



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ecosistemas Agroforestales

Confusión sexual de *Tuta absoluta* en invernadero de
tomate: eficacia del tratamiento y estudio de la
concentración de feromona en aire.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Sanidad y Producción Vegetal

AUTOR/A: Garin Tolon, Irati

Tutor/a: Rodrigo Santamalia, María Eugenia

Cotutor/a externo: VACAS GONZALEZ, SANDRA

Director/a Experimental: NAVARRO LLOPIS, VICENTE

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

RESUMEN

“Confusión sexual de *Tuta absoluta* en invernadero de tomate: eficacia del tratamiento y estudio de la concentración de feromona en aire”.

La polilla del tomate (*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)) es un microlepidóptero que ha colonizado muy rápidamente la totalidad de la costa mediterránea y parte sur de la atlántica tras su detección en 2006. Afecta a las plantas de tomate en cualquier estado de su desarrollo y puede ocasionar pérdidas de hasta el 100% de la producción tanto al aire libre como en invernadero. Esta situación junto con la necesidad de reducir el control químico hace que el control de *T. absoluta* con feromonas mediante confusión sexual sea un método prometedor.

En el presente Trabajo se estudia la eficacia de los emisores de feromona TUTATEC instalados a una densidad de 300 emisores/ha en cultivo protegido de tomate. Para ello se realizan tanto el seguimiento del vuelo de machos como prospecciones de daños. De forma paralela, se estudia la cinética de emisión de los emisores poliméricos mediante cromatografía de gases. También, se estudia la concentración de feromona sexual de *T. absoluta* en aire haciendo uso de un captador de volátiles de alto volumen y el posterior análisis por cromatografía de gases con detector de masas.

Los resultados obtenidos muestran que la confusión sexual ha contribuido en el control de la polilla en lo que respecta al número de frutos dañados, pero no al porcentaje de plantas afectadas. El número de capturas por trampa y día en el invernadero sometido a tratamiento se ha mantenido en todo momento por debajo del control, pero muestra variaciones posiblemente asociadas a la migración de población de parcelas colindantes. Los emisores muestran una velocidad de emisión constante de 1,1mg/día y aun contienen un 46,9% de feromona residual a día 115, hecho que podría ser optimizado. Aunque ha sido posible la cuantificación de la concentración de feromona en aire, una media de 3,2 ng/m³, no ha podido establecerse un valor umbral a partir del cual resulta eficaz el tratamiento.

De esta forma se puede afirmar que es necesario la continua investigación en este ámbito con la finalidad de lograr que los métodos de control de plagas mediante el uso de semioquímicos sean una herramienta óptima y rentable en las explotaciones afectadas.

Palabras clave: polilla del tomate; control biotécnico; feromona; confusión sexual; concentración de feromona en aire.

Autor/a: Garín Tolón, Irati

Tutor/a: Rodrigo Santamalia, María Eugenia

Cotutor/a externo: Vacas González, Sandra

Director/a experimental: Navarro Llopis, Vicente

Valencia, julio de 2022

ABSTRACT

“Mating disruption of *Tuta absoluta* in tomato greenhouse: efficacy of the treatment and study of the airborne pheromone concentration”.

The tomato leaf miner (*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is a Microlepidoptera that has rapidly colonized the full length of the Mediterranean and South Atlantic coast since its detection in 2006. This miner can affect tomato plants in any development stage, causing harvest losses of up to 100% both outdoors and in greenhouse. This situation along with the need to reduce chemical control makes controlling *T. absoluta* with pheromones by mating disruption a promising avenue.

The present project studies the effectiveness of TUTATEC pheromone dispensers installed at a 300 dispensers per hectare density in tomato cultivated in greenhouse. For this purpose, monitoring of adult males and damage surveys are carried out. In parallel, the emission kinetics of the polymeric dispensers is studied by means of gas chromatography. Also, the concentration of *T. absoluta* airborne pheromone is studied by using a high-volume air sampler and the subsequent analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

The results show that mating disruption has contributed to the control of the miner regarding to the number of damaged fruits, but not to the percentage of affected plants. The number of catches per trap and day in the treated greenhouse has remained below control at all times, but shows variations that could be associated with population migration from adjacent plots. The dispensers show a constant emission rate of 1,1 mg/day, and they still contained 46,9% of the initial pheromone load at day 115, a fact that could be optimized. Although it has been possible to quantify the concentration of airborne pheromone, a mean of 3,2 ng/m³, it has not been possible to establish a threshold value from which treatment is effective.

In this way, it can be said that continuous research in this area is needed in order to make pest control methods through the use of semiochemicals an optimal and cost-effective tool in the affected plots.

Key words: tomato leaf miner; biotechnical control; pheromone; mating disruption; airborne pheromone concentration.

Author: Garín Tolón, Irati

Academic tutor: Rodrigo Santamalia, María Eugenia

External cotutor: Vacas González, Sandra

Experimental director: Navarro Llopis, Vicente

Valencia, July 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a Vicente y a Sandra, por confiar y permitirme realizar el Trabajo de Fin de Máster en las instalaciones del Centro de Ecología Química Agrícola, ha sido un verdadero placer. También por sus numerosas correcciones y ánimos.

A Aitor, por acompañarme siempre a los invernaderos, por sus explicaciones relacionadas con la cromatografía y la captación de volátiles, por responder a todas mis dudas, así como por su paciencia principalmente durante los primeros días de laboratorio.

A Leti y a Juan por acompañarme a realizar las prospecciones de daños; y al resto de compañeros del CEQA: Jaime, Ilde, Sonia, David, Pilar, y Gara, ¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Manejo Integrado de Plagas.....	4
1.2. Semioquímicos en el control de plagas	4
1.2.1. Ventajas e inconvenientes de su uso	5
1.2.2. Estrategias de control con semioquímicos	5
1.2.2.1. Control indirecto: detección y seguimiento de poblaciones	5
1.2.2.2. Control directo.....	5
1.3. Técnica de confusión sexual	6
1.4. Medida de semioquímicos en aire.....	7
1.5. El cultivo de tomate.....	9
1.6. La polilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i>).....	9
1.6.1. Importancia y distribución.....	9
1.6.2. Daños y plantas huésped.....	10
1.6.3. Sistemática	10
1.6.4. Ciclo biológico y morfología.....	11
1.6.5. Métodos de lucha.....	12
1.6.5.1. Medidas de prevención y/o culturales	12
1.6.5.2. Control físico y mecánico	12
1.6.5.3. Control químico.....	13
1.6.5.4. Control biológico	13
1.6.5.4.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
1.6.5.4.2. <i>Nesidiocoris tenuis</i>	14
1.6.5.5. Control biotécnico	15
1.7. Control de <i>Tuta absoluta</i> mediante confusión sexual	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Localización de los invernaderos y cultivo.....	17
3.2. Confusión sexual de <i>Tuta absoluta</i>	18
3.3. Evaluación de la eficacia de la confusión sexual.....	19
3.3.1. Seguimiento de la población	19
3.3.2. Prospección de daños.....	19
3.4. Estudio de la cinética de emisión de los emisores TUTATEC	19
3.5. Cuantificación de feromona en aire	20
3.6. Análisis estadístico.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Evaluación de la eficacia de la confusión sexual.....	23

4.1.1.	Seguimiento de la población	23
4.1.2.	Prospección de daños.....	24
4.2.	Cinética de emisión de los emisores TUTATEC	26
4.3.	Cuantificación de feromona en aire	27
5.	DISCUSIÓN.....	28
6.	CONCLUSIONES.....	31
7.	BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	– Distribución mundial de <i>Tuta absoluta</i> (Fuente: CABI, 2022).	9
Figura 1.2.	– Daños causados por <i>Tuta absoluta</i> en hojas (a) y fruto (b) de tomate. (Fuente: Elaboración propia).	10
Figura 1.3.	– Estados de desarrollo de <i>Tuta absoluta</i> . Adulto (a) , larva (b, c) y pupa (d) de <i>Tuta absoluta</i> . (Fuente: Aguado et al., 2010; Elaboración propia.)	12
Figura 1.4.	– Adulto de <i>Nesidiocoris tenuis</i> alimentándose de huevos de <i>Tuta absoluta</i> . (Fuente: Urbaneja et al., 2008).	15
Figura 1.5.	– Molécula de (E, Z, Z) – (3, 8, 11) – tetradecatrien-1-il-acetato, componente principal de la feromona sexual de <i>Tuta absoluta</i>	15
Figura 3.1.	– Invernadero control (azul) e invernadero tratado con confusión sexual (verde) y ubicación de las trampas delta (triángulos rojos). (Fuente: adaptado de visor SIGPAC).	18
Figura 3.2.	– Material para confusión sexual y seguimiento de la población de <i>Tuta absoluta</i> . Difusor de confusión sexual TUTATEC (a) , trampa delta con base pegajosa (b) y difusor de seguimiento Tutalab LT (c)	18
Figura 3.3.	– Material para la captación y análisis de feromona en aire. Captador de alto volumen utilizado para la toma de muestras (a) , contenedor con el cilindro de vidrio que aloja la espuma de poliuretano (b) y extracción tipo Soxhlet (c) . (Fuente: Elaboración propia).....	21
Figura 4.1.	– Capturas por trampa y día desde el inicio del ensayo en el invernadero control y en el sometido a confusión sexual, e índice de inhibición de capturas.....	24
Figura 4.2.	– Porcentaje de plantas atacadas durante las diferentes prospecciones en ambos tratamientos. Para cada fecha, barras etiquetadas con la misma letra no difieren significativamente (test χ^2 , $P > 0,05$).	25
Figura 4.3.	– Perfil de liberación de TDTA, el componente mayoritario de la feromona de <i>T. absoluta</i> y de los emisores TUTATEC.....	27
Figura 4.4.	– Relación entre la concentración de feromona en aire y el índice de inhibición de capturas.	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.	– Valores óptimos de los parámetros de MS/MS de TFN y TDTA utilizados para cuantificar la concentración de feromona en aire de <i>Tuta absoluta</i>	22
Tabla 4.1.	– Prospecciones de daños de <i>T. absoluta</i> en planta de tomate los días 31, 67 y 87 del ensayo.....	25

Tabla 4.2. – Prospección final de daños de <i>T. absoluta</i> en planta de tomate.....	26
Tabla 4.3. – Cantidad y emisión de feromona en los emisores de envejecimiento TUTATEC.	27

LISTA DE ABREVIATURAS

Bt: *Bacillus thuringiensis* Berliner

Btk: *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki

C: Control

CFA: Concentración/es de feromona en aire

CS: Confusión sexual

CTD: Capturas por trampa y día

FA: Foliolos atacados

FI: Foliolos inspeccionados

G/F: Galerías por foliolo

GC: Cromatografía de gases/cromatógrafo de gases

GC – FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llama

GC-MS/MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

GT: Galerías totales

IIC: Índice de inhibición de capturas

LT: Larvas totales

MS/MS: Espectrometría de masas de triple cuadrupolo

PA: Plantas atacadas

PEI: Plantas con estados inmaduros

PI: Plantas inspeccionadas

PT: Pupas totales

PUF: Espuma de poliuretano

SRM: Monitoreo de Reacciones Seleccionadas

TDDA: (E,Z)–(3,8)–tetradecadien-1-il-acetato

TDTA: (E,Z,Z)–(3,8,11)–tetradecatrien-1-il-acetato

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

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Manejo Integrado de Plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) surgió en un contexto de uso constante y creciente de productos fitosanitarios de síntesis, que dio lugar a la aparición tanto de resistencias en plagas principales como de aparición de secundarias. Además, la toma de conciencia por parte de la población de las consecuencias nocivas que estos fitosanitarios tienen en la salud humana y su persistencia en el medioambiente dio el impulso a esta nueva forma de gestión de plagas (FAO, 2022).

La Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB), ya en los años 70, coordinaba los estudios ecotoxicológicos sobre enemigos naturales previos al registro de plaguicidas, que en 1991 pasaron a ser obligatorios tras la publicación de la Directiva 91/414/CEE de la Unión Europea (García-Marí, 2003). Esta misma organización definió en 1973 el MIP 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” (Deguine et al., 2021). Una de las técnicas alternativas contempladas en el MIP es el uso de semioquímicos para un control de plagas sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

1.2. Semioquímicos en el control de plagas

Llamamos semioquímicos a los compuestos implicados en la comunicación entre insectos, y se conocen como feromonas o aleloquímicos cuando la comunicación es intraespecífica o interespecífica, respectivamente (Vacas, 2011). Las feromonas son sintetizadas en glándulas especializadas para ser transmitidas al medio en función de las necesidades de comunicación (Mosquera, 1990) y se clasifican en dos tipos: inductoras (de alarma, sexuales, de agregación, de rastro...) y primarias (de maduración sexual, desarrollo...) (El-Shafie y Faleiro, 2017; Gavara, 2021). En términos de MIP, las sexuales y las de agregación son las más usadas para el control de plagas en campo (Witzgall et al., 2010; Borges et al., 2011). Con respecto a las sexuales, generalmente son emitidas por la hembra para atraer al macho con motivo de la cópula. Así, en 1959, Butenandt identificó la primera feromona sexual, bombykol, que utilizada por la hembra de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), sirve para la atracción a distancia de los machos. Desde ese momento, se ha proseguido en la identificación de feromonas propias de cientos de especies de insectos (Vacas, 2011; Ortiz, 2020).

Específicamente, las feromonas sexuales de especies de Lepidópteros consisten en cadenas largas (C10 – C30), generalmente insaturadas, con grupos alcohol, éster acético o aldehído (Vacas, 2011). En algunos casos se trata de compuestos individuales, pero en otros, la

feromona sexual es una mezcla de varios compuestos, siendo la proporción de cada uno de ellos determinante en la respuesta del insecto y, por tanto, en su control (Mosquera, 1990).

1.2.1. Ventajas e inconvenientes de su uso

Como ventajas del uso de semioquímicos en el control de plagas destacamos que son sustancias con elevada especificidad, por lo que no actúan frente especies no diana, son respetuosos con el medio ambiente y no dejan residuos. Además, se pueden usar en programas de control integrado, al contrario de lo que ocurre con muchos de los productos químicos de síntesis. Sin embargo, los formulados pueden ser inestables, volátiles y en algunos casos sensibles a la temperatura y la luz. Además, el coste de sintetizar los semioquímicos en ocasiones es elevado, sobre todo en técnicas como la confusión sexual donde se requiere una cantidad elevada de los mismos (Vacas, 2011; Ezzat et al., 2020).

1.2.2. Estrategias de control con semioquímicos

El hecho de que los semioquímicos sean los responsables de la comunicación entre insectos hace que sean una base potente para el control de estos. Así, varias estrategias de control integradas en el MIP se basan en su uso. Pueden utilizarse para el control de plagas de forma indirecta o directa (El-Ghany, 2019).

1.2.2.1. Control indirecto: detección y seguimiento de poblaciones

La detección y el seguimiento de las poblaciones plaga mediante trampas provistas con atrayentes químicos son métodos de control indirecto eficaces y económicos ampliamente utilizados. Permiten determinar la presencia de una especie de plaga, así como la densidad poblacional y sus fluctuaciones y, por consiguiente, el comienzo del vuelo y la dinámica poblacional. Por ende, proporcionan una información que se puede utilizar para establecer umbrales de capturas a partir de los cuales se producen pérdidas económicas y poder aplicar diferentes estrategias de control antes de alcanzarlos.

1.2.2.2. Control directo

Con respecto al control directo, este puede realizarse mediante trampeo masivo, atracción y muerte/infección/esterilización, atracción – repelencia y confusión sexual.

- **Trampeo masivo.** Se basa en el uso de trampas con feromona, u otros semioquímicos, a una densidad suficiente para eliminar suficientes adultos de la población plaga y, consecuentemente el daño que estos puedan causar. La forma en la que se atrapa a los individuos depende del tipo de trampas; desde pegajosas hasta agua o un insecticida. Es una técnica efectiva siempre que las poblaciones previas al tratamiento sean relativamente bajas y que el ciclo biológico de la plaga sea largo y el número de huevos en cada puesta sea

bajo. Presenta inconvenientes tales como el coste, la falta de atracción de hembras si se usan feromonas sexuales, así como el mantenimiento frecuente para evitar saturación de las trampas (Jones, 2004; El-Shafie y Faleiro, 2017; El-Ghany, 2019).

- **Atracción y muerte/infección/esterilización.** Técnica en la que los semioquímicos tienen la finalidad de atraer a los individuos hasta un punto en el que un agente de control los va eliminando de la población. El agente de control puede ser un insecticida, un patógeno o un esterilizante, los que dan el nombre a la técnica. En el caso de atracción y muerte, el insecto muere de forma inmediata; en atracción e infección con patógenos, el individuo queda infectado y capacitado para la transmisión de la enfermedad a sus congéneres y descendientes; y en el caso de atracción y esterilización, el macho transmitirá idealmente la esterilización adquirida a la hembra (Jones, 2004; El-Shafie y Faleiro, 2017).

- **Atracción – repelencia o *push and pull*.** En su sentido más amplio, esta técnica consiste en el uso de dos tipos de elementos: uno que repele o disuade al insecto plaga y lo saca del cultivo principal (*push*) y el otro que lo atrae desde fuera del cultivo (*pull*), donde podremos actuar sobre el insecto de diversas maneras. Tiene como ventaja el hecho de poder usar el cultivo principal, las cubiertas o cultivos colindantes como fuentes naturales de los semioquímicos (Blassioli-Moraes et al., 2019). Requiere de un buen conocimiento de la biología y ecología del insecto, así como de las interacciones entre las plantas hospedantes y los enemigos naturales (El-Ghany, 2019; Prasad, 2022).

- **Confusión sexual.** Dado que esta técnica de control directo es la estudiada en el presente Trabajo de Fin de Máster, se describe de forma más extensa en el siguiente apartado.

1.3. Técnica de confusión sexual

La confusión sexual es una estrategia cuya finalidad es incidir sobre la conducta de apareamiento, reduciendo, retrasando o evitando las cópulas y, por tanto, la reproducción de la especie. Para ello se liberan al ambiente cantidades suficientes de feromona sexual sintética y específica de la plaga. Los principales mecanismos por los que puede tener lugar la confusión sexual pueden ser: (1) mecanismos competitivos (seguimiento de pistas falsas), o (2) mecanismos no competitivos, como la confusión de machos (camuflaje); adaptación/habitación sensorial y por emigración de los machos antes del apareamiento (El-Ghany, 2019).

- **Atracción competitiva (seguimiento de pistas falsas).** En este caso, los machos no tienen ningún impedimento para responder al estímulo emitido por las hembras, pero se ven

atraído por los semioquímicos sintéticos en vez de por la feromona emitida por la hembra, teniendo lugar una competencia entre hembras y difusores de feromona (El-Ghany, 2019).

- **Confusión de machos (camuflaje).** El ambiente saturado de semioquímicos causa patrones de vuelo aleatorios en los machos, ya que la estela de la feromona natural emitida por las hembras queda enmascarada por la sintética, imposibilitando así el alcance de la hembra por el macho y por tanto el apareamiento (Jones, 2004; El-Ghany, 2019).

- **Adaptación/habitación sensorial.** Los receptores antenales y/o el sistema nervioso central de los machos se adaptan neurofisiológicamente como consecuencia de la sobreexposición a la feromona sexual. De esta forma, el macho se ve incapacitado para responder ante niveles normales del estímulo de la feromona natural (Jones, 2004; El-Ghany, 2019).

- **Emigración de los machos antes del apareamiento.** Los machos emigran de la zona en la que se encuentran debido al exceso de feromona en el ambiente y por tanto no estarán disponibles para las hembras (El-Ghany, 2019).

En general, para un correcto uso de la técnica de confusión sexual se requiere tanto la capacidad de sintetizar los componentes de la feromona a gran escala como el desarrollo de emisores específicos de la misma que permita una emisión homogénea (Blassioli-Moraes et al., 2019). La confusión sexual es la técnica basada en el uso de feromonas más utilizada, para la que se estima que existen más de 750.000 ha tratadas mediante esta técnica para controlar plagas agrícolas a nivel mundial, principalmente de lepidópteros (Franco et al., 2022).

1.4. Medida de semioquímicos en aire

Tal y como se ha descrito en apartados anteriores, el proceso de síntesis de las feromonas encarece mucho su uso. Así, la medida de semioquímicos en aire y su distribución en el campo puede aportar información valiosa para determinar si está teniendo lugar un correcto aprovechamiento de dichas sustancias y poder optimizar su uso. Además, conocer la cantidad de feromona presente en el ambiente puede correlacionarse con la cinética de emisión de los dispositivos emisores.

Sin embargo, la medida de feromona en aire trae consigo una serie de inconvenientes tales como su baja concentración en el ambiente y la ausencia de rasgos diferenciales de importancia en la estructura química para distinguirlas de otros hidrocarburos lineales presentes en la atmósfera. Por estos motivos, durante la Tesis Doctoral “Cuantificación de

feromonas en aire y su aplicación en métodos de control de plagas” llevada a cabo en el Centro de Ecología Química Agrícola del Instituto Agroforestal del Mediterráneo, se desarrolló un procedimiento para la cuantificación de feromonas mediante la captación de muestras de aire (Gavara, 2021). A grandes rasgos, el protocolo está basado en la captación de grandes volúmenes de aire en materiales adsorbentes, y la posterior extracción, concentración y análisis químico de las muestras ambientales. A continuación, se detallará el proceso utilizado para realizar las medidas en el presente Trabajo.

La captación se realiza de forma dinámica o activa mediante un captador de alto volumen, ya que se considera la técnica más adecuada para la captación de sustancias presentes a muy bajas concentraciones en aire. Esto es, el aire, gracias a un bombeo activo, pasa a través de un prefiltro y un cartucho de material adsorbente, los cuales retendrán las partículas sólidas y los volátiles, respectivamente. Este captador es capaz de movilizar de 13 a 30 m³/h, por lo que permite tratar en muy poco tiempo, gran cantidad de aire. Sin embargo, requieren de energía eléctrica y su transporte y montaje puede ser problemático. Como material para la toma de muestra se utiliza espuma de poliuretano (PUF) y, como paso previo, un filtro de fibra de vidrio para retener las partículas sólidas.

Para la extracción de la muestra captada en la espuma, se utiliza un extractor tipo Soxhlet. Se trata de una técnica económica y fácil, además de eficaz, por someter la muestra repetidamente al disolvente limpio en caliente, evitando tener que realizar un filtrado de la disolución obtenida puesto que permanece separada del material adsorbente. Sin embargo, requiere de un periodo de tiempo largo, puede tener lugar la degradación de compuestos termolábiles y se requieren grandes cantidades de disolvente (De Castro y Priego-Capote, 2010).

La disolución obtenida se somete a concentración en un evaporador rotatorio para su posterior análisis en equipos de cromatografía de gases. El extracto final se analiza por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (GC-MS/MS), ya que se considera la técnica más adecuada al estar trabajando con compuestos muy volátiles, feromonas, y porque proporciona una elevada sensibilidad. Previamente, para aumentar la selectividad y la sensibilidad a la hora de cuantificar la feromona contenida en el extracto, es necesario optimizar la detección de los compuestos en el detector de masas. Para ello, se deben elegir unas transiciones características de la molécula; es decir, un ion procedente del espectro de masas de la sustancia de interés (precursor) y el ion o iones más abundantes procedentes de la fragmentación del seleccionado como precursor.

1.5. El cultivo de tomate

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) es la hortaliza con mayor importancia económica a nivel mundial. La superficie dedicada en España en el año 2020 es de 16.326 ha y se obtuvo una producción de 4.754.380 T. Con respecto a la Comunidad Valenciana, la superficie es de 56.106 ha, de las cuales 16.326 ha están destinadas al cultivo protegido en regadío y tienen un rendimiento de 92.075 kg/ha (MAPA, 2022a).

1.6. La polilla del tomate (*Tuta absoluta*)

1.6.1. Importancia y distribución

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) es un minador que ataca a las plantas de tomate en cualquier momento de su desarrollo (Vacas et al., 2011), pudiendo realizar la puesta en la mayor parte de órganos aéreos y alimentarse de hojas y frutos para completar su ciclo (Urbaneja et al., 2007), llegando a causar daños de hasta el 100% de la cosecha (EPPO, 2005).

