Stelinski et al. (2003b) results showed an EAG signal reduction for *C. rosaceana* and *Argyrotaenia velutinana* (Walker) after the pre-exposure to their pheromones in the control stimuli done. Our results highlight the importance of going into depth in these issues in future experiments to clarify this possibility of cross-adaptation and the consequent utility of this effect for developing new pheromone dispensers, e.g., in the use of blends of pheromones that targets multiple species but could contain antagonists (Suckling et al., 2018; Suckling et al., 2016; Porcel et al., 2015; Evenden et al., 1999).

Capítulo 3

**“Influence of climate conditions in *Lobesia botrana*
mating disruption dispensers’ performance”**

“Influence of climate conditions in *Lobesia botrana* mating disruption dispensers’ performance”

Abstract. Passive dispensers are the most commonly employed dispensers to control the European Grapevine Moth, *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) by mating disruption. Although their efficacy is widely demonstrated, there are concerns about reducing their emission rates keeping the same efficacy and reducing MD costs. For this purpose, two different type of dispensers employed in Spain against this pest (Ampoule and Rope dispensers), have been deployed in field conditions to verify their disrupting performance and to study their pheromone emission rates and their climate dependency in actual field conditions. The release profile of both dispensers was studied by extracting and quantifying the residual pheromone load throughout time using gas chromatography. Then, the dispensers’ dependency from climate conditions was assessed by multiple linear regressions by correlating daily emission rates with the mean daily values of several climate variables provided by weather stations. Although both dispensers performed at high efficacy controlling the pest populations and reducing the fruit damage, their pheromone content at the end of the crop cycle and their release rates were different. Ampoule dispensers emitted constant lower pheromone quantities throughout the study period but retained high residual pheromone amounts at the end of the crop cycle. Rope dispensers performed with a higher pheromone emission and were depleted at the end of the crop cycle. The release profile of Rope dispensers was climate-dependent with higher emission rates at higher mean temperatures and wind speeds. Our results showed that the current commercial MD dispensers can still be improved to fit their release rates to the actual pheromone requirements.

3.1 Introduction

The European grapevine moth (EGVM), *Lobesia botrana* (Denis & Shiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) is a key pest of grapes in the majority of wine-growing areas worldwide, especially in the Mediterranean regions (Ioriatti et al., 2011; Thiéry and Moreau, 2005; Bournier, 1977). The losses produced by this pest are caused after oviposition in berry clusters where larvae feed, which facilitates the colonization of fungal pathogens, such as *Botrytis cinerea* and *Aspergillus spp.*, in mid-season causing the development of rots at harvest (Cozzi et al., 2006; Fermaud and Le Menn, 1989).

This pest has been faced traditionally using several applications per year with different insecticides, such as insect growth regulators or organophosphates (Lucchi and Benelli, 2018). Due to the widely known consequences of these treatments on non-target organisms and the environment, many efforts have been devoted to identifying and developing new alternatives. Semiochemicals are well known examples of these alternatives that are employed for both monitoring and direct control (El-Ghany and Nesreen, 2019). Mating disruption (MD) is currently used with great success for controlling pests, mainly in lepidoptera and hemipteran orders (Lucchi et al., 2019; Vacas et al., 2015; Witzgall et al., 2010). MD has many advantages regards insecticide methods such as their specificity, the lack of toxic residues on fruit and the lack of negative effects on human health (Lucchi and Benelli, 2018; Witzgal et al., 2010). This control method takes part in an important industry that is reducing the environmental impacts improving pest control tools with integrated pest management and organic farming (Miller and Gut, 2015; Welter et al., 2005).

The availability of effective dispensers is critical for the success of pheromone-based pest control strategies and there is a wide variety of dispensing technologies to apply MD against lepidopteran pests. Among the different technologies employed there are microencapsulated sprayable formulations (Il'ichev et al., 2006), female-equivalent dispensers (Stelinski et al., 2008), automatic aerosol devices (Benelli et

al., 2019), and hand-applied passive dispensers which are the most widely applied to control EGVM (Ioriatti et al., 2011). These hand-applied passive or reservoir dispensers release the pheromone contained or impregnated on their material—rubber, biodegradable or plastic polymers. Most of them provide effective control of EGVM by reducing pest populations below the economic injury level (Ioriatti et al., 2011; Akyol et al., 2010; Vassiliou, 2009; Ioriatti et al., 2004) but many of them use an unnecessary quantity of pheromone which causes an extra cost and hampers the development of this control system for some pests.

An ideal dispenser must meet the following requirements (Ogawa, 1997): (1) a close to zero-order release kinetic, providing a constant emission rate, without substantial fluctuations throughout their lifespan, (2) temperature-independent releasing, avoiding peaks of emission corresponding with the highest temperatures, (3) moderately wind-dependent emission to avoid pheromone waste under strong wind conditions, and (4) long lifespan to protect the crop during its most susceptible period or the whole pest cycle, without the need of replacement.

All of these parameters are influenced by the climate conditions of the crop location where the dispensers are deployed. Femenia (2010) found differences between the emission rates of dispensers kept under constant laboratory conditions and those displayed by dispensers deployed in field conditions. Higher temperatures and airflows were demonstrated to considerably increase pheromone emissions in laboratory assays done with Trimedlure dispensers (Alfaro et al.; 2008; Leonhardt et al., 1989). Accordingly, these variables can significantly affect the emission of the most climate-dependent dispensers, reducing their lifespan and causing a waste of pheromone.

The objectives of the present study are to compare the efficacy of currently employed *L. botrana* MD dispensers under field conditions, and to correlate their emission rates with different climate parameters. This information could allow the estimation of how climate conditions affect pheromone emission and dispensers' lifespan to establish future improvements.

3.2 Material and methods

3.2.1 Mating disruption field trials and pheromone dispensers

Trials were carried out during 2 growing seasons, between March and October 2018 and 2019, in winery vineyards growing on a trellis. Two trials were carried out in 2018 at two locations in the València Region (Spain): Requena (Location 1; UTM coordinates 39.482608, -1.318822) and Moixent (Location 2; UTM coordinates 38.808779, -0.815917). A third trial was conducted in the 2019 season only at Location 2. Each location had homogenous conditions and grape varieties: (Location 1) plantation pattern 2.5 x 1.5 m (cultivar Bobal) and (Location 2) plantation pattern 2.5 x 1.5 m (cultivar Monastrell). Each trial included three 2-ha plots, one of them remaining untreated (UTC) and the two others receiving a different MD treatment: (Rope) MD treatment with the Isonet[®] L rope dispensers (Shin-Etsu Chemical Co., Tokyo, Japan) at a density of 500 dispensers/ha or (Ampoule) MD treatment with the Lobetec dispensers (SEDQ SL, Barcelona, Spain) at a density of 400 dispensers/ha. The untreated plot (UTC) was left without any type of treatment against EGVM and located 500 m upwind from the MD treatments at each location. During the trials, no additional insecticide or fungicide treatments were applied in any plot.

Both MD dispensers release the pheromone through polymeric plastic membranes and contain synthetic (*E,Z*)-7,9-dodecadienyl acetate, the main component of the sex pheromone released by EGVM females. Isonet[®] L dispensers consist of plastic twist-tie ropes, on which the pheromone (172 mg) is loaded inside capillaries. Lobetec dispensers consist on small plastic ampoules loaded with 210 mg (quantities according to manufacturer technical sheet).

In both seasons, EGVM male flight was monitored from mid-March and MD treatments were deployed when the first catch was detected at each location. Accordingly, in the 2018 season, dispensers were set on April 24 at Location 1 and April 23 at Location 2, whereas the dispensers were installed on April 26 in the 2019 season.

3.2.2 Climate data

Climate data used in the study was obtained from Associació Valenciana de Meteorologia (AVAMET) and corresponded to the nearest station to each location. Specifically, data of Location 1 was obtained from the IVIA climatic station of the Irrigation association of Los Ruices (5 km from the field), whereas the climatic station of the solar farm at Font de la Figuera (5 km from the field) provided the data of Location 2.

3.2.3 Dispenser release kinetic studies

Fifty additional dispensers of each type were aged under the same field conditions in nearby areas in each trial to study their release profiles and their lifespan. Four dispensers of each type were randomly collected from each location once a month and stored at -20°C inside airtight bags until their extraction in the laboratory.

For residual pheromone extraction, each dispenser was cut into pieces and soaked individually in 24 mL dichloromethane (DCM), inside a 50-mL glass centrifuge tube, for 2 h at room temperature, with magnetic agitation. Then, 1 mL of an internal standard solution of *n*-dodecane was added to each extract for the final chemical analysis and quantification.

Residual pheromone content determination was done by gas chromatography using a flame ionization detector (GC/FID) in a Clarus 500 GC apparatus (PerkinElmer Inc. Wellesley, MA). All injections were made onto a ZB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column (Phenomenex Inc., Torrance, CA), held at 100 °C for 1 min and then, raised at 25 °C/min up to 250 °C, maintained for 3 min. The carrier gas was helium at 1.5 mL/min. The amount of pheromone and the corresponding chromatographic peak areas were connected by fitting a linear regression model, $y = a + bx$, where y is the ratio between pheromone and *n*-dodecane areas and x is the amount of pheromone. Occasionally, the re-extraction of previously extracted dispensers was done to corroborate that there was no pheromone left in the residue.

To obtain the release kinetics, multiple linear regression analyses were applied to relate the residual pheromone loads quantified (mg) with the corresponding days of field exposure for each type of dispenser on each location and season. The polynomial terms of time (days, days², days³) were introduced as independent variables to model the emission. Then, the first derivative of the resulting equations provided estimations of the mean daily emission rates. These analyses were performed using R version 4.0.3 (The R Foundation for Statistical Computing, 2020).

3.2.4 Population monitoring

Four delta traps provided with a sticky base and baited with a “Grapemone” monitoring lure (OpenNatur, Lleida, Spain) were placed in the center of each plot (treated and untreated) in a square-arrangement (70 x 70 m) to follow EGVM male flight throughout the study periods. The traps were positioned 1 m above the ground inside the canopy. On account of the low EGVM populations in the study areas, captures were revised fortnightly and the septum lures were replaced every 42 days, as an effective period ensured by the manufacturer. The number of males captured per trap and day (CTD) was compared among treatments; the absence of catches in the plots treated with MD was considered a necessary condition, although not enough, to ensure their success.

3.2.5 Damage assessments

Crop damage inflicted by EGVM was scouted after each male flight as the final proof for MD efficacy. At least 200 bunches were visually examined in 50 vines around each of the four delta traps installed in the center of each treatment to look for damaged or occupied flower clusters or bunches (% damage). In the first assessment (June), a flower cluster was considered damaged when nests, larvae, or pupae were found. In the case of the second (July) and the third assessments (September) a bunch was considered damaged when nests, eggs, larvae, or pupae were found.

In addition to the percentage of damaged bunches, the efficacy of each treatment was calculated following an adapted Abbott's formula for pesticides (Abbott, 1925):

$Efficacy = 100 \times (m_c - m_t) / m_c$, where m_c is the mean percentage damage in the control plots and m_t the mean percentage damage in the treated plots.

3.2.6 Statistical analysis

All the statistical analyses carried out to evaluate the significance of the differences observed in population monitoring data and damage assessments were performed using SPSS v. 16 (Armonk, NY, USA).

Population monitoring data, captures per trap and day (CTD), were analyzed by the non-parametric statistics Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post hoc tests, due to the impossibility to fulfill homoscedasticity requirements and normal distribution of residuals.

A Multi-factor analysis of variance (ANOVA), followed by post-hoc Fisher's least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$, was applied to the whole damage assessment data set, considering three factors: (1) trial (Location 1 and Location 2 in 2018 and Location 2 in 2019), (2) assessment (June, July, September), and (3) treatment (Rope, Ampoule, UTC). The percentage of damaged bunches data were subjected to normalization using the angular transformation, $\arcsin(\sqrt{x})$, prior to the Multi-factor ANOVA to fulfill homoscedasticity requirements and normal distribution of residuals. Damage data (% damaged bunches) were also separately analyzed for each assessment by using a One-way ANOVA followed by post-hoc Fisher's least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$. In this case, no data transformation was needed as data fulfilled homoscedasticity and normality requirements.

Regarding pheromone emission, the main goal was to evaluate the dispensers' dependency on the main field climate variables: temperature (minimum (Tmin), mean (Tmean), maximum (Tmax)), relative humidity (minimum (Hrmin), mean (Hrmean), maximum (Hrmax)), wind velocity (mean (Wm) and maximum

(Wmax)) and precipitation (Pp). After applying the MLRs to obtain the release kinetics, the resulting equations were derived, and the mean daily emission rates were obtained for each type of dispenser on each location. The mean daily emission rates of the last month (from 140 days onwards), corresponding with pheromone loads < 10 % of the initial load, were disregarded from the MLR analyses considering that from this moment the effect of dispenser depletion can be confounded with the climate effect. Then, the daily mean emission rates were correlated with the corresponding values of the abovementioned different climate variables by means of MLR. These analyses were performed using R version 4.0.3 (The R Foundation for Statistical Computing, 2020). The finally included variables were selected by stepwise removal and the quality of the models built was assessed by the calculation of the Akaike Information Criterion (AIC) indices, to estimate the predictive accuracy of the competing models (Posada and Buckley 2004). Emission rates data did not need previous transformation as they fulfilled the normality requirements.

3.3 Results

3.3.1 Population monitoring

Male catches per trap and day (CTD) recorded throughout the assays (Figure C3.1) were low in the three trial replicates and not significantly different among them ($H = 0.526$; $P = 0.526$), which leads to conclude that the population level was similar in the three trials. These low catches can be explained by the use of MD against EGVM in these areas during the last years. Despite the low male catches throughout the study periods, the treatments with the different MD dispensers, Rope dispenser ($H = 6.210$; $P < 0.001$) and Ampoule dispenser ($H = 6.456$; $P < 0.001$), significantly reduced male captures against the untreated controls.

Very high male capture inhibitions were observed for both MD treatments. During the first flight, no captures were obtained in the plots treated with Ampoule dispenser, whereas Rope dispensers performed an inhibition of 96.40 %, significantly reducing the male captures against the UTC plots ($H = 3.008$; $P = 0.008$). No males were captured during the second and the third flights with both MD

treatments, Ampoule dispensers and Rope dispensers, performing a very high effectivity against the UTC plots.

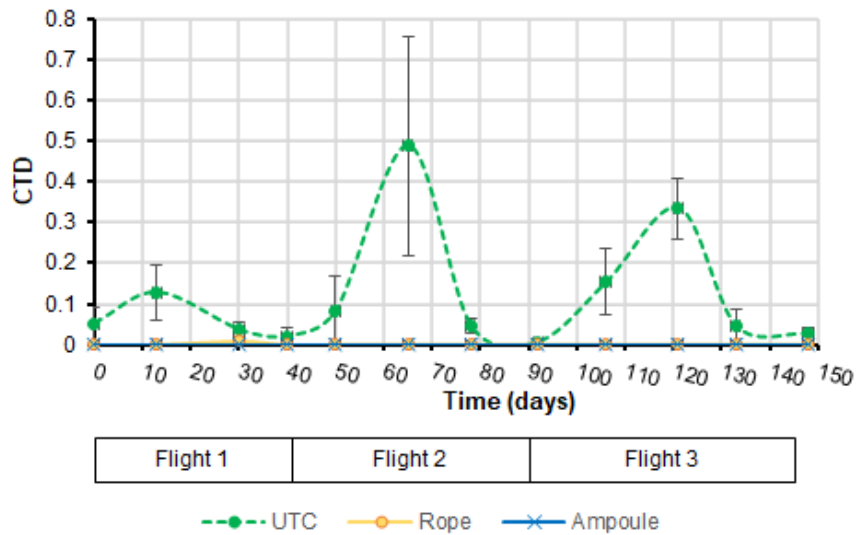


Figure C3.1 Mean (\pm SE) male captures per trap per day (CTD) throughout the study period of the three trial replicates in the plots with different treatments: (UTC) untreated control, (Rope) MD treatment with Isonet[®] L dispensers, and (Ampoule) MD treatment with Lobetec dispensers.

3.3.2 Damage assessments

The factor trial had a significant effect in the data of the damage assessments ($F = 7.490$; $df = 2,107$; $P = 0.001$). The percentages of damaged bunches obtained with the MD treatments were not significantly different between them ($F = 51.508$; $df = 2,107$; $P < 0.001$) and both achieved a significant damage reduction against the UTC plots ($P = 0.886$), below 5% in both cases (Figure C3.2).

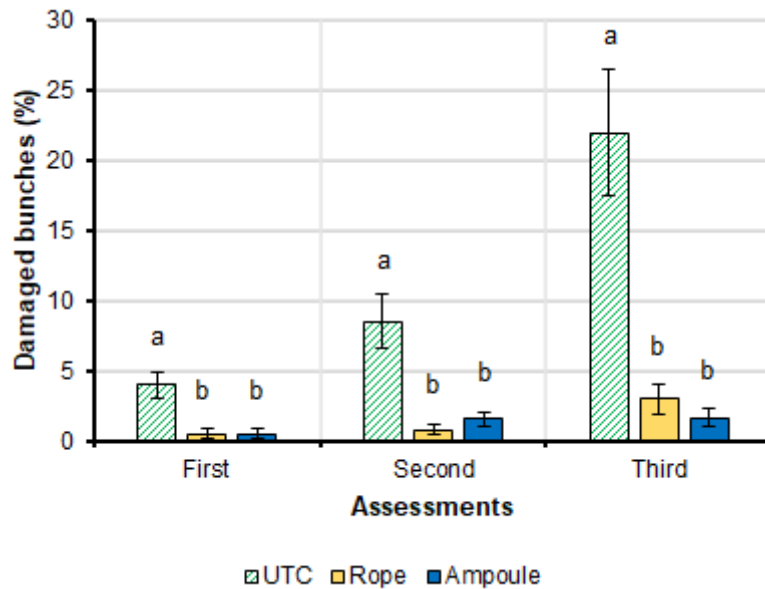


Figure C3.2 Mean (\pm SE) percentage of damaged bunches obtained in each treatment (untreated control (UTC), MD with Rope dispensers, MD with Ampoule dispensers) in the three damage assessments carried out in the three trial replicates. Damage assessments were performed after the first, second and third male flights. For each assessment, bars labelled with different letters are significantly different (ANOVA test, at $P < 0.05$).

No significant differences were observed between the MD treatments in the percentage of damaged bunches found in the first ($F = 26.619$, $df = 2,35$, $P = 0.1$), the second ($F = 55.057$, $df = 2,35$, $P = 0.349$), and the third assessments ($F = 42.058$, $df = 2,35$, $P = 0.5$). Moreover, both alternatives significantly reduced damage against the UTC plots ($P < 0.001$) in all the assessments carried out.

By employing Abbott's formula, the efficacy of both MD treatments reached 95% after the first flight, not differing significantly. After the second flight, Rope dispensers kept their efficacy with similar values than those of the first assessment, whilst Ampoule dispensers' efficacy was reduced up to 80% but it did not differ from Rope dispensers' ($F = 3.981$, $df = 1,5$, $P = 0.117$). Despite not being significantly different ($F = 0.556$, $df = 1,5$, $P = 0.497$), the highest efficacy in the last assessment was obtained with Ampoule dispensers (93.64%), while Rope treatment achieved 88.76%.

3.3.3 Dispensers release kinetics

After the solvent extraction of the field aged dispensers, the quantified residual pheromone contents were related to the corresponding days of field exposure by fitting the regression models ($R^2 > 0.92$ in all cases) depicted in Figure C3.3 and Figure C3.4.

The residual pheromone load of the Ampoule dispensers fitted linear models in all cases (Figure C3.3), regardless of the location, given that the quadratic and cubic effects of time initially included in the models were not significant ($P > 0.1$ in all cases). Accordingly, their emission was significantly constant and the slopes of the fitted linear models (Figure C3.3) provided the mean emission rates of the Ampoule dispensers throughout the study period in trials 1, 2 and 3 (0.71, 0.65 and 1.02 mg/day, respectively). Besides having a higher mean emission rate, the results highlight that Ampoule dispensers in 2019 season also had a higher mean initial load (256 mg), compared with 2018 data (206 mg).

By contrast, the release profile of the Rope dispensers was not constant in any case and the residual pheromone loads fitted the polynomial equations depicted in Figure 3.4. The fitting of polynomial models indicates the presence of different slopes in the release profile, which means variable pheromone emission rates throughout the study period.

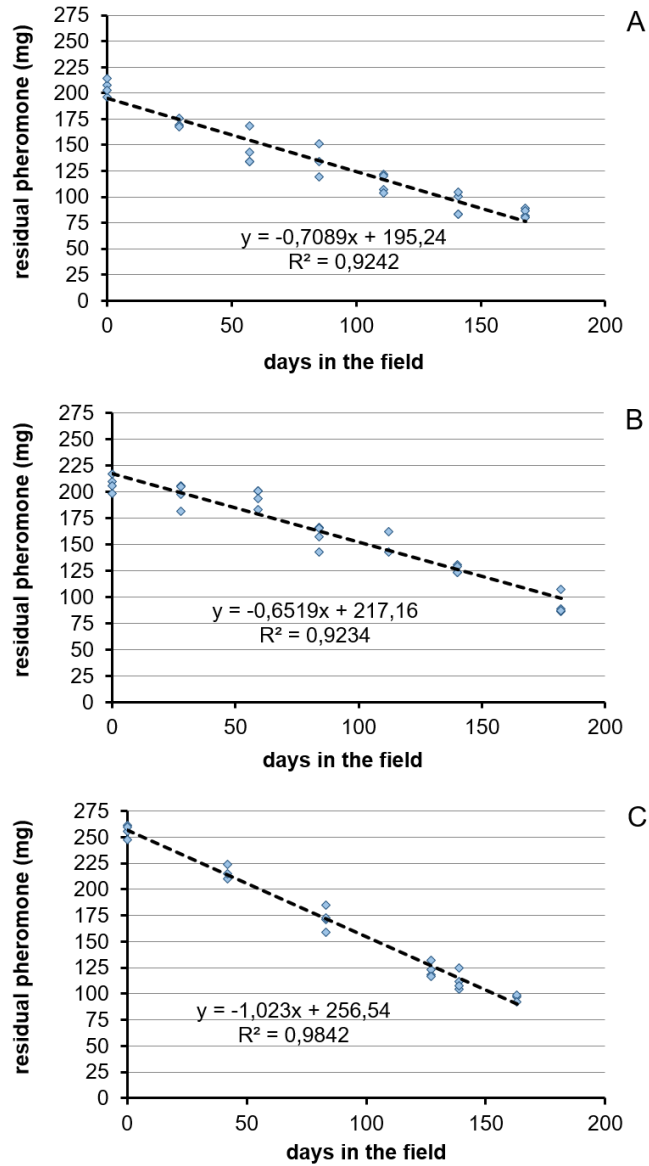


Figure C3.3 Pheromone release profiles of Ampoule dispensers in the three trials: (A) Moixent 2018; (B) Requena 2018 and (C) Moixent 2019. Residual mean pheromone load (mg) contained in the dispensers vs. the time of field exposure (days). Release kinetics fitted the linear models given by their equations.

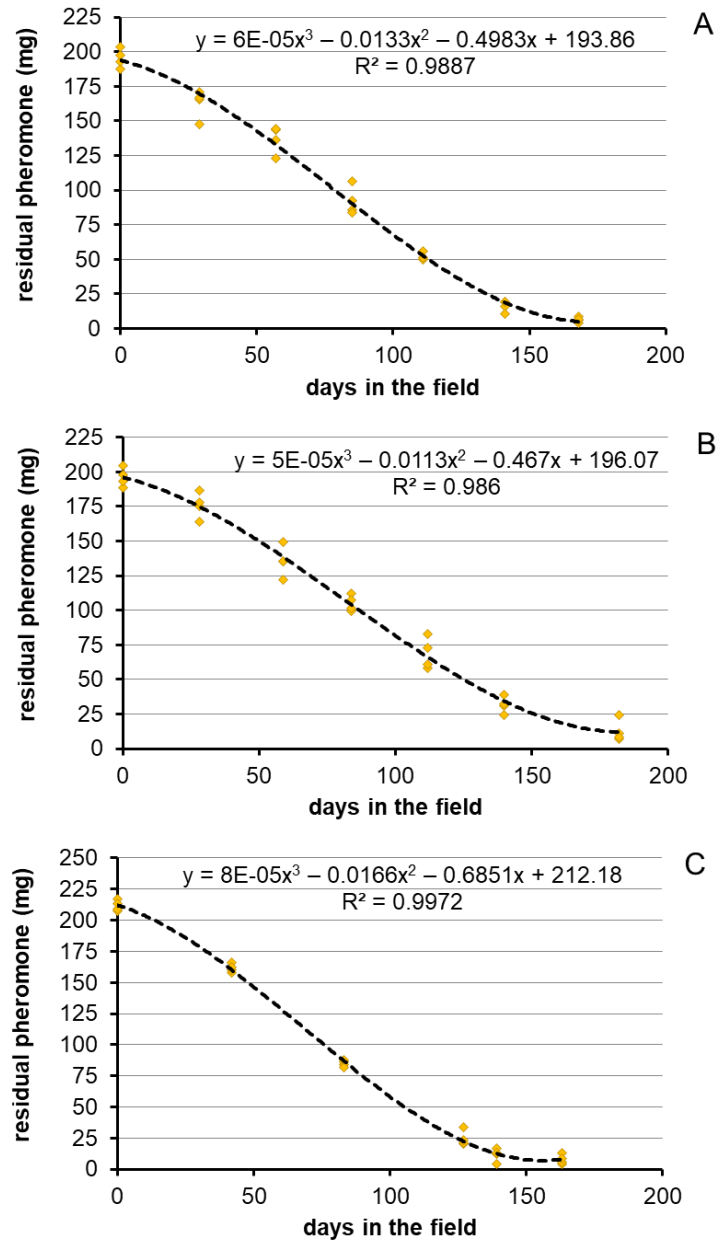


Figure C3.4. Pheromone release profiles of Rope dispensers in the three trials: (A) Moixent 2018; (B) Requena 2018 and (C) Moixent 2019. Residual mean pheromone load (mg) contained in the dispensers vs. the time of field exposure (days). Release kinetics fitted the polynomial models given by their equations.

