

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**VALORACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL DE LA
PROCESIONARIA DEL PINO, *Thaumetopoea pityocampa*,
BASADA EN LA UTILIZACIÓN DE SEMIOQUÍMICOS
RELACIONADOS CON LA OVIPOSICIÓN**

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

Trabajo de Fin de Máster

Autor: Dña. Leticia Gómez Pérez

Tutor: Prof. Dña. María Eugenia Rodrigo Santamalia

Tutores experimentales: Dña. Pilar Moya Sanz

Dña. Sandra Vacas González

Curso académico 2019/2020

Valencia, Julio 2020

VALORACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL DE LA PROCESIONARIA DEL PINO, *Thaumetopoea pityocampa*, BASADA EN LA UTILIZACIÓN DE SEMIOQUÍMICOS RELACIONADOS CON LA OVIPOSICIÓN

Resumen

Dada la problemática actual de la plaga de la procesionaria del pino, *Thaumetopoea pityocampa*, y la necesidad de su control, se hace necesaria la búsqueda de métodos alternativos más efectivos y ecológicamente seguros, que puedan ser utilizados en un sistema de control integrado de plagas.

En este trabajo se evaluó una posible metodología de control basada en la utilización de semioquímicos relacionados con el comportamiento ovopositor de las hembras. La existencia de productos descritos como atrayentes de oviposición (extracto de las acículas de *Pinus brutia*), así como, de productos disuasorios de oviposición (R-(+)-limoneno) hizo posible plantear una estrategia “push-pull”. La primera fase del trabajo consistió en desarrollar, en el laboratorio, los emisores del atrayente y del disuasorio que, posteriormente, serían utilizados en campo. Para evaluar la eficacia de la estrategia, en la segunda fase del estudio, se diseñó un experimento en campo con dos secciones de estudio. En cada sección se establecieron 6 bloques (3 bloques con emisores atrayentes y 3 bloques con emisores control) a lo largo del camino forestal, cada uno de los cuales estaba compuesto por 3 árboles con diferentes dosis, de forma que el primer árbol llevaba 1 emisor de extracto de *P. brutia*, el segundo árbol llevaba 2 emisores y el tercer árbol, tres emisores. Una sección se seleccionó para evaluar la estrategia push-pull con la colocación de los emisores para provocar el efecto disuasorio de la oviposición (componente “push” (R-(+)-limoneno), en las zonas más interiores de la masa forestal, alejados por lo menos 25 metros del camino forestal donde se encontraban los emisores del extracto de *P. brutia* (componente “pull”). En la segunda sección, a modo de control de la primera, no se colocaron los emisores de limoneno lo que permitió evaluar sólo la actividad atrayente de oviposición del extracto de *P. brutia*.

Los resultados del estudio no permitieron demostrar, de forma concluyente, que la estrategia push-pull propuesta pueda funcionar. Puesto que la emisión de extracto de *P. brutia* en las dos secciones fue estadísticamente similar, la disminución de las puestas de procesionaria en la sección con emisores de limoneno podría atribuirse a la presencia de este último compuesto, a diferencia de lo esperado. En el trabajo se argumentan varias razones que podrían haber provocado este inesperado resultado.

Ambos tipos de emisores desarrollados han funcionado correctamente en campo. Sin embargo, aunque los emisores de extracto de *P. brutia* han provocado una clara tendencia a aumentar el número de puestas en función de su dosis en el árbol, estas diferencias no se han podido establecer como significativas. Los resultados obtenidos con los emisores de extracto de *P. brutia* parecen indicar que, para mostrar un efecto atrayente eficaz, se podría precisar una mayor emisión del extracto.

Palabras clave: Procesionaria del pino, *P. brutia*, R-(+)-limoneno, “push-pull”, oviposición, emisor.

ASSESSMENT OF A PINE PROCESSIONARY MOTH CONTROL STRATEGY, BASED ON THE USE OF SEMIOCHEMICALS RELATED TO OVIPOSITION

Abstract

The pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa*, is a serious pest of pine trees in Spain which periodically needs control measures. Consequently it is necessary to find more effective and ecologically safe alternative methods, which may be used as an integrated pest control system.

In this study, the possibility of using a control methodology based on semiochemicals which are involved in the ovipositional behaviour of females was evaluated. This study was made possible due to the existence of products which possess oviposition attractant activity (extract of *P. brutia* needles), and other chemicals which deter oviposition (R-(+)-limonene). These previously described products allow for the development of our push-pull strategy. The first phase of the study consisted on the development, in the lab, of emitters for both the attractant and the deterrent. In order to evaluate the efficacy of our strategy during the second phase of our study, a field experiment with two distinct sections was designed. In each section, 6 blocks (3 blocks with attractant emitters and 3 blocks with non-extract-control emitters) were established following the edge of the forest pathway. Each block was comprised of 3 trees with different dosage. The first tree had only one emitter of *P. brutia* extract, the second tree 2 emitters and the third one, 3 emitters. The first section was selected to evaluate the push-pull strategy, as limonene emitters were placed to cause a deterrent effect in the most interior areas of the forest mass. These emitters were distanced, at least, 25 meters from the forest pathway, where the *P. brutia* extract emitters were found. In the second section, to act as a control for the previously mentioned section, no limonene emitters were placed, which allowed for the evaluation of the effect that the *P. brutia* extract had on oviposition.

The results of the study did not conclusively prove that the push-pull was an effective strategy for *T. pityocampa* control. As the emission of *P. brutia* extract was significantly similar in both sections, the fall of oviposition in the Limonene emitters section seem to be caused due to the Limonene, contrary to what was expected. In this study, several possible reasons for this unexpected result have been discussed.

Both types of emitters have worked correctly during field trials. Nonetheless, it was observed that as the number of emitters a tree had increased the number of egg masses also increased. Despite this, the difference in oviposition between trees with different number of emitters was not proven statistically significant. The results obtained from the *P. brutia* extract emitters studies seem to indicate that, in order to obtain an effective attractant effect, a larger extract emission could be required.

Key Word: Pine processionary moth, *Pinus brutia*, R-(+)-limonene, "push-pull", oviposition, emitter

Alumna: Dña. Leticia Gómez Pérez

Tutor académico: Prof. Dña. María Eugenia Rodrigo Santamalia

Tutores experimentales: Dña. Pilar Moya Sanz

Dña. Sandra Vacas González

Valencia, Julio 2020

Agradecimientos

Después de un año duro, y de una situación difícil, por fin puedo decir que llegó el día, termina para mí una etapa de aprendizaje y sacrificio con el que me llevo miles de recuerdos agradables. Al no haber realizado la carrera en esta Universidad, no sé lo que es vivir esos siete u ocho años todos juntos, tomando una cerveza a la salida de clase en el bar de Bellas Artes. Pero lo que sí sé, es que aquí me he sentido como si fuera mi casa. Por ello, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han estado a mi lado en todo momento, motivándome, enseñándome, y dándome siempre una oportunidad.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutoras experimentales, Pilar y Sandra, ya que sin ellas nada de esto hubiera sido posible, además de darme la oportunidad de poder aprender y trabajar al lado de ellas. Al igual que a mis compañeros de trabajo del Centro de Ecología Química Agrícola (CEQA), por su apoyo y ayuda en los momentos más difíciles, Ilde, Aitor, Raúl, Gara, Ismael, Juan, Vicente...Gracias!! Con un equipo así da gusto ir a trabajar.

También quisiera agradecer a todo el equipo de Conselleria que han colaborado, ya que este trabajo forma parte de un proyecto de investigación subvencionado por la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo rural, concretamente por la dirección General de Medio Natural y de Evaluación Ambiental (línea 58477000 del presupuesto de la Generalitat para el ejercicio 2019).

Gracias también a todos mis amigos porque ellos me han aportado toda esa ayuda vital y emocional que siempre fortalece en los momentos más complicados, Sara, Félix, Sergio, Jaime, Carmen, Elena, Adela, Vane, Toni...a todos vosotros, GRACIAS, gracias por estar ahí, por haberme hecho sentir como en familia, y por todas esas risas reconfortantes.

Y por último, gracias a mi familia y pareja por el apoyo en los momentos de crisis, y no permitir que flaqueara en ningún momento.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. LA PROCESIONARIA DEL PINO (<i>T. pityocampa</i>): HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN. | 1 |
| 1.2. IMPORTANCIA Y DAÑOS DE LA PLAGA..... | 2 |
| 1.3. TAXONOMIA Y MORFOLOGÍA DE <i>T. pityocampa</i> | 4 |
| 1.4. CICLO BIOLÓGICO..... | 5 |
| 1.5. MANEJO Y CONTROL DE LA PLAGA. | 6 |
| 1.5.1. Monitoreo y seguimiento de las poblaciones. | 7 |
| 1.5.2. Control cultural. | 7 |
| 1.5.3. Control químico..... | 7 |
| 1.5.4. Control biológico. | 8 |
| 1.5.5. Control biotecnológico..... | 9 |
| 1.5.6. Nuevas alternativas de control. | 10 |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 13 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 15 |
| 3.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE <i>P. brutia</i> Y ESTUDIO DEL PERFIL DE VOLÁTILES. ... | 15 |
| 3.1.1. Extracción de aceites esenciales de pino de la especie <i>P. brutia</i> | 15 |
| 3.1.2. Determinación cualitativa de la composición volátil del extracto de los brotes de <i>P. brutia</i> . 15 | |
| 3.2. CRITERIO Y DESARROLLO DE LOS EMISORES DE <i>P. brutia</i> | 16 |
| 3.2.1. Impregnación de los emisores <i>rubber septa</i> | 16 |
| 3.3. ESTUDIOS DE EMISIÓN DE LOS EMISORES <i>rubber septa</i> | 18 |
| 3.3.1. Determinación cuantitativa de los volátiles del extracto..... | 18 |
| 3.4. DESARROLLO DE LOS EMISORES DE LIMONENO Y DETERMINACIÓN DE SU CINÉTICA DE EMISIÓN..... | 20 |
| 3.4.1. Preparación de los emisores de limoneno..... | 20 |
| 3.5. ESTUDIOS EN CAMPO..... | 21 |
| 3.5.1. Determinación de la curva de vuelo de <i>T. pityocampa</i> | 21 |
| 3.5.2. Diseño del experimento de campo. | 21 |
| 3.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO. | 22 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 23 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.1. | COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VOLÁTILES DEL EXTRACTO DE <i>P. brutia</i> | 23 |
| 4.2. | EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DE LOS EMISORES IMPREGNADOS Y CUANTIFICACIÓN DE LOS VOLÁTILES..... | 26 |
| 4.3. | EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DE LIMONENO EN LABORATORIO..... | 27 |
| 4.4. | DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>T. pityocampa</i> | 29 |
| 4.5. | SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LAS PUESTAS DE <i>T. pityocampa</i> | 30 |
| 4.6. | EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DE LOS <i>rubber septa</i> EN CAMPO..... | 31 |
| 4.7. | EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DEL LIMONENO EN CAMPO..... | 33 |
| 5. | CONCLUSIONES | 35 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 36 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1: | Distribución mundial de la procesionaria del pino. Fuente: CABI, 2019. | 2 |
| Figura 2: | Grados de infestación de procesionaria del pino en una masa forestal. Fuente: Junta de Andalucía, 2013..... | 3 |
| Figura 3: | Esquema de la tecnología push-pull. Fuente: Cook <i>et al.</i> , (2007)..... | 12 |
| Figura 4: | Distribución geográfica de <i>Pinus brutia</i> . Fuente: www.euforgen.org (06/03/20)..... | 13 |
| Figura 5: | Impregnación de los <i>rubber septa</i> con el extracto puro de <i>Pinus brutia</i> de forma manual. Fuente: Elaboración propia..... | 17 |
| Figura 6: | Impregnación de los <i>rubber septa</i> con el extracto puro de <i>Pinus brutia</i> con rotavapor. Fuente: Elaboración propia..... | 17 |
| Figura 7: | Cámara de aireación para el envejecimiento acelerado de los <i>rubber septa</i> de los emisores con el extracto puro de <i>Pinus brutia</i> . Fuente: Elaboración propia..... | 18 |
| Figura 8: | Elaboración de la curva patrón o de calibrado. Fuente: Elaboración propia..... | 19 |
| Figura 9: | Extracción de los <i>rubber septa</i> envejecidos en diferentes tiempos. Fuente: Elaboración propia..... | 19 |
| Figura 10: | Concentración del extracto resultante de la extracción de los <i>rubber septa</i> , bajo una corriente suave de nitrógeno (A) y preparación de los viales con la solución patrón para su cuantificación (B). Fuente: Elaboración propia..... | 20 |
| Figura 11: | Botes de Polietileno de diferentes tamaños y diferentes orificios de emisión. Fuente: Elaboración propia | 20 |
| Figura 12: | Emisores de limoneno envejeciendo en la cámara de aireación para cinética de laboratorio (A), y emisores de limoneno envejeciendo en la terraza del edificio para cinética en condiciones externas (B). Fuente: Elaboración propia..... | 21 |

| | |
|--|----|
| Figura 13: Cromatograma del perfil de volátiles del extracto puro de <i>Pinus brutia</i> obtenido por SPME. Los tiempos de retención de los diferentes compuestos corresponden con los de la tabla 3..... | 24 |
| Figura 14: Cromatograma del perfil de volátiles del extracto puro de <i>Pinus brutia</i> obtenido por inyección directa. Los tiempos de retención de los diferentes compuestos corresponden con los de la tabla 3. | 24 |
| Figura 15: Curvas de emisión del β -pineno (A) y β -cariofileno (B) con un envejecimiento acelerado en condiciones de cámara en el laboratorio (30°C y 0,45 m/s de velocidad de aire).27 | |
| Figura 16: Estudio preliminar en condiciones de cámara de aireación en laboratorio para la selección del tamaño y orificio adecuados en los emisores de limoneno, con botes de PE de 100 ml (A), y botes de PE de 50 ml (B). | 28 |
| Figura 17: Comportamiento del emisor de limoneno seleccionado bajo condiciones de laboratorio, en cámara de aireación, y exteriores en terraza..... | 29 |
| Figura 18: Curva de vuelo de la procesionaria en La Vallesa (Paterna, València) en 2019. | 30 |
| Figura 19: Efecto de la dosis del extracto de <i>Pinus brutia</i> y de la presencia de la barrera de limoneno sobre la oviposición de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> . (RS: <i>rubber septa</i>)..... | 31 |
| Figura 20: Nivel de emisión ($\mu\text{g}/\text{día}$) medio de β -pineno y β -cariofileno a lo largo del ensayo. 32 | |
| Figura 21: Velocidad de emisión de los dispositivos de limoneno en campo. | 33 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Taxonomía de <i>Thaumetopoea pityocampa</i> | 4 |
| Tabla 2: Ciclo biológico de la procesionaria del pino en zonas de clima cálido. Fuente: Libro Sanidad Forestal, 2003..... | 6 |
| Tabla 3: Relación de los compuestos identificados y su proporción relativa en el extracto de <i>P.brutia</i> analizado por SPME y por inyección directa. | 25 |

ANEJO

ANEJO 1: FOTOGRAFÍAS DE LA MORFOLÓGIA Y CICLO BIOLÓGICO DE *Thaumetopoea pityocampa*

Figura 1: Adultos de la procesionaria del pino. Fuente: Battisti *et al.*, 2015.