La polilla del tomate fue descrita por primera vez a principios de los años 80 en el sureste de Brasil (Souza y Reis, 1986), siendo ahora una de las plagas más importantes en el cultivo de tomate en el sur del continente americano (Urbaneja et al., 2007).

Posteriormente, y a pesar de haber estado incluida en la lista de acción A1 en la Unión Europea (lista de plagas recomendadas para su regulación como plagas cuarentenarias), se confirmó a finales de 2006 su presencia por primera vez en la región EPPO, concretamente en cultivo de tomate de la provincia de Castellón. Desde entonces, ha invadido la totalidad de las costas mediterránea y sur-atlántica de la Península Ibérica, aparte de regiones del interior de España (Urbaneja et al., 2007; EPPO, 2008; Vacas et al., 2011). La expansión continuó con rapidez y, actualmente el microlepidóptero se encuentra en gran parte de África, Europa y Asia tal y como puede verse en la **Figura 1.1**.

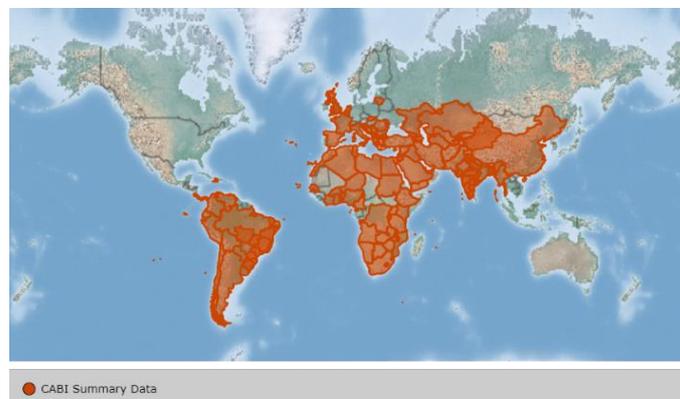


Figura 1.1. – Distribución mundial de *Tuta absoluta* (Fuente: CABI, 2022).

1.6.2. Daños y plantas huésped

Las larvas son las principales causantes de los daños. Ocasionalmente ocasionan galerías transparentes en las hojas como consecuencia de la alimentación del mesófilo, dejando intacta la epidermis (**Figura 1.2a**). Las galerías se van ensanchando conforme avanzan los estadios larvares, adquiriendo una forma característica. También pueden verse estas minas en los tallos, en la inserción de folíolos, pedúnculos y parte apical que afecta a las inflorescencias. Con respecto a los frutos, las larvas penetran por el cáliz y se ha visto que prefieren aquellos verdes o inmaduros (**Figura 1.2b**). Además, estas galerías permiten la invasión por patógenos secundarios (EPPO, 2005; Aguado et al., 2010).

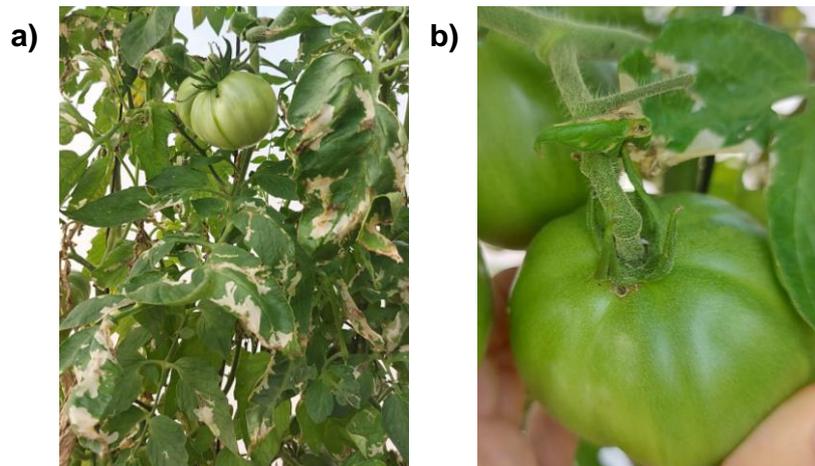


Figura 1.2. – Daños causados por *Tuta absoluta* en hojas (**a**) y fruto (**b**) de tomate. (Fuente: Elaboración propia).

El huésped preferido de este lepidóptero es el tomate, pero puede encontrarse en otras solanáceas, tanto cultivadas (berenjena (*Solanum melongena* L.), patata (*Solanum tuberosum* L.) y pepino dulce (*Solanum muricatum* L.), como silvestres (tomatillo (*Lycium chilense* Bertero), hierba mora (*Solanum nigrum* L.) y estramonio (*Datura stramonium* L.) (EPPO, 2005; Urbaneja et al., 2007).

1.6.3. Sistemática

Reino: Animalia

Phylum: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Gelechiidae

Género: *Tuta*

Especie: *Tuta absoluta*

1.6.4. Ciclo biológico y morfología

El ciclo biológico de *T. absoluta* incluye cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. Se trata de una especie multivoltina, capaz de completar entre 10 y 12 generaciones al año, siendo su ciclo biológico de 29 – 38 días (EPPO, 2005). En España está activa todo el año, donde se han registrado capturas de enero a diciembre de forma ininterrumpida (Vercher et al., 2010).

- **Adulto:** Es un microlepidóptero de 6 – 7 mm (**Figura 1.3a**). Posee un primer par de alas de color gris oscuro jaspeado con manchas oscuras y un segundo par de alas de color negro. Las hembras tienen el abdomen amarronado, más ancho y voluminoso que el de los machos. Posee hábitos nocturnos, se esconde entre las hojas durante el día y la cópula se inicia de inmediato tras la emergencia. Se desarrolla en un periodo entre 9 y 23 días (EPPO, 2005; Ruisánchez, 2013; MAPA, 2021).

- **Huevo:** Las hembras fecundadas comienzan a poner los huevos tres días tras la cópula y pueden llegar a poner hasta 260 huevos de forma individual o en grupos de hasta cinco. La oviposición tiene lugar preferentemente en hojas (73%), y en menor magnitud en las nervadura de las hojas y márgenes de los tallos (21%), sépalos (5%) y frutos verdes (1%) (Desneux et al., 2010). Estos son pequeños (0,36 mm de largo y 0,22 mm de diámetro), ovalados y amarillentos que viran hacia tonos más oscuros cuando se aproxima la eclosión, la cual tiene lugar de 5 a 10 días después de la oviposición (Ruisánchez, 2013; MAPA, 2021).

- **Larva:** El estado larvario comprende cuatro estadios pudiendo ser de 0,9 mm el primero de ellos y de 7,5 mm el cuarto. Posee tres pares de patas y cinco pares de falsas patas. La coloración es amarillenta, vira hacia verdoso conforme se alimenta y evoluciona, y de color rojo en su zona dorsal cuando está próxima al estado de pupa. La cabeza es de color castaño y el escudo protorácico marrón oscuro en su parte basal (**Figura 1.3b, c**). Generalmente, salen de la galería para cambiar de estadio y penetrar en otras hojas. Normalmente pupan en el suelo, pero algunas lo hacen en el envés de las hojas cerca de la nervadura central o junto al cáliz del fruto. Crece en un periodo de 13 – 23 días. (Ruisánchez, 2013; MAPA, 2021).

- **Pupa:** Es obtecta, cilíndrica, de color verde que torna a marrón al avanzar el desarrollo, y normalmente cubierta por un capullo blanco sedoso (**Figura 1.3d**). Presenta dimorfismo sexual, siendo las hembras de mayor tamaño (4,67 mm de largo y 1,37 mm de ancho) que los machos (4,27 mm de largo y 1,23 mm de ancho). Se desarrolla en un periodo de 7 – 21 días. (Ruisánchez, 2013; MAPA, 2021).

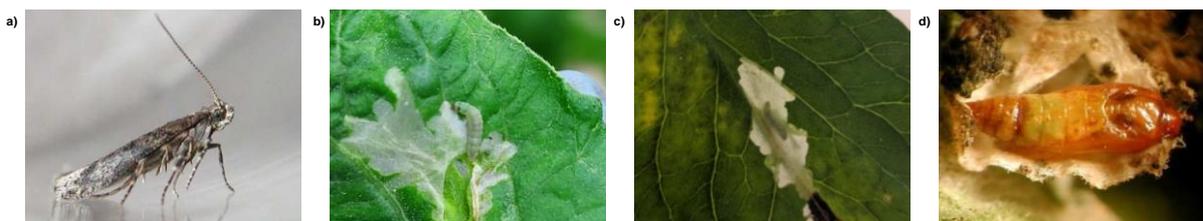


Figura 1.3. – Estados de desarrollo de *Tuta absoluta*. Adulto (a), larva (b, c) y pupa (d) de *Tuta absoluta*. (Fuente: Aguado et al., 2010; Elaboración propia.).

1.6.5. Métodos de lucha

1.6.5.1. Medidas de prevención y/o culturales

Con respecto a las medidas de prevención y/o culturales de la polilla del tomate, se ha de saber que es necesario rotar los cultivos de solanáceas con otras especies siempre que sea posible, para poder romper el ciclo de la plaga; y utilizar material de plantación libre de plaga. Además, durante el cultivo se debe mantener una correcta limpieza e higiene de la parcela, lo que implica: eliminación de restos de cosecha, de poda y material vegetal, además de malas hierbas presentes en el cultivo y colindantes. También, el material vegetal afectado deberá de ser eliminado con precaución para evitar la dispersión de la plaga. Asimismo, se favorecerá la proliferación de insectos auxiliares, así como la existencia de plantas con floración permanente que sirvan de alimento para la fauna auxiliar tales como *Lobularia maritima* (L.) Desv. Al finalizar el cultivo, es de interés el arrancar las plantas frescas inmediatamente después de la última cosecha y eliminarlas de forma correcta. También, se recomienda mover el suelo inmediatamente después de la última cosecha para evitar la evolución de larvas y pupas presentes en el suelo; y en el caso de sistemas de cultivo protegido, realizar un proceso de solarización durante al menos quince días. Hasta 200 pupas por metro cuadrado de suelo puede haber en un cultivo gravemente afectado (OIRSA, 2015; MAPA, 2021).

En relación a la estructura de la parcela o invernadero, esta deberá estar lo más aislada posible, incluso en zonas de ventilación, doble puerta y cerramientos en correcto estado (MAPA, 2021).

1.6.5.2. Control físico y mecánico

Se basa en el uso de trampas cromáticas y de luz, y ambas se utilizan tanto para su detección como para captura masiva. Las trampas de colores pueden ser franjas continuas o discontinuas, de color negro, azul o amarillo. Pueden ser bandas adhesivas de mínimo 15 cm de ancho que se colocan en las zonas interiores periféricas del invernadero o, placas de 200-1000 cm² que se colocan en intervalos de 2,5-3 m las pequeñas o 5-6 m las más grandes a lo largo de todo el interior del invernadero. Las trampas de luz son blancas y ultravioletas y atraen a los adultos de *T. absoluta*. Sin embargo, estas son incapaces de eliminar muchas

hembras antes de la oviposición y atraen a insectos del exterior si el invernadero no está correctamente cerrado (Ruisánchez, 2013).

1.6.5.3. Control químico

Desde el establecimiento de *T. absoluta* en la península ibérica en 2006, el aumento del uso de fitosanitarios necesarios en cultivo de tomate ha aumentado, favoreciendo desequilibrios en la fauna auxiliar y por tanto en el control biológico, así como la reducción de tratamientos que previamente se había logrado (Navarro-Llopis et al., 2010).

El control de *T. absoluta* haciendo uso de compuestos químicos no se consigue fácilmente por dos razones: el comportamiento alimenticio y el desarrollo de resistencias. La primera implica el uso de plaguicidas con efecto translaminar, que puedan afectar a los estadios larvarios ubicados en el mesófilo, o aplicaciones reiterativas con la finalidad de atacar a las larvas en el momento que salen de las galerías. La segunda conlleva el uso de diferentes tipos de plaguicidas y su consiguiente acumulación en el medio. Así, para sobrellevar estos problemas se requiere de estrategias basadas en el MIP (Aynalem, 2017).