In addition, the dispensers also differed in the features showed in Table C3.1. Although Rope dispensers contained less initial amount of pheromone than Ampoule dispensers (196 mg vs. 206 mg), their emission was higher throughout the growing season, as was the total pheromone applied, considering the higher number of dispensers installed (503.82 vs. 254.01 mg/ha/day). The pheromone content at the end of the crop cycle was nearly half of the initial content (ca. 40%) in Ampoule dispensers; whereas the Rope dispensers are almost empty (3-6%).

Attending to the data of both seasons, dispensers release kinetics were different in 2019 season, which belonged to a different production batch than those of 2018 season (Table C3.1).

Table C3.1 Initial pheromone content, total pheromone released per dispenser and per ha/day and percentage of residual pheromone at the end of the season.

Location	Dispenser	Initial content (mg/dispenser) ¹	Released (mg/dispenser) ²	Released (mg/ha/day) ³	Residual ⁴ %
1 (2018)	Rope	196.04 ± 3.39	183.39	503,82	6.44%
	Ampoule	206.05 ± 3.70	115.57	254,01	44.39%
2 (2018)	Rope	196.04 ± 3.39	189.69	564.56	3.23%
	Ampoule	206.05 ± 3.70	121.53	289.36	41.02%
2 (2019)	Rope	211.83 ± 2.16	204.06	625.94	3.67%
	Ampoule	256.09 ± 2.99	155.46	381.50	39.29%

¹Initial pheromone content (mg/dispenser) quantified by dispenser extraction and quantification by GC/FID. ²Pheromone released (mg/dispenser), total pheromone released until the harvest. ³Pheromone released (mg/ha/day), total pheromone released per day and ha until the harvest. Rope dispensers are deployed at 500 dispensers/ha whereas Ampoule dispensers at 400 dispensers/ha. ⁴%Residual pheromone, total pheromone remaining in the dispenser before the harvest.

Firstly, initial pheromone loads were higher in both dispensers in 2019, especially in the Ampoule ones, whose mean load reached 256 mg. These higher initial contents seem to be related with higher emission rates according to the pheromone released (more than 620 mg/ha/day in front of 560 mg/ha/day performed by Rope dispensers and 380 in front of 280 mg/ha/day performed by Ampoule ones).

3.3.4 Dispensers climate dependency

Both locations share the characteristics of the Mediterranean climate conditions with a high increase of temperatures during summer. Data obtained throughout the vines crop cycle show a progressive increase of the temperatures from March, with an average of around 10 °C, to July with more than 25 °C (Figure C3.5). After August, temperatures decreased until harvest in September-October to around 15-20 °C. The average wind speed during the study periods reached its maximum in the first month after MD dispensers deployment, April, with more than 4 m/s, whereas the average wind speed was kept between 2-3 m/s without many variations for the rest of the cycle.

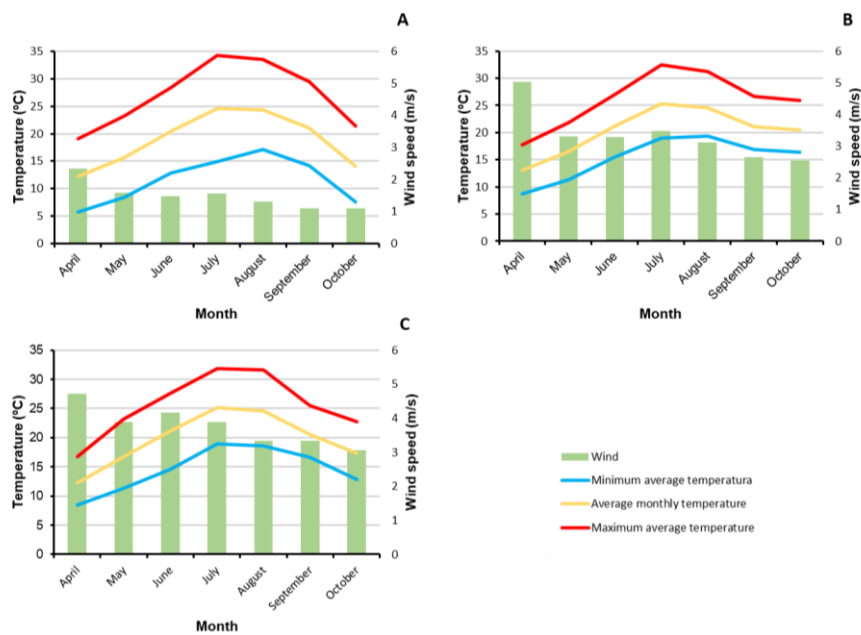


Figure C3.5 Average temperatures (minimum, mean and maximum in °C) and wind speed (m/s), parameters identified as statistically significant in Rope dispensers emission after the regression analyses, in the three trial locations of the assay (A: Requena 2018, B: Moixent 2018, and C: Moixent 2019).

According to the results of the release profile studies, the mean emission rate of Ampoule dispensers was significantly constant throughout the study period, which suggests that their performance is significantly independent from the climate

variables registered in the study area. By contrast, the release profiles of the Rope dispensers indicate that their pheromone emission rates were not constant and were probably affected by climate conditions. The daily mean emission rates obtained from the derived resulting polynomial equations and the daily values of the climate variables registered were correlated by means of MLR analyses. The simplest model that significantly fitted our field data was given by the following equation 1 ($P < 0.0001$, $R^2 = 0.359$):

$$(1): ER \text{ (daily emission rate)} = 0.238 + 0.043 \times T_{\text{mean}} + 0.013 \times W_{\text{mean}}$$

Accordingly, the regression analysis confirmed that the emission rate of the Rope dispensers was dependent from the mean daily temperature and the mean daily wind speed. However, the calculation of the AIC indices showed that daily pheromone emission rates can be slightly better predicted by including the minimum and maximum daily temperatures ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.378$) as in the following equation 2:

$$(2): ER = 0.246 - 0.031 \times T_{\text{min}} + 0.105 \times T_{\text{mean}} - 0.031 \times T_{\text{max}} + 0.012 \times W_{\text{mean}}$$

All the independent variables included in both models were highly significant ($P < 0.0001$). This implies that the mean temperature and wind conditions clearly affected the Rope dispensers by increasing emission rates when the values of these parameters rise. Nevertheless, isolated episodes of extreme temperature values should not be neglected.

If the monthly average residual pheromone content (%) from the three trials is represented versus time in relation to the average monthly mean temperatures (Figure C3.6), it can be observed that when mean temperatures raised up to 20° C from June, the slope of the Rope dispensers curve became steeper, meaning that mean emission rates increased with the temperature. In contrast, the slope of

Ampoule dispensers remained practically constant without great changes when temperature rises.

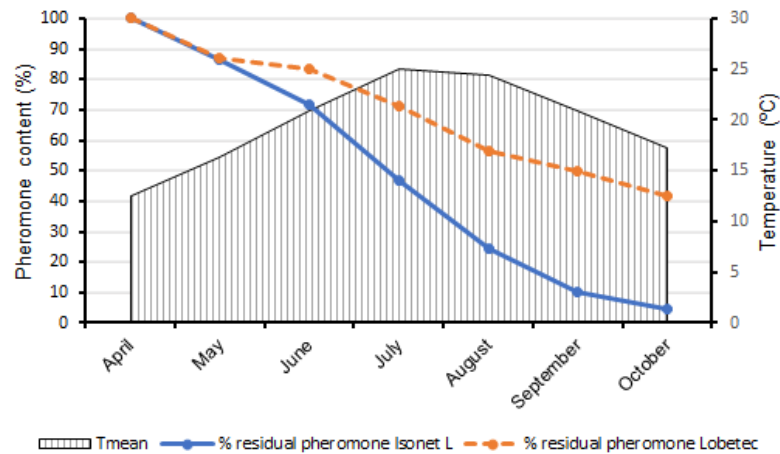


Figure C3.6 Mean residual pheromone content (%) of each type of dispenser throughout the crop cycle and monthly average mean temperatures from the three trial replicates.

3.4 Discussion

Reducing the implementation costs of MD is crucial to allow growers employing this pest control technique. Considering that the pheromone usually accounts for more than 90% of the implementation costs (Vacas et al., 2015), pheromone saving by keeping MD efficacy has always been debated. In this regarding, the comparison of different commercial MD dispensers can help to discuss about parameters such as emission rates and the effect of climate conditions that can impact on the treatments' efficacy. Our results showed that there is still room for improving the current commercial MD dispensers by avoiding high residual pheromone contents, reducing climate dependence, and fitting release rates to actual requirements.

Although few male catches were recorded in the UTC plots, due to the low populations in the study areas, our results revealed once again the high efficacy of MD against EGVM in vine production areas. Both types of dispensers, ropes and ampoules, performed effectively, reducing the catches of EGVM males in the

monitoring traps compared to UTC and even reaching total trap shut down in some cases (100% in the case of ampoules). This performance was in accordance with other studies done with Isonet® L rope dispensers (Altindisli, 2016; Altindisli and Özsemerci, 2013; Vassiliou, 2009), in which similar crop damage and efficacy results were obtained. In our trials, both types of dispensers kept the crop damage below 5%, which meant that no complementary chemical treatments were needed throughout the crop cycle. In the case of UTC, the damage reached almost 10% after the second peak flight and continued increasing up to 22% after the third generation. In this way, both dispensers were proven valid and advisable. These results were similar in the three trials, this way it can be said that in these vineyard production areas there was little variability of pest pressure throughout the years.

In Mediterranean vine production areas, the damage inflicted by the third generation of EGVM normally is the most important as it coincides with the end of the crop cycle just before harvest (Vassiliou, 2009; Ioriatti et al., 2004). Consequently, ensuring pheromone emission to cover the whole third flight until end-September is a necessary condition for MD dispensers to be used in these production areas. These results demonstrate that both studied dispensers' lifespan accomplished this requirement with different emission rates. However, depending on the cultivar, grapes can remain in the field until November and a fourth generation can take place, mainly in table grape varieties (Coscollá, 1997). In this case, and taking into account that the study has been carried out under the climate conditions of the València area, Isonet® L rope dispensers could not ensure effective pest control and only Lobetec ampoule dispensers would be suitable for these late varieties.

Climate conditions are described as influential factors in pheromone releasing. Wind speed is reported in the literature as an influential climate variable for semiochemical dispensers (Suckling et al., 1999; Sauer and Karg, 1998). An increase of this parameter has proven to increase release rates in laboratory experiments, i.e. the emission of trimedlure, the synthetic parapheromone of the tephritid *Ceratitis capitata* Wiedemann, increased in the laboratory following a linear

correlation with the wind speed (Alfaro et al., 2008), especially when using polymeric dispensers. Likewise, Ogawa (1997) reported a 13% increase in the pheromone release rate of the Isonet® L rope dispensers when wind speed increased from 1 to 2.5 m/s under controlled conditions. In our case, the multiple regression suggested that mean wind speed significantly affected Rope emission rates. In this way, it is possible that the higher emission recorded during the first month immediately after their installation (April to May with the highest wind speed values, 4 m/s) is partly produced by this wind-dependency effect.

Many studies relate higher emissions with higher temperatures in laboratory experiments (Pop et al., 1993; Weatherston, 1992; McDonough et al., 1989). In the present study, whilst increasing mean temperatures had a clear effect on Rope dispensers, by increasing their release rate from June, this variable did not significantly affect Ampoule dispensers, which kept their emission at similar rates throughout the crop cycle. Femenia (2010) found that Rope dispensers aged in a thermostatic chamber at 30°C and at constant airflow of 0.3 m/s presented higher emission values than field-aged dispensers, which are exposed to fluctuating temperatures. Thus, the importance of the temperature as an influential factor was deduced but this was not verified in field conditions. The differences in the climate dependency of the dispensers could be attributed to the nature of their polymeric wall (material, porosity, thickness, etc.) which can condition the permeability, but also the exposure surface of each type of dispenser (Femenia, 2010).

A lower dependence from temperatures ensures, in principle, the reduction of pheromone wasting. We should take into account that a higher dependence on the temperature means a waste of pheromone in the warmer months, but also means a waste of pheromone in the warmer hours of the day, when there is no male moth activity (Lucchi et al., 2018c). Therefore, it is possible that in an extreme case, a highly temperature-dependent dispenser could be releasing enough mean daily amounts of pheromone but providing release rates under the required quantity to reach disruption effect during sunset and sunrise.

Taking into account the number of dispensers installed per ha, their emission rates, and the efficacy of each treatment, it can be stated that Ampoule dispensers released the pheromone more efficiently in comparison to Rope dispensers. Ampoule dispensers provided the same efficacy than Rope dispensers inhibiting the male flights and reducing the damages with lower mean emission rates and lower quantity of dispensers installed per hectare. However, Ampoule dispensers still contained near 40% of their initial mean pheromone load at the end of the crop cycle in Valencian climate conditions, accounting for a very significant pheromone waste. Thus, Rope dispensers, despite releasing more pheromone, had a better adjusted lifespan to the EGVM cycle in the study areas, reaching depletion at harvest.

Recent studies based on airborne pheromone quantifications in MD treated fields with mating disruption, suggested that lower pheromone concentrations than those found in the center of a treated field with Isonet® L rope dispensers could still trigger MD without losing effectivity (Gavara et al., 2020). The use of Lobetec ampoule dispensers, with lower emission rates, could confirm this hypothesis demonstrating that emission rates and the number of dispensers per hectare could possibly be adjusted, reducing pheromone waste and the cost of this technique in places with similar characteristics to these study areas —low EGVM populations and MD usage background. However, further studies would be necessary to study whether lower emission values than those displayed by Lobetec dispensers keep their efficacy or, on the contrary, these values are not able to disrupt EGVM.

Capítulo 4

“Importance of the early deployment of mating disruption dispensers against the striped rice stem borer assessed with airborne pheromone variations along the crop cycle”

**“Importance of the early deployment of mating
disruption dispensers against the striped rice stem
borer assessed with airborne pheromone variations
along the crop cycle”**

Abstract. Mating disruption (MD) was demonstrated an effective environmentally friendly control method against the striped rice stem borer (RSB), *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). In the Albufera Natural Park (València, Spain), the density of pheromone releasing points and their emission were optimized in the past and, currently, the installation of 31 dispensers/ha is a collective strategy applied along the 16,000 ha rice-growing area. In the present study, it is demonstrated that the current MD dispensers release the pheromone exponentially, with higher initial release rates that decrease throughout the time. To optimize the use of the pheromone, the main aims of the present study were to adjust the timing of dispensers' deployment and evaluate the importance of controlling the early first or the second male flight. For this purpose, three field trials were carried out to test the efficacy of two strategies: the early dispenser deployment before the first male flight (May) and the late deployment before the second flight (June). In parallel, airborne pheromone concentrations were quantified throughout the crop cycle to relate them with the dispensers' release profiles. Results showed that the early dispenser deployment was more effective in reducing plant damage inflicted by RSB when assessed at harvest. However, neither of these strategies was able to inhibit the male catches of the third flight due to the dispensers' depletion. Attending to the airborne pheromone concentrations obtained, the results suggest that values around 1.60 ng/m³ were capable to inhibit *C. suppressalis* male flight effectively. The importance of controlling the first emerging moths that migrate from the perimeter shelter areas is discussed.

4.1 Introduction

The striped rice stem borer (RSB), *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae), is one of the most serious rice pests in Asia, southern Europe and northern Africa (Chen et al., 2011; Alfaro et al., 2009; Zibae et al., 2009; Jiang and Cheng, 2003). It is a polyphagous pest that can reach five generations in warmer Asian regions (Hou et al., 2010), although in Mediterranean climate RSB develops three generations. In these conditions, the three male flights usually take place at the beginning of June, in mid-August and during September (Vacas et al., 2016). Damage and losses in rice fields are produced when plant stems are drilled by RSB larvae where they feed and develop themselves to pupae stage provoking the death of the top of the plant producing “white heads” with unfilled grains (Chen and Klein, 2012). Consequently, the efficacy of the conventional chemical control, such as foliar contact insecticides, against this pest is restricted to the narrow period from emergence until larvae penetrates the stem (Howse et al., 1998). Losses produced by RSB can become very serious, from 5 to 100% found in some areas of Japan (Cho et al., 2005). In the Valencia region (Spain) rice field losses produced by RSB varied from 10 to 25% in the past (Jimenez et al., 1992) but, nowadays damage achieves values under 2% due to the implementation of new control strategies adopted, such as the mating disruption (MD) (Vacas et al., 2016).

The water requirements and climatic conditions needed for rice crops make that rice production areas tend to be placed in floodable areas, which are usually environmentally protected, where chemical applications are highly restricted (Alfaro et al., 2009; Vacas et al., 2009). For this reason, alternative control methods are needed, and the use of techniques based on semiochemicals is advisable. The sex pheromone of the RSB was first described as a mixture of (*Z*)-11-hexadecenal and (*Z*)-13-octadecenal (Ohta et al., 1976; Nesbitt et al., 1975; Ohta et al., 1975;) and later, a third component enhancing the activity was identified, (*Z*)-9-hexadecenal (Tatsuki et al., 1983). This three-component blend allowed the development of the first commercial pheromone formulations (Howse, 1998) and the implementation of

population monitoring, mating disruption and mass trapping against RSB in an environmentally friendly way, reducing chemical treatment impacts. Nowadays, it is demonstrated that the use of these semiochemical-based control techniques improves the results of the conventional chemical treatments (Chen et al., 2014).

Mating disruption was the first pheromone-based technique used to control RSB in Spanish paddy fields (Casagrande, 1993). Particularly, rice is mostly grown in environmentally protected areas in Spain, in which insecticide chemical treatments are not advisable due to their potential impact. For this reason, these treatments were gradually banned in some areas and the use of MD was promoted. This approach was possible due to the development of different mating disruption dispensers based on different technologies and the study of parameters such as their emission rates and their deployment densities (Vacas et al., 2016; Alfaro et al.; 2009, Vacas et al.; 2009). Nowadays, the mating disruption strategy covers all the rice-growing area of the Valencia Region and no chemical treatments are used against RSB. Pheromone dispensers are installed at a density of 31 dispensers/ha (18m x 18m) in all the paddy fields and supplied by the regional government in a collective strategy to fight this pest. Although this strategy offers great results reducing significantly crop damage, it would be advisable to determine the lifespan of these dispensers to ensure the complete protection against this pest throughout the different male flights. This information would be useful to evaluate the best deployment date to optimize their emission.

The release profile of these dispensers can be reliably studied by gas chromatography analyzing field-aged samples, but their impact on the total airborne pheromone is still unknown. Airborne pheromone data could help to determine the range of concentrations needed to disrupt mating of RSB and define at what pheromone release rate mating disruption is no longer triggered. This could be an interesting point because not only could the lifespan be known, but the real efficacy period of these MD dispensers could also be discussed. Recently, the absolute airborne pheromone concentrations present in vineyards have been determined and employed to discuss the mode of operation of different releasing systems (Gavara

et al., 2020). Results from this study revealed that, using passive dispensers, these concentrations varied throughout the crop cycle and were maximum in the middle of the season. These variations were explained by the role of the foliage and the climate conditions affecting dispensers' kinetics. Given these hypotheses and that rice is an herbaceous crop, airborne pheromone concentration in paddy fields is expected to be more dependent from dispensers' kinetics.

The main objective of the present work was to evaluate the lifespan of the dispensers currently employed to control RSB by MD and how the date of their deployment affects the efficacy of the method. For this purpose, three field trials were carried out to test two different deployment strategies: before the first or the second male flight. The release profile of the MD dispensers and the airborne pheromone concentrations present in the treated fields were simultaneously studied to establish a range of values in which MD is triggered using these dispensers.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Pheromone dispensers

The pheromone dispensers applied in the MD treatments were the commercial Bioselibate CS passive dispensers (Suterra LLC, Oregon, USA). These are extrusion devices based on a cellulose-matrix, where the pheromone (250 mg) is impregnated in a 10:1:1 ratio —(*Z*)-11-hexadecenal, (*Z*)-13-octadecenal and (*Z*)-9-hexadecenal—, avoiding the pollution from disposal wastes after their use. Individual dispensers were placed in the field on stakes, 0.6 m above the ground, at a density of 31 units per ha (18m x 18m).

4.2.2 Experimental design

Three trials were carried out during the 2019 season in different paddy fields in the Valencia Region (Spain) (Figure C4.1). Trial 1 was carried out in a 17 ha field growing Bomba cultivar, located in Sueca (València) belonging to the Albufera Natural Park (UTMs 39.284342. -0.340804). Trials 2 and 3 were conducted in two 90 ha fields (trial 2: UTM 38.855309. -0.034552; trial 3: UTM 38.860206. -0.029016) growing Bomba cultivar, both located in Pego (Alicante) and belonging to

the Marjal de Pego-Oliva Natural Park. In each trial, the field was divided in two plots to install two different MD strategies: (1) early dispenser deployment in 24 May 2019, before the first male flight, and (2) late dispenser deployment in 18 June 2019, before the second flight. No untreated plots were included in this study due to the collective strategy of MD followed in these areas.

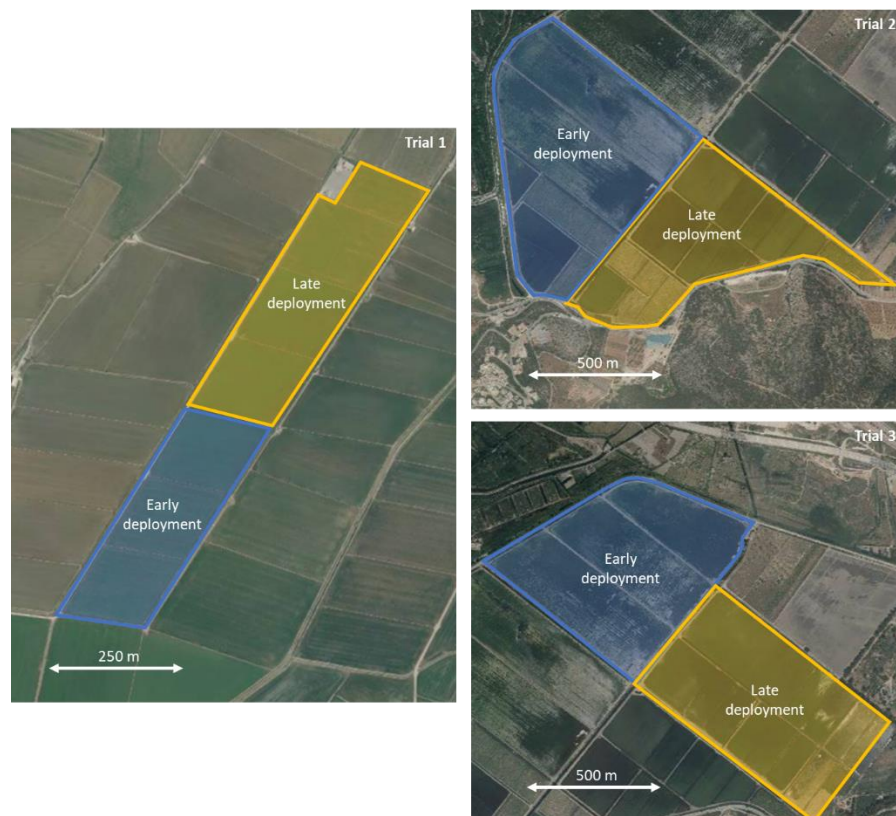


Figure C4.1 Arrangement of the different deployment strategies (early (May) and late (June)) at each location. Trial 1 (17 ha) was located in the Albufera Natural Park (València, Spain), whilst Trials 2 and 3 (90 ha both) were located in the Marjal Pego-Oliva Natural Park (Alicante, Spain).

4.2.3 Efficacy of the treatments

MD treatments' efficacy was checked according to (1) population monitoring, registering male captures per trap and day (CTD) in each treated plot, and (2) crop damage assessments performed after the second male flight. In addition, an extra assessment was done in Trial 1 plots after the harvest, inspecting the attacked plants in the stubble and scouting the offspring of the third generation. This was not possible to perform in Trials 2 and 3 due to the burning of the straw in these fields, a common cultural labor done at the end of the season. This extra assessment allows the knowledge about the final population of the season. Monitoring and damage assessments were both recorded in the center of the treated areas to check the actual effect of each treatment minimizing all kinds of interferences, such as pheromone drift or pest intrusion.

Population monitoring was assessed by installing four commercial funnel traps (Lepisan®, Sansan Prodesing SL, València, Spain) baited with Chiloprotect monitoring dispensers (SEDQ SL, Barcelona, Spain) in the center of each plot. These dispensers are loaded with 6 mg three-component blend of the RSB pheromone. The funnel traps were also provided with a DDVP Strip 20% dichlorvos (w/w) (Biagro, València, Spain) to retain the insects. Funnel traps were installed in all treatments one week before the early deployment of the MD dispensers.