Figura 2: Larva de procesionaria del pino estadio L3 o L4, vista lateral (a) y dorsal (b). Fuente: Battisti *et al.*, 2015.

Figura 3: Hembra de procesionaria del pino realizando la puesta entre dos acículas (a), puesta de huevos (b). Fuente: Elaboración propia.

Figura 4: Larvas de procesionaria del pino saliendo de los huevos (a), y larvas de procesionaria formando nidos de seda en otras partes el árbol (b). Fuente: Elaboración propia.

Figura 5: Orugas de procesionaria del pino elaborando el nido o bolsón de invierno. Fuente: Elaboración propia.

ANEJO 2: FOTOGRAFÍAS DEL SEGUIMIENTO Y CONTROL DE LAS POBLACIONES DE *T. pityocampa*.

Figura 6: Trampa G con la feromona (a), colocación del dispensador de la feromona por la parte superior (b). Fuente: Elaboración propia (a) y Econex (b).

Figura 7: Eliminación de puestas con el uso de pértiga. Fuente: Elaboración propia.

Figura 8: Barrera física para la captura de las orugas de la procesionaria del pino en su descenso por el tronco. Fuente: Econex.

Figura 9: Tratamiento de endoterapia en un árbol ornamental. Fuente: www.endoterapia-arborea.com (05/03/20).

Figura 10: Nido de murciélagos para el control de adultos de procesionaria del pino. Fuente: Econex.

ANEJO 3: MAPAS DEL DISEÑO DEL EXPERIMENTO EN CAMPO.

Figura 11: Mapa del experimento de campo mostrando las dos secciones y la distribución de las trampas. Fuente: Elaboración propia.

Figura 12: Detalle de la Sección 1 (atrayente + disuasorio) del ensayo de campo. Los números 1,2 y 3 corresponden al número de emisores colocados sobre el árbol. Fuente: Elaboración propia.

Figura 13: Detalle de la Sección 2 (sólo atrayente) del ensayo de campo. Fuente: Elaboración propia.

ANEJO 4: GRÁFICAS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *T.pityocampa* ENTRE LOS AÑOS 2016-2018.

Figura 14: Curva de vuelo de la procesionaria en La Vallesa (Paterna) en el año 2016. Fuente: Ayuntamiento de La Cañada.

Figura 15: Curva de vuelo de la procesionaria en La Vallesa (Paterna) en el año 2017. Fuente: Ayuntamiento de La Cañada.

Figura 16: Curva de vuelo de la procesionaria en La Vallesa (Paterna) en el año 2018. Fuente: Ayuntamiento de La Cañada.

AJENO 5: CLIMATOGRAMA DEL MES DE AGOSTO DEL 2019.

Figura 17: Climatograma de las temperatura mínimas y máximas medias durante el mes de Agosto del 2019. Fuente: AEMET.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA PROCESIONARIA DEL PINO (*T. pityocampa*): HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN.

El nombre del género al que pertenece nuestra especie en estudio deriva del griego y significa [insecto que] “hace cosas maravillosas”, posiblemente referido a la capacidad que tiene para realizar nidos de seda en las copas de los árboles y su posterior enterramiento para pupar mediante largas procesiones de individuos (Battisti *et al.*, 2015).

El género, *Thaumetopoea* sensu lato (Hübner, 1820), incluye una docena de especies en la región Paleártica y una en la región Afrotropical. En 1982, Freina y Witt, a través de la caracterización de los rasgos morfológicos de los adultos, dividieron dicho género en dos más (*Thaumetopoea* Hübner sensu stricto y *Traumatocampa*). Posteriormente, en 1987 realizaron una separación adicional de un nuevo género, (*Heliantocampa*) (Torres, 2016; Salvato *et al.*, 2002).

Dentro de este género de lepidópteros (*Thaumetopoea* sensu lato) existe una elevada variabilidad con respecto a los ciclos de vida, habiendo especies típicas de verano, como *Thaumetopoea pinivora* (Treitschke, 1834); *Thaumetopoea solitaria* (Freyer, 1838); *Thaumetopoea bonjeani* (Powell, 1922); etc. o de invierno, como las especies *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller, 1775); *Thaumetopoea wilkinsoni* (Tams, 1924); y *Thaumetopoea jordana* (Staudinger, 1894).

Las polillas de procesionaria identificadas en la cuenca mediterránea, pertenecen a nueve especies, de las cuales cuatro se encuentran en la Península Ibérica, *Thaumetopoea processionea* (Linnaeus, 1758); *Thaumetopoea herculeana* (Rambur, 1840); *Thaumetopoea pinivora* (Treitschke, 1834); y *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller, 1775), siendo esta última una de las plagas defoliadoras más importantes de nuestros pinares (López, 2014).

La procesionaria del pino (*T. pityocampa*) se extiende por toda el área mediterránea, desde el norte de África a todo el sur de Europa, y desde la costa atlántica hasta la parte occidental de Turquía (figura 1). Dentro de España, se puede localizar por toda la península e incluso en las Islas Baleares (Torres, 2016). La expansión de esta plaga, tanto a nivel altitudinal como latitudinal ya es notable, como consecuencia del incremento de las temperaturas invernales, asociado al cambio climático (Battisti *et al.*, 2005; Hórdar y Zamora, 2004).



Figura 1: Distribución mundial de la procesionaria del pino. Fuente: CABI, 2019.

1.2. IMPORTANCIA Y DAÑOS DE LA PLAGA.

La expansión de la procesionaria del pino, anteriormente comentada, conlleva una serie de importantes daños tanto ecológicos y económicos, como de salud pública (Torres, 2016):

-Daños forestales. Los pinares atacados por la procesionaria del pino sufren defoliaciones masivas que dan lugar a importantes pérdidas económicas, debidas al descenso en la producción de madera, y a un debilitamiento general del pinar. Provocan, además, un impacto paisajístico, que causa una pérdida de valor estético del monte (Jactel *et al.*, 2006; Torres, 2016). Tales defoliaciones suelen ser cíclicas, con años de infestación baja o nula, y otros con ataques considerables (Hórdar y Zamora, 2009).

-Daños ecológicos. La procesionaria del pino es una especie oligófaga que afecta fundamentalmente a especies del género *Pinus sp.*, pudiendo también afectar a cedros (*Cedrus sp.*) (Roques *et al.*, 2015). La expansión en altitud y latitud de esta plaga como consecuencia del cambio climático la está conduciendo a zonas donde hasta ahora no había estado presente (Battisti *et al.*, 2005, 2006). En estas zonas, donde los posibles hospedadores, como *P. sylvestris* L.; *P. mugo* Turra.; *P. uncinata* Mill.; *P. cembra* L., nunca han tenido un contacto previo con la procesionaria, no tienen capacidad de reacción frente al ataque y pueden sufrir defoliaciones masivas, en comparación con los hospedadores donde la plaga siempre ha estado presente, los cuales son relativamente resistentes a la defoliación (*P. nigra* Arnold.; *P. halepensis* Mill.; *P. pinea* L.; *P. brutia* Ten.) (Hórdar *et al.*, 2003; Torres, 2016).

Estas defoliaciones masivas en pinares que hasta ahora estaban libres de la plaga pueden llegar incluso a poner en peligro la biodiversidad de la zona (Hórdar *et al.*, 2003).

-Daños a la salud humana y veterinaria. Esta plaga es bien conocida por las alergias cutáneas que pueden llegar a provocar en el ser humano y animales domésticos (Vega *et al.*, 2003, 2004, 2011), causadas por los pelos urticantes de las larvas a partir del tercer estadio (Hórdar *et al.*, 2012).

Estos pelos urticantes tienen forma de arpón que, al clavarse y romperse en la piel, liberan una sustancia llamada taumetopeina que es liberadora de histamina, por lo que si la persona o animal es sensible provoca alergias que pueden llegar a ser graves, además de un dolor agudo en la zona afectada, ronchas, etc. (Vega *et al.*, 2003, 2004, 2011).

Todo esto repercute en el uso social del monte, afectando a caminos y zonas de paseo, áreas recreativas, etc., provocando una depreciación del mismo.

-Con el fin de poder adoptar las medidas necesarias para gestionar dicha plaga, se hace necesario conocer el estado de las poblaciones de la misma en un año determinado, evaluando los niveles de infestación existentes a través de los daños producidos por las colonias de orugas (Flores, 2019). Para ello, se lleva a cabo:

-División de la superficie del pinar en zonas homogéneas, evaluándolas de forma independiente (especies de pino, altitud, orientación).

-Asignación de niveles o grados de infestación, a través de una escala diseñada de modo general, con el objetivo de concentrar las evaluaciones realizadas por observadores diferentes y poder compararlas en distintos años.

Estos niveles o grados de infestación de procesionaria del pino (Agentes Medioambientales de la Generalitat Valenciana, 2005; figura 2), son:

-Grado 0: Ninguno o algunos bolsones muy diseminados. No se encuentran bolsones o su número es tan reducido que es difícil encontrarlos.

-Grado 1: Algunos nidos en los bordes de la masa forestal y pies aislados. Se observan nidos en árboles de bordes de caminos con cierta frecuencia, pero hay otros completamente limpios.

-Grado 2: Bastantes nidos en los bordes de caminos, y algunos en los centros de la masa forestal, aunque no se observan defoliaciones o son muy esporádicas.

-Grado 3: Defoliaciones parciales en los bordes de las masas forestales y pies aislados. Se observan muchos nidos en el centro de la masa.

-Grado 4: Defoliaciones muy fuertes en los bordes de las masas forestales y pies aislados, y parciales en el centro.

-Grado 5: Defoliaciones muy fuertes en toda la masa forestal, y pueden verse muy pocos árboles o ninguno que mantengan zonas parcialmente verdes.

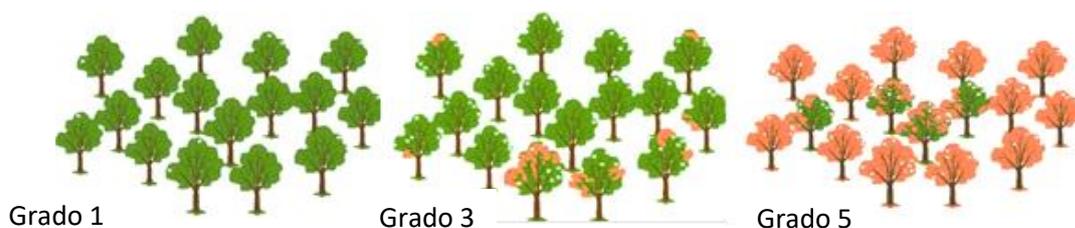


Figura 2: Grados de infestación de procesionaria del pino en una masa forestal. Fuente: Junta de Andalucía, 2013.

1.3. TAXONOMIA Y MORFOLOGÍA DE *T. pityocampa*.

La procesionaria del pino (*T. pityocampa*), es un lepidóptero defoliador que presenta una metamorfosis completa (holometábolo), es decir, pasa por los estados de huevo, larva, pupa e imago (adulto). En la tabla 1, se observa la clasificación taxonómica de esta especie.

Tabla 1: Taxonomía de *Thaumetopoea pityocampa*.

| Clasificación | |
|---------------------|---|
| Clase | Insecta |
| Orden | Lepidoptera |
| Superfamilia | Noctuoidea |
| Familia | Thaumetopoeidae |
| Género | <i>Thaumetopoea</i> |
| Especie | <i>T. pityocampa</i> (Denis & Schiffermüller, 1775) |

Morfológicamente, los adultos presentan un tamaño de entre 30-50 mm. Los machos se caracterizan por tener antenas pectinadas (en forma de peine) y amarillentas. El tórax está recubierto de pelos grisáceos con bandas oscuras más difusas y el abdomen es alargado y de color amarillento. Las alas anteriores son de color gris, con intensidad variable, en la que destacan tres líneas transversales y las posteriores blanquecinas con una mancha típica más oscura en la región anal (Anejo 1) (Hódar y Zamora, 2004; López, 2014; Battisti *et al.*, 2015).

Por otra parte, las hembras son ligeramente mayores que los machos, cuyo abdomen es cilíndrico, más grueso y cubierto por unas escamas doradas. Las alas anteriores son de color gris ceniza sobre las que destacan nerviaciones con bordes más oscuros y las posteriores, iguales que el macho, siendo la mancha anal ligeramente más grande; y, en general, de tonalidad menos intensa. Las antenas (filiformes) son mucho más largas que las de los machos. (Hódar y Zamora, 2004; López, 2014; Battisti *et al.*, 2015).