De esta forma, es determinante el conocimiento de la dinámica poblacional mediante la utilización de trampas de captura y observaciones directas dentro de la parcela. Así, según la Guía de Gestión Integrada de Plagas en solanáceas se han de realizar dos o tres aplicaciones cada siete días cuando las capturas por trampa y semana sean superiores a 100. Además, no se aconsejan los tratamientos fitosanitarios cuando la mortalidad de las larvas por parasitismo supera el 10% y la fauna auxiliar está correctamente instalada (MAPA, 2021).

Los tratamientos químicos se aconsejan únicamente cuando otros métodos no resulten eficaces y siendo intercalados con otro tipo de tratamientos para evitar la aparición de resistencias.

Entre los productos autorizados en España contra la polilla del tomate encontramos compuestos que afectan principalmente a los sistemas nervioso y/o muscular (abamectina, emamectina, clorraniliprol, metaflumizona, cyantraniliprol, piretrinas e indoxacarb), sistema digestivo (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* y *aizawai*), o compuestos con modo de acción desconocido o incierto (azadiractina, sales potásicas de ácidos vegetales) y sales potásicas de ácidos grasos C14 – C20 (IRAC, 2022; MAPA, 2022b).

1.6.5.4. Control biológico

A continuación, se explican dos estrategias de control biológico, ambas utilizadas en los invernaderos donde se ha llevado a cabo el presente Trabajo de Fin de Máster.

1.6.5.4.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis Berliner (Firmicutes: Bacillaceae) (Bt) es una bacteria entomopatógena, cuyos preparados comerciales han sido clave durante décadas en el control integrado de plagas como método alternativo a los químicos. Son respetuosos con el medio ambiente, no provocan daños ni en humanos ni otros vertebrados, y respetan a los enemigos naturales presentes (González-Cabrera et al., 2011).

En la zona de origen se conoce que la variedad *kurstaki* (Btk) puede ser efectiva contra varios de los estadios larvarios de *T. absoluta* y que incluso pueden verse efectos sinérgicos cuando se aplica a tomates cuyo genotipo es resistente al lepidóptero. En España, en condiciones de laboratorio, invernadero y campo, se ha visto que *B. thuringiensis* puede ser altamente eficiente en el control de larvas de *T. absoluta*. Aplicaciones de 180,8 MUI/L de Bt reducen el daño hasta un 90% en comparación con el control. Además, aplicaciones de 90,4 MUI/L de forma semanal han demostrado controlar la polilla del tomate a lo largo del ciclo del cultivo sin ningún tratamiento adicional, incluso con niveles elevados (González-Cabrera et al., 2011; Mollá et al., 2011; Urbaneja et al., 2012). También, estudios han demostrado la ausencia de frutos infestados en las zonas tratadas con Bt (González-Cabrera et al., 2010).

1.6.5.4.2. *Nesidiocoris tenuis*

Nesidiocoris tenuis Reuter (Hemiptera: Miridae) es un enemigo natural autóctono que aparece de forma espontánea colonizando el cultivo de tomate en España junto con *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae). Ensayos llevados a cabo tanto en invernadero como en campo han demostrado la capacidad de depredar y reducir significativamente la infestación por *T. absoluta*. Ambos sexos de *N. tenuis* son capaces de depredar huevos (**Figura 1.4.**) y larvas de *T. absoluta*. Son capaces de depredar hasta más de 30 huevos por día, consumiendo las hembras más que los machos. Con respecto a las larvas, el mírido se alimenta de los cuatro estadios larvarios, pero se observa una clara preferencia por el primer y segundo estadio, siendo capaces de alimentarse de dos larvas por día aproximadamente. Todo ello ocurre de forma eficaz siempre y cuando se permita la instalación del mírido antes de que *T. absoluta* alcance la categoría de plaga. Su aparición tardía implica una disminución de la eficacia, por lo que se recomienda la introducción de *N. tenuis* por inoculación bien en semillero, en lugares donde la presión de plaga puede suponer un mayor problema, o bien post – trasplante (Urbaneja et al., 2008; Urbaneja et al., 2009; Mollá et al., 2013).



Figura 1.4. – Adulto de *Nesidiocoris tenuis* alimentándose de huevos de *Tuta absoluta*. (Fuente: Urbaneja et al., 2008).

1.6.5.5. Control biotécnico

En 1978 se comprobó que, usando hembras vírgenes de *T. absoluta*, se conseguían capturas de más de 100 machos por trampa y día, lo que sugería la emisión de una feromona sexual por parte de dichas hembras (Quiroz, 1978). Tiempo después, en 1995, la feromona fue caracterizada como una mezcla 90:10 de (E,Z,Z)–(3,8,11)–tetradecatrien-1-il-acetato (TDTA) (**Figura 1.5.**), como componente principal de esta feromona sexual y (E,Z)–(3,8)–tetradecadien-1-il-acetato (TDDA) como componente secundario (Attygalle et al., 1995). Esta es sintetizada por la hembra en la glándula feromonal, estructura especializada situada en el extremo del abdomen (Vogel et al., 2010).

De esta forma, se ha permitido el desarrollo de emisores de feromona para la aplicación de diferentes técnicas tales como: seguimiento de poblaciones, captura masiva, atracción y muerte y confusión sexual (Vacas, 2011; Caparros et al., 2013). Siendo así una forma de control implementada en Suramérica, Europa, Asia y África, tanto en cultivo protegido como al aire libre (Tarusikirwa et al., 2020).

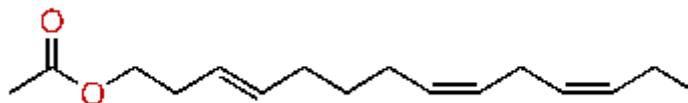


Figura 1.5. – Molécula de (E, Z, Z) – (3, 8, 11) – tetradecatrien-1-il-acetato, componente principal de la feromona sexual de *Tuta absoluta*.

Varias empresas han desarrollado emisores de feromona para la detección y seguimiento de poblaciones de *T. absoluta*, la mayoría del tipo *rubber septum*, pero estos tienen una cinética de emisión muy deficiente por lo que pierden su eficacia de forma rápida (Vacas et al., 2013). Así, este tipo de control puede usarse como una parte de una estrategia de control; es decir, una medida complementaria a otras opciones de manejo. Por ejemplo, un estudio en Egipto reveló la eficacia contra larvas de *T. absoluta* de la feromona sexual en combinación

con otros insecticidas (El-Aassar et al., 2015); y Cherif et al. (2018) demostraron una reducción en la población de *T. absoluta* cuando el uso de feromona sexual se combinaba con *Bt* y ciromazina.

1.7. Control de *Tuta absoluta* mediante confusión sexual

El método de confusión sexual ha demostrado ser muy eficiente en el control de muchas plagas de lepidópteros (Witzgall et al., 2010). Esto es una realidad para *T. absoluta* en España, gracias a la existencia de dos difusores de vapores comerciales autorizados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. El primero de ellos, inscrito en 2018 pertenece a la empresa Shin-Etsu Chemical Co LTD (número de registro: 25942), y el segundo, inscrito en 2020, a SEDQ Healthy Crops S.L (número de registro: ES-01163), conteniendo ambos una mezcla de TDTA y TDDA (MAPA, 2022b).

Esta técnica fue ensayada en Suramérica con dosis de TDTA de entre 10 y 80 g/ha en parcelas de cultivo al aire libre de apenas 200 m², sin buenos resultados ni estudios de la emisión de feromona (Michereff et al., 2000; Vacas, 2011). Por parte de Martí et al. (2010), se describió la primera experiencia en España sobre confusión sexual de *T. absoluta* y ensayaron dosis de 0,15 y 2 g/ha, obteniendo también resultados poco favorables.

Navarro-Llopis et al. (2010), concluyeron que el control de *T. absoluta* mediante confusión sexual en invernadero es posible siempre que este posea una hermeticidad óptima, que la carga de feromona mínima esté cercana a los 40 g/ha y que se emita de forma constante desde el inicio de las capturas en trampas delta hasta el final del ensayo.

Más tarde, en la región italiana de Cerdeña se observó una lenta disipación de la feromona que daba lugar a emisores con el 50% del ingrediente activo sin emitir al finalizar el cultivo. También, afirmaron que la confusión es efectiva únicamente a densidades de la población bajas/moderadas y que muchas veces la presencia de una elevada población se debe a la emergencia de pupas en el suelo procedentes del cultivo anterior. Así, en presencia de poblaciones elevadas de *T. absoluta*, pese a estar sometidas a la técnica de confusión sexual, la probabilidad de encuentro entre machos y hembras es elevada, perturbando el efecto de la confusión sexual (Cocco et al., 2013).

2. OBJETIVOS

En un ambiente de necesidad de disminuir las materias activas de síntesis química utilizadas, así como de conservar los enemigos naturales en el ámbito agrícola, el desarrollo de métodos biotécnicos, como es el caso de la confusión sexual, juega un papel fundamental. Además, la polilla del tomate es una plaga capaz de provocar pérdidas de hasta el 100% de la producción.

Así, los objetivos del presente Trabajo han sido:

- Evaluar la eficacia de nuevos emisores de feromona para combatir *T. absoluta* mediante confusión sexual en cultivo de tomate en invernadero.

Para ello se ha estudiado tanto el efecto del tratamiento de forma indirecta (seguimiento de la población) y directa (daños), como la cinética de emisión de la feromona mediante técnicas cromatográficas.

- Establecer un valor umbral de concentración de feromona en aire eficaz para confundir sexualmente a *T. absoluta*.

Para ello, mediante una metodología de detección y cuantificación de feromona en aire desarrollada recientemente, se ha analizado la concentración de feromona de *T. absoluta* presente en el invernadero al aplicar la confusión sexual y su relación con la eficacia de la técnica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de los invernaderos y cultivo

El ensayo se ha realizado entre los meses de marzo y junio de 2022 en invernaderos de tomate (*Solanum lycopersicum* L. (Solanales: Solanaceae)), variedad Valenciano, sobre sustrato de fibra de coco, con antecedentes de daño por *T. absoluta*. Tanto el invernadero control (C) como el tratado con confusión sexual (CS) están ubicados en Meliana (Valencia, España), en las coordenadas 39°31'29.3"N 0°20'11.7"W y 39°31'32.9"N 0°20'11.2"W, respectivamente. Las dimensiones del invernadero CS son 80 x 55 m (4056,67 m²) y las del invernadero C, 57,5 x 30 m (1654,23 m²) (**Figura 3.1.**). Cabe destacar, que dichos invernaderos carecen de doble puerta, protección en las zonas de ventilación cenital y algunos cerramientos laterales tienen soluciones de continuidad. Ambos invernaderos recibieron el mismo manejo, en cuanto a labores culturales y tratamientos fitosanitarios.

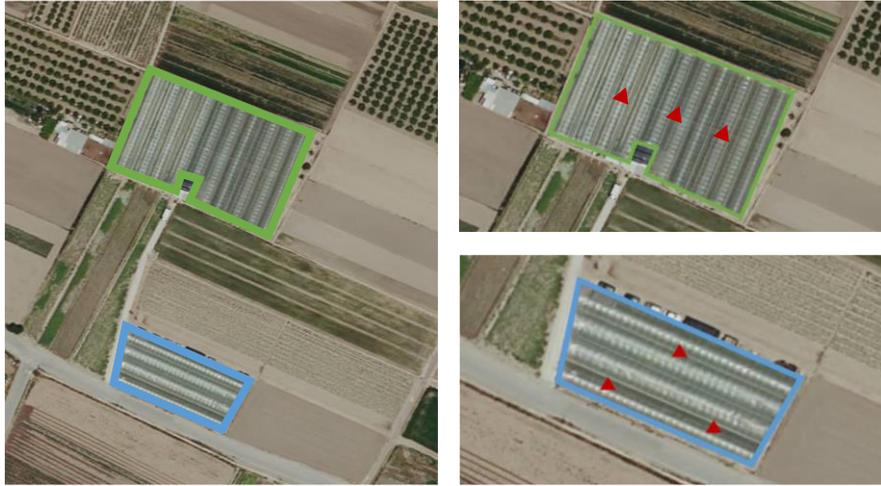


Figura 3.1. – Invernadero control (azul) e invernadero tratado con confusión sexual (verde) y ubicación de las trampas delta (triángulos rojos). (Fuente: adaptado de visor SIGPAC).