Crop damage was assessed by counting the number of infested plants inside 1-m² plots randomly selected in the center of each treated area. A 1-m² frame was randomly thrown four times around each funnel trap. The number of RSB attacked plants –confirmed by the presence of larvae, pupae or galleries with frass- in each throw, was recorded to calculate the percentage of damaged plants.

4.2.4 Pheromone release profiles

In parallel with the field trials, two groups of additional MD dispensers were aged in nearby areas of Trial 1 from the date of their deployment (24 May or 18 June 2019) until the harvest, to obtain their pheromone release profiles. Four dispensers were taken from the field each month to analyze their residual pheromone content

in the laboratory. Pheromone extractions were made by cutting and soaking individual dispensers in 25 mL dichloromethane (DCM), inside a 50-mL glass centrifuge tube for 4 h with magnetic agitation. The residual content of (*Z*)-11-hexadecenal, the main pheromone compound, was quantified by gas chromatography using a flame ionization detector (GC-FID) in a Clarus 500 GC (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA). All injections were made onto a ZB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column (Phenomenex Inc., Torrance, CA), held in the GC oven programmed at 100 °C for 1 min and then, raised at 25 °C/min up to 250 °C, maintained for 3 min. The carrier gas was helium at 1.5 mL/min. The residual (*Z*)-11-hexadecenal contained in the extracts was then quantified, using *n*-dodecane as an internal standard. The amount of pheromone and the corresponding chromatographic areas were connected by fitting a linear regression model, $y = a + bx$, where y is the ratio between pheromone and *n*-dodecane peak areas and x is the amount of pheromone. Occasionally, the dispensers were re-extracted to verify the complete extraction of the pheromone.

4.2.5 Airborne Pheromone Quantification

4.2.5.1 Field Air Sampling

Air samples from paddy fields were collected with a high-volume air sampler (CAV-A/Mb, MCV, Barcelona, Spain) provided with an adsorbent 30 g/L polyurethane foam (PUF) (MCV, Barcelona, Spain). The election of the adsorbent material was made according to literature (López et al., 2017) and after field experiments based on airborne pheromone quantifications (Gavara et al., 2020).

The air samples were only taken at Location 1 in the plot treated with early dispensers' deployment, due to the availability of electrical supply needed for the air sampler in a nearby field warehouse. From that electrical source, an extension cord was connected to allow the installation of the air sampler in the center of the treated area, on a platform to avoid contact with the field water. Samplings were carried out monthly coinciding with different plant growth phenological stages (BBCH scale) according to Lancashire et al. (1991). Three samples were taken in June, coinciding with the setting up of the dispensers and the seeding, four samples in July at BBCH

26-30, four samples in August at BBCH 56-60 and three samples at the beginning of September at BBCH 90-96. All the samples belonging to the same month were performed in a period of less than 5 days to consider each sample a replication of the same period. All samplings were initiated at 12:00 h and the sampling time was established at 24 h with a flow of 15 m³/h. Once collected, the samples (PUFs) were stored in a freezer at 3°C in airtight bags until their extraction.

4.2.5.2 Sample extraction and filtration

Polyurethane foams were extracted using a 250 mL Soxhlet apparatus, bringing 300 mL of hexane to boil for 6 h, obtaining approximately 15 Soxhlet cycles. Each extract was concentrated up to 5 mL using a rotary evaporator, with a water bath set at 30°C, and finally to 1 mL under a gentle stream of nitrogen. Then, the samples were cleaned up through a gravity column (0.5 cm × 15 cm) packed, from bottom to top, with a glass wool plug and 500 mg of silica gel pre-eluted with hexane. The column was sequentially eluted with hexane (5 mL) and 2% Et₂O/hexane (12 mL), collecting three fractions of 5 mL. Fractions two and three containing the pheromone were finally concentrated up to 0.5 mL in a 2 mL GC screw-cap vial (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain) under a nitrogen stream. Occasionally, the column was rinsed with 100% Et₂O in order to corroborate the complete elution of the pheromone from the samples.

4.2.5.3 Pheromone quantification

The quantification of the pheromone collected in the air samples was performed by gas chromatography coupled to mass spectroscopy with a triple quadrupole detector (GC-MS/MS), using an internal standard. Due to the abundance of pheromone structurally-related compounds in the air collected samples, a straight chain fluorinated hydrocarbon ester (heptyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoate, TFN) was selected as an internal standard to improve both sensitivity and selectivity for the MS/MS method optimization. TFN was synthesized as described in Chapter 1.

Ten microliters of an internal standard solution of TFN were added to the fraction containing the pheromone. This sample was then analyzed using a TSQ 8000 Evo triple quadrupole MS/MS instrument operating in SRM (selected reaction monitoring) mode using electron ionization (EI +), coupled with a Thermo Scientific™ TRACE™ 1300 GC. All injections were made onto a ZB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) fused silica capillary column (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). The oven was held at 60 °C for 1 min then was raised by 10 °C/min up to 110 °C, maintained for 5 min, raised by 3 °C/min until 150 °C and finally raised by 35 °C/min up to 300 °C held for 5 min. The carrier gas was helium at 1.5 mL/min.

For each target compound —TFN and the main component of RSB pheromone, (*Z*)-11-hexadecenal— the MS/MS method was optimized by selecting the precursor ion and the product ions that provided the highest selective and sensitive determinations (Table C4.1). TFN transition 2 and RSB transition 2 were the ones employed to obtain the chromatographic areas. In the case of the RSB chromatographic signal, the other transitions were monitored for confirmatory purposes to have increased selectivity when several peaks appear near to the pheromone peak retention time.

Table C4.1. Optimum values of the MS/MS parameters for each target compound to quantify *C. suppressalis* airborne pheromone.

	Transition	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)
TFN	1	375	263	10
	2	393	373	5
RSB pheromone (main component)	1	81.1	77.1	15
	2	82.1	67.1	10
	3	95.1	67.1	10
	4	95.1	93.1	5

The amount of pheromone and the corresponding chromatographic areas were connected by fitting a linear regression model, $y = a + bx$, where y is the ratio between pheromone and TFN areas and x is the amount of pheromone.

The percentage of pheromone recovery after the whole process of extraction, concentration and sample preparation was checked by spiking known pheromone concentrations to PUFs previously exposed to the same procedure of air sampling in pheromone-free places and, thus, containing a similar environmental matrix. The chemical analysis showed a mean pheromone recovery rate of 95.3 %.

4.2.6 Data analysis

Multi-factor analysis of variance (ANOVA), followed by post-hoc Fisher's least significance difference (LSD) test ($P < 0.05$), was carried out to study the significance of the differences observed in the number of males captured per trap and day (CTD) recorded during each peak flight between the different deployment strategies. Capture data was \sqrt{x} transformed prior to the analysis to fulfill homoscedasticity requirements and the normal distribution of the ANOVA residuals.

Crop damage assessment data (infested or healthy rice plants) were submitted to contingency tables and the Person's chi-square test (χ^2 at $P < 0.05$) to assess the significance of the differences observed between treatments.

One-way ANOVA, followed by post-hoc Fisher's least significant difference (LSD) test ($P < 0.05$), was used to study the differences observed between the absolute airborne pheromone concentrations sampled each month. The analysis was applied without transformation, as they fulfilled the homoscedasticity requirements and the residuals of the ANOVA fitted a normal distribution.

All the statistical analyses were performed using SPSS v. 16 (Armonk, NY, USA).

4.3 Results

4.3.1 Efficacy of the treatments

Although male captures (CTD) were very low throughout the crop season in the three trials (Figure C4.2). —the low pest pressure is due to the use of MD against RSB for more than 10 years in the study area—, there were higher values in male catches in Trial 1 than in trial 2 and 3 ($F = 11.980$; $df = 4, 7, 2$; $P = 0.0001$). The different peaks differed statistically among them ($F = 5.13$; $df = 47, 2$; $P = 0.0102$) although no captures were recorded during the first male flight period (May 28 to June 25) or the second (July 30 to August 22), in the case of the plots that received early dispenser deployment. In contrast, in the plots where dispensers were deployed in June 18, some males were detected during the first and second flight peak. The third male flight was detected at the end of the growing season although no statistical differences were observed between treatments ($F = 0.460$; $df = 7, 1$; $P = 0.5098$).

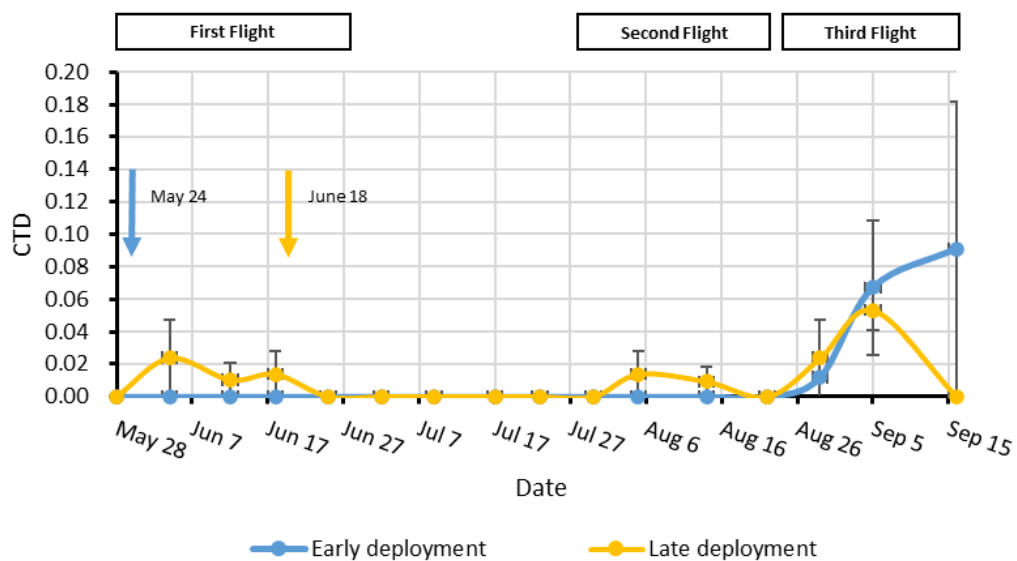


Figure C4.2 Mean (\pm SE) male captures per trap per day (CTD) of the three trials throughout the crop season with the different mating disruption treatments: (May) early deployment of pheromone dispensers and (June) late deployment.

Crop damage assessment-data (Table C4.2) showed that the level of plant attack was significantly lower in the plots where dispensers were deployed early in the three trials. The most significant difference was found in Trial 1, recording 61.5% less damage in the area treated with early deployment compared with the strategy of late dispenser installation. In the case of the trials 2 and 3, the percentage of attacked plants is 58.3% and 27% lower, respectively, in the plots treated with early deployment. Attending to the assessment carried out in Trial 1 at post-harvest, presence of RSB was high with both treatments as the third generation was allowed to build up. However, the damage in the early-treated plot remained significantly lower than that in the late-treated plots.

Table C4.2 Mean (\pm SE) of infected plants in one square meter (NIP/m²) and percentage of attacked plants (%) obtained in each treatment in the three assessments carried out at each trial.

Assessment ¹	Damage (%) ²		Stats ³	
	Early (May)	Late (June)	χ^2	P
Trial 1	0.55 \pm 0.51 a	1.21 \pm 0.77 b	10.774	0.001
Trial 2	0.13 \pm 0.07 a	0.32 \pm 0.16b	11.241	0.001
Trial 3	0.47 \pm 0.15 a	0.66 \pm 0.18b	4.146	0.025
Post-harvest	26.21 \pm 7.87a	35.93 \pm 10.15b	9.451	0.009

¹All the assessments were performed after the second male flight, except for the Post-harvest, which was carried out only in Trial 1 after the harvest by checking the stubble. ²Percentage of damaged plants (%). ³Results of the statistical analysis (χ^2 t-test, at P < 0,05), all analysis showed statistical differences between treatments.

4.3.2 Dispenser release profiles

The residual pheromone content of the field aged dispensers, either deployed in May or June, fitted an exponential model (Figure C4.3). Although both kinetics were similar, the dispensers installed in May (early deployment) emitted 50% of their pheromone load during the first month of field exposure, whilst the dispensers installed in June (late deployment) released 60% of their content in the same time interval (Table C4.3). Higher temperatures could explain the higher emission performed by the dispensers installed in June (21 °C from May 24 to June 24 vs. 25

°C from June 18 to July 18). This fact caused that the residual pheromone content of these dispensers in the third month from their installation matched with the pheromone content of the May dispensers in their fourth month of ageing (around 80% of the pheromone released).

The late deployment caused higher emissions in the same period of time (Table C4.3) and all the dispensers reached the end of their lifespan practically at the same time. In this way, the mean pheromone released by the dispensers, despite the deployment date, was the same, (ca. 60 mg/day/ha), the lower emissions at the end of their lifespan compensate the higher initial emissions. This fact causes a reduced emission in the second and the third male flights of the pest.

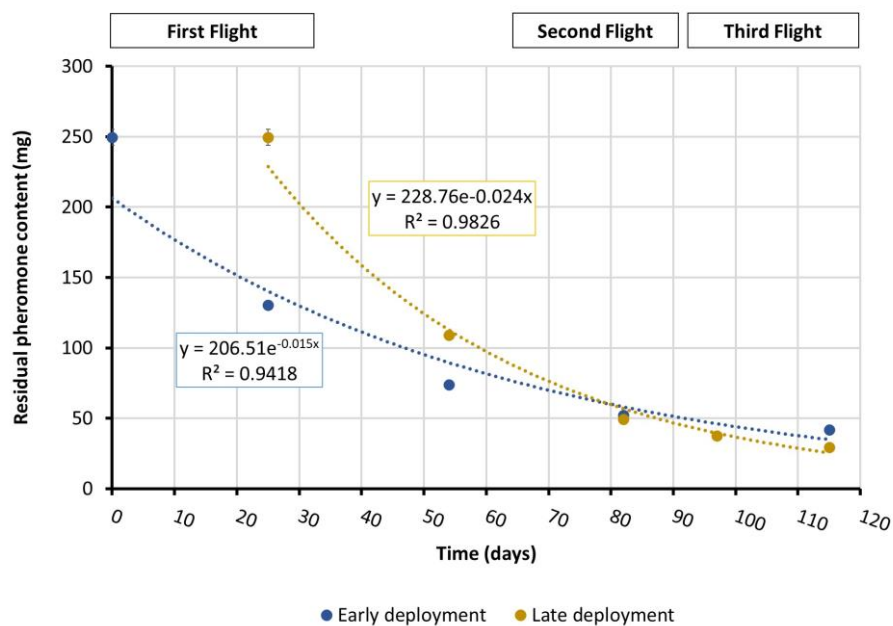


Figure C4.3 Residual pheromone content of Bioselibate CS dispensers installed in May and June, as residual mean pheromone load (mg) contained in the dispensers vs the time of field exposure (days), Release kinetics fitted the linear model given by the equation.

Table C4.3 Bioselibate CS dispensers aging installed in May 24 (Early deployment) and in June 18 (Later deployment), Residual means of pheromone content (mg) throughout the time in field (days), Point values of Figure 2 and the total mean of pheromone used (mg/day/ha).

Early deployment (May)			Late deployment (June)		
Days	Pheromone content (mg)	Pheromone emission (mg/day/ha)	Days	Pheromone content (mg)	Pheromone emission (mg/day/ha)
0	249.53 ± 5.79	-	0	249.53 ± 5.79	-
25	130.45 ± 2.11	147.66	29	108.95 ± 2.81	150.28
54	73.91 ± 1.96	60.44	57	49.22 ± 3.34	66.13
82	52.39 ± 1.54	23.83	72	37.54 ± 2.54	24.14
115	41.82 ± 2.47	9.93	90	29.41 ± 0.70	14.00
Mean		60.46±30.96	Mean		63.64±31.01

4.3.3 Airborne pheromone quantification

The profile of airborne pheromone concentrations present in the field followed the same trend observed in the release profile of the dispensers installed in May, with the emission rate and the airborne concentration decreasing significantly throughout the crop cycle ($F = 23.828$; $df = 13,3$; $P < 0.001$) (Figure C4.4). The most significant reduction of the airborne pheromone occurred after the first month, from 1.60 ± 0.05 ng/m³ at the beginning of June to 0.74 ± 0.18 ng/m³ at the beginning of July ($P < 0.001$). After the second month, the quantified concentration decreased but not significantly, reaching 0.41 ± 0.01 ng/m³ ($P = 0.057$). At the end of the season, the mean concentration decreased up to 0.24 ± 0.03 ng/m³, differing significantly from the initial sampling periods ($P = 0.013$). These results match with the dispensers' pheromone emission rate (mg/day/ha), with higher emission at the beginning of the growing season (147.66 mg/day/ha to 60.44 mg/day/ha, from June to July) and lower rates throughout the study period (23.83 and 9.93 mg/day/ha).

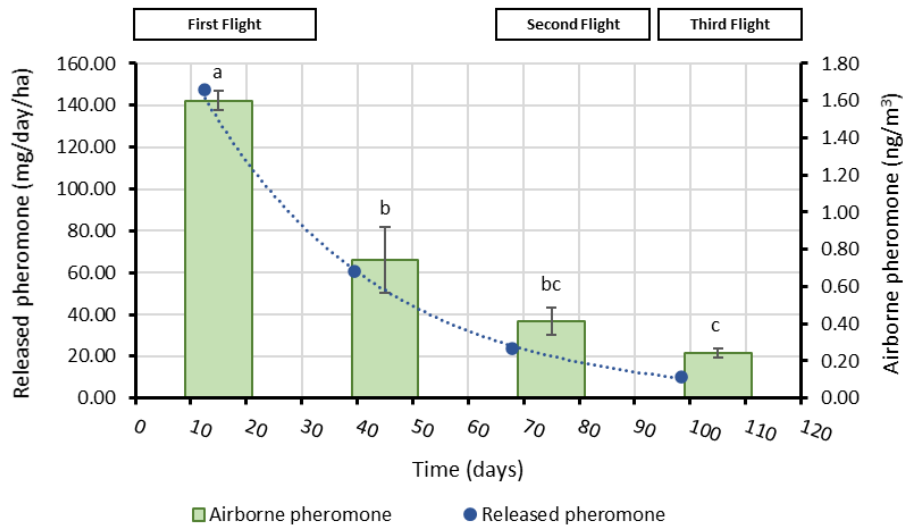


Figure C4.4 In bars, Mean (\pm SE) absolute airborne pheromone concentrations (ng/m^3) in rice field treated with passive dispensers Bioselibate CS installed in the end May. Air samples were collected monthly from June to September during the crop cycle. Bars labelled with different letters are significantly different, ANOVA followed by Fisher LSD test ($F = 23,828$; $df = 13,3$; $P < 0,001$). The points show the pheromone released/day during the study period.

4.4 Discussion

Mating disruption has been used collectively for more than 10 years in the study area and progressively improved by establishing the optimal release of pheromone and the number of dispensers per hectare needed to disrupt effectively RSB (Alfaro et al., 2009). The results of the present work show the date of dispensers' deployment as an important parameter that affected the population and the damage level produced by RSB. Moreover, the airborne pheromone quantifications performed throughout the crop cycle and their relation with the dispensers' pheromone emission appeared as convenient parameters to explain at which concentration RSB is disrupted, effectively inhibiting male captures, and how the dispenser deployment date affected the efficacy of this control method.

The first parameter that deserves our attention is the low pest pressure observed, reflected by the low male captures recorded in the three trials, as a consequence of the prolonged use of this biotechnical approach on the study area. This capture level is comparable to those reported in past studies carried out in the same area (Vacas et al., 2009 and 2016, Alfaro et al., 2009). Despite the low values, data allowed the detection of significant differences between the performances of the different strategy. Whilst male flights were not detected in the plots that received early dispenser deployment (May) until the third flight (90 days after their deployment), the late deployment (June) strategy was not effective for the complete inhibition of the second flight catches. This fact probably led to the significantly higher level of plant attack recorded in these plots. Nevertheless, the level of damage obtained was low and similar to that reported in other experiments carried out in the same area, where damaged plants did not exceed 1.50 infested plants per m² (Alfaro et al., 2009) or 1% of damaged plants (Vacas et al., 2016).

Neither strategy was able to control the third flight, which agrees with the depletion of the MD dispensers confirmed by the study of their release profiles. As a result, this abundant uncontrolled flight allowed population to build up, obtaining percentages of infested plants over 20% in the post-harvest assessments. This last damage assessment, despite not being useful to deduce yield losses since the rice is already harvested, highlights the importance of conducting the traditional cultural control at the end of the crop cycle. Burning or removing the straw rests and flooding the fields are traditional practices that reduce the RSB reservoirs that would have an impact on the next growing season. Due to the lack of crop host, the hibernating population develops on the perimeter marsh vegetation of the paddy fields, such as grasses, reeds and sedges, to later emerge and migrate again toward the rice plants in the next season (Batalla, 1999b). Thus, in these conditions, and in rice cultivars that are harvested before October, our results suggest that it is not essential to control the third male flight but an early deployment of the MD dispensers is recommended. An effective disruption of the male first flight is probably avoiding or delaying the mating of the first emerging moths that will colonize the young rice

plants. By contrast, when dispensers are deployed after the first flight, the establishment of migrating gravid females in the rice fields and the development of the subsequent generation are then allowed. In other insect orders, such as the hemipteran *Aonidiella aurantii* Maskell, it has been demonstrated that a later deployment could be advantageous due to their biology and crop characteristics (Vacas et al., 2015). Our results agree with which has already been reported for other Lepidoptera species, proving that mating disruption of the first emerging moths is crucial and that early pheromone applications prevent mid-season increases (Lykouressis et al., 2005; Kehat et al., 1995; Staten et al., 1987). Airborne pheromone quantifications carried out throughout the growing season showed that the concentrations present in field conditions decreased in parallel with dispensers' pheromone emission and never exceeded 1.60 ng/m³. Recent studies measuring airborne pheromone concentrations in vineyards obtained higher values, reaching in some cases more than 40 ng/m³ (Gavara et al., 2020). These differences could be explained by different factors, such as those related to the crop (type, height, foliage...), the environment or the kind of MD dispensers used. Vines are bushy crops, with well-developed foliage that can act as pheromone reservoirs and reduce pheromone washing caused by wind (Gavara et al., 2020; Karg and Sauer, 1997; Uchijima, 1988). By contrast, rice is an herbaceous crop with limited foliage surface. The characteristic leaves of grasses—smaller and thinner layer of waxy surfaces—were described as a disadvantage for adsorbing pheromone content (Karg and Sauer, 1997; Karg et al., 1994). In addition, their size and luxuriance does not prevent the crop area from strong winds exposure capable to wash away the airborne pheromone.

Regarding the MD treatment, the dispensers employed against *L. botrana* in vineyards are hand-applied passive dispensers deployed at 500 dispensers/ha (ca. 600 mg/day/ha) or automatic aerosol devices at lower densities but with high pheromone dose (4 dispensers/ha; ca. 600 mg/day/ha). In contrast, the dispensers employed against *C. suppressalis* are also hand-applied but are installed at lower densities (31 dispensers/ha) and provide lower mean emission (ca. 60 mg/day/ha).

Since the pheromone emission is around 10 times lower in rice than in vineyards treated with mating disruption, it is consistent that the pheromone concentration measured in air is around 20 times lower in rice than in vineyards.

The decreasing quantity of airborne pheromone throughout the crop cycle, together with the decreasing emission rate of the dispensers, suggest that emissions above 70.19 mg/day/ha, producing 1.60 ng/m³ of airborne pheromone, inhibit *C. suppressalis* male flight effectively. However, when airborne pheromone decreased under 0.45 ng/m³ (with emission rates under 30 mg/day/ha), male flight was not consistently disrupted, as captures were detected in the late-treated plots but not in the early-treated ones during the second flight. With these data, we cannot state whether the lack of male captures during the second flight in the early-deployment treatment was caused by the airborne pheromone concentration or by the fact that there were less moth migration into these fields and lower populations installed after the first flight.

In conclusion, the late deployment of MD dispensers after the first flight could not completely disrupt RSB flight, suffering greater damage as set out in damage assessment results. We should consider that previous studies demonstrated in a 20-year data set that 1% of dead plants or white heads panicles can cause from 2.5 to 6.4 % of yield loss (Liu 1990, Bandong and Litsinger 2005). We hypothesized that this higher damage is probably due to a higher incidence of the mating of the first moths emerging from the neighbor vegetation, which were not affected by the late dispenser deployment. Accordingly, it would be interesting to study if early treatments applied to the perimetral vegetation of the paddies, such as installation of MD dispensers or spraying with pheromone formulations (e.g. microencapsulated), before the seeding could be effective to reduce the offspring of the overwintering population. Moreover, this could be a convenient practice to reduce the initial populations rather than the early dispenser deployment inside the paddy fields which can be sometimes difficult to manage when seeding dates are not properly synchronized along the growing area.

Discusión general

Discusión general

La cuantificación de feromona en aire y la optimización de los métodos de control de plagas

A lo largo del presente trabajo se ha desarrollado una metodología que ha permitido cuantificar la feromona en aire de especies plaga de viñedos y arrozales, contra las que se utiliza la confusión sexual como principal método de control. Tres son los métodos que se describieron en la literatura científica para estudiar la cantidad de feromona en aire en condiciones de campo (Karg and Sauer 1995). En primer lugar, ensayos de electroantenografía, en segundo lugar, registros de sensilia única y, por último, las captaciones de volátiles en aire, como las realizadas en el presente trabajo.