La oruga recién nacida presenta una longitud de 2,5 mm de largo, pasando por cuatro mudas a lo largo de su vida, llegando a alcanzar de 25 a 40 mm de largo. Después de la segunda muda es cuando adquiere su aspecto definitivo, con el tegumento de color gris azulado un poco más claro en la parte ventral (Hódar y Zamora, 2004; López, 2014; Battisti *et al.*, 2015).

En estado de oruga se pueden observar como los pelos laterales del abdomen y del tórax son de color blanquecino, y los dorsales de color amarillo-anaranjado. En el lateral presenta unos pliegues en el tegumento que forman una especie de estuche, donde se alojan las espesas matas de pelos urticantes de color anaranjado (Anejo 1). Estos pliegues, cuando la oruga está quieta, se mantienen cerrados, pero cuando se agita, se abren y libera los pelos,

que contaminan el ambiente pudiendo producir urticarias (Hódar y Zamora, 2004; López, 2014; Battisti *et al.*, 2015).

La oruga, al enterrarse para pupar se recubre con un capullo, siendo la crisálida de forma ovoide y, de color rojizo (Hódar y Zamora, 2004; López, 2014; Battisti *et al.*, 2015).

1.4. CICLO BIOLÓGICO.

El ciclo biológico de la procesionaria del pino (*T. pityocampa*) dura en general un año, aunque en algunos casos puede extenderse durante dos o más años por la diapausa. Este ciclo comprende dos etapas que se desarrollan en dos estratos diferenciados del ecosistema, una “aérea o epigea” sobre el pino (fases de adulto, huevo y larva) y otra “subterránea o hipogea” (fase de pupa). El paso de una etapa a otra se caracteriza por una migración primaveral y colectiva de las orugas ya maduras, y otra en verano, por la emergencia de los adultos que asegura su retorno sobre el hospedador vegetal (López, 2014).

En las zonas de climas fríos o latitudes elevadas, la emergencia de adultos se produce a partir del mes de junio, mientras que en climas más cálidos puede retrasarse hasta septiembre (Pimentel *et al.*, 2011). En general, las hembras suelen vivir alrededor de uno a dos días, mientras que los machos pueden vivir algo más (Zhang y Paiva, 1998), siendo aquellas las que seleccionan el árbol para realizar la puesta influenciadas por, el tamaño y posición del árbol, la forma de la copa y el grosor de las acículas (Stastny *et al.*, 2006).

La hembra fecundada (Anejo 1), realiza la puesta envolviendo los huevos entre dos acículas de una misma vaina; posteriormente, los cubre con las escamas doradas de su abdomen, formando una estructura de filas de huevos bien organizada a lo largo de las dos acículas. Puede llegar a poner entre 150-350 huevos en una única puesta, eclosionando éstos en julio, en los lugares más fríos, y en octubre, en los más cálidos (Zhang y Paiva, 1998).

El desarrollo embrionario depende, en gran medida, de los factores ambientales, siendo necesarios unos 780°C de suma de las temperaturas medias diarias para asegurar la incubación (integral térmica contada desde la puesta hasta la eclosión de los huevos) (López, 2014).

Las orugas desde que nacen ya empiezan a formar nidos de seda en los que se protegen, los cuales dejan vacíos cuando se van trasladando a otras zonas dentro del mismo árbol (Anejo 1). Normalmente estas larvas se alimentan durante la noche, y durante el día se protegen de depredadores y condiciones climáticas adversas dentro del nido (Torres, 2016).

La evolución larvaria se puede dividir en dos periodos. El periodo de “deambulación”, que abarca desde la eclosión de los huevos hasta el estadio L3, en el cual las orugas dejan un rastro de ramillos devorados y pequeños bolsones de seda mientras se desplazan por el árbol según preferencias térmicas y alimenticias, y el periodo de “nido de invierno”, que se corresponde con los últimos estadios (L4 y L5), en el cual la colonia no cambia de lugar, salvo desplazamientos alimentarios (López, 2014).

Los nidos de invierno (Anejo 1), son bolsas de seda grandes, donde las orugas pasan la estación desfavorable, asegurando así, la protección de la colonia ya que actúa como acumulador de calor. De esta forma, la colonia puede resistir temperaturas de hasta -12°C . Estos nidos normalmente se sitúan sobre las ramas más soleadas con orientación Sur, quedando así protegidos de los vientos Norte y Oeste (López, 2014).

Las procesiones se dan al final del quinto estadio, en general, de febrero a abril e incluso mayo, las orugas descienden del tronco de los pinos hospedadores siempre encabezadas por una hembra, que es la que guía y elige el lugar adecuado para el enterramiento masivo para la fase de pupación (Hódar y Zamora, 2004).

Durante la fase de pupa pueden presentar diapausa prolongada (hasta 9 años) si las condiciones ambientales no son favorables, por ello hay años en los que la plaga apenas es visible y otros se produce una explosión de la misma. Como resultado de esto, la emergencia de los adultos está muy influenciada por la temperatura y, a su vez, el momento de predicción de la oviposición (Pimentel *et al.*, 2011) (Ver tabla 2).

Tabla 2: Ciclo biológico de la procesionaria del pino en zonas de clima cálido. Fuente: Libro Sanidad Forestal, 2003.

| | Ene. | Feb. | Marz. | Abr. | May. | Jun. | Jul. | Ago. | Sept. | Oct. | Nov. | Dic. |
|--------------------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| Adulto | | | | | | | | ■ | | | | |
| Huevo | | | | | | | | ■ | | | | |
| Oruga | ■ | ■ | | | | | | | | ■ | | |
| Bolsones | ■ | ■ | | | | | | | | | ■ | ■ |
| Procesiones | | ■ | | | | | | | | | | |
| Crisálida | | | | | ■ | | | | | | | |

1.5. MANEJO Y CONTROL DE LA PLAGA.

Un buen manejo de la plaga requiere del uso de todas las herramientas disponibles para su control (físicas, mecánicas, químicas, biológicas, culturales), con el fin de mantener sus poblaciones en niveles aceptables, que no ocasionen daños económicos, aspirando siempre a reducir o eliminar el uso de plaguicidas y minimizar el impacto al medio ambiente.

Además, para un control eficaz, es necesario un conocimiento previo de la biología de la plaga (hábitos, ciclo de vida, necesidades y aversiones), tomar medidas preventivas (políticas de plantación de árboles menos susceptibles y/o métodos de detección temprana), y curativas (trampeo de adultos, eliminación de bolsones, barreras físicas, y aplicación de insecticidas), además del establecimiento de un umbral para decidir cuándo es el momento de actuar.

La normativa de salud pública y de régimen local establece que es de competencia de los ayuntamientos realizar acciones contra insectos que afectan a la salud pública. Dentro de este marco, está indicado que se realice el control de la procesionaria del pino en espacios verdes, áreas recreativas y entornos periurbanos frecuentados por la población, impidiendo su acceso si fuera necesario. Se recomienda efectuar el control antes de que las orugas lleguen al estadio L3, que es cuando empiezan a ser urticantes, además de advertir de su presencia e informar de su peligro (Ordenación y gestión forestal, Generalitat Valenciana, 2016).

1.5.1. Monitoreo y seguimiento de las poblaciones.

El seguimiento del vuelo de los machos adultos de *T. pityocampa* se realiza con el uso de trampas tipo “G”, cebadas con el componente mayoritario de la feromona sexual de la especie (acetato de (Z)-13-hexadecen-11-inilo; pityolure). Esta trampa consta de una caja de color marrón con dos accesos laterales en embudo para permitir la entrada de las polillas, un orificio superior donde se inserta el tapón que porta el dispensador de la feromona, y una abertura inferior que conecta con la bolsa receptora de las capturas (Anejo 2) (López, 2014).

Las trampas se cuelgan de las ramas y, de forma general, se colocan al comienzo del periodo de vuelo para la detección de la plaga y la observación del nivel de sus poblaciones que, mediante umbrales de tolerancia establecidos en cada zona, se podrá definir después el momento idóneo para adoptar medidas de control (López, 2014).

1.5.2. Control cultural.

Los métodos de lucha contra la procesionaria del pino, pueden variar en función del grado o nivel de infestación, realizando siempre, medidas preventivas o curativas si los niveles son considerables (Junta de Andalucía, 2013).

Se recomienda para niveles bajos de ataque (grados de infestación 0 y 1), realizar medidas culturales, como la eliminación manual de puestas, entre los meses de agosto a octubre, sobre todo en los árboles de pequeño tamaño con tijeras, o con pértigas si los árboles son de mayor tamaño (Anejo 2) (Ordenación y gestión forestal, Generalitat Valenciana, 2016).

La eliminación manual de bolsones es otra práctica cultural recomendada, siendo la época idónea para este tratamiento durante los meses de noviembre a febrero cuando todas las orugas ya han nacido y están entre el segundo o tercer estadio. Éstos se cortan, se apilan e incineran destruyendo las poblaciones larvales (Plagas y enfermedades de jardines, 1996).

Un tratamiento eficaz, es el uso de barreras físicas que se instalan a cierta altura del tronco (1,5 m o más). Este tipo de trampas consta de una lámina negra PET con un espesor determinado, y una barra de espuma de poliuretano de sección rectangular, atravesada en su parte media por un tubo corrugado que conecta con una bolsa de polietileno con su mitad inferior opaca (Anejo 2). La lámina negra está recubierta en su cara interior por una película de cola de contacto sin disolvente para facilitar el montaje y disuadir a las orugas de trepar por la lámina, forzándolas a que descendan por el tubo hacia la bolsa, donde quedan retenidas (Ordenación y gestión forestal, Generalitat Valenciana, 2016).

1.5.3. Control químico.

Los tratamientos químicos deben utilizarse de manera controlada, ya que pueden entrañar riesgos para el medio ambiente y la biodiversidad de la zona. Por ello, la aplicación de productos fitosanitarios debe llevarse a cabo por personal cualificado (Ordenación y gestión forestal, Generalitat Valenciana, 2016).

En el artículo 27, del Real Decreto 555/2019, de 27 de septiembre por el que se modifica el Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, se establece un marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. Se prohíben las aplicaciones aéreas de los productos fitosanitarios, salvo casos especiales, como aquellas autorizadas por el órgano competente de la comunidad autónoma donde vaya a realizarse, y en casos en los que suponga la única alternativa técnica y económicamente viable para combatir la plaga.

Las sustancias habitualmente utilizadas para su control, por su bajo poder residual y gran efectividad, son los piretroides como cipermetrina, deltametrina, etc. o los inhibidores de la síntesis de la quitina como el diflubenzurón (Liñan, 1992). Actualmente, se encuentran autorizados para su aplicación contra la procesionaria diversos formulados de los piretroides alfa-cipermetrina, deltametrina y lambda- cihalotrina, y de los reguladores del crecimiento azadiractina y tebufenocida (MAPA, 2020).

Su aplicación se realiza habitualmente en dos momentos del ciclo de la plaga en los que son más vulnerables; uno sería durante el primer y segundo estadio (L1 y L2), pudiendo emplear dosis bajas, y otro sería en el quinto estadio (L5), que es cuando las larvas descienden de los nidos y se pueden realizar aplicaciones directamente sobre ellas (García y Ferragut, 2002).

Entre los métodos químicos disponibles para el control de la procesionaria, cabe destacar la endoterapia, que consiste en la inyección directa en el árbol de los productos fitosanitarios autorizados, mediante una pequeña perforación que llega a los vasos vasculares conductores ascendentes (xilema) (Anejo 2). La solución entra en contacto con el árbol y los organismos que se alimentan de él. Se puede realizar en cualquier época del año, pero resulta más efectivo en coníferas en otoño debido al flujo de savia y al estado de la plaga.

Esta estrategia muestra una gran eficacia pero presenta dos desventajas importantes. La primera de ellas es que posee una gran persistencia pudiendo permanecer en el sistema vascular del árbol hasta dos años, afectando a toda la fauna del árbol en ese transcurso de tiempo. La segunda desventaja es el coste elevado del tratamiento. Por ello, solo está justificado en casos puntuales como en árboles monumentales, zonas recreativas o tratamientos de árboles en propiedades privadas (Ordenación y gestión forestal, Generalitat Valenciana, 2016).

1.5.4. Control biológico.

Según la Organización Internacional para la Lucha Biológica (OILB), el control biológico consiste en el uso de organismos vivos o sus productos para prevenir o reducir las pérdidas o daños causados por las plagas, siendo uno de los pilares fundamentales sobre el que se apoya el Control Integrado (Flores, 2019).

Un organismo no deseado debe eliminarse localmente o reducir su población hasta un nivel que no ocasione daños económicos, ya que su erradicación completa podría suponer problemas ecológicos, porque se eliminaría por completo el alimento del enemigo natural de

esa plaga. Por esta razón, lo que se persigue es, garantizar la supervivencia del agente controlador con el tiempo para mantener la plaga siempre en niveles adecuados que no causen daños (Flores, 2019).

El complejo de enemigos naturales que posee la procesionaria del pino juega un papel fundamental en su control, por lo que es importante no alterar estas poblaciones, siendo también importante, siempre que sea posible, no repoblar con especies de pinos que sean sensibles a esta plaga, como el *P. nigra*. Dentro del complejo de enemigos naturales destaca: (López, 2014)

Parásitos de los huevos de procesionaria. La gran mayoría son himenópteros como *Ooencyrtus pityocampae* (Mercet, 1921), *Baryscapus servadei* (Domenichini, 1965), *Anastatus bifasciatus* (Geoffroy, 1875) o *Trichogramma embryophagum* (Hartig, 1838).

Depredadores de huevos. Suelen ser diversos ortópteros como *Barbitistes fischeri* (Yersin, 1854), así como varias especies del Género *Steropleurus* como *S. andalusius* (Rambur, 1839) o *S. stalii* (Bolivar, 1877).