3.2. Confusión sexual de *Tuta absoluta*

El tratamiento en el invernadero CS se ha realizado utilizando difusores de confusión sexual comerciales TUTATEC (SEDQ *Healthy Crops*, S.L., Barcelona, España) (**Figura 3.2a**) y número de registro ES-01163. Cada uno de ellos contiene una carga de 0,185 g de una mezcla de su feromona sexual. Estos emisores poseen una vida útil teórica de 180 días. Se han colocado a una dosis de 300 difusores por hectárea, al inicio del cultivo, a una altura de 1,6 – 2 m en los alambres o cuerdas de fijación, tal y como indica su registro (MAPA, 2022b; SEDQ, 2022a).

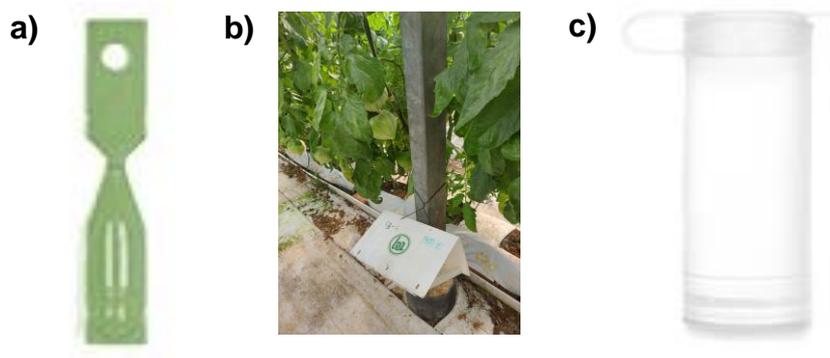


Figura 3.2. – Material para confusión sexual y seguimiento de la población de *Tuta absoluta*. Difusor de confusión sexual TUTATEC (**a**), trampa delta con base pegajosa (**b**) y difusor de seguimiento Ttotalab LT (**c**).

3.3. Evaluación de la eficacia de la confusión sexual

3.3.1. Seguimiento de la población

Para el seguimiento del vuelo de machos de *T. absoluta*, se instalaron tres trampas tipo delta provistas de base pegajosa (**Figura 3.2b**) y emisor de seguimiento Tatalab LT (SEDQ *Healthy Crops*, S.L., Barcelona, España) (**Figura 3.2c**) en cada invernadero. La separación entre trampas fue de al menos 20 m y se situaron a una altura de 30 cm del suelo. La duración de dichos emisores es de 110 días (SEDQ, 2022b).

Las capturas se revisaron de forma semanal y se calculó el número de machos capturados por trampa y día (CTD) en cada invernadero. La reducción del número de capturas en el invernadero tratado con confusión sexual, respecto al control, es un indicador de que se está afectando a la población de machos y produciendo un efecto de confusión. Por ello, se calculó el índice de inhibición de capturas (IIC) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IIC (\%) = 100 - \left(\frac{CTD_{CS}}{CTD_C} \times 100 \right).$$

3.3.2. Prospección de daños

La prueba final de la eficacia de la confusión sexual se obtiene mediante la evaluación de los daños en las plantas. Las prospecciones se realizaron de forma mensual, intervalo que se redujo con el inicio de la recolección. Se examinaron visualmente 20 plantas de tomate próximas a cada trampa delta, por lo que se han inspeccionado 60 plantas de cada tratamiento, una totalidad de 120 plantas en cada prospección. Para ello, se contó el número de galerías presentes en hojas, tallo y frutos, considerando que una planta ha sido atacada cuando se detecta al menos una galería. Además, se anotó la presencia o ausencia de estados inmaduros (larvas y pupas) en el interior de las galerías.

Con motivo del aumento de capturas de machos de *T. absoluta*, se realizó una última prospección diferente a las descritas con anterioridad. En esta se observaron todos los folíolos de dos hojas de la planta de tomate presentes a la altura de la vista de forma aleatoria. Se contó el número de galerías en los folíolos y la presencia de estados inmaduros en ellos. También, se observó la presencia de galerías en la totalidad de los frutos de la misma planta.

3.4. Estudio de la cinética de emisión de los emisores TUTATEC

En paralelo al ensayo, se estudió el contenido inicial de los difusores de confusión sexual y su cinética de emisión. Para ello, se colocaron, de forma adicional, 20 emisores TUTATEC bajo las mismas condiciones en el invernadero CS. De esta forma, se recogieron mensual y aleatoriamente cuatro emisores, y se almacenaron a -20 °C en bolsas herméticas correctamente identificadas hasta proceder a su análisis en laboratorio.

Para cuantificar la cantidad de feromona contenida en los difusores a los distintos tiempos de envejecimiento (0, 31, 62, 88 y 115 días), se realizó la extracción de la misma mediante maceración con disolvente. Cada difusor se cortó en pedazos de menos de 1x1 cm con ayuda de unas tijeras y se introdujo en un tubo de centrífuga de cristal de 50 mL con 23 mL de diclorometano y 2 mL de una disolución de patrón interno (*n*-dodecano). Estos se colocaron en un agitador magnético durante dos horas a temperatura ambiente.

El contenido residual de TDTA se determinó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC – FID) haciendo uso de un Cromatógrafo de gases Clarus®590 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, USA). Todas las inyecciones se realizaron en una columna ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA) sometida al siguiente programa de temperaturas: 120 °C durante un minuto y aumentando 20 °C por minuto hasta 250 °C, temperatura que se mantiene durante un minuto. Como gas portador se utiliza helio a 1,5 mL/min, siendo la temperatura del inyector 250 °C. Las áreas de los picos cromatográficos de la feromona y el patrón interno se procesaron mediante el software Totalchrom (Perkin Elmer Inc.). Estas áreas se relacionan mediante un modelo de regresión lineal del tipo $y = a + bx$, donde y es el ratio [área feromona / área *n*-dodecano] y x la cantidad de feromona. De forma ocasional, se realizan re-extracciones de emisores ya sometidos a extracción para corroborar la ausencia de feromona residual.

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

3.5. Cuantificación de feromona en aire

Para la cuantificación de compuestos volátiles, concretamente feromonas, mediante la captación de muestras de aire se ha seguido la metodología desarrollada por Gavara (2021). La primera captación se realizó dos semanas después de la instalación de los difusores de feromona con motivo del establecimiento de la feromona en el invernadero. Después, se realizaron periódicamente hasta el final del ensayo.

La captación de las muestras de aire se ha realizado con un captador de alto volumen (CAV-A/Mb, MCV, Barcelona, España) dispuesto en el centro del invernadero CS (**Figura 3.3a**), ubicación donde se considera que afectan en menor medida los factores externos al invernadero. Este está conectado a la red eléctrica y programado para la captación de la muestra a 15 m³ por hora durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se recoge el material adsorbente en bolsas herméticas correctamente identificadas y se almacena a -20 °C hasta su extracción. La identificación se basa en la fecha y metros cúbicos de aire captados.

El captador va equipado con un cabezal (PST – 810, MCV, Barcelona, España) al que se le introdujo un pre-filtro de microfibra de vidrio (Grado G-F1, MCV, Barcelona, España) para evitar la entrada partículas sólidas al cartucho de material adsorbente. El pre-filtro está situado previo a un contenedor de PVC (CBE, CAV, MCV, Barcelona, España) que contiene un cuerpo cilíndrico de vidrio, donde se introduce el material adsorbente, consistente en una espuma de poliuretano cilíndrica (10 cm de alto y 10 cm de diámetro) cuya densidad es de 30 g/L (MCV, Barcelona, España) (**Figura 3.3b**). Previo al uso de las espumas, estas se sometieron a un proceso de limpieza por maceración con una disolución 95:5 hexano-éter en un agitador magnético durante mínimo cuatro horas y su posterior secado en un desecador con bomba de vacío a temperatura ambiente hasta observar de forma visual que estas están secas (dos horas aproximadamente).

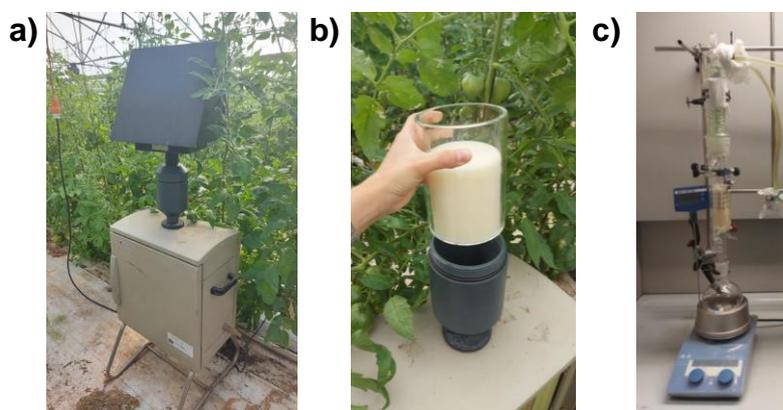


Figura 3.3. – Material para la captación y análisis de feromona en aire. Captador de alto volumen utilizado para la toma de muestras (**a**), contenedor con el cilindro de vidrio que aloja la espuma de poliuretano (**b**) y extracción tipo Soxhlet (**c**). (Fuente: Elaboración propia).

Para la extracción de las sustancias captadas en la muestra, se realizó una extracción de tipo Soxhlet (**Figura 3.3c**) haciendo uso de 300 mL hexano como disolvente, y sometiendo las espumas a más de 6 ciclos de extracción. El extracto resultante se concentró hasta 5 mL haciendo uso de un evaporador rotatorio, manteniendo la muestra en un baño de agua destilada aproximadamente a 30 °C.

Finalmente, se toman 0,5 mL de la muestra concentrada, a los que se añaden 50 μ L de 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanoato de heptilo (TFN) (patrón interno) previamente al análisis cromatográfico. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) (Trace 1300 GC; Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS/MS) (TSQ 8000 Evo, Thermo Scientific) trabajando en modo SRM (Monitoreo de Reacciones Seleccionadas). El cromatógrafo fue equipado con una columna capilar de sílice fundida ZB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) (Phenomenex Inc., Torrance, CA,

USA). El gas portador fue helio a un caudal de 1,5 mL/min, siendo la temperatura del inyector 250 °C y 280 °C la de la fuente de ionización.

Para cada componente de interés – TDTA y TFN – se optimizó el método MS/MS seleccionando el ion precursor y los iones producto cuyas determinaciones fueran más selectivas y sensibles (**Tabla 3.1.**). Para la obtención de las áreas cromatográficas se utilizaron la transición 2 para TFN y la 3 para TDTA. En el caso de las señales de TDTA, cuando se detectaron varios picos muy cercanos al pico del tiempo de retención de TDTA, se hizo uso de las otras transiciones (Transiciones 1, 2, 4, 5 y 6) con propósito de confirmación.

Tabla 3.1. – Valores óptimos de los parámetros de MS/MS de TFN y TDTA utilizados para cuantificar la concentración de feromona en aire de *Tuta absoluta*.

	Transición	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Energía de colisión (eV)
TFN	1	375,0	263,0	10
	2	393,0	373,0	5
TDTA	1	67,1	41,4	10
	2	79,1	77,0	10
	3	80,1	79,1	10
	4	93,1	77,1	10
	5	108,1	91,1	10
	6	108,1	93,1	10

La relación entre la cantidad de feromona y su área cromatográfica correspondiente se obtiene mediante un modelo de regresión lineal, $y = a + bx$, donde y es el ratio [área feromona / área patrón interno] y x es la cantidad de feromona.

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

3.6. Análisis estadístico

Los datos de número de machos capturados (por trampa y día) en las trampas de seguimiento de población instaladas en el invernadero control y el sometido a confusión sexual se introdujeron en un Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial, seguido de un test *post-hoc* LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher ($P < 0,05$), para estudiar el efecto del factor tratamiento sobre las capturas. También se introdujo el factor semana para evaluar el efecto del tiempo sobre las mismas. Los datos de capturas se transformaron previamente mediante $\log(x+1)$ para homogeneizar la varianza.