Las feromonas se encuentran en concentraciones muy bajas en el ambiente, mucho menores que las de sustancias que se monitorizan diariamente como es el caso del NO₂, el O₃ o el SO₂, cuantificadas a un orden de magnitud de µg/m³ (MITECO, 2018). También se han desarrollado metodologías para la cuantificación de sustancias a concentraciones mucho menores, como es el caso de las dioxinas y de los furanos cuyas concentraciones se sitúan en el orden de fg/m³ (Abad et al., 2007, Li et al., 2008, Lohmann and Jones, 1998), y para la cuantificación de compuestos cuyos niveles en aire son del mismo orden de magnitud que las feromonas (ng/m³), como nicotina o cocaína (Cecinato et al., 2012) y pesticidas cuya concentración en aire se sitúa entre los 0.1 pg/m³ hasta los 10 ng/m³ (López et al., 2017). En el caso de las feromonas, además de su baja concentración en el ambiente, sus estructuras químicas las hacen difíciles de diferenciar de muchas otras sustancias presentes en la matriz ambiental, bien por ser de tipo hidrocarburo de cadena lineal o terpenoide.

Con el objetivo de superar estos inconvenientes y para captar cantidades de feromona que se encuentren dentro del nivel de detección de los instrumentos analíticos actuales, se necesitan muestrear grandes volúmenes de aire (Alfaro,

2006), lo que se soluciona mediante el uso de captadores de alto volumen equipados con distintos materiales adsorbentes. En el presente trabajo se utilizaron la resina XAD-2 y las espumas de poliuretano en base a los resultados obtenidos en la tesis de Alfaro (2006) y la metodología empleada en la actualidad para cuantificar pesticidas en aire (López et al., 2017).

Aunque los tiempos de muestreo de aire (24 y 48 horas) empleados en nuestros estudios hacen que las cantidades obtenidas sean valores medios, frente al uso de las técnicas electrofisiológicas, que pueden proporcionar medidas instantáneas, es cierto que mediante las captaciones se superan muchos de los inconvenientes de estas técnicas, como son: la preparación laboriosa y el difícil calibrado de la muestra, el efecto que puede tener la interacción de otros compuestos presentes en la matriz ambiental sobre la señal electrofisiológica obtenida, la influencia del estado de los insectos, la interpretación de la señal etc.

Sin embargo, esta técnica presenta también algunos inconvenientes, como la necesidad de disponer de matrices adsorbentes capaces de captar las feromonas presentes en el aire a bajísimas concentraciones (del orden de ng/m^3), aun teniendo que pasar a través de ellas grandes volúmenes de aire. Esto provoca que se produzca el efecto *breakthrough*, por el que una parte de la muestra captada en el material adsorbente se lava por efecto del paso del aire, lo que supone un error de medida que puede resultar importante. En el sistema desarrollado, a pesar de no haber podido eliminar el efecto *breakthrough*, es cierto que los niveles a los que se presenta son similares a los considerados aceptables por diversos autores en estudios de cuantificación de otras sustancias en el aire (Bidleman and Tyskling, 2018; Peters et al., 2000; Hart, et al., 1992).

En los estudios realizados en nuestro caso, los valores obtenidos de feromona en aire en las diferentes captaciones realizadas para las diferentes especies (*A. aurantii*, *L. botrana* y *C. suppressalis*) son comparables a los de otras experiencias del mismo tipo realizadas en el pasado. Por ejemplo, la cantidad de Disparlure (feromona utilizada en el control de *Lymantria dispar* Linnaeus

(Lepidoptera: Erebidae) en aire se estableció en el orden de ng/m^3 en diferentes trabajos (Caro et al., 1980; Caro et al., 1978; Plimmer et al., 1978). En estos estudios iniciales, la feromona captada tenía que derivatizarse para poder obtener sensibilidad suficiente al utilizar un detector de captura de electrones. Más recientemente, Alfaro (2006) consiguió cuantificar, con un equipo de espectrometría de masas de cuadrupolo simple, la feromona de *C. suppressalis* en campos de arroz. Aun así, en su caso solo se pudieron obtener valores de feromona en aire a principio del ciclo de cultivo (mes de junio) y en campos en los que la densidad de emisores era superior a la que se utiliza actualmente (51 emisores por hectárea frente a 31 en la actualidad), de manera que las cantidades de feromona serían previsiblemente superiores a las actuales. A pesar de no poder obtener resultados de concentración de feromona en aire a lo largo de todo el ciclo de cultivo y no proceder al estudio del *breakthrough*, el trabajo de Alfaro (2006) ha servido como base para el desarrollo de la metodología utilizada en este trabajo.

El conocimiento de la cantidad de feromona en aire es útil desde diferentes puntos de vista. La obtención de estos valores ha facilitado en este trabajo, la correlación de los niveles de feromona en aire con los valores de emisión de distintos tipos de emisores de feromona, la eficacia que proporcionan en campo, la fecha de colocación más adecuada para los emisores, los mecanismos que desencadenan la confusión sexual y el estudio del efecto de la cubierta vegetal sobre la cantidad de feromona presente en un campo de cultivo. De esta manera, la cuantificación de la concentración de feromona en aire puede facilitar la optimización y la mejora de los emisores actuales, así como servir de base para el desarrollo de emisores en el futuro, teniendo en cuenta el impacto real de las emisiones en la cantidad total de feromona conseguida en aire y los mecanismos que pueden provocar la confusión en la especie diana. Estos valores también podrían ser utilizados como punto de partida para el desarrollo y la optimización del uso de la feromona en plagas en las que se usa el trapeo masivo si se consiguiera reducir el tiempo de muestro, puesto que podrían utilizarse para establecer el alcance de cada una de las trampas utilizadas o incluso determinar a partir de qué

valor (nivel de emisión) se produce confusión sexual. Las últimas captaciones realizadas en campos de arroz para la cuantificación de feromona de *C. suppressalis* se han realizado con muestras tomadas durante 24 horas frente a las muestras de 48 horas tomadas en los viñedos, y los resultados obtenidos sugieren que sería posible reducir aún más el tiempo del muestreo, dada la sensibilidad que han proporcionado los equipos de medida utilizados.

Fuera del ámbito puramente agronómico, existe una creciente preocupación, por parte de la ecotoxicología, por lo que se conoce como efecto infoquímico, causado por sustancias de origen antropogénico que pueden intervenir modificando la comunicación química entre organismos (Klaschka, 2008). Esto es debido a que una gran cantidad de sustancias utilizadas en ámbitos tan diferentes como procesos industriales, agricultura, cosmética, etc., son también utilizadas como semioquímicos en la comunicación de los insectos. En este ámbito, la técnica planteada podría utilizarse, dado el caso, para estudiar la presencia y/o la cantidad de un determinado semioquímico que pudiera generar un impacto negativo.

El tipo de cultivo afecta a la distribución y persistencia de la feromona en el ambiente

En el caso de la cuantificación de la feromona de *L. botrana*, se han obtenido similitudes con estudios realizados por Karg y Sauer (1997). En ellos se observó, mediante estudios de EAG en campo, que la cantidad de feromona presente en el cultivo en verano es superior a la que se observa en primavera. Además, comprobaron que las señales obtenidas en un campo defoliado, debido a una tormenta de granizo, no diferían estadísticamente de las medidas realizadas en primavera, pero eran significativamente menores a las obtenidas en un campo de viña cercano que se mantuvo en buen estado. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, tanto en las captaciones realizadas en viñedos como en las realizadas en el arrozal, sugieren que la presencia de follaje o una masa foliar bien desarrollada (en el caso de los cultivos arbustivos) puede estar relacionada con una mayor cantidad de feromona en el ambiente. Esto podría justificar en parte las

diferencias de concentración detectadas entre el viñedo, con un máximo de 40 ng/m³, y el arrozal, cuyo valor máximo se estableció en 1,30 ng/m³.

Además de reducir la velocidad del viento y las corrientes de convección en el interior del cultivo (Karg and Sauer, 1997; Schmitz et al., 1997a, Uchijima, 1988), se ha demostrado que la presencia de follaje puede favorecer una distribución más homogénea de la feromona a lo largo del campo de cultivo. En experimentos controlados, incluidos en el presente trabajo, en los que se analizó la presencia de feromona de *L. botrana* a lo largo del tiempo en hojas de vid previamente rociadas con la misma, se comprobó que las hojas adsorbían feromona en su superficie y que, posteriormente, se iba liberando al ambiente. En condiciones reales de campo, si se observa la cinética de emisión de los emisores y la variación de la concentración de feromona en el aire, esa concentración, en el caso de las captaciones realizadas en los viñedos, parece no guardar una relación directa con los valores de emisión que proporcionan los dispositivos de confusión sexual. En general, se detectaron bajas concentraciones al principio del ciclo de cultivo, cuando las cepas aún no tienen un follaje desarrollado, y concentraciones máximas en la parte central del ciclo. Sin embargo, en el caso de las cuantificaciones realizadas en el cultivo de arroz, el perfil de la concentración de la feromona en aire a lo largo del ciclo de cultivo coincide con el perfil de feromona emitida, de manera que es más alta al principio, cuando los emisores emiten la mayor parte de su contenido, y menor al final de su vida útil (exponencial negativo). Por lo tanto, la feromona que se emite en el arrozal no se ve beneficiada por el efecto tampón de la concentración que proporciona una densa masa vegetal.

De los estudios realizados se pueden obtener dos conclusiones que pueden influir claramente en la cantidad de feromona requerida para conseguir alcanzar la confusión sexual. En primer lugar, existe un mecanismo amortiguador de la vegetación, que protege de la reducción de la concentración de feromona debido al lavado por las corrientes de aire y que provoca un efecto tampón en la concentración de feromona en aire. En segundo lugar, los resultados obtenidos en los estudios de *L. botrana* indican que el vuelo aún se inhibe eficazmente en los valores más bajos

cuantificados cuando se instalan emisores pasivos. Estas dos conclusiones indican la posibilidad de reducir la feromona emitida para la confusión sexual de plagas presentes en cultivos arbustivos o arbóreos manteniendo su eficacia.

En los viñedos, con con uso histórico de confusión sexual como en los que se han realizado estos estudios, la posibilidad de reducir la cantidad de feromona emitida parece factible principalmente por dos motivos. Por un lado, se obtuvo inhibición del vuelo de machos en los campos tratados con emisores pasivos con concentraciones de feromona muy diferentes (4.84 ng/m³ hasta un máximo de 42.20 ng/m³). Por otro lado, se observó que utilizando emisores cuya emisión era menor —los emisores Lobetec emitieron una media de unos 300 mg/ha/día frente a los 600 mg/ha/día emitidos por los emisores Isonet[®] L— se mantuvo el mismo nivel de control de la plaga.

El impacto del tipo de emisor en la concentración de feromona en aire

Como se ha comentado en distintos capítulos, existen diversos tipos de emisores disponibles para aplicar la confusión sexual de *L. botrana*. Entre ellos, los más utilizados en Europa son los emisores pasivos de aplicación manual y, más recientemente, los dispositivos de pulverización automáticos de tipo aerosol.

Los resultados obtenidos mediante las captaciones muestran que en el campo en el que se instalaron emisores pasivos hubo variaciones en la concentración de feromona de *L. botrana* en aire a lo largo del tiempo, posiblemente debido a la propia cinética de los emisores y a las condiciones climáticas, junto al efecto de la cubierta vegetal. La velocidad de emisión de los emisores pasivos Isonet[®] L se ha demostrado dependiente de las condiciones climáticas, especialmente de la temperatura y la velocidad del viento, en el periodo considerado de manera que la emisión de feromona aumenta ligera pero significativamente cuando el valor de estos factores climáticos aumenta. Este efecto de dependencia de algunos emisores pasivos con la temperatura también se ha observado en el caso los emisores de feromona de *C. suppressalis* en el que una instalación

posterior de los emisores en campo (tras el primer pico de vuelo) provocó un aumento de su emisión media, reduciendo su tiempo de vida útil. Además, el nivel de emisión de este tipo de emisores es dependiente de su carga, siendo menor la velocidad al aproximarse al final de su vida útil, y contribuyendo a una menor concentración de feromona en aire.

En cambio, en el caso de los dispositivos de emisión automática, dado que la velocidad de emisión de feromona es un parámetro previamente programado y constante, se consiguió mantener una mayor concentración de feromona en aire hasta el final de la campaña de cultivo. Si bien, es cierto que una de las principales ventajas de los dispositivos de pulverización automática, frente a los emisores pasivos, es la posibilidad de emitir la feromona en el momento en el que se produce el vuelo, en el caso de *L. botrana* se calculó la cantidad de feromona total aplicada y se constató que ambos sistemas de emisión utilizaban una cantidad similar de feromona, unos 600 mg/ha/día. Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores obtenidos de feromona en aire a lo largo del ciclo de cultivo y los valores a partir de los cuales se consiguió inhibir el vuelo, parece bastante posible una reducción de la feromona utilizada en los campos tratados con dispositivos automáticos sin comprometer la eficacia de control. El planteamiento de estos estudios se podría hacer desde dos puntos de vista diferentes: un retraso en su colocación tras el primer pico de vuelo, ya que se sabe que este no se pudo controlar correctamente por la falta de la cubierta vegetal en esa época y, por otro lado, modificar la emisión de feromona, ya sea mediante la reducción del tiempo de funcionamiento o la reducción de la cantidad de feromona utilizada.

En el caso de la reducción de la cantidad de feromona utilizada, un punto de partida sería el de reducir el tiempo de funcionamiento ya que se conoce que el vuelo de *L. botrana* ocurre al anochecer (Lucchi et al., 2018c). McGhee y sus colaboradores (2016) demostraron la posibilidad de reducir parámetros como la cantidad de feromona emitida en cada disparo, el número de disparos realizados y el tiempo total de funcionamiento sin comprometer la eficacia de la técnica contra *Cydia pomonella*.

El retraso en la colocación de los emisores, que implica no afectar al primer vuelo anual de machos, se ha visto como una forma eficiente de ahorrar feromona en otras plagas como *A. aurantii* en cítricos debido a las particularidades de los coccoideos (Vacas et al., 2015). Sin embargo, en el caso de lepidópteros, este retraso parece no ser la mejor opción puesto que el primer vuelo tiene un impacto considerable en el desarrollo de las siguientes generaciones. Los experimentos de Lykouressis et al. (2005) demostraron que la aplicación temprana del tratamiento de confusión fue efectiva para controlar el daño causado por *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), previniendo que la población se multiplique conforme avanza la temporada. Lo mismo concluyeron Kehat et al. (1995), ya que cuando la aplicación del tratamiento con feromona fue tardía necesitaron realizar aplicaciones insecticidas para complementar la eficacia contra *C. pomonella*. Los resultados obtenidos en el para *C. suppressalis* también apoyan esta hipótesis, ya que pese a que actualmente la emisión de feromona no abarca todo el ciclo de cultivo, cuando los emisores se instalaron antes del primer vuelo de machos, el efecto de control de la plaga fue mayor, probablemente debido a que se afectó a la salida de las poblaciones invernantes.

Los mecanismos de confusión sexual no actúan de manera aislada

El estudio de la cuantificación de feromona en aire se ha realizado para dos especies de lepidópteros, orden de insectos para los que se conoce que pueden llegar a ser confundidos de manera no competitiva —en el caso de los machos puede producirse la habituación o la adaptación del sistema nervioso periférico—. Existen pocos ejemplos pertenecientes a otros órdenes de insectos para los que se hayan descrito o sugerido este tipo de fenómenos. Por ejemplo, en el caso de los hemípteros, en los que se está introduciendo el uso de la confusión sexual, la habituación como mecanismo de confusión ha sido descartada en algunos trabajos. Por ejemplo, los machos de *Pseudococcus calceolariae* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae), previamente sometidos a concentraciones altas de su feromona,

mostraron el mismo comportamiento hacia una fuente de feromona que los machos control (Suckling et al., 2018). Ya fuera del ámbito de la confusión sexual, se pueden mencionar algunos casos muy concretos de áfidos en los que se ha observado desensibilización tras ser expuestos a su feromona de alarma (de Vos et al., 2010).

Para los lepidópteros estudiados en el presente trabajo, *L. botrana* y *C. suppressalis*, se ha demostrado que la cantidad de feromona en aire que se alcanza con el uso de sus respectivos emisores de confusión sexual se sitúa en el mismo orden de magnitud. De acuerdo con los valores de concentración obtenidos, los ensayos biológicos aquí presentados con *L. botrana* y los resultados de experiencias anteriores (Suckling et al., 2018; Stelinski et al., 2005a; Schmitz et al., 1997a), se confirma que para desencadenar los mecanismos no competitivos de confusión en lepidópteros se requerirían concentraciones de feromona en aire mucho mayores a las que realmente se alcanzan en campo (para *L. botrana*, mayores de 7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Por lo tanto, los mecanismos competitivos serían los que predominarían en condiciones de campo y las concentraciones necesarias para actuar de forma no competitiva solo se podrían alcanzar en puntos muy cercanos a los emisores.

En los diferentes experimentos realizados a lo largo del presente trabajo se han utilizado diferentes tipos de emisores a diferentes densidades de colocación: dispositivos automáticos de pulverización —utilizados contra *L. botrana* a una densidad de 4 emisores por hectárea—, emisores pasivos de colocación manual —Isonet[®] L y Lobetec para el control de *L. botrana* con una densidad de colocación de 500 y 400 emisores/ha, respectivamente— y emisores pasivos biodegradables colocados a bajas densidades —utilizados contra *C. suppressalis* a una densidad de 31 emisores/ha—. Mientras que para la gran mayoría de especies en las que se usa, la confusión sexual se ha conseguido con el uso de emisores pasivos de colocación manual, probablemente desencadenando mecanismos de confusión competitivos, el éxito de los emisores colocados en densidades mucho menores parece estar relacionado con el desencadenamiento de mecanismos de confusión no competitivos (Miller and Gut, 2015). De hecho, Reinke y sus colaboradores

(2014) demostraron que emisores utilizados contra *Grapholita molesta* emitían una cantidad suficiente de su feromona como para desencadenar la desensibilización de los machos. La cantidad de feromona total aplicada por día y hectárea en el caso de *L. botrana* es un orden de magnitud superior a la que se aplica en *C. suppressalis* (unos 600 vs. una media de 73.90 mg/ha/día). Cuando nos fijamos en las medidas de concentración en aire realizadas en este trabajo, estas diferencias se siguen observando: 20-40 ng/m³ en *L. botrana* frente a un máximo de 2 ng/m³ en *C. suppressalis*. Sin embargo, en ambos casos se produce un efecto de inhibición de las capturas y una reducción significativa del daño, lo que podría significar que los machos *C. suppressalis* son más propensos a la desensibilización. Esta mayor sensibilidad explicaría el éxito de la confusión sexual de *C. suppressalis* con esa menor cantidad de emisores y una menor concentración, aunque harían falta estudios complementarios que demostraran esta hipótesis.

En el caso de los dispositivos automáticos de pulverización, Welter et al. (2005) argumentaron que machos de *C. pomonella* en un campo tratado con este tipo de emisores se producía la desensibilización de los machos a lo largo de la pluma que generan, tratando de explicar la ausencia de capturas alrededor del emisor. Por otro lado, tras realizar ensayos de suelta-recaptura con polillas esterilizadas, McGhee (2014) observó que la captura en las proximidades de este tipo de dispositivos seguía un patrón direccional ascendente hacia el emisor, de manera que el número de capturas aumentaba conforme se reducía la distancia con el emisor, aunque el máximo de capturas se alcanzaba a barlovento del mismo. Alopatría inducida fue el nombre por el que se denominó el efecto por el que los machos se distancian espacialmente de las hembras en campos tratados con dispositivos automáticos de pulverización (Miller and Gut, 2015). Los experimentos descritos en el presente trabajo, encaminados a detectar y cuantificar la cantidad de feromona presente en las hojas de vid, apoyarían estas teorías ya que se observó un aumento de la cantidad de feromona presente en las hojas más cercanas al dispositivo de pulverización, con una cantidad de feromona considerablemente superior en las hojas situadas inmediatamente frente al mismo.

Conclusiones

Conclusiones

Metodología de cuantificación de feromona en aire

1) Se ha conseguido desarrollar una metodología que ha permitido cuantificar la concentración de feromona presente en el aire en cultivos en los que se utiliza la confusión sexual. Esta metodología se ha basado en la captación de grandes volúmenes de aire en materiales adsorbentes y su posterior extracción y análisis cromatográfico.

2) Esta metodología ha permitido:

-Conocer las diferentes concentraciones de feromona en aire en campos tratados con distintos tipos de emisores.

-Estudiar la variación estacional de la concentración de feromona en aire en dos tipos de cultivos diferentes (viñedos y arrozales) tratados con tres sistemas de emisión diferentes (para el control de *L. botrana* y *C. suppressalis*) y el efecto de la cubierta vegetal en la cantidad de feromona en aire.

-Estudiar los mecanismos de confusión sexual no competitivos que provocan la incapacidad de los machos de detectar la feromona.

Mecanismos que permiten la confusión sexual

3) Dada la concentración de feromona cuantificada en aire en este estudio y los resultados de los ensayos biológicos de laboratorio, se concluye que los mecanismos competitivos son los que actúan principalmente y permiten que se produzca la confusión sexual en condiciones de campo.

4) La adaptación periférica puede ser el mecanismo desencadenado en los machos ante altas concentraciones de feromona, aunque se ha observado que su recuperación es rápida una vez cesa la exposición.

5) Los mecanismos no competitivos solo podrían darse de forma natural cuando el macho se aproxima al emisor por la elevada concentración de feromona requerida.

El efecto que produce la cubierta vegetal en la cantidad de feromona en aire

6) La masa foliar presente en cultivos arbóreos y arbustivos actúa como reguladora de la concentración de feromona en aire. Se demuestra que el follaje adsorbe parte de la feromona emitida y posteriormente esta feromona se libera al ambiente de nuevo proporcionando un efecto tampón de la concentración y reduciendo el lavado de feromona provocado por las corrientes de aire.

7) El escaso desarrollo de la cubierta vegetal de las viñas al principio de la primavera provoca que la cantidad de feromona en aire en ese período sea inferior a la que hay en verano. En consecuencia, el primer vuelo de *L. botrana* no se controló completamente por los dispositivos automáticos de pulverización.

8) El efecto tampón que provoca la cubierta sobre la cantidad de feromona en aire aumenta la eficacia de los dispositivos automáticos de pulverización ya que consigue mantener una mayor concentración de feromona en aire. Este efecto desaconsejaría la utilización de este tipo de emisores en cultivos con poca masa foliar.

9) En los cultivos con ausencia de copa, como en los arrozales, la cantidad de feromona en aire está mucho más relacionada con la emisión instantánea que proporcionan los emisores de confusión sexual.

Margen de mejora de los dispositivos de emisión estudiados

10) Teniendo en cuenta la concentración de feromona en aire a la que se produjo la inhibición de capturas de machos en los casos estudiados, sería posible reducir la cantidad de feromona aplicada para provocar confusión sexual.

11) Los estudios de emisión muestran que los emisores que se utilizan actualmente en confusión sexual de *C. suppressalis*, tienen una cinética exponencial, con mayor emisión al principio y menor al final de su vida útil. Esto hace que el final del segundo vuelo de la especie no se vea controlado eficazmente.

12) Una colocación temprana de los emisores de confusión sexual (antes del primer vuelo de machos) mejora el nivel de control de *C. suppressalis*, ya que de esta manera interfiere la multiplicación de las poblaciones invernantes.

13) El estudio de la correlación entre las velocidades de emisión de feromona y algunas variables climáticas medidas en campo sugiere que las condiciones climáticas no afectan de igual forma a todos los tipos de emisores pasivos. Existen emisores en el mercado que emiten la feromona de forma sustancialmente constante, apenas dependiente de condiciones climáticas como la temperatura o el viento. Estos emisores resultarían más eficaces en regiones climáticas con mayor amplitud térmica o en condiciones muy ventosas.

Bibliografía

Bibliografía

- Abad, E., Martínez, K., Gustems, L., Gomez, R., Guinart, X., Hernández, I., & Rivera, J. (2007). Ten years measuring PCDDs/PCDFs in ambient air in Catalonia (Spain). *Chemosphere*, 67, 1709-1714.
- Abd el Monsef, A. I. (2004). Biological control of grape berry moths *Eupoecilia ambiguella* Hb. and *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) by using egg parasitoids of the genus *Trichogramma*. Doctoral dissertation. Universität Giessen. Giessen.
- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265–267
- Ahad, J. M., Macdonald, R., Parrot, J., Yang, Z., Zhang, Y., Siddique, T., ... & Shang, D. (2020). Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: A review of sampling techniques, strategies and instrumentation. *Environmental Pollution*, 114988.
- Ahrens, L., Harner, T., & Shoeib, M. (2014). Temporal variations of cyclic and linear volatile methylsiloxanes in the atmosphere using passive samplers and high-volume air samplers. *Environmental science & technology*, 48(16), 9374-9381.
- Akyol, B., & Aslan, M. M. (2010). Investigations on efficiency of mating disruption technique against the European grapevine moth (*Lobesia botrana* Den. Et. Schiff.) (Lepidoptera; Tortricidae) in vineyard, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 730-735.
- Alfaro, C. 2006. Medida de la concentración de semioquímicos en aire ambiente. Aplicación a la feromona de *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) para la optimización del método de confusión sexual. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València, València.