Parásitos de orugas. Algunos himenópteros como *Apanteles sp.* (Foerster 1862), *Erigorgus femorator* (Aubert, 1960) o *Meteorus versicolor* (Wesmael, 1835), y diversos dípteros como *Phryxe caudata* (Rondani, 1859), *Compsilura concinnata* (Meigen, 1824), *Exorista larvarum* (Linnaeus, 1758), que incluso atacan a las orugas en plena procesión de enterramiento.

Depredadores de orugas. Son sobre todo, aves insectívoras como *Parus major* (Linnaeus, 1758) conocido por carbonero común.

Depredadores de crisálidas. El más conocido es el lirón (*Eliomys quercinus*, Linnaeus, 1766).

Depredadores de adultos. Son, fundamentalmente, las hormigas rojas y los murciélagos (Anejo 2).

También pueden afectar a la procesionaria del pino diversos hongos entomopatógenos como *Paecilomyces farinosus* (Homlsk A. H. S. Brown. & G. Smith, 1957), *Beauveria bassiana* (Balsamo.-Criv. Vuillemin 1912) y *Cordyceps militaris* (Linnaeus: Fries Link 1833), virus como *Smithiavirus pityocampae* (Vago, 1951) y bacterias del tipo *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915), siendo éste último el tratamiento actual más extendido contra la plaga.

1.5.5. Control biotecnológico.

La aplicación de feromonas puede resultar una herramienta eficaz para el control de plagas. Esta alternativa, sobre todo se dirige a la detección y seguimiento de poblaciones y a métodos directos de control (principalmente captura masiva y confusión sexual) (Vacas, 2011).

La captura masiva o trampeo masivo, consiste en el uso de un elevado número de trampas por hectárea para controlar la plaga al capturar una proporción de individuos de una

población elevada. Esta técnica presenta ciertas desventajas como, el elevado coste del diseño de trapeo, la posibilidad de saturación de las trampas o captura únicamente de machos, pero puede resultar ventajosa con el uso de trampas eficaces y potentes atrayentes, tanto para machos como para hembras (Vacas, 2011).

La confusión sexual se basa en bloquear la comunicación entre los insectos macho y hembra, mediante la saturación del medio con feromona sexual para reducir o impedir las cópulas, evitando así la reproducción de la especie (Vacas, 2011).

Recientemente, se han realizado una serie de experimentos para el control de *T. pityocampa* mediante la aplicación de feromonas. Entre ellos, destacan los estudios realizados por Trematerra *et al.* (2019 a), en el que describen un ensayo de trapeo masivo, durante dos años, en el que se instalaron 10 trampas/ha cebadas con feromona sexual para la atracción solo de los machos, demostrando una reducción de las puestas de un 88% en el primer año, y un 94% en el segundo con respecto a una parcela control. Además de otro experimento también realizado durante dos años, para demostrar el potencial de la confusión sexual en el control de la procesionaria del pino. En este caso, utilizan una formulación de la feromona de tipo pasta, aplicando unas pequeñas gotas en el tronco de cada árbol y creando un ambiente saturado de la feromona. Mediante el seguimiento del vuelo de los machos y la revisión de las puestas, se demuestra que el tratamiento con feromona consigue inhibir la captura de machos en un 91% y reducir las puestas también en más de un 90%, respecto a una zona control (Trematerra *et al.* 2019 b).

Por lo tanto, ambas estrategias que pueden resultar una alternativa interesante para el control de la procesionaria del pino, sobre todo cuando se encuentra en parques urbanos y suburbanos o en áreas recreativas, en los que otros tratamientos pueden resultar perjudiciales, caros, y/o poco prácticos (Trematerra *et al.*, 2019).

1.5.6. Nuevas alternativas de control.

El uso de productos químicos para la lucha contra plagas ha sido una herramienta agroforestal muy útil durante muchas décadas, pero el uso y abuso de los mismos, ha generado graves consecuencias, como residuos tóxicos, desarrollo de resistencias, explosiones de plagas secundarias, y en general problemas de toxicidad. Como respuesta a este problema, se comenzaron a desarrollar nuevas estrategias de control con el desarrollo de “métodos biorracionales”, cuya acción se basa en el conocimiento de los procesos fisiológicos y bioquímicos, patología, y sistemas de comunicación intra e interespecífica de los insectos, con el fin de obtener agentes capaces de interferir en cualquiera de estos procesos (Vacas, 2011).

Los semioquímicos son compuestos implicados en la comunicación entre insectos, y se dividen en dos grupos (Howse, 1998):

- Feromonas: implicadas en la comunicación intraespecífica.
- Aleloquímicos: implicados en la comunicación interespecífica.

Las feromonas más estudiadas son las sexuales. Son generalmente emitidas por las hembras y, provocan en el macho una respuesta de atracción y cópula. Por otro lado, los aleloquímicos, son compuestos liberados por un hospedador, que pueden afectar al comportamiento o fisiología del insecto, pudiendo tener un efecto positivo o negativo, siendo una potencial herramienta de control de plagas (Vacas, 2011).

Numerosos estudios demuestran que muchos insectos fitófagos utilizan los volátiles de la planta para localizarlas, en particular durante la puesta de huevos, por lo que las sustancias emitidas por las acículas de diferentes especies de pino pueden influir en la selección por parte de las hembras (Stastny *et al.*, 2006). Este tipo de sustancias las clasificaríamos dentro de los aleloquímicos, y más concretamente como kairomonas.

Anteriormente, Tiberi *et al.* (1999), estudió la composición de monoterpenos de las acículas de cinco especies de *Pinus spp*, demostrando que los dos isómeros de limoneno tenían un efecto disuasorio en la selección del huésped por *T. pityocampa*. Aunque, posteriormente, los estudios de Niccoli *et al.* (2008) muestran resultados contradictorios respecto a la actividad repelente de los dos isómeros de limonenos, los trabajos de Pérez-Contreras *et al.* (2008) parecen confirmar la preferencia de la oviposición de las hembras, con el contenido de metabolitos secundarios, observando que los árboles con mayores niveles de monoterpenos (incluyendo el limoneno) eran los menos atacados.

Posteriormente, Paiva *et al.* 2011, encontró diferencias significativas entre cuatro especies de *Pinus spp.*, con respecto al número de nidos o bolsones de procesionaria. El estudio demuestra que, las hembras de procesionaria del pino muestran una mayor atracción por la especie *P. brutia*, en comparación con otras especies de pino (*P. pinaster*, *P. halepensis*, y *P. pinea*), localizándose en dicha especie una mayor carga de lotes de huevos. En cambio, la especie *P. pinea* que tiene niveles altos de limoneno, presentó la menor carga de lotes de huevos, demostrando así el efecto disuasorio de la oviposición del limoneno.

Basándonos en los resultados descritos en los párrafos anteriores podríamos disponer de dos herramientas interesantes desde un punto de vista del control de la oviposición. Por una parte, un atrayente interesante, el extracto de *P. brutia* y, por otro lado, un repelente o disuasorio de la oviposición. Si ambas herramientas fuesen lo suficientemente potentes se podría pensar en establecer una metodología de control basada en una estrategia “push-pull”

La tecnología push-pull es un nuevo método de control de plagas que se está implementando como alternativa a los métodos tradicionales de control. Es un método libre de insecticidas convencionales que proporciona medidas adecuadas y accesibles de control, siendo respetuoso con el medio ambiente y económicamente rentable. Se ha convertido en una estrategia muy popular en Australia y África para la protección de cultivos agrícolas. De forma muy concisa, esta tecnología funciona mediante el uso de “plantas complementarias” que disuaden y repelen (empujan: push) a los insectos plaga de cultivos agrícola importantes y el uso de “plantas señuelo” que atraen a los insectos repelidos a lugares concretos donde son atrapados o depredados por insectos beneficiosos.

Un ejemplo de esta estrategia desarrollada en África y que está dando buenos resultados se muestra, de forma esquemática, en la figura 3 (Cook *et al.*, 2007). Consiste en intercalar las plantas de cereales, maíz en este caso, y el Desmodium, que es una leguminosa nativa de África y repelente de insectos. En la zona perimetral del cultivo se siembra una planta atrayente del insecto-plaga (en este caso, *Pennisetum purpureum* Schumach., también conocida como Napier Grass, utilizada como forraje de alta calidad para el ganado). El Desmodium emite unos semioquímicos que repelen a los barrenadores del tallo del maíz más importantes en África, *Busseola fusca* Fuller, 1901 (Lepidoptera: Noctuidae) y *Chilo partellus* Swinhoe, 1885 (Lepidoptera: Crambidae). El Napier grass juega entonces su papel como planta señuelo, provocando la atracción no sólo de los barrenadores del tallo del maíz, que acuden de forma masiva a ovipositar en ella, sino también de otros insectos depredadores de las polillas.

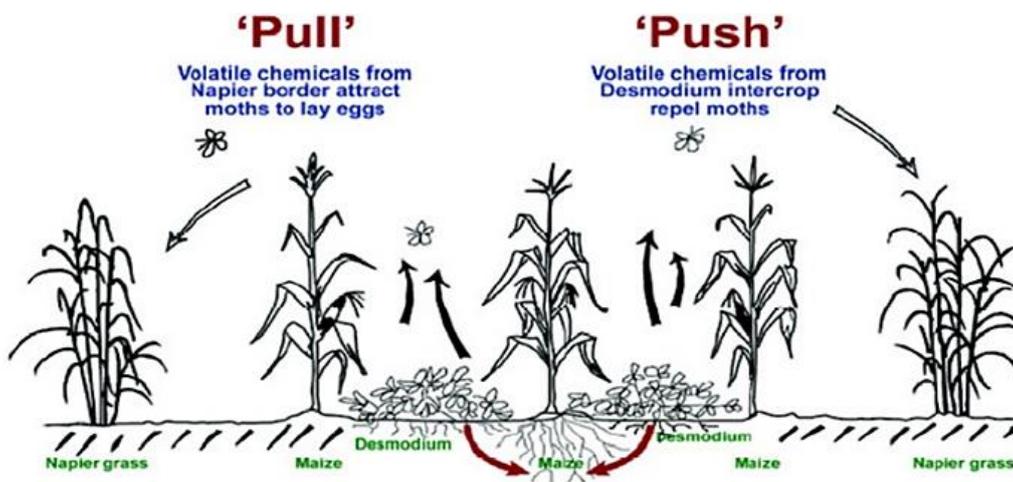


Figura 3: Esquema de la tecnología push-pull. Fuente: Cook *et al.*, (2007).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En este estudio proponemos valorar, en campo, una versión de la estrategia push-pull basada directamente en el uso de semioquímicos (en lugar de en plantas complementarias) los cuales han sido previamente descritos como atrayentes y repelentes de la oviposición de las hembras de *T. pityocampa* y que, en nuestro caso, utilizaremos como componentes “pull” y “push”, respectivamente.

Como ya se ha comentado, nuestro componente “pull” sería el extracto de *P. brutia*, según los resultados de Paiva *et al.*, (2011).

Los *P. brutia* se caracterizan, por ser árboles de gran tamaño, llegando a alcanzar los 30-35 m de altura y un metro de diámetro de tronco. Las acículas, de color verde oscuro, son de 10 a 18 cm de largo y, las flores masculinas y femeninas están localizadas en diferentes partes del árbol, dando lugar a una gran diseminación de semillas. Respecto a su hábitat, puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 600 m en el norte del Mediterráneo y hasta los 1.400 m en el sur. El desarrollo óptimo de *P. brutia* requiere precipitaciones de entre 350 y 700 mm, y una temperatura media de las mínimas entre -5°C y 10°C (Frankis *et al.*, 1999).

Pinus brutia, cubre extensas áreas al este del Mediterráneo, como Grecia, Turquía, Chipre, Siria, y Líbano (figura 4), siendo la especie de conífera más importante en Turquía. De hecho, posee, más de 3,5 millones de hectáreas de bosque de *P. brutia*, lo que hace de su explotación un importante motor económico del país, tanto a nivel de producción de madera como de extracción de resina y producción de miel (Frankis *et al.*, 1999).



Figura 4: Distribución geográfica de *Pinus brutia*. Fuente: www.euforgen.org (06/03/20).

El componente “-push”, como también se ha mencionado, sería el isómero R-(+)-limoneno que, aunque con resultados controvertidos, parece que podría ser un repelente adecuado.

Para las aplicaciones de estos semioquímicos en campo, tanto atrayentes como repelentes, es necesario disponer de un dispositivo (emisor o difusor) que emita las distintas sustancias al ambiente de manera controlada y prolongada en el tiempo, para que actúen de forma eficaz.

La evaluación de la estrategia consistiría en la colocación de emisores del repelente en las zonas más interiores de la masa forestal y emisores del atrayente en el borde, aprovechando la tendencia natural de las hembras de la procesionaria a realizar las puestas en los bordes de las masas, caminos, etc. Una vez concentradas las puestas, resultaría más fácil su control, por ejemplo, mediante la eliminación manual de puestas o bolsones, con la colocación de las barreras físicas en los troncos para capturar las larvas en su descenso del árbol o, incluso, con la colocación de dispositivos de liberación de parasitoides de huevos en la zona de atracción.

Según todo lo expuesto, los objetivos concretos del presente trabajo son:

- (1) Diseño y elaboración de emisores del extracto de *Pinus brutia* y del limoneno y, estudio de sus cinéticas de emisión, en condiciones de campo y de laboratorio.
- (2) Diseño de un experimento en campo capaz de evaluar la estrategia push-pull propuesta para el control de *T. pityocampa*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE *P. BRUTIA* Y ESTUDIO DEL PERFIL DE VOLÁTILES.

3.1.1. Extracción de aceites esenciales de pino de la especie *P. brutia*.

Para la extracción se han utilizado brotes frescos del último año de la especie *Pinus brutia*, facilitados por el Jardín Botánico de València, aprovechando la poda de ramas de ese año.