Los datos obtenidos en las distintas prospecciones de daño se analizaron como se detalla a continuación:

- Se utilizó un ANOVA simple (test LSD, $P < 0,05$) para conocer si existen diferencias en el porcentaje de folíolos atacados entre las plantas control y las sometidas a confusión sexual.
- Se utilizaron tablas de contingencia y la prueba del chi – cuadrado (χ^2) de Pearson para evaluar el efecto del tratamiento en el número de plantas atacadas por *T. absoluta*, el número de plantas con presencia de estados inmaduros de la plaga y el número de frutos atacados en la cosecha.

También se analizó estadísticamente mediante un análisis de regresión lineal simple la correlación entre el IIC y la concentración de feromona en aire.

Todos los análisis se realizaron mediante el software Statgraphics Centurion 18V. 18.1.13 (Statgraphics Technologies Inc., The Plains, VA, EEUU).

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la eficacia de la confusión sexual

4.1.1. Seguimiento de la población

La **Figura 4.1.** muestra la dinámica de población de *T. absoluta*, es decir, los machos capturados por trampa y día (CTD) en el invernadero control y en el que tiene lugar la confusión sexual. La media de CTD en el invernadero control fue de 11,35 y en el sometido a tratamiento con confusión sexual fue 3,08. Durante todo el ensayo se observó que las CTD en el invernadero control superaban aquellas del invernadero con feromona sexual. Además, se observa un aumento de las capturas en ambos invernaderos a partir del día 80, fecha en la que comienza la recolección de frutos, siendo la media antes de esta fecha de 4,4 CTD en el control y de 0,6 en el tratado; y después de 29,5 CTD en el control y 9,6 en el sometido a confusión sexual. Finalmente, a partir del día 110 se observa un aumento drástico en las CTD del invernadero con confusión sexual. El análisis estadístico indica que el factor tratamiento fue significativo y la confusión sexual redujo significativamente las capturas con respecto al control ($GI = 1,84$; $F = 158,03$; $P < 0,0001$). Esto indica que los machos tienen algún impedimento para alcanzar las trampas de seguimiento en el invernadero tratado con la feromona sexual. Con respecto al índice de inhibición de capturas (IIC), podemos observar que durante todo el ensayo es de más del 70%, excepto en los días 95 y 115 que es de 56,3 y 43,4% respectivamente.

Por otro lado, el análisis también indica que el factor semana tuvo un efecto significativo sobre las capturas ($GI = 16,84$; $F = 12,81$; $P < 0,0001$), lo que se debe a la propia dinámica poblacional de la plaga.

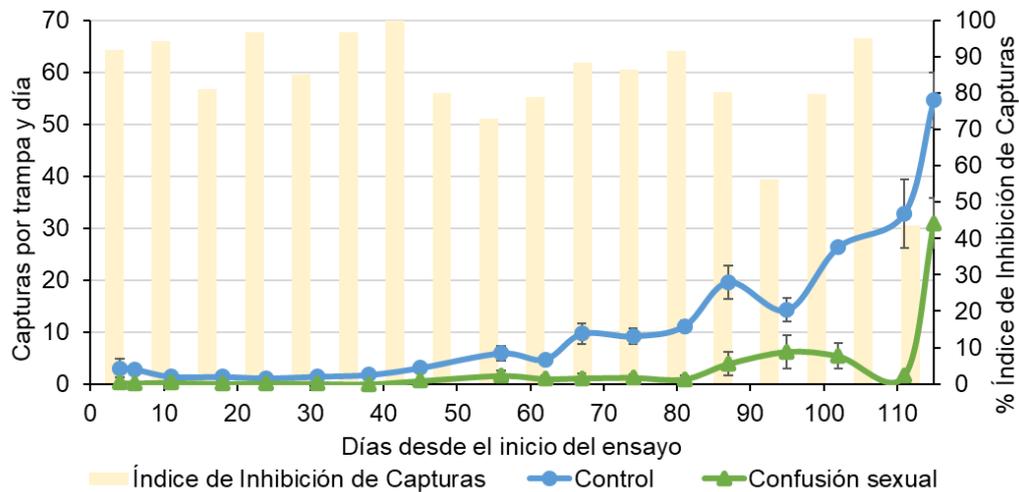


Figura 4.1. – Capturas por trampa y día desde el inicio del ensayo en el invernadero control y en el sometido a confusión sexual, e índice de inhibición de capturas.

4.1.2. Prospección de daños

Si nos fijamos en las prospecciones realizadas antes de la cosecha (días 31, 67 y 87 desde el inicio del ensayo) (**Tabla 4.1.**), en cuanto al porcentaje de plantas atacadas (%PA), el análisis estadístico indica que únicamente hay diferencias significativas entre tratamientos en la prospección llevada a cabo el día 67 ($\chi^2 = 4,675$; $P = 0,0306$), con un 90% de plantas afectadas en el caso de la confusión sexual y un 75% en el control (**Figura 4.2.**). Tanto en el día 31 como en el 87 no se observan diferencias significativas ($\chi^2 = 0,711$; $P = 0,3991$) y ($\chi^2 = 1,008$; $P = 0,3153$), respectivamente) (**Figura 4.2.**). Esto se debe a que la selección de plantas al realizar la prospección se hace de manera aleatoria.

Tabla 4.1. – Prospecciones de daños de *T. absoluta* en planta de tomate los días 31, 67 y 87 del ensayo.

		PI	PA	%PA	#GT	#LT	#PT	PEI	%PEI
Prospección 28-03-22 (31)	CS	60	17	28,3 a	26	9	0	7	11,7 a
	C	60	13	21,7 a	14	6	0	6	10,0 a
Prospección 03-05-22 (67)	CS	60	54	90,0 a	255	66	8	33	55,0 a
	C	60	45	75,0 b	189	51	5	26	43,3 a
Prospección 23-05-22 (87)	CS	60	60	100,0 a	812	32	1	20	33,3 a
	C	60	59	98,3 a	541	33	1	24	40,0 a

Plantas inspeccionadas (PI), Plantas atacadas (PA), Número de galerías totales (#GT), Número de larvas totales (#LT), Número de pupas totales (#PT), Plantas con estados inmaduros (PEI). Entre paréntesis días desde el inicio del ensayo. Para cada parámetro estudiado, valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (test χ^2 ; $P > 0,05$).

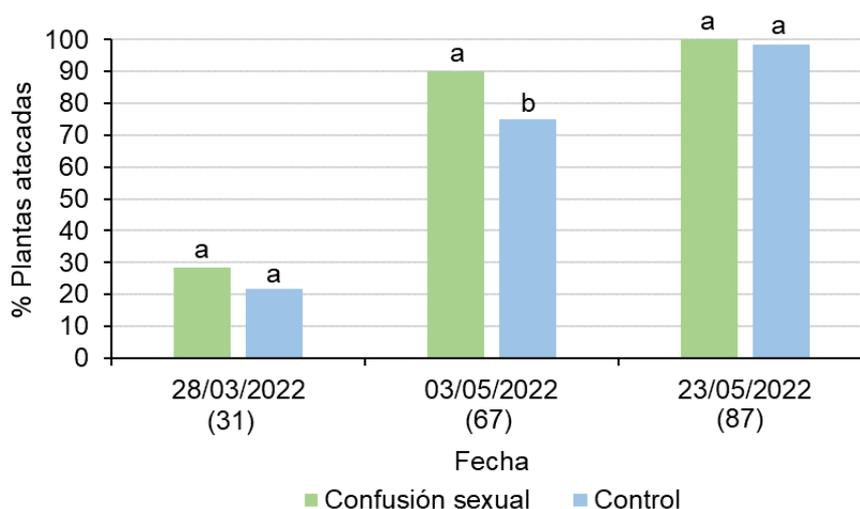


Figura 4.2. – Porcentaje de plantas atacadas durante las diferentes prospecciones en ambos tratamientos. Para cada fecha, barras etiquetadas con la misma letra no difieren significativamente (test χ^2 , $P > 0,05$).

En cuanto al número de plantas con presencia de estados inmaduros de *T. absoluta* (%PEI; **Tabla 4.1.**), observamos que no existen diferencias significativas en los tratamientos en ninguna de las prospecciones (día 31: $\chi^2 = 0,086$, $P = 0,7690$; día 67: $\chi^2 = 1,634$, $P = 0,2012$; día 87: $\chi^2 = 0,574$, $P = 0,4486$).

Finalmente, durante la prospección realizada en cosecha (día 111) (**Tabla 4.2.**) obtuvimos que el 96,7% de las plantas estaban atacadas en ambos tratamientos, por lo que no hubo ningún efecto ($P = 1,0000$). Así mismo, el tratamiento tampoco tuvo efecto en el grado de ataque, ya

que el porcentaje de foliolos afectados por planta tampoco presentaba diferencias significativas respecto al control (GI = 1,119; F= 2,23; P = 0,1378); presentando en el caso de la confusión sexual un 28,2% del total y un 23,9% del total de los foliolos inspeccionados en el caso del control.

Lo mismo ocurre con el número de galerías por foliolo revisado (GI = 1,118; F= 2,98; P = 0,0870) ya que se encontró una media de 0,4 galerías/foliolo en el caso de la confusión sexual y 0,3 galerías/foliolo en el control.

Con respecto a la presencia de estados inmaduros tampoco encontramos diferencias significativas ($\chi^2 = 2,828$; P = 0,0926), habiendo un 23,3% y 11,7% de plantas con estados inmaduros en el tratamiento con confusión sexual y control, respectivamente.

Tabla 4.2. – Prospección final de daños de *T. absoluta* en planta de tomate.

		PI	PA	% PA	FI	FA	% FA	# GT	G/F	# LT	PEI	% PEI
Prospección 16-06-22 (111)	CS	60	58	96,7 a	1217	343	28,2 a	458	0,4 a	17	14	23,3 a
	C	60	58	96,7 a	1154	276	23,9 a	328	0,3 a	10	7	11,7 a

Plantas inspeccionadas (PI), Plantas atacadas (PA), Foliolos inspeccionados (FI), Foliolos atacados (FA), Número de galerías totales (#GT), Galerías por foliolo (G/F), Número de larvas totales (#LT), Número de pupas totales (#PT), Plantas con estados inmaduros (PEI). Entre paréntesis días desde el inicio del ensayo. Para cada parámetro estudiado, valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (test χ^2 ; P>0,05).

En el caso de los frutos atacados, sí que se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, estando un 1,4% de los frutos atacados (14 de 1025 frutos inspeccionados) en el invernadero sometido a confusión sexual y un 3,5% en el control (35 de 1003 frutos inspeccionados) ($\chi^2 = 9,697$; P = 0,0018); es decir, se redujo el daño en un 60%.

4.2. Cinética de emisión de los emisores TUTATEC

Se estudió el perfil de liberación de TDTA de los emisores TUTATEC y la carga residual de feromona se ajustó a un modelo de regresión lineal hasta el día 115, de fin del ensayo. Así, se obtuvo una ecuación lineal (1): $y = -1,0901x + 249,08$, con un coeficiente de determinación: $R^2 = 0,9434$ (**Figura 4.3.**). Esto significa que la feromona se libera a una velocidad media constante durante el periodo del ensayo. Esta velocidad viene dada por la pendiente de la ecuación lineal (1), y es igual a 1,09 mg/día. Cabe destacar también el porcentaje residual de feromona en el emisor al acabar el ensayo que era de 46,9% (**Tabla 4.3.**).