- Alfaro, C., Domínguez, J., Navarro-Llopis, V., & Primo, J. (2008). Evaluation of trimedlure dispensers by a method based on thermal desorption coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Applied Entomology*, 132, 772-777.
- Alfaro, C., Navarro-Llopis, V., & Primo, J. (2009). Optimization of pheromone dispenser density for managing the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker), by mating disruption. *Crop protection*, 28, 567-572.
- Alfaro-Lassala, F., Cuenca, F., & Alfaro, C. (2006). Control del barrenador del arroz (*Chilo suppressalis*) por medio de feromonas de confusión: una lucha histórica en Valencia. *Phytoma España*, 183, 43.
- Altindisli, F. O., Ozsemerci, F., Koclu, T., Akkan, Ü., & Keskin, N. (2016). Isonet LTT, a new alternative material for mating disruption of *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.). Turkey. In *BIO Web of Conferences*, 7, 01029. EDP Sciences.
- Altindisli, F. O., and Ozsemerci, F. (2013). Efficacy evaluation of RAK 2 PRO dispensers against *Lobesia botrana* on Sultani Cekirdeksiz grapes in Turkey. *IOBC wprs Bulletin*, 91, 219-225.
- Anfora, G., Tasin, M., Bäckman, A. C., de Cristofaro, A., Witzgall, P., & Ioriatti, C. (2005). Attractiveness of year-old polyethylene Isonet sex pheromone dispensers for *Lobesia botrana*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 117, 201-207
- Arn, H., & Louis, F. (1997). Mating disruption in European vineyards. *Insect pheromone research* (pp. 377-382). Springer, Boston, MA.
- Arn, H., Rauscher, S., Guerin, P., & Buser, H. R. (1988). Sex pheromone blends of three tortricid pests in European vineyards. *Agriculture, ecosystems & environment*, 21, 111-117.

- Baker, T. C., & Haynes, K. F. (1989). Field and laboratory electroantennographic measurements of pheromone plume structure correlated with oriental fruit moth behaviour. *Physiological entomology*, 14, 1-12.
- Bandong J.P. Litsinger J.A. (2005). Rice crop stage susceptibility to the rice yellow stem borer *Scirpophaga incertulas* (Walker). *International Journal of Pest Management*, 51, 37-43.
- Barbaro, L., Rusch, A., Muiruri, E. W., Gravellier, B., Thiery, D., & Castagneyrol, B. (2017). Avian pest control in vineyards is driven by interactions between bird functional diversity and landscape heterogeneity. *Journal of applied ecology*, 54, 500-508.
- Barbosa-Cornelio, R.; Cantor, F.; Coy-Barrera, E.; Rodríguez, D. (2019). Tools in the investigation of volatile semiochemicals on insects: from sampling to statistical analysis. *Insects*, 10, 241.
- Bartell R.J. & Lawrence, L. A. (1973). Reduction in responsiveness of males of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera) to sex pheromone following previous brief pheromonal exposure. *Journal of Insect Physiology*, 19, 845-855.
- Batalla, J.A. (1999a). Breve historia de la lucha contra el barrenador del arroz ("cucat") en los arrozales de la Comunidad Valenciana. *Phytoma España*, 109, 53-59.
- Batalla, J.A. (1999b). Los barrenadores del tallo del arroz. *Phytoma España*, 106, 35-41.
- Beevor, P. S., David, H., & Jones, O. T. (1990). Female sex pheromones of *Chilo* spp (Lepidoptera: Pyralidae) and their development in pest control applications. *International Journal of Tropical Insect Science*, 11, 787-794.
- Beevor, P. S., Hall, D. R., Nesbitt, B. F., Dyck, V. A., Arida, G., Lippold, P. C., & Oloumi-Sadeghi, H. (1977). Field trials of the synthetic sex pheromones of the striped rice borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae), and of related compounds. *Bulletin of Entomological Research*, 67, 439-447.

- Benelli, G., Lucchi, A., Thomson, D., & Ioriatti, C. (2019). Sex Pheromone Aerosol Devices for Mating Disruption: Challenges for a Brighter Future. *Insects*, 10, 308.
- Bidleman, T. F., and Tysklind, M. (2018). Breakthrough during air sampling with polyurethane foam: What do PUF 2/PUF 1 ratios mean?. *Chemosphere*, 192, 267-271.
- Bleszynski, S. (1970). A revision of the world species of *Chilo zinchen* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulletin of the Natural History Museum, Entomology*, 25, 101-195.
- Boselli, M. (2014). Three-year field trials with pheromone aerosols (Checkmate Puffer® LB) for the control of the European grapevine moth. Atti, Giornate Fitopatologiche, Chianciano Terme (Siena), 18-21 marzo 2014, Volume primo, 167-176.
- Bournier, A. (1977). Grape insects. *Annual. Review of Entomology*, 22: 355-376.
- Brown, D. F., & McDonough, L. M. (1986). Insect sex pheromones: formulations to increase the stability of conjugated dienes. *Journal of Economic Entomology*, 79, 922-927.
- Burgess, E. D. (1964). Gypsy moth control. *Science*, 143(3606), 526-526.
- Butenandt, A., R. Beckmann, D. Stamm and E. Hecker. (1959). Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und konstitution. *Z. Naturforsch*, 14, 283-284.
- Buser, H., Rauscher, S., & Arn, H. (1974). Notizen: Sex Pheromone of *Lobesia botrana*: (*E,Z*)-7,9-Dodecadienyl Acetate in the Female Grape Vine Moth. *Zeitschrift für Naturforschung, C*, 29, 781-783.
- Cahiez, G., Guerret, O., Moyeux A., Dufour, S. & Lefevre, N. (2017): Eco-Friendly and Industrially Scalable Synthesis of the Sex Pheromone of *Lobesia botrana*. Important Progress for the Eco-Protection of Vineyard. *Organic Process Research & Development*, 21, 1542-1546.

- Cardé, R. T. (2007). Using pheromones to disrupt mating of moth pests. *Perspectives in ecological theory and integrated pest management*. Cambridge University Press, Cambridge, 122-169.
- Cardé, R.T., Staten, R.T. & Mafra-Neto, A. (1998): Behaviour of pink bollworm males near high-dose, point sources of pheromone in field wind tunnels: insights into mechanisms of mating disruption. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89, 35-46.
- Cardé, R. T., & Minks, A. K. (1995): Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annual review of entomology*, 40, 559-585.
- Cariou, S., & Guillot, J. M. (2006). Double-layer Tedlar bags: a means to limit humidity evolution of air samples and to dry humid air samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384, 468-474.
- Caro, J. H., Bierl, B. A., Freeman, H. P., & Sonnet, P. E. (1978). A method for trapping disparlure from air and its determination by electron-capture gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 461-463.
- Caro, J.H., Glotfelty, D.E. & Freeman, H.P. (1980). (Z)-9-tetradecen-1-OL formate: Distribution and dissipation in the air within a corn crop after emission from a controlled-release formulation. *Journal of Chemical Ecology*, 6, 229–239.
- Carpenter, J. E., Sparks, A. N., & Gueldner, R. C. (1982). Effects of moth population density and pheromone concentration on mating disruption of the corn earworm in large screened cages. *Journal of Economic Entomology*, 75, 333-336.
- Casagrande, E. (1993). The commercial implementation of mating disruption for the control of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*, in rice in Spain. Bulletin OILB SROP (France).

- Cazacu, S., Drosu, S., Dumitrascu, L., Gansca, L., & Oprean, I. (2009). Attract & kill technique against *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) in Romania. *Romanian Journal of Plant Protection*, 2.
- Cecinato, A., Balducci, C., Romagnoli, P., & Perilli, M. (2012). Airborne psychotropic substances in eight Italian big cities: burdens and behaviours. *Environmental pollution*, 171, 140-147.
- Charmillot, P. J., Pasquier, D., Scalco, A., & Dupuis, D. (1995). Lutte par confusion contre les vers de la grappe eudémis et cochylis à Perroy et Allaman: résultats de 1995. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 27, 347-358.
- Chen, F., Han, Y., Hu, Q., & Hou, M. (2011). Diapause induction and photoperiodic clock in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). *Entomological science*, 14, 283-290.
- Chen, R. Z., Klein, M. G., Sheng, C. F., Li, Q. Y., Li, Y., Li, L. B., & Hung, X. (2014). Mating disruption or mass trapping, compared with chemical insecticides, for suppression of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Northeastern China. *Journal of economic entomology*, 107, 1828-1838.
- Chen, R. Z., & Klein, M. G. (2012). Efficacy of insecticides against the Rice Stem-borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae), and use of sex pheromones to time accurately the yearly application. *International Journal of Pest Management*, 58, 354-360.
- Cho, J. R., Lee, J. S., Kim, J. J., Lee, M., Kim, H. S., & Boo, K. S. (2005). Cold hardiness of diapausing rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 8, 161-166.
- Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52, 375-400.
- Cozzi, G., Pascale, M., Perrone, G., Visconti, A., & Logrieco, A. (2006). Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *International journal of food microbiology*, 111, S88-S92.

- Coscollá, R. (1997). La polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana* Den. & Dchiff.). Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, Valencia.
- Demeestere, K., Dewulf, J., De Witte, B., & Van Langenhove, H. (2007). Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices. *Journal of chromatography A*, 1153(1-2), 130-144.
- Dergachev, D. V. (1995). Dibrachys application to control grape leaf roller. *Zashchita Rastenii. Moskva*, 7, 18-19.
- Drotikova, T., Ali, A. M., Halse, A. K., Reinardy, H. C., & Kallenborn, R. (2020). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and oxy-and nitro-PAHs in ambient air of the Arctic town Longyearbyen, Svalbard. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 20(16), 9997-10014.
- Domínguez-Ruiz, J., Sanchis, J., Navarro-Llopis, V., & Primo, J. (2008). A new long-life trimedlure dispenser for Mediterranean fruit fly. *Journal of economic entomology*, 101, 1325-1330.
- Dewulf, J., & Van Langenhove, H. (1997). Analytical techniques for the determination and measurement data of 7 chlorinated C1-and C2-hydrocarbons and 6 monocyclic aromatic hydrocarbons in remote air masses: an overview. *Atmospheric Environment*, 31, 3291-3307.
- De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383-2389.
- D'Errico, G., Faraone, N., Rotundo, G., De Cristofaro, A., & Trimble, R. M. (2013). Sensory Adaptation of Antennae and Sex Pheromone-Mediated Flight Behavior in Male Oriental Fruit Moths (Lepidoptera: Tortricidae) After Prolonged Exposure to Single and Tertiary Blends of Synthetic Sex Pheromone. *Environmental Entomology*, 42, 548-557.
- De Vos, M., Cheng, W. Y., Summers, H. E., Raguso, R. A., & Jander, G. (2010). Alarm pheromone habituation in *Myzus persicae* has fitness consequences

- and causes extensive gene expression changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 14673-14678.
- Epstein, D. L., Stelinski, L. L., Reed, T. P., Miller, J. R., & Gut, L. J. (2006). Higher densities of distributed pheromone sources provide disruption of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) superior to that of lower densities of clumped sources. *Journal of economic entomology*, 99, 1327-1333.
- Espadas, A. L., Blanc, F. F., Palao, J. S., Muñoz, V. G., Cerón, A. H., Martí, S., ... & Navarro, L. A. T. (2009). Evaluación de la eficacia de los emisores de Feromona Puffers LB, para el control por confusión, de polilla del racimo (*Lobesia botrana*) en viñedo de vinificación: Murcia 2008. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, 28, 136-142.
- Eixarch, M. M., & Fornós, D. G. (2006). El barrenador de arroz (*Chilo suppressalis*). *Phytoma España*, 178, 28-33.
- El-Ghany, A., & Nesreen, M. (2019). Semiochemicals for controlling insect pests. *Journal of Plant Protection Research*, 2019, 1-11.
- EPPO (2020) European and Mediterranean Plant Protection Organization. In EPPO Global Database GC Deskt (available online). <https://gd.eppo.int> Accessed: June 2020.
- Evenden, M. L., Judd, G. J. R., & Borden, J. H. (1999). Mating disruption of two sympatric, orchard-inhabiting tortricids, *Choristoneura rosaceana* and *Pandemis limitata* (Lepidoptera: Tortricidae), with pheromone components of both species' blends. *Journal of Economic Entomology*, 92, 380-390.
- Falck, P., & Karsholt, O. (1998). *Lobesia virulenta* Bae & Komai, 1991 recorded for the first time in Europe, with description of a new subspecies. *Entomologiske meddelelser*, 66, 117-126.
- Femenia, B. 2011. Desenvolupament d'emissors degradables de les feromones de *Lobesia botrana* Denis i Schiffermüller i *Cydia pomonella* Linnaeus (Lepidoptera:Tortricidae) per a la tècnica de confusió sexual. Avaluació de la

- seua eficàcia al camp. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València, València.
- Fermaud, M., and R. Le Menn. (1989). Association of *Botrytis cinerea* with grape berry moth larvae. *Phytopathology*, 79, 651- 656.
- Flint, M. L., Louise, M. y Van den Bosch, R. (1981). S A History of Pest Control, pp. 51-81. Introduction to integrated pest management. Plenum Press, New York.
- Forbes, P. (2019). Atmospheric Chemistry Analysis: A Review. *Analytical Chemistry*, 92(1), 455-472.
- Franin, K., Barić, B., & Kuštera, G. (2016). The role of ecological infrastructure on beneficial arthropods in vineyards. *Spanish journal of agricultural research*, 14, 8.
- Gaston, L. K., Shorey, H. H., & Saario, C. A. (1967). Insect population control by the use of sex pheromones to inhibit orientation between the sexes. *Nature*, 213, 1155-1155.
- Gavara, A., Vacas, S., Navarro, I., Primo, J., & Navarro-Llopis, V. (2020). Airborne pheromone quantification in treated vineyards with different mating disruption dispensers against *Lobesia botrana*. *Insects*, 11, 289.
- Girling, R. D., Higbee, B. S., & Cardé, R. T. (2013). The plume also rises: trajectories of pheromone plumes issuing from point sources in an orchard canopy at night. *Journal of chemical ecology*, 39, 1150-1160.
- Gökçe, A., Stelinski, L. L., Gut, L. J., & Whalon, M. E. (2007). Comparative behavioral and EAG responses of female obliquebanded and redbanded leafroller moths (Lepidoptera: Tortricidae) to their sex pheromone components. *European Journal of Entomology*, 104, 187.
- Gómez Clemente, F. (1940). El barrenador del arroz. *Boletín de patología vegetal y entomología agrícola*, 9, 51-66.

- Gordon, D., Zahavi, T., Anshelevich, L., Harel, M., Ovadia, S., Dunkelblum, E. & Harari, A. R. (2005): Mating Disruption of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae): Effect of Pheromone Formulations and Concentrations. *Journal of Economic Entomology*, 98,135-142
- Guerrero, A. 1988. Feromonas sexuales de insectos, pp. 271-296. In X. Bellés (ed.) Insecticidas biorracionales. CSIC. Madrid.
- Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (1994). Sensory systems and behaviour, pp. 95-121. In P. J. Gullan and P. S. Cranston (ed.). The insects: an outline of entomology. Wiley, New York.
- Gut, L. J. Stelinski, L. L. Thomson, D. R. Miller, J. R (2004). Behaviour-modifying chemicals: prospects and constraints in IPM. En Koul, O., Dhaliwal, G. S., & Cuperus, G. W. Integrated pest management: potential, constraints and challenges. CABI.
- Harper, M. (2000). Sorbent trapping of volatile organic compounds from air. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), 129-151.
- Hart, K. M., Isabelle, L. M., & Pankow, J. F. (1992). High-volume air sampler for particle and gas sampling. 1. Design and gas sampling performance. *Environmental science & technology*, 26, 1048-1052.
- Hebert, V. R., Tomaszewska, E., Brunner, J. F., Jones, V. P., & Doerr, M. (2007). Evaluating the pheromone release rate characteristics of commercial mating disruption devices. *ACS Symposium Series*, 947.
- Hommay, G., Gertz, C., Kienlen, J. C., Pizzol, J., & Chavigny, P. (2002). Comparison between the control efficacy of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and two *Trichogramma cacoeciae* Marchal strains against grapevine moth (*Lobesia botrana* Den. & Schiff.), depending on their release density. *Biocontrol Science and Technology*, 12, 569-581.

- Hou, M., Hao, L., Han, Y., & Liao, X. (2010). Host status of wheat and corn for *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Environmental entomology*, 39, 1929-1935.
- Howse, P.E. 1998. Pheromones and behaviour, pp. 1-134. In P.E. Howse, I. Stevens and O. Jones (eds.) *Insect pheromones and their use in pest management*. Chapman & Hall, London, UK.
- Howse, P.E. Pheromones and behavior P.E.Howse,I.Stevens,O.T.Jones (Eds.),*Insect Pheromones and their Use in Pest Management*,Chapman & Hall,London, UK (1998), pp.1-130
- Hummel, H. E., Langner, S. S., & Eisinger, M. T. (2013). Pheromone dispensers, including organic polymer fibers, described in the crop protection literature: comparison of their innovation potential. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 78, 233.
- Il'ichev, A. L., Stelinski, L. L., Williams, D. G., & Gut, L. J. (2006). Sprayable microencapsulated sex pheromone formulation for mating disruption of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Australian peach and pear orchards. *Journal of economic entomology*, 99, 2048-2054.
- Ioriatti, C., Bagnoli, B., Lucchi, A., & Veronelli, V. (2004). Vine moths control by mating disruption in Italy: results and future prospects. *Redia*, 87, 117-128.
- Ioriatti, C., Anfora, G., Tasin, M., De Cristofaro, A., Witzgall, P. & Lucchi, A. (2011). Chemical Ecology and Management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), *Journal of Economic Entomology*, 104, 1125–1137
- Ioriatti, C., & Lucchi, A. (2016). Semiochemical strategies for tortricid moth control in apple orchards and vineyards in Italy. *Journal of chemical ecology*, 42, 571-583.
- Jiang, M. X., & Cheng, J. A. (2003). Interactions between the striped stem borer *Chilo suppressalis* (Walk.) (Lep., Pyralidae) larvae and rice plants in response

- to nitrogen fertilization. *Anzeiger für Schädlingkunde, Journal of pest science*, 76, 124-128.
- Jimenez, R., Falcó, J. V., Gimeno, C., Luna, F., & Moreno, J. (1992). Lucha biológica contra *Chilo suppressalis* Walker (Lep. Pyralidae). I: Estudio del complejo parasitario del arrozal valenciano. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 18, 201-212.
- Jones, O.T. 1998. Practical applications of pheromones and other semiochemicals, pp. 263-357. In P.E. Howse, I. Stevens and O.T. Jones (eds.) *Insect pheromones and their use in pest management*. Chapman & Hall, London.
- Judd, G.J., Gardiner, M.G., DeLury, N.C. & Karg, G. (2005): Reduced antennal sensitivity, behavioural response, and attraction of male codling moths, *Cydia pomonella*, to their pheromone (*E,E*)-8,10-dodecadien-1-ol following various pre-exposure regimes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114, 65-78.
- Karg, G., Suckling, D. M., & Bradley, S. J. (1994). Absorption and release of pheromone of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) by apple leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 1825-1841.
- Karg, G., & Sauer, A. E. (1995). Spatial distribution of pheromone in vineyards treated for mating disruption of the grape vine moth *Lobesia botrana* measured with electroantennograms. *Journal of chemical ecology*, 21, 1299-1314.
- Karg, G., & Sauer, A. E. (1997). Seasonal variation of pheromone concentration in mating disruption trials against European grape vine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) measured by EAG. *Journal of chemical ecology*, 23, 487-501.
- Karlsón, P., and Butenandt, A. (1959). Pheromones (ectohormones). *Insects. Annual review of entomology*, 4, 39-58.

-
- Karlsøn, P. and M. Luscher. (1959). 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 55-56.
- Kehat, M., Anshelevich, L., Harel, M., & Dunkelblum, E. (1995). Control of the codling moth (*Cydia pomonella*) in apple and pear orchards in Israel by mating disruption. *Phytoparasitica*, 23, 285.
- Khan Z. R. Litsinger J. A. Barrion A. T. Villanueva F.F.D. Fernandez N. J. Taylo L. D. (1991). World bibliography of rice stem borers. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Klaschka, U. (2008). The infochemical effect—a new chapter in ecotoxicology. *Environmental science and pollution research*, 15, 452-462.
- Knight, A. L. (1995). Evaluating pheromone emission rate and blend in disrupting sexual communication of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental entomology*, 24, 1396-1403.
- Kosikowska, M., & Biziuk, M. (2010). Review of the determination of pesticide residues in ambient air. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1064-1072
- Kovanci, O. B. (2017). Comparison of the costs of mating disruption with traditional insecticide applications for control of codling moth in apple orchards in turkey. *Scientific Papers Series B Horticulture*, 61, 455-460.
- Król, S., Zabiegała, B., & Namieśnik, J. (2010). Monitoring VOCs in atmospheric air II. Sample collection and preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1101-1112.
- Kuenen, L.P.S. and Baker, T.C. (1981): Habituation versus sensory adaptation as the cause of reduced attraction following pulsed and constant sex pheromone pre-exposure in *Trichoplusia ni*. *Journal of Insect Physiology*, 27, 721-726.
- Kuhns, E. H., Pelz-Stelinski, K., & Stelinski, L. L. (2012). Reduced mating success of female tortricid moths following intense pheromone auto-exposure varies

- with sophistication of mating system. *Journal of chemical ecology*, 38, 168-175.
- Kumar, A., & Viden, I. (2007). Volatile organic compounds: Sampling methods and their worldwide profile in ambient air. *Environmental monitoring and assessment*, 131(1-3), 301-321.
- Lancashire, P. D., Bleiholder, H., Boom, T. V. D., Langelüddeke, P., Stauss, R., Weber, E., & Witzemberger, A. (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of applied Biology*, 119, 561-601.
- Lance, D. R., Leonard, D. S., Mastro, V. C., & Walters, M. L. (2016). Mating disruption as a suppression tactic in programs targeting regulated lepidopteran pests in US. *Journal of chemical ecology*, 42, 590-605.
- Leonhardt, B. A., Cunningham, R. T., Rice, R. E., Harte, E. M., & Hendrichs, J. (1989). Design, effectiveness, and performance criteria of dispenser formulations of trimedlure, an attractant of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic entomology*, 82, 860-867.
- Li, Y., Jiang, G., Wang, Y., Cai, Z., & Zhang, Q. (2008). Concentrations, profiles and gas-particle partitioning of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the ambient air of Beijing, China. *Atmospheric Environment*, 42, 2037-2047.
- Light, D. M. (2016). Control and monitoring of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in walnut orchards treated with novel high-load, low-density "meso" dispensers of sex pheromone and pear ester. *Environmental entomology*, 45, 700-707.
- Liu, T. S. (1990). A survey on the occurrence of rice stem borers and their damage in Taichung areas. *Bulletin of Taichung District Agricultural Improvement Station*, 29, 39-47.

- Lohmann, R., and Jones, K. C. (1998). Dioxins and furans in air and deposition: a review of levels, behaviour and processes. *Science of the Total Environment*, 219, 53-81.
- López, A., Coscollà, C., & Yusà, V. (2017). Selection of sampling adsorbents and optimisation and validation of a GC-MS/MS method for airborne pesticides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97, 949-964.
- Lorenz, D. H., Eichhorn, K. W., Bleiholder, H., Klose, R., & Meier, U. (1994). Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-Skala. *Wein-Wissenschaft*, 49, 66-70.
- Lucchi, A.; Ladurner, E.; Iodice, A.; Savino, F.; Ricciardi, R.; Cosci, F.; Conte, G.; Benelli, G. (2018a). Eco-friendly pheromone dispensers—a green route to manage the European grapevine moth?. *Environmental Science and Pollution Research*. R., 25, 9426-9442.
- Lucchi, A., Sambado, P., Royo, A. B. J., Bagnoli, B., Conte, G., & Benelli, G. (2018b). Disrupting mating of *Lobesia botrana* using sex pheromone aerosol devices. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 22196-22204.
- Lucchi, A., Sambado, P., Royo, A. B. J., Bagnoli, B., & Benelli, G. (2018c). *Lobesia botrana* males mainly fly at dusk: video camera-assisted pheromone traps and implications for mating disruption. *Journal of Pest Science*, 91, 1327-1334.
- Lucchi A. and Benelli, G. (2018): Towards pesticide-free farming? Sharing needs and knowledge promotes Integrated Pest Management. *Environ Sci Poll Res* 25, 13439–13445.
- Lykouressis, D., Perdikis, D., Samartzis, D., Fantinou, A., & Toutouzias, S. (2005). Management of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) by mating disruption in cotton fields. *Crop protection*, 24, 177-183.