Los brotes se trituraron en un molinillo eléctrico (Jata electro ML 130) para favorecer la extracción. Después del triturado, se añadieron 300 g del material obtenido y 1800 mL de una mezcla de éter-etílico >99,5%/pentano 99,35% (50:50) (Fisher Scientific SL, Madrid), en un matraz Erlenmeyer de 5L, dejándolo en agitación durante 4 horas en una placa a 100 rpm.

El extracto resultante se filtró, utilizando un embudo de cristal y papel Whatman de 30 µm (Scharlab SL, Sentmenat, Barcelona), almacenándolo en una botella de topacio de 2,5L, y conservándolo a 4°C hasta el momento de su utilización (Paiva *et al.*, 2011).

3.1.2. Determinación cualitativa de la composición volátil del extracto de los brotes de *P. brutia*.

Para la identificación de las sustancias volátiles que componen el extracto puro, se analizó una muestra utilizando fibras adsorbentes mediante la técnica de captación de volátiles llamada micro-extracción en fase sólida (solid-phase microextraction (SPME), (Arthur y Pawliszyn, 1990). Consiste brevemente en colocar una muestra del extracto en un vial hermético y exponer la fibra de SPME al espacio de cabeza del vial que contiene los volátiles, de manera que éstos quedan adsorbidos a la fibra. Las sustancias captadas se recuperan por desorción térmica y la composición de la muestra se analiza mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). En este caso, se tomó una muestra de 1 mL del extracto de *P. brutia* que se introdujo en un vial hermético de 10 mL. Se dejó equilibrar durante 30 min y pasado ese tiempo se expuso una fibra de SPME (de tipo polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), Supelco, Sigma-Aldrich, Madrid) al espacio de cabeza durante 1 h. Para la posterior desorción y análisis de la muestra se utilizó un equipo Clarus 600 GC/MS de Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, EEUU), equipado con una columna capilar de sílice fundida ZB-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm) de Phenomenex Inc. (Torrance, CA, EEUU). La temperatura del inyector se programó a 250 °C, mientras que el horno del CG se programó con la siguiente rampa de temperaturas: 40 °C durante 2 min, 5 °C/min hasta 180 °C y posteriormente a 10 °C/min hasta 280 °C, temperatura a la que se mantuvo durante 1 min (tiempo total de análisis = 41 min). El gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó en modo de Impacto Electrónico (EI), con una energía de ionización de 70 eV y utilizando un escaneo total de iones entre m/z 35-500. La temperatura de la fuente de ionización se programó a 200 °C y la de la línea de transferencia a 250 °C. Los cromatogramas y espectros se procesaron con el software Turbomass v 5.4 de Perkin Elmer.

La identificación de las sustancias se realizó comparando el tiempo de retención y el espectro de masas de forma tentativa basado en coincidencias de alta probabilidad (>80%) de acuerdo con la biblioteca de espectros de masas NIST *MS Search routine* (NIST Mass Spectral Search Program for the NIST \EPA\NIH Mass Spectral Library, version 2.0, build 4/2005).

Puesto que el método que se empleará para estudiar las cinéticas de emisión de los emisores será la CG por inyección directa del extracto de *P. brutia*, se procedió a realizar la comprobación previa para confirmar si los compuestos volátiles mayoritarios observados por esta metodología se correspondían con los obtenidos mediante SPME. Para realizar esta comprobación se inyectó 1 µL en el equipo de CG/EM y se analizó la composición empleando los mismos parámetros detallados anteriormente.

3.2. CRITERIO Y DESARROLLO DE LOS EMISORES DE *P. BRUTIA*.

Para poder evaluar correctamente la estrategia de control propuesta en el apartado 1.5.6, es necesario disponer de dispositivos que emitan el extracto de forma duradera en el tiempo, es decir, que tenga una cinética de emisión adecuada. Una cinética ideal, sería aquella en la que se evita una emisión inicial elevada y una carga residual alta al final del tratamiento (Vacas, 2011).

Uno de los emisores más utilizados, sobre todo en los estadios más iniciales de un estudio, son los *rubber septa*. Son piezas de goma, en forma de copa, con gran capacidad de absorción, además de baratos y de fácil aplicación, pero presentan la desventaja de tener una vida útil muy corta y, por lo tanto, requiere de varias reposiciones durante el periodo de estudio o tratamiento (Vacas, 2011). A pesar de su corta vida útil, la información que proporcionan, como ya se ha comentado, en las fases iniciales de los estudios, es muy importante y sirven de base para el posterior desarrollo de emisores más adecuados, con cinéticas de emisión más constantes y duraderas en el tiempo, que muestren menos sensibilidad a las condiciones climáticas y que sean económicamente viables (Vacas, 2011).

3.2.1. Impregnación de los emisores *rubber septa*

Se evaluaron dos métodos diferentes de impregnación de los emisores, con el fin de determinar si esta variable podría influir en su posterior cinética de emisión en campo:

-Impregnación manual:

Se impregnaron 15 *rubber septa* con 0,25 mL cada uno y de manera consecutiva, hasta completar un volumen final de 1mL por cada septum, debido a la incapacidad del septum de contener el volumen total. Para ello se utilizó una jeringuilla graduada de 1mL (figura 5).

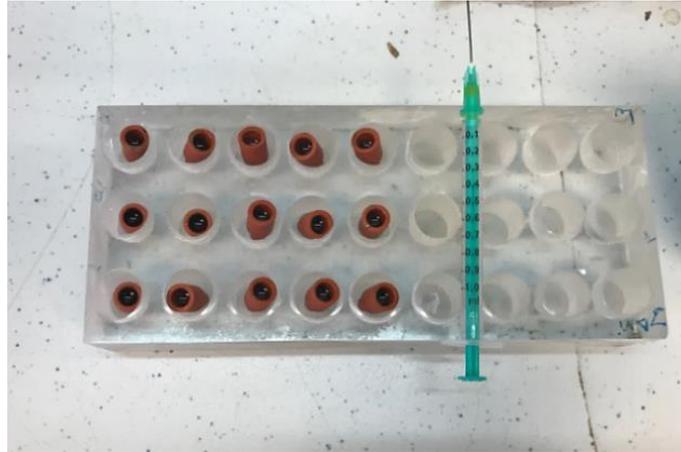


Figura 5: Impregnación de los *rubber septa* con el extracto puro de *Pinus brutia* de forma manual.
Fuente: Elaboración propia.

-Impregnación con un evaporador rotativo:

Se introdujeron 15 *rubber septa* con 15 mL del extracto puro (1mL por emisor) en un matraz esférico, el cual se colocó en el evaporador rotativo (rotavapor) y se mantuvo girando lentamente, sin vacío y a temperatura ambiente, hasta la completa incorporación del extracto en los emisores (figura 6).



Figura 6: Impregnación de los *rubber septa* con el extracto puro de *Pinus brutia* con rotavapor.
Fuente: Elaboración propia.

Finalizados los procesos de impregnación, los emisores se almacenaron en una cámara de aireación a temperatura (30°C) y con un flujo de aire (0,45 m/s) constantes, para conseguir un envejecimiento acelerado de los emisores (figura 7). Posteriormente se fueron retirando de la cámara cada cierto tiempo, para estudiar cómo iban liberando los volátiles con los que se habían impregnado. Los resultados de este estudio nos permitieron estimar el tiempo que los emisores podían permanecer en el campo antes de ser periódicamente renovados.



Figura 7: Cámara de aireación para el envejecimiento acelerado de los *rubber septa* de los emisores con el extracto puro de *Pinus brutia*. Fuente: Elaboración propia.

3.3. ESTUDIOS DE EMISIÓN DE LOS EMISORES *rubber septa*.

3.3.1. Determinación cuantitativa de los volátiles del extracto.

Para determinar la cinética de emisión del extracto contenido en los emisores, se determinó, cuantitativamente, la liberación de dos compuestos representativos del extracto, tanto de la fracción más volátil (β -pineno), como de la menos volátil (β -cariofileno). La cuantificación se realizó mediante CG con detector de ionización de llama (FID, *flame ionization detector*) (Clarus 500 GC, Perkin Elmer Inc.), utilizando patrón interno. La columna cromatográfica, gas portador y, su flujo fueron los mismos que los descritos anteriormente para los análisis CG/EM (apartado 3.1.2). El programa de temperaturas del horno del CG se cambió para acortar el tiempo de análisis y fue el siguiente: 40 °C durante 2 min, 5 °C/min hasta 120 °C, 10 °C/min hasta 180 °C y posteriormente a 25 °C/min hasta 280 °C, temperatura a la que se mantuvo durante 2 min (tiempo total de análisis = 30 min).

-Curva patrón o de calibrado:

Una vez seleccionados los volátiles más representativos del extracto, y previo a la cuantificación de los diferentes *rubber septa* envejecidos, se seleccionó empíricamente un patrón interno con un tiempo de retención diferente al de los compuestos a evaluar y que no camuflase a ningún otro compuesto del extracto. En este caso se preparó una solución en diclorometano (DCM) de patrón interno (*n*-dodecano), a una concentración de 0,2 mg/mL (figura 8).

Para obtener las rectas de calibrado que relacionan las concentraciones de cada compuesto con su correspondiente área del pico cromatográfico, se prepararon soluciones en DCM con cantidades crecientes conocidas de los volátiles de interés, β -pineno y β -cariofileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., EEUU). A cada una de ellas se le añadió 200 μ L de la solución patrón. Cada una de las soluciones se inyectó (1 μ L) en el CG-FID y se registraron las áreas de los picos cromatográficos del β -pineno, β -cariofileno y del patrón interno (pi). Posteriormente, se calculó la relación entre el área del pico correspondiente a cada volátil y el área del pico del

patrón (área volátil/área pi). Cada muestra se analizó 3 veces en el CG, lo que nos permitió obtener un valor medio con un error estándar inferior al 5%.

Las relaciones de áreas se relacionan con las correspondientes concentraciones de cada volátil mediante una regresión lineal ($y = a + bx$), donde “y” es la relación de áreas y, “x” la concentración.



Figura 8: Elaboración de la curva patrón o de calibrado. Fuente: Elaboración propia.

-Extracción de los *rubber septa*:

Para cada uno de los tiempos de envejecimiento en la cámara de aireación (0, 3, 7, 10 y 14 días), se seleccionaron, al azar, cinco emisores para analizar el contenido residual de los volátiles objeto de estudio. Para realizar la extracción, cada emisor se troceó, se introdujo en un vial de vidrio de 50 mL, se añadieron 10 mL de DCM y se mantuvo a temperatura ambiente con agitación magnética, durante 2h (figura 9).



Figura 9: Extracción de los *rubber septa* envejecidos en diferentes tiempos. Fuente: Elaboración propia.

Recogido el extracto final, se concentró bajo una corriente suave de nitrógeno para tener suficiente sensibilidad en el CG-FID, hasta un volumen final aproximado de 0,5mL. A continuación, se llevaron a un vial de CG, se añadieron 200µL de solución de patrón interno, y se enrasaron a 1mL con DCM, para su posterior cuantificación (figura 10).

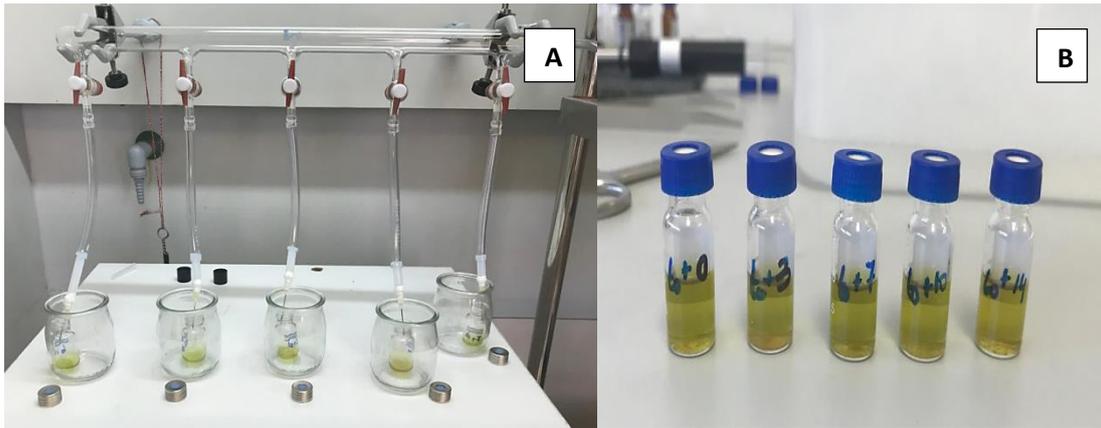


Figura 10: Concentración del extracto resultante de la extracción de los *rubber septa*, bajo una corriente suave de nitrógeno (A) y preparación de los viales con la solución patrón para su cuantificación (B). Fuente: Elaboración propia.

3.4. DESARROLLO DE LOS EMISORES DE LIMONENO Y DETERMINACIÓN DE SU CINÉTICA DE EMISIÓN.

3.4.1. Preparación de los emisores de limoneno.

Como ya se ha comentado en la introducción, según los estudios de Pazavolta *et al.*, (2015), emisiones de, aproximadamente, 200 mg/emisor y día, de R-(+)-limoneno, es suficiente para mostrar un efecto disuasorio o repelente de la oviposición en la hembra de procesionaria. Partiendo de este dato, el objetivo fue encontrar un emisor capaz de cumplir con este requisito de nivel de emisión.