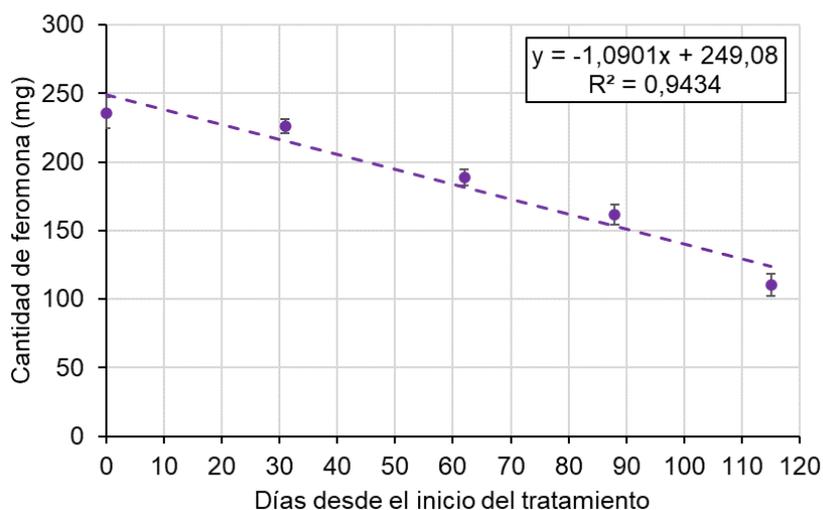


Figura 4.3. – Perfil de liberación de TDTA, el componente mayoritario de la feromona de *T. absoluta* y de los emisores TUTATEC.

Tabla 4.3. – Cantidad y emisión de feromona en los emisores de envejecimiento TUTATEC.

Días desde el inicio del tratamiento	Cantidad de feromona (mg)	Cantidad de feromona (%)	Emisión de feromona (mg/día)
0	235,8 ± 11,2	100,0	—
31	226,3 ± 5,2	96,0	0,3
62	188,7 ± 6,1	80,0	1,2
88	161,4 ± 7,4	68,4	1,1
115	110,6 ± 8,1	46,9	1,9
	Media		1,1 ± 0,3

4.3. Cuantificación de feromona en aire

La captación de volátiles y los consiguientes análisis químicos dieron como resultado concentraciones de feromona en aire (CFA) variables con una media global de 3,2 ng/m³. Sin embargo, la concentración media durante las cinco primeras captaciones realizadas fue de 4,6 ng/m³, mientras que la media disminuye hasta 1,8 ng/m³ durante las últimas semanas del ensayo.

A pesar de que se puede observar una tendencia de mayores IIC que corresponden a una mayor concentración de feromona en aire (**Figura 4.4.**), el análisis estadístico de regresión lineal simple realizado indica que no existe una correlación significativa entre ambas variables ($P = 0,3825$; $R^2 = 0,0964$).

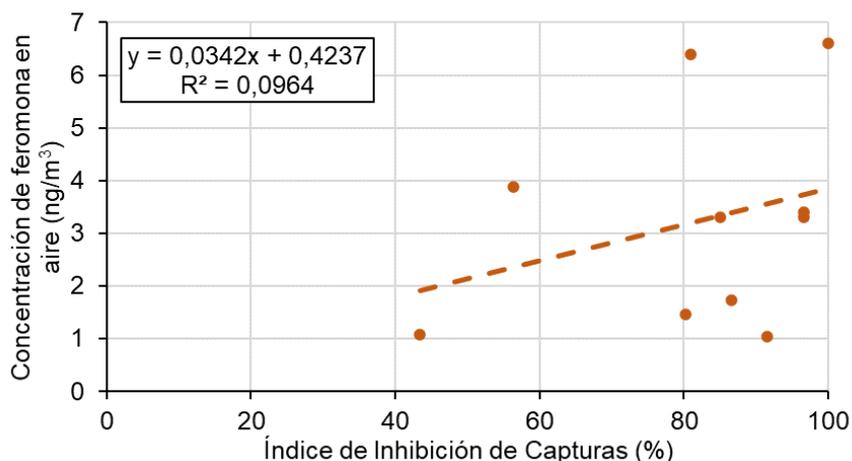


Figura 4.4. – Relación entre la concentración de feromona en aire y el índice de inhibición de capturas.

5. DISCUSIÓN

Los experimentos llevados a cabo en el presente Trabajo han puesto de manifiesto la importancia del grado de aislamiento para la eficacia de la confusión sexual de *T. absoluta* bajo invernadero. Atendiendo al seguimiento de la población, se observa un ascenso de las capturas una vez iniciada la recolección de frutos, algo que no ocurre en otros ensayos. En el llevado a cabo en Brasil y publicado por Michereff et al. (2000), las capturas en el control durante el estado vegetativo son de $233,3 \pm 53,1$ CTD y durante el estado reproductivo de $68,3 \pm 19,3$, es decir, disminuyen una vez comienza la recolección. En el presente Trabajo, la coincidencia del aumento de capturas con la recolección de frutos se debe probablemente a la pérdida de hermeticidad del invernadero y a la entrada de *T. absoluta* del exterior. El mantenimiento durante largos periodos de tiempo de la puerta abierta y la constante entrada y salida del personal con herramientas de trabajo, probablemente han promovido la migración de *T. absoluta* desde parcelas colindantes de cultivo de patata (*Solanum tuberosum* L.), importante hospedero alternativo de la plaga (Urbaneja et al., 2007), cuya cosecha se inició pocos días antes que la del tomate.

La cinética de emisión obtenida de los emisores poliméricos ensayados (TUTATEC) se ajusta a un modelo de regresión lineal, lo que indica que la emisión es sustancialmente constante. También resultó constante la cinética de los emisores poliméricos Isonet descrita por Cocco et al. (2013), así como la de los emisores mesoporosos empleados en los experimentos de Vacas et al. (2011). Sin embargo, estudiando la emisión de TUTATEC en detalle, aunque la velocidad media de emisión de feromona durante el ensayo fue de 1,1

mg/día, se observa que al inicio del ensayo la velocidad media fue de 0,3 mg/día. Esto se puede atribuir a las bajas temperaturas registradas durante el mes de marzo en el invernadero (media de 12,8 °C en marzo vs. 27,8 °C en junio), ya que es bien conocido que la velocidad de emisión de algunos tipos de emisores de feromona, especialmente los poliméricos, es muy dependiente de la temperatura (Gavara et al., 2022).

La emisión media diaria de feromona (1,1 mg/día) de los difusores empleados en el presente Trabajo es mucho mayor que la obtenida en el ensayo de Vacas et al. (2011), donde se alcanzaban emisiones máximas de 491,3 µg/día con emisores cargados con 80 mg de feromona. También se describen niveles de emisión menores en los experimentos de Cocco et al. (2013), en los que los emisores Isonet liberaron la feromona a razón de 216,6 µg/día. En cualquier caso, todos estos niveles de emisión son superiores al nivel considerado óptimo para la captura de 150 µg/día, descrito por Vacas et al. (2013). Velocidades de emisión por encima de este valor comienzan a tener efectos de confusión sexual sobre los machos de *T. absoluta*.

En relación al porcentaje de feromona residual, resultó del 46,9%, 115 días después de la instalación de los emisores de SEDQ, por lo que manteniendo la velocidad de emisión de 1,1 mg/día la duración estimada de los emisores sería de 228,5 días y no de 180 como especifica el fabricante. Esto es similar a lo que describen otros estudios: emisores mesoporosos en el día 124 contienen más del 60% (Vacas et al., 2011) y el 57% en el día 126 en el caso de aquellos poliméricos de Isonet (Cocco et al., 2013). Estos valores altos de carga residual son comunes, pero suponen un desperdicio de feromona, hecho que se podría optimizar, ya que el 90% del precio que supone el tratamiento corresponde al coste de la feromona (Vacas et al., 2015).

En el presente Trabajo, con una densidad de 300 emisores/ha se alcanza finalmente, tanto en control como en confusión sexual, un nivel del 96,7% de plantas afectadas. Parecido es lo que ocurre en el ensayo de Cocco et al. (2013) cuando usan una densidad de 500 emisores/ha, el 98,3% de las plantas resultan dañadas, superando al control. Sin embargo, estos porcentajes de ataque se redujeron al aumentar el número de emisores por hectárea, ya que con una densidad de 1000 emisores/ha consiguen que menos de la mitad (44,0 - 46,7%) de las plantas se vean afectadas.

Con respecto a los frutos atacados, medida final de la eficacia de la técnica, en los experimentos que hemos realizado, el tratamiento de confusión sexual ha conseguido una reducción del 60% respecto al control. Considerando la emisión media por emisor y la densidad de emisores empleadas, la dosis de feromona aplicada ha sido de 330 mg/ha/día. De la misma forma, Cocco et al. (2013), empleando 204,76 mg/ha/día consiguieron una

reducción del 62% en el número de frutos dañados. Sin embargo, cuando aplicaron 102,38 mg/ha/día se obtuvo un nivel de daño en fruto mayor que en el control. El hecho de que el tratamiento de confusión sexual haya conseguido una reducción significativa en el porcentaje de frutos dañados, aun no habiendo frenado el ataque en planta, resulta esperanzador para la aplicación de la técnica. No obstante, todavía hay margen de mejora en cuanto a la dosis de feromona a utilizar.

A pesar de haber podido medir los valores de concentración de feromona de *T. absoluta* en aire y observar que estos varían con el tiempo, no se ha podido establecer un valor umbral a partir del cual se consigue una confusión sexual eficaz. Puesto que la metodología llevada a cabo es de reciente desarrollo, existen pocos estudios que proporcionen datos de concentración de feromona en aire, aunque todos ellos se refieren a plagas de lepidópteros. Uno de ellos está realizado en el cultivo de viña (*Vitis vinífera* L.) para el control de *Lobesia botrana* (Denis and Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae), donde se describen concentraciones de feromona para las diferentes etapas del ciclo de cultivo, que varían desde 4,84 ng/m³ hasta 42,20 ng/m³ (Gavara et al., 2020). En cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) se ha obtenido que concentraciones de aproximadamente 1,60 ng/m³ son capaces de interferir en el vuelo del barrenador del arroz (*Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae) (Gavara et al., 2021). La concentración media cuantificada en el presente Trabajo ha sido de 3,2 ng/m³ para la feromona de *T. absoluta* en el interior de un invernadero, valor que se encuentra en el mismo rango de los arriba descritos. Sin embargo, este valor ha sido inesperadamente bajo considerando los que se llegaron a cuantificar para *L. botrana* en campo abierto. No obstante, el valor aquí determinado puede encontrarse en el rango eficaz para producir confusión sexual en lepidópteros, lo que no se ha podido confirmar debido a que otros factores, como la intrusión de plaga desde zonas colindantes, han podido influir en la eficacia del tratamiento.

La finalidad de determinar la concentración de feromona en aire es optimizar el uso de la feromona, tanto en su forma de aplicación como en su cantidad, para conseguir tratamientos sostenibles que sean competitivos con la rentabilidad del cultivo. Son necesarios más estudios de este tipo, en distintas condiciones de cultivo y con distintas condiciones del tratamiento de confusión sexual (e.g. distintas densidades de emisores) para determinar la concentración de feromonas eficaz. También, se requiere de investigación para intentar reducir los costes que supone la síntesis de feromona. Todo ello implicaría la obtención de conclusiones más consistentes que permitiesen aumentar el uso de semioquímicos como herramienta en el control de plagas y, por tanto, hacer del método de confusión sexual un método altamente eficaz y rentable que permitiese a los agricultores el uso de esta técnica.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Fin de Máster se obtienen las siguientes conclusiones:

1. El control de *T. absoluta* en invernadero de tomate mediante una estrategia integrada que incluye la confusión sexual es favorable en lo que a frutos dañados se refiere, ya que se ha conseguido una reducción del 60% con respecto al control.

2. El nivel de control de *T. absoluta* en invernadero está muy influenciado por el grado de aislamiento de la estructura.

3. La cinética de emisión de feromona sexual por parte de los emisores TUTATEC es sustancialmente constante con una velocidad media de 1,1 mg/día.

4. La metodología empleada para la captación de volátiles en aire ambiente y cuantificación de la concentración de feromona ha permitido, por primera vez, conocer la concentración de feromona sexual de *T. absoluta* durante un tratamiento de confusión sexual en cultivo de invernadero.

5. La concentración media de feromona de *T. absoluta* obtenida mediante el tratamiento de confusión sexual empleado (300 difusores TUTATEC por ha) ha sido de 3,2 ng/m³.