- Mafrá-Neto A. & Baker, T. (1996): Elevation of pheromone response threshold in almond moth males pre-exposed to pheromone spray. *Physiological Entomology*, 21, 217-222.
- MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2020). Registro de productos fitosanitarios. Acceso: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>. Mayo del 2020.
- McDonough, L. M., Brown, D. F., & Aller, W. C. (1989). Insect sex pheromones. Effect of Temperature on Evaporation Rates of Acetates from Rubber Septa. *Journal of chemical ecology*, 15, 779-790.
- McGhee, P.S. 2014. Impact of High Releasing Mating Disruption Formulations on (Male) Codling Moth, *Cydia pomonella* L. Behavior. Ph.D. Thesis, Michigan State University, East Lansing, MI, USA.
- McGhee, P. S., Gut, L. J., & Miller, J. R. (2014). Aerosol emitters disrupt codling moth, *Cydia pomonella*, competitively. *Pest management science*, 70, 1859-1862.
- McGhee, P. S., Miller, J. R., Thomson, D. R., & Gut, L. J. (2016). Optimizing aerosol dispensers for mating disruption of codling moth, *Cydia pomonella* L. *Journal of chemical ecology*, 42, 612-616.
- Miller, J. R., & Gut, L. J. (2015). Mating disruption for the 21st century: matching technology with mechanism. *Environmental entomology*, 44, 427-453.
- Miller, J. R., Gut, L. J., De Lame, F. M., & Stelinski, L. L. (2006). Differentiation of competitive vs. non-competitive mechanisms mediating disruption of moth sexual communication by point sources of sex pheromone (Part I): Theory. *Journal of chemical ecology*, 32, 2089.
- MITECO. (2020). Emisiones. Actividades emisoras. De compuestos orgánicos volátiles. Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico. Acceso: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfe>

- ra-y-calidad-del-aire/emisiones/actemis/compuestos_organicos_volatiles.aspx. Mayo del 2020.
- Mochalski, P., Wzorek, B., Śliwka, I., & Amann, A. (2009). Suitability of different polymer bags for storage of volatile sulphur compounds relevant to breath analysis. *Journal of Chromatography B*, 877, 189-196.
- Munoz-Pallares, J., Corma, A., Primo, J., & Primo-Yufera, E. (2001). Zeolites as pheromone dispensers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 4801-4807.
- Nesbitt, B. F., Beevor, P. S., Hall, D. R., Lester, R., & Dyck, V. A. (1975). Identification of the female sex pheromones of the moth, *Chilo suppressalis*. *Journal of Insect Physiology*, 21, 1883-1886.
- Noldus, L. P. J. J., Potting, R. P. J., & Barendregt, H. E. (1991). Moth sex pheromone adsorption to leaf surface: bridge in time for chemical spies. *Physiological Entomology*, 16, 329-344.
- Ogawa, K. (1997). The key to success in mating disruption. Technology Transfer in Mating Disruption. *IOBC-WPRS Bulletin*, 20, 1-9.
- Ohta, K., Tatsuki, S., Uchiumi, K., Kurihara, M., & Fukami, J. I. (1975). Sex Pheromone of Rice Stem Borer; Purification and Chemical Properties. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39, 2437-2438.
- Ohta, K., Tatsuki, S., Uchiumi, K., Kurihara, M., & Fukami, J. I. (1976). Structures of sex pheromones of rice stem borer. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 1897-1899.
- Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K. P., & Naidu, R. (2013). Illicit drugs and the environment—a review. *Science of the Total Environment*, 463, 1079-1092.
- Palència, J., & Ramoneda, J. (2004). Trampeo masivo del gusano del arroz "*Chilo suppressalis*" con la feromona sexual sintética como atrayente: el ejemplo del Delta del Ebro. *Fruticultura profesional*, 147, 155-157.

- Pandey, S. K., Kim, K. H., & Brown, R. J. (2011). A review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(11), 1716-1739.
- Perkins, J.H. (2002). History, pp. 368-372. In D. Pimentel (ed.) *Encyclopedia of pest management*. CRC Press. New York.
- Peters, A. J., Lane, D. A., Gundel, L. A., Northcott, G. L., & Jones, K. C. (2000). A comparison of high volume and diffusion denuder samplers for measuring semivolatile organic compounds in the atmosphere. *Environmental science & technology*, 34, 5001-5006.
- Plimmer, J. R., Caro, J. H., & Freeman, H. P. (1978). Distribution and dissipation of aerially-applied disparture under a woodland canopy. *Journal of Economic Entomology*, 71, 155-157.
- Pop, L., Arn, H., & Buser, H. R. (1993). Determination of release rates of pheromone dispensers by air sampling with C-18 bonded silica. *Journal of chemical ecology*, 19, 2513-2519.
- Porcel, M., Sjöberg, P., Swiergiel, W., Dinwiddie, R., Rämert, B. and Tasin, M. (2015): Mating disruption of *Spilonota ocellana* and other apple orchard tortricids using a multispecies reservoir dispenser. *Pest Management Science*, 71: 562-570.
- Posada, D., and Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic biology*, 53, 793-808.
- Ramonedá, J. 1988. Biología de *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), plaga del arroz del Delta del Ebre: Estudios de campo i de laboratori. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Reinke, M. D., Siegart, P. Y., McGhee, P. S., Gut, L. J., & Miller, J. R. (2014). Pheromone release rate determines whether sexual communication of

- Oriental fruit moth is disrupted competitively vs. non-competitively. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 150, 1-6.
- Renou, M., & Guerrero, A. (2000). Insect parapheromones in olfaction research and semiochemical-based pest control strategies. *Annual review of entomology*, 45, 605-630.
- Roelofs, W., Kochansky, J., Cardé, R., Arn, H., & Rauscher, S. (1973). Sex attractant of the grape vine moth, *Lobesia botrana*. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 46, 71-73.
- Roehrich, R., & Carles, J. P. (1977). Perturbations dans la reproduction de *Lobesia botrana* Schiff (Lepidoptera, Tortricidae) induites par la presence de la pheromone sexuelle de synthese. Comptes rendus hebdomadaires des seances. *Serie D. Sciences naturelles*, 1977.
- Rumbo, E. R., Suckling, D. M., & Karg, G. (1995). Measurement of airborne pheromone concentrations using electroantennograms: interactions between environmental volatiles and pheromone. *Journal of Insect Physiology*, 41, 465-471.
- Rumbo, E. R., Vickers, R. A. (1997): Prolonged Adaptation as Possible Mating Disruption Mechanism in Oriental Fruit Moth *Cydia* (= *Grapholita*) *molesta*. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 445–457.
- Sanders, C. (1996): Effects of prolonged exposure to different concentrations of synthetic pheromone on mating disruption of spruce budworm moths in a wind tunnel. *The Canadian Entomologist*, 128: 57-66.
- Sauer, A. E., & Karg, G. (1998). Variables affecting pheromone concentration in vineyards treated for mating disruption of grape vine moth *Lobesia botrana*. *Journal of chemical ecology*, 24, 289-302.
- Sauer, A. E., Karg, G., Koch, U. T., De Kramer, J. J., & Milli, R. (1992). A portable EAG system for the measurement of pheromone concentrations in the field. *Chemical Senses*, 17, 543-553.

- Schartel, T. E., Bayles, B. R., Cooper, M. L., Simmons, G. S., Thomas, S. M., Varela, L. G., & Daugherty, M. P. (2019). Reconstructing the European grapevine moth (Lepidoptera: Tortricidae), invasion in California: Insights from a successful eradication. *Annals of the Entomological Society of America*, 112, 107-117.
- Schmitz, V., Roehrich, R. & Stockel, J. (1995a): Etude du mécanisme de la confusion sexuelle pour l'Eudémis de la vigne *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lep., Tortricidae). I. Rôles respectifs de la compétition, du camouflage de la piste odorante et de la modification du signal phéromonal. *Journal of Applied Entomology*, 119: 131-138.
- Schmitz, V., Roehrich, R. & Stockel, J. (1995b): Disruption mechanisms of pheromone communication in the European grape moth *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lep., Tortricidae) II. Influence of the population density and the distance between insects for males to detect the females in atmosphere impregnated by pheromone. *Journal of Applied Entomology*, 119, 303-308.
- Schmitz, V., Charlier, L., Roehrich, R., & Stockel, J. (1997a). Etude du mécanisme de la confusion sexuelle chez l'Eudémis de la vigne, *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lep., Tortricidae) IV–Quel est le rôle de la fixation de la phéromone par le feuillage?. *Journal of Applied Entomology*, 121, 41-46.
- Schmitz, V., Renou, M., Roehrich, Stockel & J., Lecharpentier, P. (1997b) Disruption Mechanisms of Pheromone Communication in the European Grape Moth *Lobesia botrana* Den & Schiff. III. Sensory Adaptation and Habituation. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 83-95.
- Schwalbe, C. P., & Mastro, V. C. (1988). Gypsy moth mating disruption: dosage effects. *Journal of chemical ecology*, 14, 581-588.
- Schwalbe CP, Albright D. (1981). Field evaluation of Hercon and Conrel formulations of disparlure for disrupting mating at varying population densities. Otis Methods Development Center Progress Report, US Department of

- Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Buzzards Bay, MA, pp:135-138
- Sentenac, G., & Rusch, A. (2017). Effect of landscape context on bat communities in vineyards. In *Écologie Chimique: nouvelles contributions à la protection des cultures contre les ravageurs et 11e Conférence Internationale sur les Ravageurs et Auxiliaires en Agriculture*, 24 au 26 octobre 2017, Montpellier, France (pp. 371-381). Association Française de Protection des Plantes (AFPP).
- Shaver, T. N. (1983). Environmental fate of (Z)-11-hexadecenal and (Z)-9-tetradecenal, components of a sex pheromone of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental entomology*, 12, 1802-1804.
- Sentenac, G. (Ed.). (2011). *La faune auxiliaire des vignobles de France*. Ed. France Agricole.
- Serrano, C., López, J., Moreno, J., & Jiménez, R. (1994). Relación entre la constante térmica acumulada y el ciclo biológico de *Chilo suppressalis* Walker (Lep., Pyralidae). *Boletín de sanidad vegetal plagas*, 20, 317-327.
- Shepson, P. B., Kleindienst, T. E., & McElhoe, H. B. (1987). A cryogenic trap/porous polymer sampling technique for the quantitative determination of ambient volatile organic compound concentrations. *Atmospheric Environment*, 21, 579-587.
- Stelinski, L. L., Gut, L. J., Haas, M., McGhee, P., & Epstein, D. (2007). Evaluation of aerosol devices for simultaneous disruption of sex pheromone communication in *Cydia pomonella* and *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Pest Science*, 80, 225-233.
- Stelinski, L. L., McGhee, P., Grieshop, M., Brunner, J., & Gut, L. J. (2008). Efficacy and mode of action of female-equivalent dispensers of pheromone for mating disruption of codling moth. *Agricultural and forest entomology*, 10, 389-397.

- Stelinski, L. L., Gut, L. J. & Miller, J. R. (2005a): Occurrence and Duration of Long-Lasting Peripheral Adaptation Among Males of Three Species of Economically Important Tortricid Moths. *Annals of the Entomological Society of America*, 98: 580–586.
- Stelinski, L. L., Gut, L. J., Epstein, D., & Miller, J. R. (2005b): Attraction of four tortricid moth species to high dosage pheromone rope dispensers: observations implicating false plume following as an important factor in mating disruption. *IOBC WPRS BULLETIN*, 28, 313.
- Stelinski, L., Gut, L., Pierzchala, A. & Miller, J. (2004): Field observations quantifying attraction of four tortricid moths to high-dosage pheromone dispensers in untreated and pheromone-treated orchards. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113, 187-196.
- Stelinski, L.L., Gut, L.J. & Miller, J.R. (2003a): Concentration of air-borne pheromone required for long-lasting peripheral adaptation in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *Physiological Entomology*, 28: 97-107.
- Stelinski, L.L., Miller, J.R. & Gut, L.J. (2003b): Presence of Long-Lasting Peripheral Adaptation in Oblique-Banded Leafroller, *Choristoneura rosaceana* and Absence of Such Adaptation in Redbanded Leafroller, *Argyrotaenia velutinana*. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 405–423.
- Stelinski, L., Miller, J. R., & Gut, L. (2002). Long-lasting adaptation as a possible mechanism for reduced susceptibility to pheromone-based mating disruption. *The 2002 ESA Annual Meeting and Exhibition*.
- Stockel, J., Schmitz, V., Lecharpentier, P., Roehrich, R., Vila, M. T., Neumann, U., Brustis, Jm. & Pronier, V. (1994). La confusion sexuelle chez l'eudémis *Lobesia botrana* (Lepidoptera Tortricidae). *EDP Sciences*, 14, 71-82.
- Stavridis, D. G., & Savopoulou-Soultani, M. (1998). Larval performance on and oviposition preference for known and potential hosts by *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *European Journal of Entomology*, 95, 55-63.

- Steinitz, H., Sadeh, A., Tremmel, M., & Harari, A. R. (2016). Methods to separate *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) males from females for the implementation of sterile insect-inherited sterility technique control tactics. *Florida Entomologist*, 99, 192-199.
- Suckling, D. M., Green, S. R., Gibb, A. R., & Karg, G. (1999). Predicting atmospheric concentration of pheromone in treated apple orchards. *Journal of chemical ecology*, 25, 117-139.
- Suckling, D.M., El-Sayed, A.M. & Walker, J.T.S. (2016): Regulatory Innovation, Mating Disruption and 4-Play™ in New Zealand. *Journal of Chemical Ecology*, 42, 584–589.
- Staten, R. T., Flint, H. M., Weddle, R. C., Quintero, E., Zarate, R. E., Finnell, C. M., Hernandez, M. & Yamamoto, A. (1987). Pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae): large-scale field trials with a high-rate gossypure formulation. *Journal of Economic Entomology*, 80, 1267-1271.
- Suckling, D. M., Daly, J. M., Chen, X., & Karg, G. (2007). Field electroantennogram and trap assessments of aerosol pheromone dispensers for disrupting mating in *Epiphyas postvittana*. *Pest Management Science*, formerly Pesticide Science, 63, 202-209.
- Suckling, D.M., Stringer, L.D., Jiménez-Pérez, A., Walter, G.H., Sullivan, N. & El-Sayed, A.M. (2018): With or without pheromone habituation: possible differences between insect orders?. *Pest Management Science*, 74, 1259-1264.
- Tatsuki, S., Kurihara, M., Usui, K., Ohguchi, Y., Uchiumi, K., Arai, K., ... & Tanaka, F. (1983). Sex pheromone of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae): the third component, Z-9-hexadecenal. *Applied Entomology and Zoology*, 18, 443-446.
- Thiery, D., & Moreau, J. (2005). Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, 143, 548.

- Torres-Vila, L.M. (2000). *Lobesia botrana*. In: CAB International (Ed.). Crop protection compendium, 2nd edn. (CD-ROM). CABInternational. Wallingford, Oxon, UK.
- Torres-Vila, L. M., McMinn, M., Rodríguez-Molina, A., & Rodríguez-Molina, M. C. (2006). Primera cita de *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) en la islas de Cabrera (Islas Baleares). First record of *Lobesia botrana* Den. et Schiff.(Lepidoptera: Tortricidae) from the Cabrera Island (Balearic Islands). *Bolletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*,49, 45-49.
- Torres-Vila, L.M. (1995). Le potentiel reproducteur et ses variables biotiques associées chez le mâle de l'Eudémis de la vigne *Lobesia botrana*. *Entomologia Experimentalis et applicata*, 77, 105-119
- Thiery, D., & Xuéreb, A. (2004). Vers une lutte biologique contre Eudémis (*Lobesia botrana*). *Proceedings Mondiaviti*, 47-52.
- Thiéry, D., Louâpre, P., Muneret, L., Rusch, A., Sentenac, G., Vogelweith, F., Iltis, C. & Moreau, J. (2018). Biological protection against grape berry moths. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38, 15.
- Trimble, R. M. & Marshall, D. B. (2010). Differences in the Relationship Between Sensory Adaptation of Antennae and Concentration of Aerial Pheromone in the Oriental Fruit Moth and Obliquebanded Leafroller (Lepidoptera: Tortricidae): Implications for the Role of Adaptation in Sex Pheromone-Mediated Mating Disruption of These Species. *Environmental Entomology*, 39, 625-632.
- Uchijima, Z. (1988, October). Concentration and diffusion of pheromone in air. Japan Plant Protection Assoc. *Symposium on Sex Pheromones*, Tokyo.
- Vacas, S. 2011. Uso de semioquímicos en el control de plagas. Estudios básicos y de aplicación. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València, València.

- Vacas, S., Alfaro, C., Navarro-Llopis, V., Zarzo, M., & Primo, J. (2009). Study on the optimum pheromone release rate for attraction of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of economic entomology*, 102, 1094-1100.
- Vacas, S., Alfaro, C., Navarro-Llopis, V., & Primo, J. (2010). Mating disruption of California red scale, *Aonidiella aurantii* Maskell (Homoptera: Diaspididae), using biodegradable mesoporous pheromone dispensers. *Pest management science*, 66, 745-751.
- Vacas, S., Alfaro, C., Primo, J., & Navarro-Llopis, V. (2011a). Studies on the development of a mating disruption system to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pest Management Science*, 67, 1473-1480.
- Vacas, S., Alfaro, C., Zarzo, M., Navarro-Llopis, V., & Primo, J. (2011b). Effect of sex pheromone emission on the attraction of *Lobesia botrana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 139, 250-257.
- Vacas, S., Alfaro, C., Primo, J., & Navarro-Llopis, V. (2015). Deployment of mating disruption dispensers before and after first seasonal male flights for the control of *Aonidiella aurantii* in citrus. *Journal of Pest Science*, 88, 321-329.
- Vacas, S., Navarro, I., Primo, J., & Navarro-Llopis, V. (2016). Mating disruption to control the striped rice stem borer: pheromone blend, dispensing technology and number of releasing points. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19, 253-259.
- Van der Pers, J. N. C., & Minks, A. K. (1998). A portable electroantennogram sensor for routine measurements of pheromone concentrations in greenhouses. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 87, 209-215.
- Varela, L. G., Smith, R. J., Cooper, M. L., & Hoenisch, R. W. (2010). European grapevine moth, *Lobesia botrana*. Napa Valley vineyards. *Practical Winery & Vineyard*, 2010, 1-5.

- Vassiliou, V. A. (2009). Control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in vineyards in Cyprus using the mating disruption technique. *Crop Protection*, 28, 145-150.
- Vives de Quadras, J.M. (1988). Control de plagas de insectos. Problemas y alternativas, pp. 3-14. In X. Bellés (ed.) *Insecticidas biorracionales*. CSIC. Madrid.
- Wall, C., Sturgeon, D. M., Greenway, A. R., & Perry, J. N. (1981). Contamination of vegetation with synthetic sex-attractant released from traps for the pea moth, *Cydia nigricana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 30, 111-115.
- Wallingford, A. K., Cha, D. H., & Loeb, G. M. (2018). Evaluating a push-pull strategy for management of *Drosophila suzukii* Matsumura in red raspberry. *Pest Management Science*, 74, 120-125.
- Wang, D. K. W., & Austin, C. C. (2006). Determination of complex mixtures of volatile organic compounds in ambient air: canister methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1099-1120.
- Wang, Y. N., Ke, K. Q., Li, Y. H., Han, L. Z., Liu, Y. M., Hua, H. X., & Peng, Y. F. (2016). Comparison of three transgenic Bt rice lines for insecticidal protein expression and resistance against a target pest, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Science*, 23, 78-87.
- Waters, R. M., & Jacobson, M. (1965). Attractiveness of gyplure masked by impurities. *Journal of Economic Entomology*, 58, 370-371.
- Wehrenfennig, C., Schott, M., Gasch, T., Düring, R. A., Vilcinskis, A., & Kohl, C. D. (2013). On-site airborne pheromone sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 6389-6403.
- Weatherston, I. (1992). Pheromone dispensers and factors affecting their efficacy. *Bulletin OILB-SROP*, 15, 27-30.
- Weinzierl, R. A. (2009). Integrating pesticides with biotic and biological control for arthropod. En E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison, R. E. Cancelado (Ed.),

-
- Integrated pest management: Concepts, tactics, strategies and case studies* (pp. 179-192), Nueva York, USA, Cambridge University Press.
- Welter, S., Pickel, C., Millar, J., Cave, F., Van Steenwyk, R., & Dunley, J. (2005). Pheromone mating disruption offers selective management options for key pests. *California Agriculture*, 59, 16-22.
- Whittaker, R.H. and Feeny, P.P. (1971) Allelochemicals Chemical Interactions between Species. *Science*, 171, 757-770.
- Williamson, E. R., Folwell, R. J., Knight, A., & Howell, J. F. (1996). Economics of employing pheromones for mating disruption of the codling moth, *Carpocapsa pomonella*. *Crop Protection*, 15, 473-477.
- Wilson, H., & Daane, K. M. (2017). Review of ecologically-based pest management in California Vineyards. *Insects*, 8, 108.
- Witzgall, P., Stelinski, L., Gut, L., & Thomson, D. (2008). Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology*, 53, 503-522.
- Witzgall, P., Bengtsson, M., Karg, G., Bäckman, A. C., Streinz, L., Kirsch, P. A., Blum, Z. & Löfqvist, J. (1996). Behavioral observations and measurements of aerial pheromone in a mating disruption trial against pea moth *Cydia nigricana* F. (Lepidoptera, Tortricidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22, 191-206.
- Witzgall, P., Kirsch, P., & Cork, A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of chemical ecology*, 36, 80-100.
- Woolfenden, E. (1997). Monitoring VOCs in air using sorbent tubes followed by thermal desorption-capillary GC analysis: summary of data and practical guidelines. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 47, 20-36.
- Xuéreb, A., & Thiéry, D. (2006). Does natural larval parasitism of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) vary between years, generation, density of the host and vine cultivar?. *Bulletin of Entomological Research*, 96, 105.

- Yusà, V., Coscollà, C., Mellouki, W., Pastor, A., & De La Guardia, M. (2009). Sampling and analysis of pesticides in ambient air. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2972-2983.
- Zaranski, M. T., Patton, G. W., McConnell, L. L., Bidleman, T. F., & Mulik, J. D. (1991). Collection of nonpolar organic compounds from ambient air using polyurethane foam-granular adsorbent sandwich cartridges. *Analytical Chemistry*, 63, 1228-1232.
- Zibae, A., Jalali Sendi, J., Ghadamyari, M., Alinia, F., & Etebari, K. (2009). Diazinon resistance in different selected strains of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) in northern Iran. *Journal of Economic Entomology*, 102, 1189-1196.

Anejo Metodológico

**Desarrollo de una metodología para la cuantificación
de feromona en aire**

ÍNDICE

Parte 1. Puesta a punto de la metodología para la medida de feromona en aire.....	5
1.1 Introducción.....	5
1.2 Material y métodos.....	6
1.2.1 Equipo de toma de muestra de aire.....	6
1.2.2 Reactivos y disolventes.....	
1.2.3 Equipos para el análisis químico de las muestras.....	9
1.2.4 Captaciones experimentales en interior: Elección de los parámetros necesarios iniciales para la captación y cuantificación de feromona en aire.....	10
1.2.4.1 Material adsorbente utilizado.....	10
1.2.4.2 Extracción de las muestras y estudio del tiempo de extracción.....	11
1.2.4.3 Concentración y preparación de la muestra...	11
1.2.4.4 Análisis de las muestras.....	12
1.2.5 Captaciones experimentales en exterior.....	12
1.2.5.1 Diseño experimental.....	12
1.2.5.2 Materiales adsorbentes.....	13
1.2.5.3 Extracción, preparación y análisis de las muestras.....	14
1.2.6 Cuantificación de feromona en aire en campos tratados con emisores de confusión sexual.....	14
1.2.6.1 Toma de muestras.....	14
1.2.6.2 Extracción de las muestras.....	16
1.2.6.3 Preparación de las muestras.....	16
1.2.6.4 Cuantificación de la feromona de las muestras.....	17
1.2.6.5 Cálculo del porcentaje de recuperación de la feromona de <i>Lobesia botrana</i>	19
1.3 Resultados y discusión.....	19
1.3.1 Captaciones en interior.....	19
1.3.2 Captaciones en exterior.....	20

1.3.3 Captaciones en condiciones reales de campo.....	21
Parte 2. Simplificación del protocolo para la captación de feromonas en aire ambiente.....	27
2.1 Introducción.....	27
2.2 Material y métodos.....	27
2.2.1 Captación simplificada de la feromona de <i>Lobesia botrana</i> y estudio comparativo de métodos.....	27
2.2.2 Captación de la feromona de <i>Chilo suppressalis</i>	28
2.2.3 Cálculo del porcentaje de recuperación.....	29
2.2.4 Determinación del límite de cuantificación de la feromona.....	30
2.3 Resultados y discusión.....	31
2.3.1 Simplificación del método de captación.....	31
2.3.2 Captación de la feromona de <i>Chilo suppressalis</i>	32
2.3.3 Determinación del límite de cuantificación de la feromona.....	33
Bibliografía.....	34

Parte 1. Puesta a punto de la metodología para la medida de feromona en aire.

1.1 Introducción

Para la captación y cuantificación de volátiles en aire existen una serie de equipos, parámetros y técnicas que se han de tener en cuenta dependiendo de la naturaleza del compuesto a analizar. Actualmente, existen procedimientos para cuantificar la presencia de compuestos químicos de muy diversa naturaleza en diferentes matrices ambientales; sin embargo, los antecedentes para la medida de concentraciones de feromona en aire son limitados. El objetivo de este estudio es, por lo tanto, el desarrollo de la metodología y la elección del equipamiento necesario para la cuantificación de concentraciones de feromona en aire, enfatizando en las diferentes etapas que componen este tipo de procedimientos:

- Elección del equipo de captación de la muestra de aire.
- Determinación del flujo y el tiempo del muestreo.
- Elección de los materiales adsorbentes para la toma de muestra.
- Extracción de la muestra de los materiales adsorbentes.
- Preparación de la muestra (concentración y filtrado).
- Parámetros para el análisis químico de las muestras.