Estudios en Laboratorio. Se seleccionaron botes de polietileno (PE) en los que se evaluaron dos parámetros, el tamaño del bote (100 y 50 mL) y el diámetro del orificio superior de emisión (3 y 2 mm) (figura 11). Se prepararon 4 emisores de cada tipo con 5 mL de limoneno y, se colocaron en la misma cámara de aireación del laboratorio (30°C y 0,45 m/s de flujo de aire) para someterlos al envejecimiento acelerado. La velocidad de emisión del limoneno se determinó valorando la pérdida de peso de los emisores, de manera periódica, cada 3 o 4 días. Se utilizó una balanza de precisión (ME204, Mettler Toledo SAE, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona).



Figura 11: Botes de Polietileno de diferentes tamaños y diferentes orificios de emisión. Fuente: Elaboración propia

Estudio comparativo en laboratorio y en condiciones externas. Tras un primer estudio en condiciones de laboratorio, según el cual, el comportamiento de los botes de limoneno de 50 mL con orificio de 2 mm se aproximaba mucho a lo requerido, se trató de validar dichos resultados en condiciones externas, más similares a las de campo, con el fin de determinar hasta qué punto las nuevas condiciones iban a alterar la emisión observada en el laboratorio.

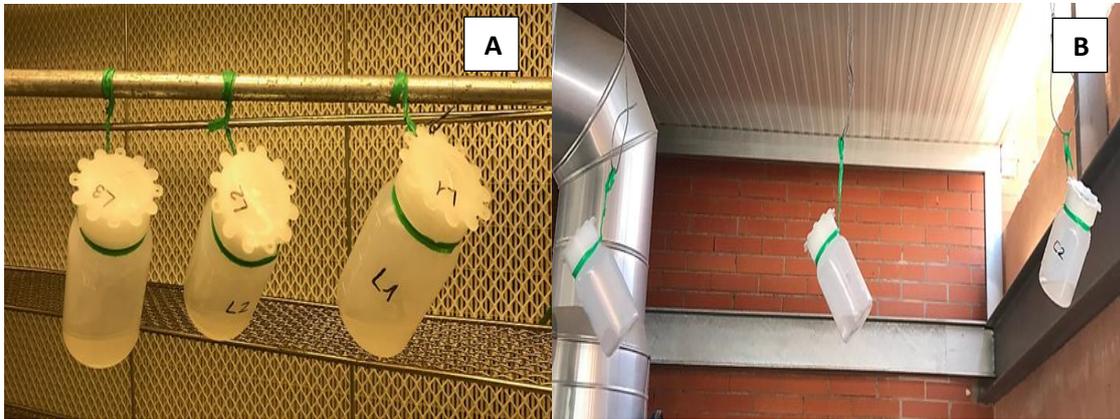


Figura 12: Emisores de limoneno envejeciendo en la cámara de aireación para cinética de laboratorio (A), y emisores de limoneno envejeciendo en la terraza del edificio para cinética en condiciones externas (B). Fuente: Elaboración propia.

Las condiciones de estudio fueron las mismas que en el apartado anterior, pero en esta ocasión se prepararon 6 emisores (botes de 50 mL con orificio de 2 mm conteniendo 5 mL de limoneno) de los cuales 3 se pusieron en la cámara de aireación (condiciones de laboratorio; figura 12A) y los otros 3 emisores se colocaron en la terraza del edificio (condiciones exteriores; figura 12B).

3.5. ESTUDIOS EN CAMPO

3.5.1. Determinación de la curva de vuelo de *T. pityocampa*.

Antes del inicio del ensayo, se colocaron 10 trampas G de seguimiento de poblaciones el día 26 de julio del 2019, usando la feromona específica de *T. pityocampa* (Econex, Murcia) a lo largo del camino forestal, donde posteriormente se han establecido las zonas de estudio. Las trampas, colocadas con una separación mínima entre ellas de 100 m, se revisaron cada dos días hasta el comienzo del vuelo, a partir del cual se empezaron a revisar semanalmente. Esto nos permitió establecer la curva de vuelo de la procesionaria. La captura del primer adulto en las trampas de seguimiento estableció el comienzo del experimento el día 20 de agosto del 2019.

3.5.2. Diseño del experimento de campo.

El ensayo se realizó en el paraje de La Vallesa, incluido en el Parque Natural del Turia (Paterna, Valencia), una zona donde predominan pinos jóvenes de la especie *P. halepensis*, con una altura media de 2 m. Se trata además de una zona donde, en años anteriores, la población de la procesionaria ha sido considerablemente alta.

Se establecieron dos zonas o secciones de estudio a lo largo del camino forestal, cada una de ellas compuesta por 6 bloques y, cada bloque, compuesto por 3 árboles (Anejo 3).

En la sección 1, se evaluó el efecto de las diferentes dosis de los semioquímicos sobre la atracción de la oviposición junto con el efecto disuasorio de la oviposición. Para evaluar el efecto de las diferentes dosis atrayentes, dentro del bloque de tratamiento, los árboles 1 contuvieron un emisor *rubber septum* con el extracto de *P. brutia*, los árboles 2 con dos emisores y los árboles 3 con tres emisores, seleccionados siempre cerca del borde del camino y separados entre ellos 15-20 m. Además, se estableció entre cada Bloque de Tratamiento un Bloque Control, siguiendo el mismo diseño, pero conteniendo solo emisores con el disolvente (éter etílico/pentano 1:1 v), alternándose hasta completar los 6 bloques. Los experimentos de laboratorio permitieron determinar que los emisores debían reponerse semanalmente. Los emisores retirados semanalmente se llevaron al laboratorio. Seis de ellos se procesaron, según lo descrito en el apartado 3.3, para cuantificar la cantidad residual de volátiles y poder estimar, de esta forma la cantidad emitida semanalmente.

Para evaluar el efecto disuasorio de la oviposición, se estableció una barrera longitudinal de los emisores de limoneno, aproximadamente unos 20-25 m desde el borde del camino hacia el interior de la masa forestal, ocupando los 6 bloques. Se colocaron un total de 90 emisores de limoneno en dos filas de 45 botes cada una, separados entre sí 8 m. Para determinar la cinética en campo de los emisores, se prepararon 18 emisores adicionales, que se dejaron envejecer en bloques de 3 por árbol y en posiciones diferentes, llevando 3 botes al laboratorio semanalmente para determinar su pérdida de peso (Anejo 3).

En la sección 2, se evaluó solo el efecto atrayente de los emisores del extracto, con la misma disposición que en la sección 1, pero sin la barrera de limoneno (Anejo 3).

Durante todo el periodo del ensayo, los árboles seleccionados se revisaron periódicamente para detectar puestas de huevos, las cuales se marcaron y dejaron evolucionar en el árbol. Al final del ensayo, se cortaron y retiraron de la zona forestal. Las diferencias entre los tratamientos se establecieron en función del número de puestas por árbol.

3.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Para estudiar el efecto del tiempo (semana del ensayo) y la zona de ensayo (sección) sobre el nivel de emisión de los emisores utilizados en campo se ha aplicado un ANOVA multifactorial, teniendo en cuenta cada uno de los volátiles estudiados. Dado que los datos se ajustan a los requeridos de normalidad y homocedasticidad, el ANOVA se aplicó sin transformación previa, seguido de pruebas de múltiple rango (test post hoc) de comparación de medias (test Tukey HSD, $P < 0,05$). El mismo análisis se ha llevado a cabo con los emisores de limoneno desarrollados en el laboratorio para evaluar el efecto del orificio superior y del tiempo sobre la emisión. Para comprobar la eficacia de las estrategias de control aplicadas en campo, se ha utilizado un análisis de varianza factorial univariante para estudiar el efecto de los factores, barrera de limoneno y emisores de atrayente, sobre la variable dependiente, número de puestas. Se ha utilizado el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVII (v.17.2.00)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VOLÁTILES DEL EXTRACTO DE *P. BRUTIA*.

El estudio realizado sobre la fracción volátil del extracto crudo de *P. brutia* mediante SPME permitió identificar 20 compuestos (Tabla 3), todos ellos compuestos orgánicos derivados del isopreno, fundamentalmente mono- y sesquiterpenos. La figura 13 muestra el perfil cromatográfico de estos volátiles obtenidos por SPME, destacando los compuestos mayoritarios, β -pineno y β -mirceno, así como, el β -cariofileno. Mediante la inyección directa del extracto puro (figura 14), comprobamos que los picos mayoritarios coincidían utilizando ambas técnicas (SPME e inyección directa), aunque con distinta abundancia (Tabla 3). Estas diferencias se deben a la forma diferente de introducir la muestra en el equipo y a la distinta afinidad de los compuestos por la fase de la fibra, en el caso del SPME. Cabe destacar, además, la mayor sensibilidad de la técnica SPME que ha sido capaz de detectar compuestos con una abundancia muy pequeña, como es el caso del L-4-terpineol o del acetato de linalilo, que no fueron detectados mediante la inyección directa (Tabla 3). Además, los resultados muestran que los compuestos volátiles característicos de la especie *P. brutia* entre las especies estudiadas por Paiva et al. (2011), ocimeno, acetato de bornilo y α -copaeno, están presentes también en nuestro extracto, lo que valida el proceso de extracción. Estos compuestos que parecen ser característicos de *P. brutia* se encuentran en el extracto en cantidades muy minoritarias respecto a los mayoritarios β -pineno y β -cariofileno (Tabla 3).

A partir del estudio de composición, se seleccionaron los compuestos β -pineno y β -cariofileno, como referencias para determinar el comportamiento de los emisores durante su desarrollo y evaluación en campo. La selección de ambos compuestos se realizó basándonos fundamentalmente en dos de sus características, su abundancia relativa inicial en el extracto respecto al total de compuestos detectados, 21% y 25%, respectivamente, y su diferente volatilidad (tiempos de retención de 13,58 min para el β -pineno y 27,47 min para el β -cariofileno). Esto nos permitirá conocer de qué manera los emisores están liberando compuestos representativos del extracto. Al estudiar el nivel de emisión de dos compuestos diferentes nos aseguraremos de que los volátiles del extracto que se encuentren en ese rango de volatilidades se están emitiendo durante el ensayo. Por otra parte, se han elegido los componentes más abundantes para poder tener suficiente fiabilidad y sensibilidad analítica para poder realizar la cuantificación a lo largo del tiempo. Si eligiésemos un terpeno menos abundante podría ocurrir que no fuéramos capaces de cuantificar la cantidad que contiene el emisor cuando está envejecido por falta de sensibilidad. Este estudio determinará, durante la fase de desarrollo de los emisores, el tiempo de vida útil (periodo de reposición) de éstos cuando se realice el experimento de campo.

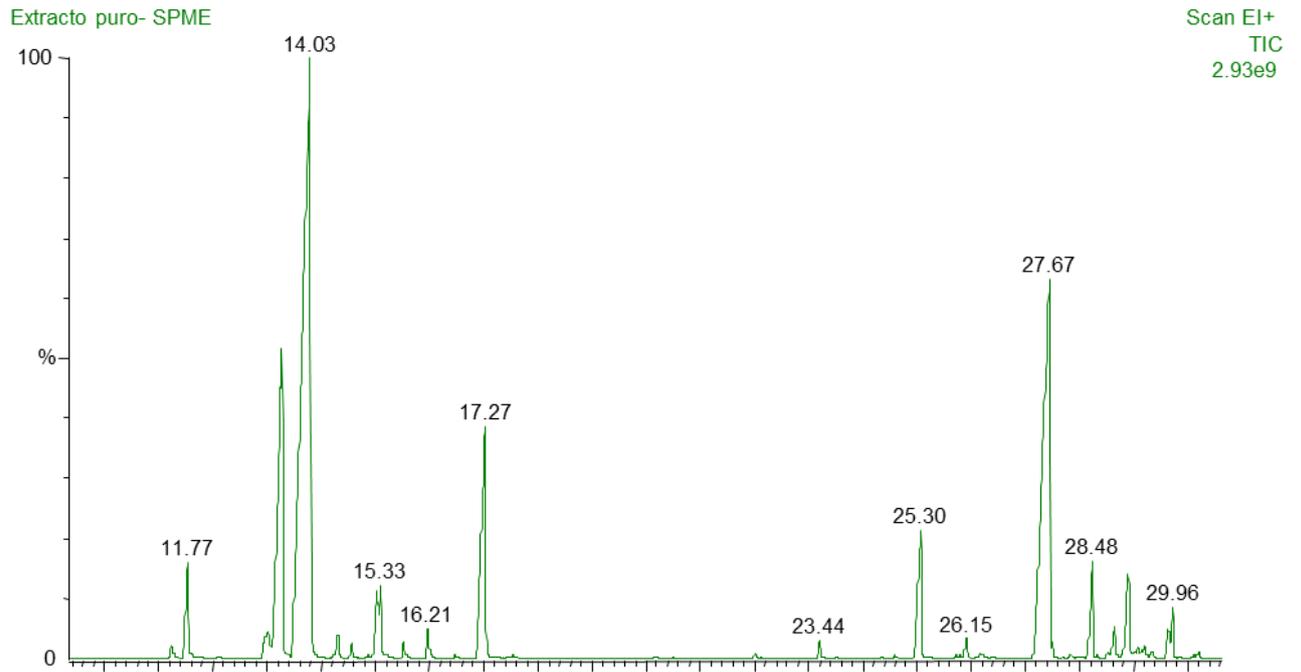


Figura 13: Cromatograma del perfil de volátiles del extracto puro de *Pinus brutia* obtenido por SPME. Los tiempos de retención de los diferentes compuestos corresponden con los de la tabla 3.