6. No se han podido correlacionar las concentraciones de feromona en aire (ng/m³) con la eficacia del tratamiento (dada como índice de inhibición de capturas). Esto ha sido debido a que otros factores han estado afectando a la eficacia de la técnica, por lo que se demuestra que la estrategia de manejo integrado resulta fundamental para la obtención de resultados óptimos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGUADO, A.M.; NÚÑEZ, E.; ALBALAT, A. 2010. La polilla del tomate. *Tuta absoluta*. Gobierno de Aragón. *Informaciones técnicas*, 2: 1 – 6.
- ATTYGALLE, A.B.; JHAM, G.N.; SVATOS, A.; FRIGHETTO, R.T.S.; MEINWALD, J.; VILELA, E.F.; FERRARA, F.A.; UCHOA-FERNANDES, M.A. 1995. Microscale, random reduction: Application to the characterization of (3E, 8Z, 11Z)-3, 8, 11-tetradecatrienyl acetate, a new lepidopteran sex pheromone. *Tetrahedron letters*, 36(31): 5471 – 5474.
- AYNALEM, M. 2017. Tomato leafminer [(*Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)] and its current ecofriendly management strategies: A review. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 10(2): 11 – 24.
- BLASSIOLI-MORAES, M.C.; LAUMANN, R.A.; MICHEREFF, M.F.F.; BORGES, M. 2019. Semiochemicals for Integrated Pest Management, en: *Sustainable Agrochemistry*, Springer. Cham (Germany), 85 – 112.
- BORGES, M; MORAES, M.C.B.; PEIXOTO, M.F.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R.; LAUMANN, R. A. 2011. Monitoring the Neotropical Brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. *Journal of Applied Entomology*, 135: 68 – 80.
- CAPARROS, R.; HAUBRUGUE, E.; VERHEGGEN, F. 2013. Pheromone-based management strategies to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 17(3): 475 – 482.
- CENTRO DE BIOCENCIA AGRÍCOLA INTERNACIONAL (CABI). 2022. Tomato leafminer portal. Distribution Maps. <https://www.cabi.org/isc/tuta>. (Consultado el 20 de junio de 2022)
- CHERIF, A.; HARBAOUI, K.; ZAPPALÀ, L.; GRISSA-LEBDI, K. 2018. Efficacy of mass trapping and insecticides to control *Tuta absoluta* in Tunisia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125: 51 – 61.
- COCCO, A.; DELIPERI, S.; DELRIO, G. 2013. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. *Journal of Applied Entomology*, 137: 16 – 28.
- DE CASTRO, M. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2383 – 2389.
- DEGUINE, J.P.; AUBERTOT, J.N.; FLOR, R.J.; LESCOURRET, F.; WYCKHUYS, K.A.G.; RATNADASAS, A. 2021. Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41:38, 1 – 35.
- DESNEUX, N.; WAJNBERG, E.; WYCKHUYS, K.A.G.; BURGIO, G.; ARPAIA, S.; NARVÁEZ-VASQUEZ, C.A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; CATALÁN RUESCAS, D.; TABONE, E.; FRANDON, J.; PIZZOL, J.; PONCET, C.; CABELLO, T.; URBANEJA, A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83: 197 – 215.
- Directiva 91/414/CEE, de 15 de julio, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 230, de 18 de septiembre de 1991. <http://data.europa.eu/eli/dir/1991/414/oj>. (Consultado el 1 de julio de 2022).
- EL-AASSAR, M.R.; SOLIMAN, M.H.A.; ABD-ELAAL, A.A. 2015. Efficiency of sex pheromone traps and some bio and chemical insecticides against tomato borer larvae, *Tuta absoluta* (Meyrick) and estimate the damages of leaves and fruit tomato plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1): 153 – 156.

- EL-GHANY, N.M.A. 2019. Semiochemicals for controlling insect pests. *Journal of Plant Protection Research*, 59(1): 1 – 11.
- EL-SHAFIE, H.A.F.; FALEIRO, J.R. 2017. Semiochemicals and Their Potential Use in Pest Management, en: *Biological Control of Pest and Vector Insects*, IntechOpen. London (United Kingdom), 3 – 22.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). 2005. Data sheets on quarantine pests: *Tuta absoluta*. *EPPO Bulletin*, 35: 434 – 435.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). 2008. First report of *Tuta absoluta* in Spain. *EPPO Reporting Service* 01-2008. <https://gd.eppo.int/reporting/article-486>. (Consultado el 14 de junio de 2022).
- EZZAT, S.M.; JEEVANANDAM, J.; EGBUNA, C.; MERGHANY, R.M.; AKRAM, M.; DANİYAL, M.; NISAR, J.; SHARIF, A. 2020. Semiochemicals: A green approach to pest and disease control, en: *Natural remedies for pest, disease and weed control*, Academic Press. Cambridge (Massachusetts, USA), 81 – 89.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2022. Manejo integrado de plagas. Manejo integrado de plagas y plaguicidas. <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/es/>. (Consultado el 16 de mayo de 2022).
- FRANCO, J.C.; COCCO, A.; LUCCHI, A.; MENDEL, Z.; SUMA, P.; VACAS, S.; MANSOUR, R.; NAVARRO-LLOPIS, V. 2022. Scientific and technological developments in mating disruption of scale insects. *Entomologia Generalis*, 42(2), 251 – 273.
- GARCÍA-MARÍ, F. 2003. Evolución del control integrado de plagas. *Actas del VI Congreso de Citricultura de la Plana* (Nules, 5 y 6 de marzo de 2003): 175 – 191.
- GAVARA, A. 2021. Cuantificación de feromonas en aire y su aplicación en métodos de control de plagas. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València, Valencia. 269 pp.
- 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: 1 – 19.
- GAVARA, A.; VACAS, S.; PRIMO, J.; NAVARRO-LLOPIS; V. 2021. Mating Disruption of Striped Rice Stem Borer: Importance of Early Deployment of Dispensers and Impact on Airborne Pheromone Concentration. *Rice Science*, 28(6): 525 – 528.
- GAVARA, A.; NAVARRO-LLOPIS, V.; PRIMO, J.; VACAS, S. 2022. Influence of weather conditions on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) mating disruption dispensers' emission rates and efficacy. *Crop Protection*, 155, 105926: 1 – 8.
- GONZÁLEZ-CABRERA, J.; MOLLÁ, O.; MONTÓN, H.; URBANEJA, A. 2010. Control biológico de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) con *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Phytoma España*, 217: 69 – 73.
- GONZÁLEZ-CABRERA, J.; MOLLÁ, O.; MONTÓN, H.; URBANEJA, A. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl*, 56: 71 – 80.
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (IRAC). 2022. IRAC Mode of Action Classification Scheme. Versión: 10.3. <https://irac-online.org/modes-of-action/>. (Consultado el 28 de junio de 2022).
- JONES, O.T. 2004. Parte tres. Aplicaciones prácticas de feromonas y otros semioquímicos, en: *Feromonas de insectos y su uso en el control de plagas*, Davinci. Barcelona (España), 279 – 371.

- MARTÍ, S.; M. MUÑOZ; E. CASAGRANDE. 2010. El uso de feromonas para el control de *Tuta absoluta*: Primeras experiencias en campo. *Phytoma España*, 217: 35 – 40.
- MICHEREFF, M.; VILELA, E.F.; JHAM, G.N.; ATTYGALLE, A; SVATOS, A.; MEINWALD, J. 2000. Initial studies of mating disruption of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) using synthetic sex pheromone. *J. Braz. Chem. Soc.*, 11: 621 – 628.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (MAPA). 2021. Guía de Gestión Integrada de Plagas. Solanáceas. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guiagipsolanaceas_tcm30-576872.pdf. (Consultado el 12 de mayo de 2022).
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (MAPA). 2022a. Avance de datos de Hortalizas, 2021. Superficies y producciones anuales de cultivos. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>. (Consultado el 20 de mayo de 2022).
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (MAPA). 2022b. Registro de Productos Fitosanitarios. <https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb>. (Consultado el 14 de junio de 2022).
- MOLLÁ, O.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; URBANEJA, A. 2011. The combined use of *Bacillus thuringiensis* and *Nesidiocoris tenuis* against the tomato borer *Tuta absoluta*. *BioControl*, 56: 883 – 891.
- MOLLÁ, O.; ALONSO, M.; SUAY, R.; BEITIA, F.; URBANEJA, A. 2013. Estrategias de control de *Tuta absoluta* en cultivo de tomate mediante la liberación y conservación de *Nesidiocoris tenuis* en la Comunidad Valenciana. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, 32(365): 161 – 165.
- MOSQUERA, O.M. 1990. Control de plagas agrícolas a través de feromonas poliedros regulares. *Revista de ciencias*, 3: 131 – 139.
- NAVARRO-LLOPIS, V.; ALFARO, C.; VACAS GONZÁLEZ, S.; PRIMO MILLO, J. 2010. Aplicación de la confusión sexual al control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Phytoma España*, 217: 32 – 34.
- ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA (OIRSA). 2015. *Manual de procedimientos para la vigilancia, prevención y control de la polilla del tomate Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) en la región del OIRSA*. Corporativo Editorial Tauro S.A. de C.V. México, 63 pp.
- ORTIZ, A. 2020. Un puzzle químico para comunicarse. *Boletín Sociedad Española de Entomología Aplicada*, 5: 10 – 16.
- PRASAD, K.V. 2022. Insect Chemical Ecology, en: *Insect Ecology: Concepts to Management*, Springer. Singapur, 61 – 76.
- QUIROZ, C. 1978. Utilización de trampas con hembras vírgenes de *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) en estudios de dinámica de población. *Agricultura técnica (Chile)*, 38: 94 – 97.
- RUISÁNCHEZ, Y. 2013. La palomilla del tomate (*Tuta absoluta*): una plaga que se debe conocer en Cuba. *Fitosanidad*, 17(3): 171 – 181.
- SEDQ. 2022a. Tutatec. Use in mating disruption to manage the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. <https://sedq.es/en/producto/tutatec/?pdf=16351>. (Consultado el 1 de junio de 2022).

- SEDQ. 2022b. Tatalab LT. Use in monitoring and pest reduction of *Tuta absoluta*. <https://sedq.es/en/producto/tatalab-lt/?pdf=16562>. (Consultado el 1 de junio de 2022).
- SOUZA, J.C.; REIS, P.R. 1986. Controle da da traça-do-tomateiro em minas gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 21: 343 – 354.
- TARUSIKIRWA, V.L.; MACHEKANO, H.; MUTAMISWA, R.; CHIDAWANYIKA, F.; NYAMUKONDIWA, C. 2020. *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on the “Offensive” in Africa: Prospects for Integrated Management Initiatives. *Insects*, 11 (11): 764, 1 – 33.
- URBANEJA, A.; VERCHER, R.; NAVARRO-LLOPIS, V.; GARCÍA-MARÍ, F.; PORCUNA, J.L. 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma España*, 194: 16 – 23.
- URBANEJA, A.; MONTÓN, H.; VANACLOCHA, P.; MOLLÁ, O.; BEITIA, F. 2008. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, una nueva presa para los míridos *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus pygmaeus*. *Agrícola vergel*, 320: 361 – 367.
- URBANEJA, A.; MONTÓN, H.; MOLLÁ, O. 2009. Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology*, 133(4): 292 – 296.
- URBANEJA, A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; ARNÓ, J.; GABARRA, R. 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Management Science*, 68(9): 1215 – 1222.
- VACAS, S. 2011. Uso de semioquímicos en el control de plagas. Estudios básicos y de aplicación. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València, Valencia. 328 pp.
- VACAS, S.; ALFARO, C.; PRIMO, J.; NAVARRO-LLOPIS, V. 2011. Studies on the development of a mating disruption system to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pest Management Science*, 67(11): 1473 – 1480.
- VACAS, S.; LÓPEZ, J.; PRIMO, J.; NAVARRO-LLOPIS, V. 2013. Response of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) to Different Pheromone Emission Levels in Greenhouse Tomato Crops. *Entomological Society of America*, 45(5): 1061 – 1068.
- VACAS, S.; NAVARRO, I.; 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.
- VERCHER, R.; CALABUIG, A.; FELIPE, C. 2010. Ecología, muestreos y umbrales de *Tuta absoluta* (Meyrick). *Phytoma España*, 217: 23 – 26.
- VOGEL, H.; HEIDEL, A.J.; HECKEL, D.G.; GROOT, A.T. 2010. Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *BMC Genomics*, 11(1): 1 – 21.
- WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. 2010. Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of chemical ecology*, 36(1): 80 – 100.