El primer paso para empezar a fijar los parámetros de captación fue realizar captaciones de muestras de aire en espacios interiores delimitados en el que se situaron emisores de confusión sexual para *Aonidiella aurantii* Maskell. A continuación, se realizaron captaciones en un espacio abierto, en este caso una zona ajardinada de la Universitat Politècnica de València, en la que se pretendían obtener matrices de aire más parecidas a las que se podían encontrar en condiciones de campo de cultivo. Una vez se establecieron los primeros parámetros con los que realizar las captaciones, se procedió a cuantificar la feromona de A.

aurantii en un campo de cultivo de cítricos tratado con confusión sexual mediante emisores pasivos de feromona. Posteriormente, se realizaron captaciones de aire en un viñedo con el objetivo de cuantificar la cantidad de feromona de *Lobesia botrana* Denis and Schiffermuller en campos tratados con confusión sexual mediante dos tipos de emisores.

En el transcurso de los experimentos se establecieron modificaciones con el objetivo de mejorar el método de captación con caudales de aire adecuados y materiales adsorbentes eficaces y así tratar de reducir o mitigar el efecto “breakthrough”, un problema especialmente importante en los muestreos en los que se utilizan captadores de alto volumen, ya que hay mayor riesgo de elución. Este efecto se produce cuando el material adsorbente no es capaz de retener toda la muestra que lo atraviesa produciéndose una fuga del analito de interés.

1.2 Material y métodos

1.2.1 Equipo de toma de muestra de aire

Las muestras de aire que se realizaron durante todo el desarrollo de la metodología fueron tomadas con un captador de alto volumen (CAV-A/Mb, MCV, Barcelona, España) conectado a la red eléctrica y programado para realizar tomas de muestra con un flujo de aire de 15 m³/h.

El equipo cuenta con un portafiltros rectangular (PST-810, MCV, Barcelona, España), equipado con un pre-filtro de microfibra de vidrio (Grado G-F1, MCV, Barcelona, España), previo a un contenedor de bloques de espuma de PVC (CBE-CAV, MCV, Barcelona, España) con un cuerpo cilíndrico de vidrio en su interior en el que se introduce el material adsorbente.

Tanto la elección de un equipo de alto volumen como el flujo programado fueron decididos en base a los resultados obtenidos por Alfaro (2006). En este trabajo se determinó, aunque con poca precisión que la concentración de feromona en un campo de arroz tratado con confusión sexual contra *Chilo suppressalis* Walker estaba en el orden de ng/m³, tras comprobar que los equipos de bajo volumen no

eran suficientes para su cuantificación y que los equipos de GC/MS de cuadrupolo simple no proporcionaban suficiente sensibilidad. Concretamente, el equipo de muestreo utilizado en el presente trabajo es el que se utiliza habitualmente para la medida de analitos en muestras medioambientales. Teniendo en cuenta el nivel de sensibilidad requerido (ng/m^3) y el nivel de detección proporcionado por un equipo de GC-MS/MS de triple cuadrupolo, se calculó que eran necesarios un flujo de $15 \text{ m}^3/\text{h}$ durante al menos 24 h para poder cuantificar la feromona captada.

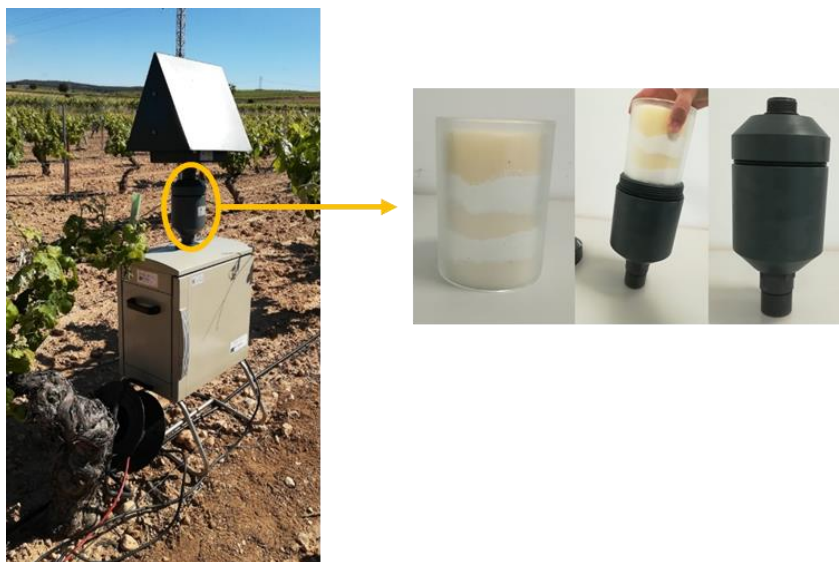


Figura 1 Captador de alto volumen utilizado para la toma de muestras y contenedor con el cilindro de vidrio que aloja al material adsorbente.

1.2.2 Reactivos y disolventes

Todos los disolventes y reactivos químicos utilizados (grado HPLC y síntesis) se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

La feromona de *A. aurantii*, 3(S)-metil-6-(R,S)-isopropenil-9-decen-1-ilo (67%), fue suministrada por Ecología y Protección Agrícola S.L. (Carlet, València, España), así como la de *Lobesia botrana*, acetato de (E,Z/E)-7,9-dodecadien-1-ilo. De esta última, tras la purificación de la muestra suministrada mediante columna de gravedad (gel de sílice con 10% de AgNO_3 ; eluyente: 3% Et_2O /hexano) se obtuvo

un estándar de alta pureza de acetato de (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-ilo (95%, cuantificado por GC-FID) cuyas propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas en la literatura (Cahiez et al., 2017). Por otro lado, el estándar del componente principal de la feromona de *Chilo suppressalis*, (*Z*)-11-hexadecenal (>95%), se adquirió a TCI America (Portland, OR, EEUU).

La elección del patrón interno utilizado para cuantificar las diferentes feromonas se adaptó en cada caso en función de la complejidad de la matriz ambiental. Las sustancias utilizadas fueron 2-(trifluorometil)benzofenona (2-TBP), octafluoronaftaleno (OFN), acetato de 1H-perfluoro-1-tetradecanol (1-PT) y 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoato de heptilo (TFN).

Las sustancias 2-TBP y OFN fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), mientras que 1-PT y TFN, se sintetizaron en el laboratorio utilizando reactivos suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

El acetato 1-PT se sintetizó por tratamiento con anhídrido acético (0.98 ml, 1.5 mmol) del 1H,1H-perfluoro-1-tetradecanol (96%) (500 mg, 0.71 mmol) en diclorometano anhidro como disolvente (10 mL), utilizando de trietilamina (0.17 mL, 1.7 mmol) como base. Tras 24 horas de reacción a temperatura ambiente, se añadieron 15 ml de diclorometano y la mezcla de reacción se lavó sucesivamente con disoluciones de HCl (1M, 15 mL), NaHCO₃ (sat., 15 mL), y salmuera (15 mL). La disolución resultante se secó y el compuesto se purificó por cromatografía de gravedad (gel de sílice, eluyente: 1% Et₂O/Hexano) obteniéndose el acetato de 1H, 1H-perfluoro-1-tetradecanol (260 mg, 35%) como un aceite incoloro.

El 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoato de heptilo (TFN), se sintetizó según se describe a continuación: sobre una disolución de ácido 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoico (500 mg, 1.3 mmol) en diclorometano (DCM; 30 mL), se añadió cloruro de oxalilo (0.13 mL; 1.5 mmol). Tras 60 minutos de agitación, el disolvente se evaporó a vacío y el residuo se re-disolvió en diclorometano anhidro (15 mL). Sobre esta disolución se añadieron a temperatura ambiente 1-heptanol (0.21 mL, 1.5 mmol) y trietil amina (0.31 mL, 3

mmol), y la disolución resultante se refluó durante 24 h. Pasado este tiempo la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 15 ml de diclorometano, y la mezcla de reacción se lavó sucesivamente con disoluciones de HCl (1M, 20 ml), NaHCO₃ (sat., 20 mL), y salmuera (15 mL). La disolución resultante se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: 1% Et₂O/Hexano) obteniéndose el 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoato de heptilo (281 mg, 45%) como un aceite incoloro. MS (70 eV, m/z): 393 (10%), 375 (40%), 373 (5%), 132 (10%), 98 (30%), 83 (15%), 70 (100%), 69 (70%), 57 (90%) and 56 (90%).

1.2.3 Equipos para el análisis químico de las muestras

Las muestras resultantes de las captaciones se analizaron mediante un cromatógrafo de gases (GC) (Trace 1300 GC; Thermo ScientificTM), acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS/MS) (TSQ 8000 Evo, Thermo ScientificTM). El cromatógrafo fue equipado con una columna capilar de sílice fundida ZB-5MS (30 m × 0.25mm × 0.25 μm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). El gas portador fue helio a un caudal de 1.5 mL/min.



Figura 2 Equipo utilizado para el análisis y la cuantificación de las muestras de aire.

1.2.4 Captaciones experimentales en interior: Elección de los parámetros necesarios iniciales para la captación y cuantificación de feromona en aire

1.2.4.1 Material adsorbente utilizado

Los materiales utilizados para configurar los cartuchos adsorbentes que se iban a introducir en el contenedor del captador fueron resina XAD-2 (resina de un copolímero hidrofóbico de estireno-divinilbenceno; Sigma-Aldrich, Madrid, España) y cilindros de espuma de poliuretano (PUF) con una densidad de 20 g/L (MCV, Barcelona, España) y dimensiones adecuadas para el equipo de muestreo, 10 cm de alto x 10 cm de diámetro.

Ambos son dos materiales utilizados para el análisis de muestras medioambientales a muy baja concentración (López et al., 2017; Abad et al., 2007; Nerin et al., 1995).

Para el estudio preliminar del efecto del *breakthrough* y la elección de la configuración del cartucho adsorbente se realizaron cuatro captaciones en interior. Las pruebas se realizaron en una habitación cerrada en la que se colocaron 6 emisores de confusión sexual de *Aonidiella aurantii* (110 mg de la mezcla (3S,6R) y (3S,6S) del acetato de 3-metil-6-isopropenil-9-decen-1-ilo (Scalebur®) proporcionados por Ecología y Protección Agrícola (Carlet, València). Las captaciones se realizaron, inicialmente, durante 24 h a un flujo de 15 m³/h. La distancia entre los emisores y el captador era de aproximadamente 3 metros.

En las dos primeras captaciones realizadas se dividió el cilindro de espuma de poliuretano en dos partes y se introdujeron 25 gramos de resina en el medio (Figura 3; configuración ERE). En la tercera y cuarta captaciones el cartucho consistió en capas alternas de los dos materiales siguiendo la siguiente secuencia: 1/3 de la espuma, 25g de resina, 1/3 de espuma, 25g de resina y 1/3 de espuma (Figura 3, configuración ERE 25:25).

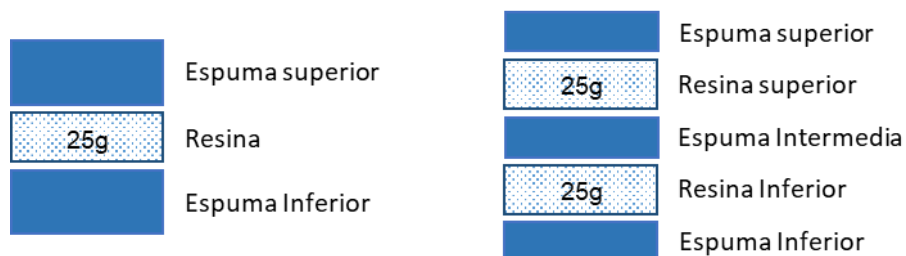


Figura 3 Esquema de la configuración de cada uno de los cartuchos adsorbentes para las captaciones realizadas en interior: ERE (izquierda) y ERERE 25:25 (derecha).

Los componentes orgánicos adsorbidos en las diferentes partes de los cartuchos fueron extraídos por separado con el objetivo de conocer cualitativamente si existía un efecto de lavado de la muestra, o *breakthrough*, indicado por la detección de feromona en la porción inferior del sándwich adsorbente.

1.2.4.2 Extracción de las muestras y estudio del tiempo de extracción

Para extraer la feromona retenida en las distintas partes del cartucho adsorbente de la captación se emplearon equipos de tipo Soxhlet de 125 mL, utilizando como disolvente 250 mL de hexano.

Las diferentes partes de los cartuchos se extrajeron durante 5 horas (aproximadamente 12 ciclos de Soxhlet), tras comprobar por reextracción que con duraciones menores no se completaba el proceso y quedaba analito en los materiales adsorbentes.

1.2.4.3 Concentración y preparación de la muestra

Una vez terminados los ciclos de los Soxhlets, las muestras se concentraron hasta 5 mL utilizando un evaporador rotatorio equipado con un baño a 30°C. Finalmente, las muestras de 5 mL se concentraron hasta 0,5 mL bajo una corriente suave de nitrógeno.

Las muestras se eluyeron por gravedad, a través de una pipeta Pasteur de 0,5 x 6 cm rellena con 0,4 g de silica gel, pasando 10 mL de la mezcla de eluyentes

8:2 (hexano: éter, v/v) de forma que quedasen retenidos los componentes más polares de la mezcla.

1.2.4.4 Análisis de las muestras

Las muestras se analizaron mediante GC-MS/MS, inyectando 1 μL en el equipo de cromatografía descrito anteriormente. La detección de la feromona se realizó en modo de escaneo total de iones (*Full Scan*), desde 40 a 500 uma, ya que estas muestras contenían una concentración suficiente de feromona para ser analizadas mediante este modo de análisis.

1.2.5 Captaciones experimentales en exterior.

1.2.5.1 *Diseño experimental*

Con el objetivo de validar si los parámetros establecidos mediante las captaciones de interior eran compatibles con una matriz más parecida a la existente en campos de cultivo, se realizaron tres captaciones en condiciones externas. Estas captaciones se llevaron a cabo en una zona ajardinada de la Universitat Politècnica de València (UTMs 39.478939, -0.339313), programando un flujo de 15 m^3/h durante 48 horas. Las dos primeras captaciones se realizaron situando el captador en el centro de 8 emisores comerciales Scalebur®, a 1 y 2 m de distancia, respectivamente (Figura 4). La tercera captación se realizó colocando las varetas con los emisores imitando el marco de plantación de una parcela comercial de cítricos (4 x 6 m), con el captador situado en el centro de la distribución.



Figura 4 Captador de volátiles en las pruebas de exterior.

1.2.5.2 Materiales adsorbentes

Las dos configuraciones utilizadas consistieron en sándwiches compuestos por la resina y los PUFs de manera alterna siguiendo las siguientes secuencias:

-Sándwich realizado siguiendo la configuración ERERE 25:25: 1/3 de la espuma, 25g de resina, 1/3 de espuma, 25g de resina y 1/3 de espuma (Figura 3).

-Sándwich realizado siguiendo la siguiente secuencia: 1/3 de la espuma, 50g de resina, 1/3 de espuma, 25g de resina y 1/3 de espuma (Figura 5).

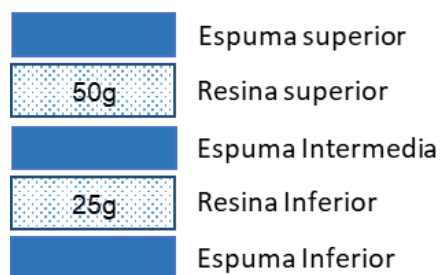


Figura 5 Esquema del sándwich adsorbente con configuración ERERE 50:25.

La primera configuración del sándwich se utilizó para las dos muestras tomadas con los emisores a 1 y 2 m de distancia, mientras que la segunda configuración se utilizó para la captación imitando el marco de plantación.

1.2.5.3 Extracción, preparación y análisis de las muestras

La preparación de las muestras y el análisis químico de las mismas se hizo de la misma manera que en las captaciones experimentales realizadas en interior (Apartado 1.2.4.3).

1.2.6 Cuantificación de feromona en aire en campos tratados con emisores de confusión sexual

1.2.6.1 Toma de muestras

Las captaciones en condiciones reales de campo se realizaron durante dos años consecutivos. En el año 2017 se realizó la cuantificación de feromona en aire de *A. aurantii* y en el año 2018 se aplicó a la cuantificación de feromona en aire de *L. botrana*. Todas las captaciones se realizaron mediante el captador de alto volumen descrito anteriormente, programado a un caudal de 15 m³/h durante 48 h.

Año 2017: Muestras de aire en una parcela tratada con confusión sexual contra *A. aurantii*

Para la cuantificación de feromona de *A. aurantii* se realizaron un total de 4 captaciones. Las muestras se tomaron en el centro de una parcela de 5 ha de cítricos situada en la partida de Benadresa, Castelló de la Plana (Castellón, España; UTM's 39.998283, -0.133612), donde el método de control aplicado era la confusión sexual contra *A. aurantii*. El tratamiento consistió en la instalación de 500 emisores/ha con una carga inicial de 110 mg/emisor de la mezcla (3S,6R) y (3S,6S) del acetato de 3-metil-6-isopropenil-9-decen-1-ilo (Scalebur; Ecología y Protección Agrícola, SL, Carlet, València).

Como material adsorbente introducido en el cartucho del captador se eligió, tal y como se describe en el apartado 1.2.6.2 de Captaciones experimentales en exterior, un sándwich con la configuración ERERE 50:25 (Figura 5).

Año 2018: Muestras de aire en una parcela tratada con confusión sexual contra *L. botrana*

Las captaciones realizadas para la cuantificación de feromona de *L. botrana* se realizaron en el centro de dos parcelas diferentes. En la parcela 1, localizada en el municipio de Venta del Moro (València, España; UTM 39.482608, -1.318822), el tratamiento de confusión sexual se aplicó mediante la instalación de emisores pasivos (Isonet® L, Shin-Etsu Chemical Co., Tokio, Japón) a una densidad de 500 emisores por hectárea y con una carga inicial de unos 200 mg/emisor. En la parcela 2, localizada en el término municipal de Moixent (València, España, UTM 38.808779, -0.815917), la confusión sexual se aplicó mediante la instalación de dispositivos automáticos de pulverización (Checkmate®Puffer® Lb, Suterra LLC, Bend, OR, EEUU) a una densidad de 4 emisores por hectárea y con una carga inicial de unos 35 g de feromona/dispositivo. En total, se tomaron 10 muestras en la parcela 1 y 11 muestras en la parcela 2.

En base a los resultados del año 2017, como cartucho adsorbente se utilizó un sándwich con configuración ERERE 50:75 (Figura 6), con el objetivo de tratar de minimizar el efecto del *breakthrough* observado el año anterior.

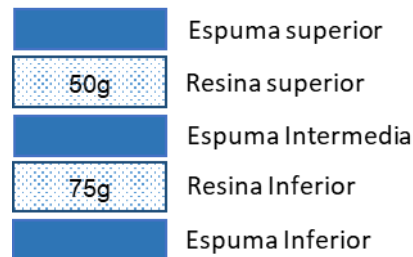


Figura 6 Esquema del cartucho utilizado en las captaciones para la cuantificación de feromona de *L. botrana* en un campo tratado con confusión sexual.

En ambos años, las partes obtenidas del sándwich de captación se almacenaron de manera individual en bolsas herméticas, en una cámara frigorífica a 3°C hasta su extracción.

1.2.6.2 Extracción de las muestras

Tanto para las muestras de 2017 como las de 2018, la extracción del material adsorbente se realizó individualmente para cada sección del sándwich utilizando equipos Soxhlet.

(1) En el caso de las resinas, se introdujeron en un Soxhlet de 500 mL. La extracción se llevó a cabo llevando a ebullición 600 ml de hexano.

(2) Las espumas enrolladas se introdujeron en Soxhlets de 150 mL, utilizando 200 mL de hexano.

Analizando individualmente cada sección del sándwich se consiguió evaluar el efecto de *breakthrough* y determinar su magnitud, midiendo la cantidad de feromona en la parte inferior del cartucho.

1.2.6.3 Preparación de las muestras

Los extractos obtenidos se concentraban hasta un volumen aproximado de 5 mL mediante evaporador rotativo equipado con un baño programado a 30 °C y una presión de 10 mmHg. Posteriormente, la muestra se concentraba hasta 1 mL bajo una corriente suave de nitrógeno. Estas muestras se eluyeron a través de una columna de gravedad (0.5 x 15 cm) rellena con 0,5 g de silica gel (40 -60 µm), sostenida en la parte inferior con un pequeño tapón de lana de vidrio. La muestra se eluyó de manera secuencial con 5 mL de hexano y 12 mL de una mezcla Et₂O:Hexano en proporción 10:90 (v/v). Se recogieron dos fracciones de 5 y 12 mL.

Tras detectar interferencias relacionadas con la matriz ambiental en las primeras captaciones de 2018 (más particularmente con variaciones en la concentración de patrón interno intramuestra), el protocolo de filtrado se modificó de manera que la columna anteriormente descrita se eluía de manera secuencial con 5 mL de hexano y 12 mL de una mezcla Et₂O:Hexano en proporción 2:98 (v/v), recogiendo de forma sistemática tres fracciones de 5 mL.

Finalmente, las fracciones obtenidas se concentraban bajo una corriente de nitrógeno hasta los 0,5 mL para su posterior análisis cromatográfico.

1.2.6.4 Cuantificación de la feromona de las muestras

Una vez concentradas las muestras resultantes de las columnas de gravedad, se añadió a cada una de ellas 10 µL de una disolución de patrón interno OFN, en el caso de las captaciones de feromona de *A. aurantii* del año 2017 y de patrón interno TFN para las muestras de feromona de *L. botrana* del año 2018.

La detección y cuantificación de la feromona contenida en los extractos se realizó mediante la inyección de 1 µL de cada extracto en los equipos GC-MS/MS descritos anteriormente. Para la cuantificación se elaboró previamente una recta de calibrado para las dos feromonas, con el patrón interno correspondiente y el siguiente rango de concentraciones de feromona: 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,7 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,1 µg/ml, 50 ng/mL y 10 ng/mL. Cada concentración se relacionó con las áreas correspondiente de los picos cromatográficos mediante una recta de regresión $y = a + bx$, donde y es la concentración de feromona y x la relación de áreas (área feromona/área patrón interno).

Muestras de 2017

Para las muestras procedentes de campos tratados con la feromona de *A. aurantii* la rampa de temperatura del horno del cromatógrafo se programó de la siguiente manera: 60°C durante 1 min, aumentando a continuación a razón de 10°C/min hasta 110 °C, que se mantienen durante 5 min; posteriormente, aumento a razón de 1,5°C/min hasta 160°C y finalmente a 35°C/min hasta 300°C, que se mantienen durante 5 min.

Para el analito y para el patrón interno (los componentes principales de la feromona de *A. aurantii*, ((3S,6R) y (3S,6S) del acetato de 3-metil-6-isopropenil-9-decen-1-ilo y OFN, respectivamente) se seleccionaron el ion precursor y los correspondientes iones producto con el objetivo de optimizar el método MS/MS (Tabla 1). La transición 3 del compuesto feromonal (Tabla 1) se utilizó para el cálculo de las áreas de los picos cromatográficos. El resto de transiciones (1, 2 y 4) se utilizaron para realizar la confirmación de su identificación cuando aparecían varios picos cercanos a su tiempo de retención.

Tabla 1 Valores óptimos de los parámetros MS/MS para cada compuesto analizado en la cuantificación de feromona de *Aonidiella auranti* (AoAu).

	Transición	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	Energía de colisión (eV)
OFN	1	272	222	20
Feromona AoAu (Componentes principales)	1	109	67	10
	2	123	81	10
	3	135	93	10
	4	149	93	10

Muestras de 2018

Para las muestras procedentes de campos tratados con la feromona de *L. botrana* la rampa de temperatura del horno del cromatógrafo se programó de la siguiente manera: 60°C durante 1 min, aumentando a 10°C/min hasta 110°C, mantenidos durante 5 min; posteriormente, 3°C/min hasta 150°C y finalmente a 35°C/min hasta 300°C, que se mantienen durante 5 min.

Para el analito y el patrón interno (el componente principal de la feromona de *L. botrana*, acetato de (*E,Z*)-7,9-dodecadien-1-ilo y TFN, respectivamente) se seleccionaron el ion precursor y los iones producto correspondientes con el objetivo de optimizar el método MS/MS (Tabla 2). La transición 2 del TFM y la transición 3 del compuesto feromonal (Tabla 2) fueron las utilizadas para el cálculo de las áreas de los picos. En el caso de la feromona de *L. botrana*, las otras transiciones (1, 2 y 4) se utilizaban para realizar la confirmación de su identificación cuando aparecían varios picos a un tiempo de retención cercano.

Tabla 2 Valores óptimos de los parámetros MS/MS para cada compuesto analizado en la cuantificación de feromona de *L. botrana* (Lb).

	Transición	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	Energía de colisión(eV)
TFN	1	375	263	10
	2	393	373	5
Feromona Lb (Componentes principales)	1	79	77	10
	2	93	77	10
	3	164	79	15
	4	164	94	5

1.2.6.5 Cálculo del porcentaje de recuperación de la feromona de *Lobesia botrana*

Además, para las captaciones en viñedos realizadas en el año 2018 se evaluó si se producía una pérdida de la cantidad inicial de la feromona durante el manejo de las muestras (extracción, concentración y preparación de la muestra) y si existía un efecto matriz relevante durante el análisis GC-MS/MS. Para ello, se decidió aditivar una cantidad conocida de feromona (1 mL de una disolución de la feromona de 0,7 µg/ml) sobre tres espumas y sobre tres bloques de 125 g (50+75) de resina, que habían sido sometidas a las mismas condiciones de captación en un campo sin emisores de confusión sexual. Tras realizar el mismo proceso de extracción y preparación que con las muestras reales, la cuantificación de la feromona contenida en el extracto final permitió calcular que el porcentaje de feromona recuperada (respecto a la cantidad conocida de feromona aditivada al principio del proceso) fue del $92.8 \pm 7,19\%$ en el caso de las espumas y del $99 \pm 5.89\%$ en el caso de las resinas.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Captaciones en interior

Tras las captaciones realizadas en interior y mediante el análisis cualitativo (intensidad de la señal cromatográfica) de las muestras obtenidas se comprobó que

la metodología y los equipos empleados permitían la captación y detección de la feromona en aire ambiente y, por lo tanto, se abría la posibilidad de poder cuantificarla utilizando los medios de los que se disponía.