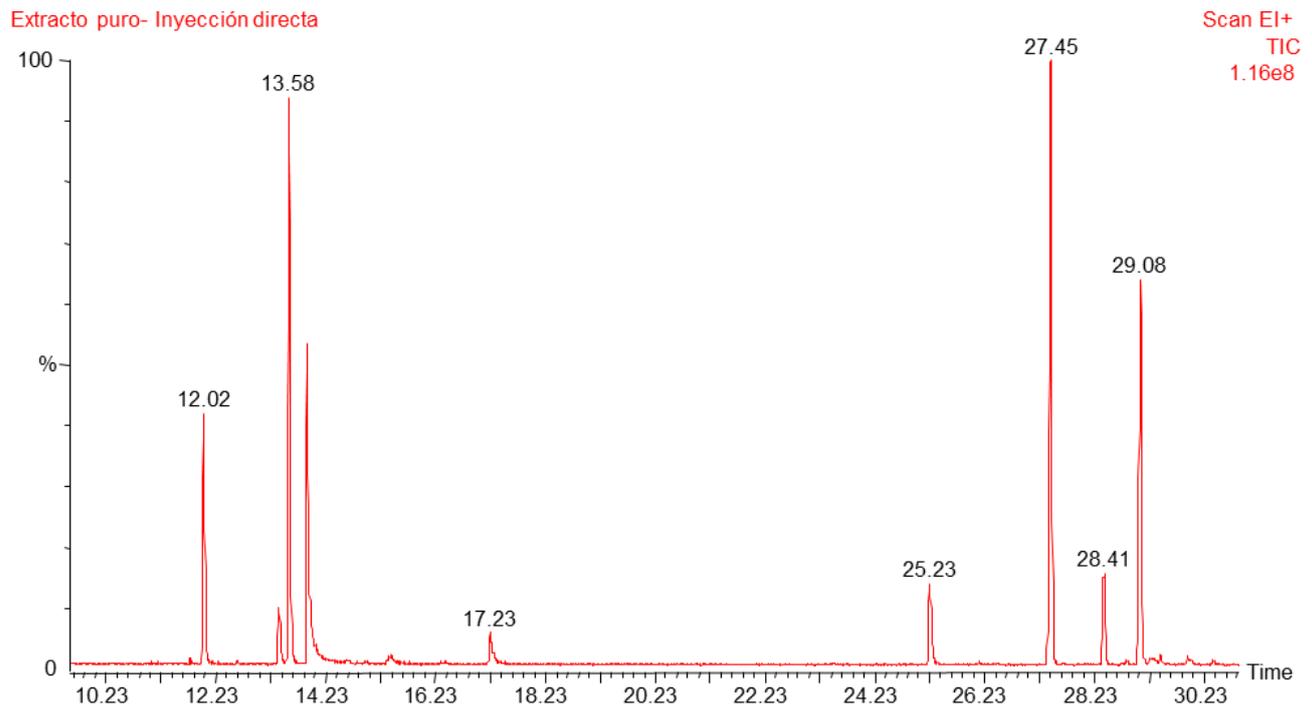


Figura 14: Cromatograma del perfil de volátiles del extracto puro de *Pinus brutia* obtenido por inyección directa. Los tiempos de retención de los diferentes compuestos corresponden con los de la tabla 3.

Tabla 3: Relación de los compuestos identificados y su proporción relativa en el extracto de *P. brutia* analizado por SPME y por inyección directa.

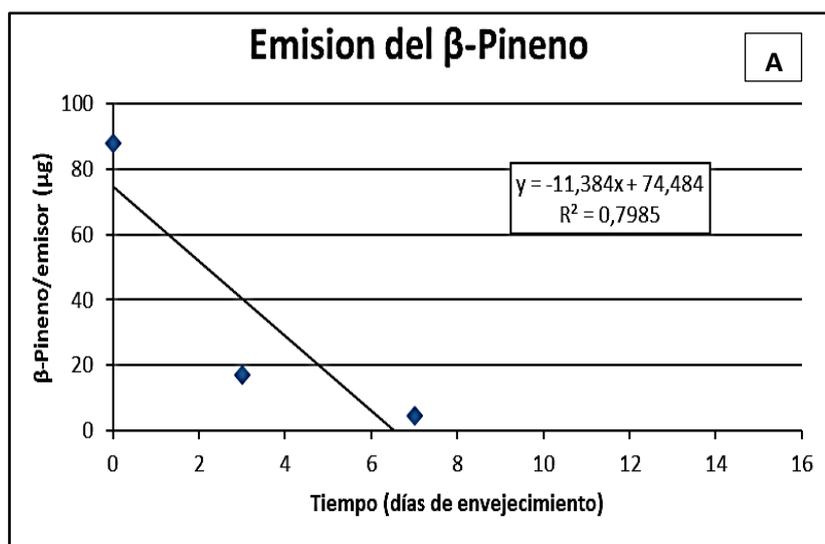
| tr ^a (min) | Compuesto | Abundancia SPME (%) | Abundancia inyección (%) |
|--------------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 11.77 (12,02) | α -pineno | 2,36 | 8,79 |
| 13,52 (13,58) | β-pineno | 12,96 | 21,25 |
| 14,03 (13,90) | β -mirceno | 38,66 | 16,03 |
| 14,53 (14,62) | 3-careno | 0,40 | 0,15 |
| 15,27 (15,36) | limoneno | 1,63 | 0,12 |
| 15.33 (15,42) | β -felandreno | 1,26 | 0,50 |
| 15,74 | β -cis-ocimeno | 0,35 | - |
| 16,21 (16,34) | α -terpineno | 0,64 | 0,18 |
| 17,27 (17,23) | α -terpinolene | 8,35 | 2,71 |
| 20,39 | L-4-terpineol | 0,05 | - |
| 22,25 | acetato de linalilo | 0,09 | - |
| 23,44 | acetato de bornilo | 0,41 | - |
| 25,30 (25,23) | acetato de α -terpineol | 4,20 | 3,88 |
| 26,15 (26,14) | α -copaeno | 0,42 | 0,22 |
| 27,67 (27,45) | β-cariofileno | 21,00 | 25,37 |
| 28.48 (28,41) | α -cariofileno | 2,38 | 3,75 |
| 28,88 (28,82) | τ -muuroleno | 0,75 | 0,13 |
| 29,14 (29,08) | β -cubebeno | 2,41 | 16,44 |
| 29,88 (29,93) | τ -cadineno | 0,57 | 0,29 |
| 29,96 (30,00) | δ -cadineno | 1,11 | 0,19 |

tr^a tiempo de retención (min) de cada compuesto en la muestra de SPME. Entre paréntesis figura el tiempo de retención en la muestra de inyección directa.

4.2. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DE LOS EMISORES IMPREGNADOS Y CUANTIFICACIÓN DE LOS VOLÁTILES.

Una vez obtenidos los emisores *rubber septa* impregnados mediante las dos metodologías (manual y rotatoria), se extrajo con disolvente una muestra de cada tipo y se estudió la composición de cada extracto resultante por inyección directa. De esta manera, se comprobó que los volátiles de interés (β -pineno y β -cariofileno) estaban presentes, aproximadamente en la misma proporción, en los extractos de los emisores obtenidos con ambos métodos de impregnación. Por ello, se optó por la impregnación rotativa ya que, debido a su mayor facilidad de elaboración, permite la impregnación de un gran número de emisores al mismo tiempo.

Por otro lado, en la extracción de los *rubber septa* seleccionados en diferentes tiempos de envejecimiento en cámara (0, 3, 7, 10 y 14 días), se cuantificaron los volátiles de interés (β -pineno y β -cariofileno), con el fin de establecer la vida útil en campo de los emisores. Se muestra en las gráficas obtenidas (figura 15), como el β -pineno ya no se detecta a los 10 días en los extractos de los emisores. Representando la carga residual cuantificada frente al tiempo, el ajuste lineal correspondiente nos indica una velocidad de emisión media para β -pineno de 11,38 $\mu\text{g}/\text{emisor}/\text{día}$, dada por la pendiente de la recta correspondiente, durante 7 días. En cambio, el β -cariofileno a los 7 días todavía presenta una cuarta parte de su carga con una emisión media de 9,77 $\mu\text{g}/\text{emisor}/\text{día}$ hasta los 14 días estudiados. Según estos datos, se fijó como 7 días el tiempo máximo de permanencia de los emisores, y se repondrán semanalmente durante el ensayo de campo con el fin de asegurar que ambos compuestos se están emitiendo. Aunque 7 días puede parecer un tiempo demasiado ajustado según el estudio de laboratorio (prácticamente no queda nada de β -pineno en los emisores), hay que considerar que las condiciones de campo son menos agresivas que las del envejecimiento acelerado en cámara y, previsiblemente, la emisión será más lenta.



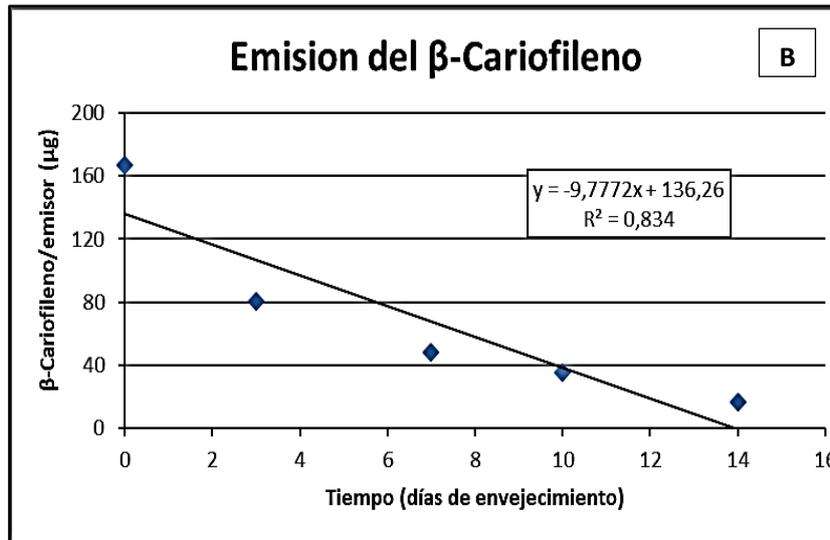


Figura 15: Curvas de emisión del β -pineno (A) y β -cariofileno (B) con un envejecimiento acelerado en condiciones de cámara en el laboratorio (30°C y 0,45 m/s de velocidad de aire).

4.3. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DE LIMONENO EN LABORATORIO.

Una velocidad de emisión de limoneno de 200 mg/emisor/día de limoneno es suficiente, de acuerdo con Panzavolta *et al.*, (2015), para provocar en las hembras de *T. pityocampa* un efecto disuasorio de la oviposición. Basándonos en este dato, el objetivo de esta sección fue encontrar un dispositivo emisor capaz de cumplir con este requerimiento de emisión.

Los resultados de las cinéticas de emisión llevados a cabo en condiciones controladas en el laboratorio mostraron que, los botes de PE de 50 mL se ajustaban a las necesidades de emisión, mientras que, con los botes de PE de 100 mL, se doblaba la emisión requerida, con cantidades puntuales de limoneno liberadas superiores a 450 mg/emisor/día (figura 16). Estos resultados demostraron, también, que el tamaño del orificio de la tapa (2 ó 3 mm) no parecía influir en la emisión, no encontrándose diferencias significativas tanto en el caso de los botes de 50 mL ($F=3,1$; $df=1$; $P=0,096$) como en los de 100 mL ($F=2,2$; $df=1$; $P=0,15$).

Destacar que, en estas condiciones, la emisión de limoneno en los botes de 50 mL a lo largo del tiempo fue considerablemente estable. Transcurridos los dos primeros días que se requieren normalmente para alcanzar el equilibrio en este tipo de emisores, la emisión fue prácticamente constante durante los siguientes siete días. Con el bote de 100 mL, sin embargo, no se observó un comportamiento similar. Después de los dos días de equilibrio, se alcanzó un máximo de emisión, entre los 3 y 6 días, en torno a los 450 mg/emisor/día, pero después se produjo un descenso gradual y bastante notable de la cantidad de limoneno emitida. Este comportamiento estaría relacionado, probablemente, con el tamaño del bote y la cantidad de limoneno inicial del estudio (también 5 mL como en el caso de los botes de 50 mL) que sería insuficiente para mantener constante su velocidad de emisión a lo largo del tiempo.

En función de los resultados obtenidos se seleccionó, para terminar los estudios previos al ensayo de campo, el bote de 50 mL con el orificio superior de 2 mm de diámetro y se sometió a un estudio comparativo. Se evaluaron dos condiciones diferentes de emisión, una, de nuevo, en condiciones de laboratorio y otra en condiciones externas (terracea del edificio). Este estudio permitió demostrar que los botes de 50 mL no eran, finalmente, los más adecuados para realizar el estudio en campo. Como era de esperar, la cinética de los emisores se ralentizó, en condiciones externas, pero a un nivel mayor del esperado, ya que, según su línea de tendencia, los emisores en la terraza estarían emitiendo una media de 153 mg/emisor/día, quedando por debajo de la velocidad requerida (figura 17).

Por lo tanto, finalmente se optó por seleccionar los botes de PE de 100 mL con un orificio de 2 mm, para los ensayos de campo, y con una carga inicial de limoneno casi tres veces superior a la de los ensayos en laboratorio. Con ello se esperaba obtener una liberación ligeramente superior a la requerida y capaz de cubrir todo el periodo de actividad de las hembras, el cual se estima en, aproximadamente, dos meses.