Además, se observó que, realizando captaciones de 24 horas con el flujo programado de 15 m³/h, existía fenómeno de *breakthrough* en las captaciones, ya que se detectaba feromona en las capas inferiores del sándwich adsorbente. La configuración que minimizaba este efecto *breakthrough* fue la del cartucho ERE 25:25, respecto a la configuración ERE (Figura 3).

1.3.2 Captaciones en exterior

Posteriormente, se trasladó la metodología realizando captaciones en condiciones externas simulando un tratamiento de confusión sexual con emisores de la feromona de *A. aurantii*. Mediante su análisis, se observó que la matriz ambiental externa era más compleja que la obtenida en interior, con presencia de productos procedentes de combustibles de automoción y terpenoides, entre otros, que se encuentran a mucha mayor concentración que el analito que se pretende cuantificar. Aún en estas condiciones, el análisis cromatográfico con detector de triple cuadrupolo proporcionó la suficiente sensibilidad y selectividad para detectar la feromona en la muestra de aire, lo que sugería que sería posible detectarla y cuantificarla en las condiciones reales de un campo de cultivo.

Respecto al efecto *breakthrough*, tras realizar la extracción y analizar el contenido en feromona de cada una de las partes del sándwich adsorbente por separado, se observó que aún podía detectarse feromona en la última capa de este. Por ese motivo, se decidió ampliar a 50 g la capa de resina superior (configuración ERE 50:25) y así aumentar la capacidad de retención del cartucho. Mediante esta modificación se consiguió que no se detectara la feromona en la última capa del sándwich, por lo que se consideró que esta configuración del sándwich evitaba el efecto *breakthrough*.

1.3.3 Captaciones en condiciones reales de campo

Captaciones año 2017

Para llevar a cabo la cuantificación de la feromona en las captaciones de campo se requiere un patrón interno cuyo espectro de masas presente fragmentos característicos que permitan su detección inequívoca en las matrices ambientales que se obtengan.

En primer lugar, se seleccionaron las sustancias OFN y 2-TBP, que cumplían los requisitos anteriormente mencionados. Con el objetivo de observarlos en una matriz ambiental y establecer los parámetros para el análisis SRM (*Selected reaction monitoring*, ver Introducción) de las muestras, se añadieron concentraciones conocidas de cada una de las sustancias a extractos resultantes de captaciones experimentales realizadas en exterior. Tras el análisis GC-MS/MS y el estudio de fragmentación (AutoSRM), se observó que la sustancia 2-TBP no proporcionaba iones muy característicos que permitieran distinguirlo con claridad de los componentes de la matriz ambiental. En el caso del OFN, sí que se obtuvieron transiciones específicas y selectivas que permitían su detección sin problemas de interacción con la matriz ambiental. Por lo tanto, la sustancia OFN se utilizó como patrón interno para la cuantificación en aire de la feromona de *A. aurantii*.

En las muestras de aire tomadas en el campo tratado con emisores para la confusión sexual de *A. aurantii* (Tabla 3), se detectaron concentraciones de feromona que oscilaron entre 4 y 14 ng/m³ durante los meses de agosto y septiembre. En ese momento, los emisores llevaban ya 5 meses en el campo y seguían proporcionando buen nivel de inhibición de capturas de machos y por lo tanto de confusión sexual. El análisis por separado de la cantidad de feromona extraída de cada una de las porciones del sándwich adsorbente (ERERE 50:25) indicaba que aún existía cierto efecto *breakthrough*, por la presencia de feromona en la porción de PUF inferior del sándwich (Tabla 3).

Tabla 3 Resultados de las captaciones realizadas en un campo tratado con emisores para la confusión sexual de *Aonidiella aurantii*.

Fecha ¹	ESPUMA ²			RESINA ³		TOTAL (ng/m ³)	Breakthrough ⁴
	Superior	Intermedia	Inferior	Superior	Inferior		
01/08/2017	0,68	0,00	0,81	0,38	2,37	4,24	0,19
20/08/2017	14,29	0,00	0,00	0,28	0,00	14,57	0,00
06/09/2017	0,70	0,17	0,36	6,47	2,25	9,95	0,04
15/09/2017	2,27	1,59	1,10	3,32	1,56	9,84	0,11

¹Fecha de inicio de la captación de la muestra. ²Datos de la cuantificación de la feromona en cada una de las espumas del cartucho (ng/m³). ³Datos de la cuantificación de la feromona en cada una de las partes de resina del cartucho (ng/m³). ⁴Ratio que expresa la cantidad de feromona cuantificada en la espuma inferior respecto a la presente en el total del cartucho.

Como se observa en la Tabla 3, la cantidad de feromona en cada una de las partes del sándwich adsorbente presentó variabilidad entre las sucesivas captaciones; es decir, no se observa una tendencia regular en cuanto a la adsorción de la feromona en las distintas porciones del sándwich. Esta variabilidad podría estar relacionada con el manejo de las resinas y de las espumas PUF ya que, al introducir el material adsorbente en el cuerpo cilíndrico de vidrio, el grado de compactación de la resina pudo ser variable y era un factor difícil de controlar.

En la cuantificación de compuestos volátiles en aire para otro tipo de sustancias, el cálculo de la ratio entre la cantidad de sustancia cuantificada en la porción inferior respecto a la presente en el total del cartucho se realiza de forma habitual para confirmar si el efecto *breakthrough* es significativo (Bidleman y Tysklind, 2018). Diversos autores han calculado la ratio entre la cantidad de analito cuantificado en la porción inferior de un cartucho adsorbente compuesto por dos porciones de PUF, respecto al total de la cuantificación, considerando como ratios mínimas aceptables aquellas cuyos valores no sobrepasaban 0,20 - 0,33 (Peters et al., 2000; Bidleman and Tysklind, 2018; Hart, et al., 1992). En nuestro caso, aunque la configuración del cartucho no es la de dos porciones iguales de PUF, los ratios obtenidos son inferiores a las descritas. La mayor ratio obtenida se observó en la captación realizada el 01/08/2017 alcanzando un 0,19. Por lo tanto, teniendo en

cuenta la cantidad total cuantificada, aquella que pudiera haberse perdido por arrastre a partir de la parte inferior del sándwich no produciría cambios significativos en el total cuantificado. Aun así, se decidió realizar un cambio en el sándwich del cartucho (configuración ERERE 50:75) para la captación de feromona de *Lobesia botrana* del año 2018 con el objetivo de conseguir ausencia de analito en la espuma inferior.

Captaciones año 2018

Además de modificar la configuración del cartucho adsorbente para minimizar el efecto *breakthrough*, en la primera captación del año 2018, aparecieron dificultades para la detección del patrón interno en el análisis GC-MS/MS, no ocurrió lo mismo con la detección y cuantificación de la feromona, puesto que se enriquecieron las muestras con cantidades conocidas de feromona y no se observó este efecto, que fue atribuido a la composición de la matriz ambiental de las muestras. Por este motivo, se realizó un cambio en el proceso de preparación de las muestras y se tuvo que utilizar un patrón interno diferente.

En el caso de la elución, el cambio se realizó en el segundo eluyente de la columna, de manera que pasó de realizarse con una disolución al 10% de Et₂O/Hexano (12 mL) a una disolución al 2% y además se amplió a 3 el número de fracciones recogidas (5, 6 y 6 mL). De esta manera, la feromona se recuperaba en la segunda fracción, reduciendo la presencia de otros compuestos contenidos en la matriz.

Para la selección del nuevo patrón interno se realizaron, primero, pruebas con el compuesto 1-PT, aunque no fue finalmente seleccionado puesto que, a pesar de observarse fragmentaciones potencialmente interesantes, era poco soluble en hexano produciendo varios picos poco definidos. Es por ello que se ensayaron varios ésteres del ácido perfluorado 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluoronoico y los alcoholes 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol y 1-nonanol, concluyendo que el 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluoronoato de heptilo, situado a un tiempo de

retención más cercano a la feromona y con un pico más definido era el candidato más adecuado.

Nota: Los correspondientes ésteres de pentilo, hexilo y nonilo se sintetizaron según el protocolo descrito para el 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluoronoato de heptilo en el apartado 1.2.2 *Reactivos y disolventes*, pero cambiando el heptanol por el alcohol correspondiente en cada caso.

Los resultados obtenidos para el estudio del *breakthrough* de las captaciones realizadas durante el año 2018 pueden observarse en la tabla 4.

Tabla 4 Resultados de las primeras captaciones realizadas en un campo tratado con emisores para la confusión sexual de *Lobesia botrana* en las que se realizó estudio del breakthrough.

Fecha ¹	Parcela ²	ESPUMA ³			RESINA ⁴		TOTAL (ng/m ³)	Breakthrough ⁵
		Superior	Intermedia	Inferior	Superior	Inferior		
03/05/2018	2	0,04	0,02	0	0,15	0,11	0,32	0,00
09/05/2018	2	0,05	0,17	0	0,06	0,03	0,32	0,00
16/05/2018	2	0,04	0,03	0	0,04	0,24	0,34	0,00
22/05/2018	2	0,44	0,15	0,16	0,02	0,01	0,78	0,21
07/06/2018	1	0,34	2,41	0,25	0,24	0,82	4,06	0,06
12/06/2018	1	1,25	1,61	0,58	0,48	0,49	4,41	0,13
15/06/2018	1	2,91	2,55	1,97	1,03	0,08	8,55	0,23
19/06/2018	1	0,66	0,64	0,24	0,7	0,13	2,37	0,10

¹Fecha de inicio de la captación de la muestra. ²Parcela dónde se realizó la toma de muestras, (1) Parcela tratada con emisores pasivos, (2) Parcela tratada con aerosoles automáticos. ³Datos de la cuantificación de la feromona en cada una de las espumas del cartucho (ng/m³). ⁴Datos de la cuantificación de la feromona en cada una de las partes de resina del cartucho (ng/m³). ⁵Ratio que expresa la cantidad de feromona cuantificada en la espuma inferior respecto a la presente en el total del cartucho.

Mediante la extracción por separado de cada una de las partes del sándwich adsorbente, se pudo observar que la mayor parte de la feromona retenida se detectó en porciones de PUF, mostrando mayor capacidad de retención de la feromona. Respecto al efecto *breakthrough*, a pesar de haber modificado la configuración del sándwich, aumentando las capas de resina (ERERE 75:50), los valores obtenidos de la ratio (cantidad de feromona en la espuma inferior / cantidad total) presentaron,

como en el caso de las captaciones del año anterior, resultados variables pero aceptables y en el rango de los obtenidos el año anterior.

Parte 2. Simplificación del protocolo para la captación de feromonas en aire ambiente

2.1 Introducción

Tras observar que el efecto *breakthrough* se mantuvo aun modificando la configuración de los sándwiches adsorbentes y aceptar una pequeña pérdida durante la toma de la muestra, se decidió realizar la comparación entre el uso de la última configuración ERERE 75:50 y el de únicamente un PUF de mayor densidad (de 20 a 30 g/L), reduciendo el tiempo de captación, para la cuantificación de feromona de *L. botrana*. A continuación, esta nueva metodología simplificada se empleó para la captación de feromona de *Chilo suppressalis* a lo largo del ciclo de cultivo en un campo de arroz tratado con confusión sexual.

2.2 Material y métodos

2.2.1 Captación simplificada de la feromona de *Lobesia botrana* y estudio comparativo de métodos

Se realizaron 4 captaciones en el año 2019 en la misma parcela en la que se realizaron las captaciones del año 2018 (parcela 1), localizada en Venta del Moro (València, España; UTM 39.482608, -1.318822). La confusión sexual de *L. botrana* se aplicó mediante la instalación de emisores pasivos (Isonet® L, Shin-Etsu Chemical Co., Tokio, Japón) a una densidad de 500 emisores por hectárea y con una carga inicial de unos 200 mg/emisor. En estas 4 captaciones, se utilizó un PUF de densidad 30 g/L como cartucho de adsorción en el captador de alto volumen (CAV-A/Mb, MCV, Barcelona, España) descrito anteriormente. El captador se conectó a la red eléctrica y se programó para realizar tomas de muestra con un flujo de aire de 15 m³/h durante 24 h. Una vez realizadas las captaciones, los PUF se guardaron en bolsas herméticas en una cámara frigorífica a 3°C hasta su extracción.

Previamente a la extracción, cada PUF se cortó por la mitad con el objetivo de extraer las dos partes por separado y poder realizar el estudio del efecto breakthrough. La extracción, la preparación y el análisis químico de las muestras se realizaron de la misma forma que en las últimas captaciones realizadas para la feromona de *L. botrana* (ver apartado 1.2.6.3 *Preparación de las muestras* de la Parte 1).

Los resultados de las nuevas captaciones obtenidas durante 2019 se compararon estadísticamente con los resultados obtenidos el año anterior, en la misma parcela y durante el mismo periodo de tiempo. La comparación se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA, test LSD, $P < 0,05$). Previamente al análisis de los datos, se confirmó que cumplían con los requerimientos necesarios de homocedasticidad y los residuos del ANOVA presentaban una distribución normal. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v. 16 (Armonk, NY, EEUU).

2.2.2 Captación de la feromona de *Chilo suppressalis*

Se realizaron un total de 3 captaciones con el objetivo de cuantificar la cantidad de feromona en aire a lo largo del ciclo de cultivo. Estas se realizaron en el centro de una parcela de 80 ha de cultivo de arroz en Sueca (València; UTM's 39.286940, -0.338964) donde el método de control aplicado era la confusión sexual contra *C. suppressalis* instalando 31 emisores/ha con una carga inicial de 210 mg/emisor del componente principal de su feromona, (*Z*)-11-hexadecenal.

Como material adsorbente introducido en el cartucho del captador se utilizó un PUF de 30 g/L de densidad. El captador se programó a un caudal de 15 m³/h durante 24 h. Una vez realizadas las captaciones, los PUF se guardaron en bolsas herméticas en una cámara frigorífica a 3°C. Previamente a la extracción, cada PUF se cortó por la mitad con el objetivo de extraer las dos partes por separado y poder realizar el estudio del efecto *breakthrough* como en la prueba anterior. La extracción y preparación de muestra se realizaron de la misma forma que en las captaciones anteriores para la cuantificación de la feromona de *L. botrana* del año 2018.

Para el analito y el patrón interno (el componente principal de la feromona de *C. suppressalis*, (Z)-11-hexadecenal, y TFN, respectivamente) se seleccionaron el ion precursor y los iones producto con el objetivo de optimizar el método MS/MS (Tabla 6). La transición 2 del TFM y la transición 2 del compuesto feromonal fueron las utilizadas para el cálculo de las áreas de los picos. En el caso de la feromona de *C. suppressalis* las otras transiciones (1, 2 y 4) se utilizaban para realizar la confirmación de su identificación cuando aparecían varios picos a un tiempo de retención cercano.

Tabla 5 Valores óptimos de los parámetros MS/MS para cada compuesto analizado en la cuantificación de feromona de *Chilo suppressalis*

	Transición	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	Energía de colisión(eV)
OFN	1	375	263	10
	2	393	373	5
Z-11- hexadecenal	1	81.1	77.1	15
	2	82.1	67.1	10
	3	95.1	67.1	15
	4	95.1	93.1	5

Las inyecciones se realizaron en el mismo equipo de cromatografía mencionado en los apartados anteriores. La rampa de temperatura del horno del cromatógrafo se programó de la siguiente manera: 60°C durante 1 min, aumentando a razón de 10°C/min hasta 110°C, que se mantienen durante 5 min, para volver a aumentar a razón de 3°C/min hasta 150°C y aumentar a razón de 35°C/min hasta 300°C, que se mantienen finalmente durante 5 min.

2.2.3 Cálculo del porcentaje de recuperación

Con el objetivo de conocer si se producía una pérdida de la cantidad inicial de la feromona durante el manejo de las muestras y adicionalmente existía un efecto matriz relevante durante el análisis MS/MS, se decidió aditivar una cantidad conocida de feromona (1 mL de una disolución de la feromona de 0,7 µg/ml) sobre

tres espumas sometidas a las mismas condiciones de captación en un campo sin emisores de confusión sexual. Tras realizar el mismo proceso de extracción y preparación que con las muestras reales, la cuantificación de la feromona contenida en el extracto final permitió calcular que el porcentaje de feromona recuperada (respecto a la cantidad conocida de feromona aditivada al principio del proceso) fue del $95,3 \pm 2,34\%$.

2.2.4 Determinación del límite de cuantificación de la feromona

Para conocer el efecto de la matriz ambiental sobre el límite de cuantificación conseguido mediante la metodología desarrollada y verificar que este límite es inferior a los valores obtenidos se decidieron realizar dos pruebas mediante las cuales establecer dicho límite y comparar su magnitud. Esta prueba se realizó utilizando como modelo el componente principal de la feromona de *C. suppressalis* ((Z)-11-hexadecenal).

Para determinar el nivel mínimo de feromona que podía ser cuantificado con el equipo utilizado se realizaron dos pruebas. La primera se realizó inyectando disoluciones de concentración decreciente de (Z)-11-hexadecenal en hexano (matriz completamente limpia): 110,18 ng/mL, 11,02 ng/mL, 2,20 ng/mL, 1,10 ng/mL y 0,11 ng/mL (equivalentes a 0,16 ng/m³, 15,61 pg/m³, 3,12 pg/m³, 1,56 pg/m³ y 0,16 pg/m³).

La segunda prueba se realizó fortificando matrices ambientales con concentraciones crecientes de feromona. Con el objetivo de disponer de espumas con una matriz ambiental real sin analito, se realizaron captaciones en un campo de arroz al final del ciclo de cultivo, con los emisores de feromona completamente descargados. Cada matriz se fortificó con 0,5 mL de disoluciones con concentraciones crecientes de feromona, partiendo del límite de cuantificación obtenido en la primera prueba (1,1 ng/ml, equivalente a 1,56 pg/m³).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Simplificación del método de captación

En la tabla 7 se muestran los resultados de la cuantificación de feromona de *L. botrana* en las captaciones realizadas con la simplificación del método.

Tabla 6 Resultados de las captaciones realizadas en un campo tratado con emisores para la confusión sexual de *Lobesia botrana* mediante la simplificación del cartucho adsorbente y estudio del breakthrough.

Fecha ¹	Espuma Superior ²	Espuma inferior ²	TOTAL (ng/m ³)	Breakthrough ³
05/05/2019	3,95	0,57	4,52	0,13
08/05/2019	2,17	0,44	2,61	0,17
12/05/2019	1,94	0,48	2,43	0,19
14/05/2019	7,98	0	7,98	0

¹Fecha de inicio de la captación de la muestra. ²Datos de la cuantificación de la feromona en cada una de las partes de la espuma del cartucho (ng/m³). ³Ratio que expresa la cantidad de feromona cuantificada en la espuma inferior respecto a la presente en el total del cartucho.

La comparación de los resultados con los obtenidos en el año 2018 en las captaciones de feromona de *L. botrana* (captaciones del mes de junio en la Tabla 4, 1.3.3 *Captaciones en condiciones reales de campo*), durante el mismo periodo de tiempo, no ofrecieron diferencias significativas ($F = 0,063$; $df = 1,7$; $P = 0,810$; Figura 7). Por lo que se pudo concluir que los resultados procedentes de la simplificación del sándwich de captación y de la reducción del tiempo de toma de muestra a la mitad (de 48 a 24 horas) arrojaron los mismos resultados. También se observó que el nivel de *breakthrough* calculado se mantuvo en niveles similares.

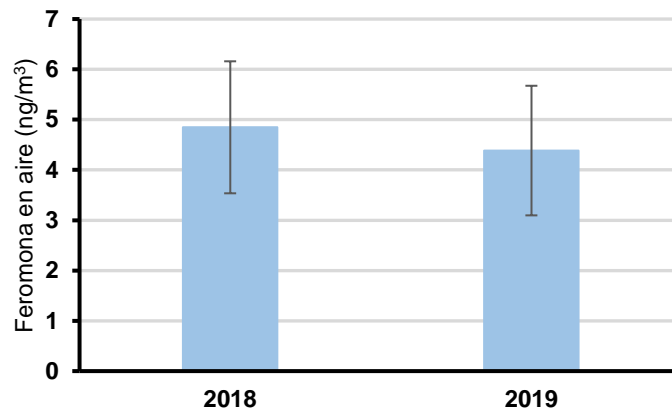


Figura 7 Comparativa de captaciones realizadas en campos de viña tratados con confusión sexual con emisores Isonet® L con las dos metodologías diferentes en el año 2018 y 2019. Los datos obtenidos en el año 2018 son obtenidos mediante el uso del Sándwich de captación ERERE (50:75) y un tiempo de captación de 48 horas el mes de Junio. Los datos obtenidos en el año 2019 son mediante la Espuma PUF de alta densidad durante 24 horas el mes de Mayo.

Por lo tanto, se decidió sustituir el sándwich adsorbente para las captaciones realizadas en los campos de arroz, además de reducir el tiempo de la captación a la mitad (24 horas).

2.3.2 Captación de la feromona de *Chilo suppressalis*

Los resultados obtenidos en las cuantificaciones de la feromona de *C. suppressalis* para el estudio del efecto *breakthrough* en los campos de arroz tratados con confusión sexual se muestran en la tabla 7. En ellos puede observarse que los resultados de las ratios de *breakthrough* se mantienen en niveles similares a las otras captaciones realizadas.

Tabla 7 Resultados de las primeras captaciones realizadas en un campo tratado con emisores para la confusión sexual de *C. suppressalis* y estudio del breakthrough.

Fecha ¹	Espuma Superior ²	Espuma inferior ²	TOTAL (ng/m ³)	Breakthrough ³
03/06/2019	1,29	0,37	1,75	0,21
04/06/2019	1,39	0,27	1,74	0,16
05/06/2019	1,31	0,17	1,56	0,11

¹Fecha de inicio de la captación de la muestra. ²Datos de la cuantificación de la feromona en cada una de las partes de la espuma del cartucho (ng/m³). ³Ratio que expresa la cantidad de feromona cuantificada en la espuma inferior respecto a la presente en el total del cartucho.

2.3.3 Determinación del límite de cuantificación de la feromona

En la primera prueba, tras inyectar concentraciones decrecientes de feromona diluidas en una matriz limpia, el equipo de triple cuadrupolo permitió establecer un límite de cuantificación de 1,56 pg/m³. Posteriormente, en el análisis de las matrices ambientales fortificadas con feromonas, solo fue cuantificable el punto con mayor concentración de feromona (0.5 mL de 110.18 ng/mL, 55,09 ng), subiendo el límite de cuantificación hasta 0.16 ng/m³. Es decir, con una matriz procedente de un campo de cultivo se redujo 100 veces la cantidad de feromona mínima cuantificable. El efecto que puede producir la matriz ambiental sobre una muestra es bien conocido, pero es especialmente considerable en el caso de la cuantificación de este tipo de feromonas sexuales, ya que las estructuras de las moléculas objetivo son muy similares a las que se pueden encontrar en el ambiente.

Bibliografía

- Abad, E., Martínez, K., Gustems, L., Gomez, R., Guinart, X., Hernández, I., & Rivera, J. (2007). Ten years measuring PCDDs/PCDFs in ambient air in Catalonia (Spain). *Chemosphere*, 67(9), 1709-1714.
- Alfaro, C. 2006. Medida de la concentración de semioquímicos en aire ambiente. Aplicación a la feromona de *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) para la optimización del método de confusión sexual. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València, València.
- Bidleman, T. F., and Tysklind, M. (2018). Breakthrough during air sampling with polyurethane foam: What do PUF 2/PUF 1 ratios mean?. *Chemosphere*, 192, 267-271.
- Hart, K. M., Isabelle, L. M., & Pankow, J. F. (1992). High-volume air sampler for particle and gas sampling. 1. Design and gas sampling performance. *Environmental science & technology*, 26(5), 1048-1052.
- López, A., Coscollà, C., & Yusà, V. (2017). Selection of sampling adsorbents and optimisation and validation of a GC-MS/MS method for airborne pesticides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(10), 949-964.
- Nerin, C., Martinez-Galera, M., Martinez, J. L., & Tornés, A. R. (1995). Trapping efficiency of polyurethane foam and Amberlite XAD-2 for various organochlorine compounds. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 352(6), 609-611.
- Peters, A. J., Lane, D. A., Gundel, L. A., Northcott, G. L., & Jones, K. C. (2000). A comparison of high volume and diffusion denuder samplers for measuring semivolatile organic compounds in the atmosphere. *Environmental science & technology*, 34(23), 5001-5006.

"It is not simply true that nature is red in tooth and claw. Not only are cooperation and differentiation toward the reduction of competition important in the function of natural communities, the means of antagonism between animals are far more varied than carnage. Many interactions of attack, defense, and behavioral response involve not physical force but chemical agents."

Whittaker, R.H. and Feeny, P.P. (1971)