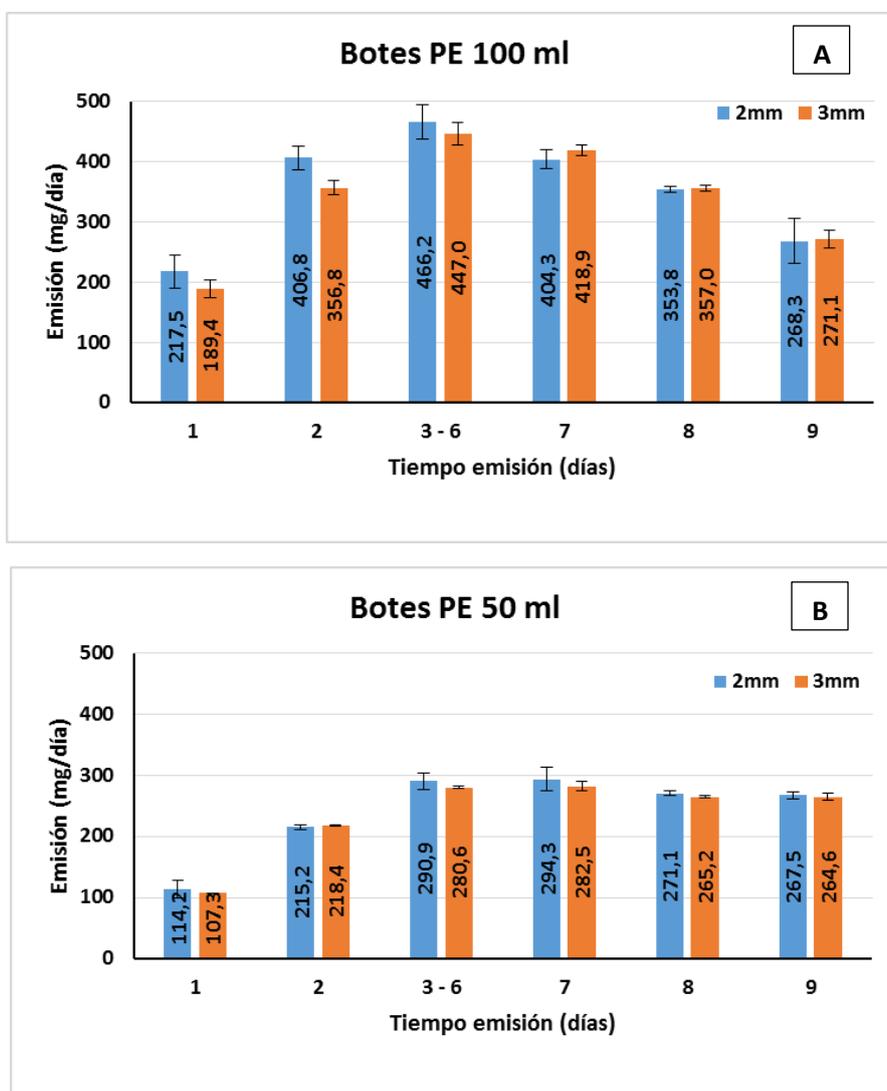


Figura 16: Estudio preliminar en condiciones de cámara de aireación en laboratorio para la selección del tamaño y orificio adecuados en los emisores de limoneno, con botes de PE de 100 ml (A), y botes de PE de 50 ml (B).

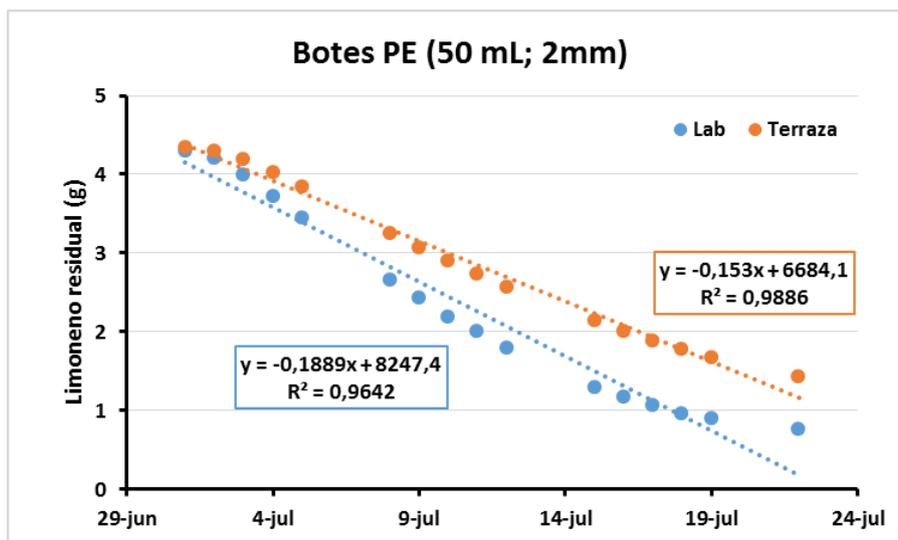


Figura 17: Comportamiento del emisor de limoneno seleccionado bajo condiciones de laboratorio, en cámara de aireación, y exteriores en terraza.

4.4. DINÁMICA POBLACIONAL DE *T. PITYOCAMPA*.

Finalizado el ensayo, se representó gráficamente la curva de vuelo de este año en La Vallesa (figura 18), a partir de la media de las capturas por trampa en función del tiempo. Los primeros adultos se capturaron el 21 de agosto, unos 15-20 días más tarde que lo que indican los datos históricos de años anteriores en la misma zona. Como se puede observar en las gráficas de los años comprendidos entre 2016 y 2018 (Anejo 4), facilitadas por el Agente Forestal del Ayuntamiento de Paterna, los primeros adultos se capturaron entre mediados de julio y principios de agosto. El máximo poblacional en nuestra zona, se alcanzó el día 10 de septiembre con más de 4 capturas/trampas/día (CTD). En años anteriores, el máximo poblacional también se alcanzó el 11 de septiembre, lo que indica que principios de septiembre es la fecha de máxima densidad poblacional de los adultos.

El retraso en la salida de los adultos puede estar influenciada por el aumento progresivo de las temperaturas como consecuencia del Calentamiento Global, sobre todo las de invierno, ya que se sabe por estudios realizados por Battisti *et al.* (2005), que *T. pityocampa*, cuyas larvas se desarrollan continuamente durante todo el invierno, está muy condicionada por las temperaturas invernales, y un aumento de éstas dificulta su desarrollo y alimentación. Esto, provoca una menor supervivencia de la población, además de facilitar su expansión hacia otros territorios, como latitudes norteñas o mayores altitudes, donde los inviernos cada vez son más suaves.

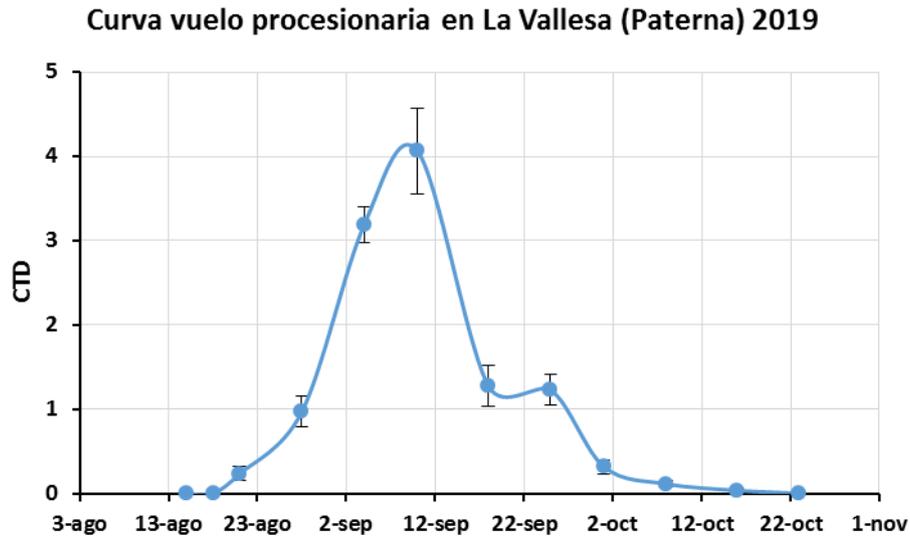


Figura 18: Curva de vuelo de la procesionaria en La Vallesa (Paterna, València) en 2019.

4.5. SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LAS PUESTAS DE *T. PITYOCAMPA*.

Una vez instalados los emisores en campo para aplicar las estrategias de control, se hizo un seguimiento periódico de las puestas a lo largo del ensayo, marcándolas, contabilizándolas, dejándolas evolucionar en el árbol y retirándolas finalmente. La representación gráfica de los valores medios del número de puestas en función del número de emisores del extracto de *P. brutia* (dosis del atrayente, componente “pull”), así como, de la presencia o no de la barrera de limoneno (componente “push”), se muestra en la figura 19.

El análisis estadístico de los resultados demostró que la colocación de la barrera de limoneno tuvo un efecto significativo en el número de puestas ($F=6,214$; $df=1$; $P=0,019$), de manera que su número se redujo cuando la barrera de limoneno estaba presente (figura 19).

Por otro lado, a pesar de que se observó una clara tendencia a aumentar el número de puestas conforme aumentó el número de emisores de extracto de *P. brutia* instalados en cada árbol, esa diferencia no resultó estadísticamente significativa ($F=2,252$; $df=3$; $P=0,104$), probablemente porque las cantidades de volátiles emitidas no fueron lo suficientemente elevadas para poder establecer las diferencias de forma precisa.

Por último, el efecto de la interacción entre los factores no resultó significativo ($F=4,565$; $df=3$; $P=0,495$). Según su definición estadística, la interacción entre dos factores existe cuando el efecto de uno de ellos sobre la variable dependiente no es el mismo en todos los niveles del otro factor. El análisis de nuestros resultados demostró que la respuesta (número de puestas de procesionaria) que se obtiene en presencia de la barrera de limoneno fue la misma independientemente del número de emisores de extracto de *P. brutia* instalados en el árbol. Y lo mismo sucedió cuando la barrera de limoneno no estuvo presente.

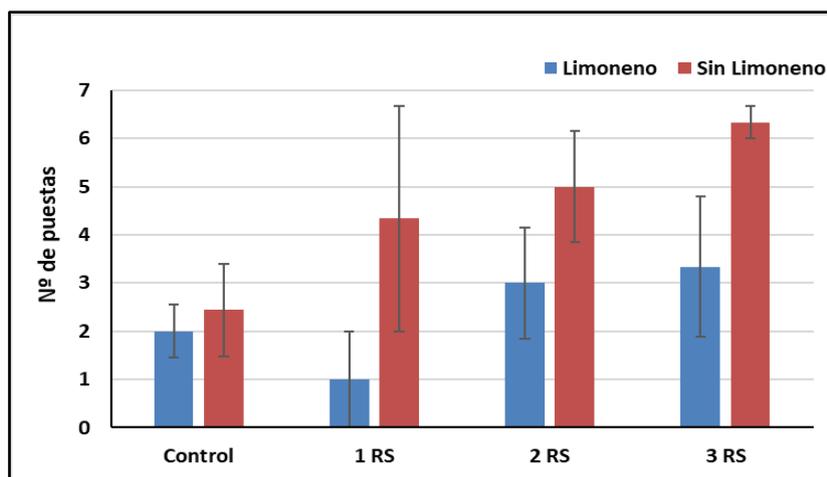


Figura 19: Efecto de la dosis del extracto de *Pinus brutia* y de la presencia de la barrera de limoneno sobre la oviposición de *Thaumetopoea pityocampa*. (RS: *rubber septa*).

4.6. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DE LOS RUBBER SEPTA EN CAMPO.

En general, la emisión media de β -pineno durante el ensayo fue de $4,80 (\pm 0,55) \mu\text{g}/\text{día}$ en la sección 1 con la barrera de limoneno, y $5,52 (\pm 0,45) \mu\text{g}/\text{día}$ en la sección 2 sin limoneno. La emisión media de β -cariofileno fue $6,88 (\pm 0,65) \mu\text{g}/\text{día}$ en la sección 1 y de $7,73 (\pm 0,61) \mu\text{g}/\text{día}$ en la sección 2.

Tomando todos los datos globalmente, el ANOVA demuestra que la emisión media de β -pineno fue significativamente inferior a la de β -cariofileno ($F= 17,53$; $gl= 1, 175$; $P< 0,001$). Dado que el nivel de emisión en los emisores de tipo *rubber septa* depende de la carga que contiene de cada compuesto (carga/superficie de emisión), esta diferencia de emisión puede deberse en parte a que la carga media inicial de β -pineno fue menor que la del β -cariofileno (figura 20).

Tomando los datos de emisión de cada compuesto por separado, el ANOVA muestra que las diferencias de emisión que se observan entre las secciones del ensayo de campo no son significativas, para los datos de β -pineno ($F= 1,16$; $gl= 1, 79$; $P= 0,284$), ni para los del β -cariofileno ($F= 1,02$; $gl= 1, 86$; $P= 0,315$), lo que indica que ambos compuestos se han emitido de forma similar en la zona con barrera de limoneno (sección 1) y en la zona sin la barrera de limoneno (sección 2)(figura 20).

Por otro lado, el factor tiempo tuvo un efecto significativo sobre el nivel de emisión de cada compuesto (β -pineno: $F= 3,79$; $gl= 9,79$; $P< 0,001$; β -cariofileno: $F= 4,80$; $gl= 9, 86$; $P< 0,001$), lo que indica que la emisión fue diferente según la semana de ensayo. Como se observa en la figura 33, el nivel de emisión de ambos compuestos entre las semanas tercera y cuarta fue significativamente menor, debido a que en esas semanas hubo un descenso de las temperaturas drástico, a unos 22°C , que corresponde con la semana del 13 de agosto (Anejo 5). Esto demuestra que el funcionamiento de los emisores tipo *rubber septa* es bastante sensible a las condiciones ambientales, por lo que los cambios de temperatura, provocan

variabilidad en la emisión. El mayor nivel de emisión de ambos compuestos se dio durante las semanas 2 y 5, coincidiendo con los cambios de temperatura más bruscos (figura 20).

Los estudios realizados por Paiva *et al.* (2011), demostraron que la volatilidad del extracto puro, especialmente los monoterpenos, es alta, no encontrándose en los emisores tras 48 horas de exposición en campo. En cambio, los sesquiterpenos debido a su menor volatilidad, pueden ser todavía detectados. Utilizando los emisores de tipo *rubber septa*, hemos conseguido regular la emisión durante más tiempo que en el trabajo anterior, consiguiendo reponer cada semana y no cada 2 días. Esto mejora considerablemente las condiciones experimentales.

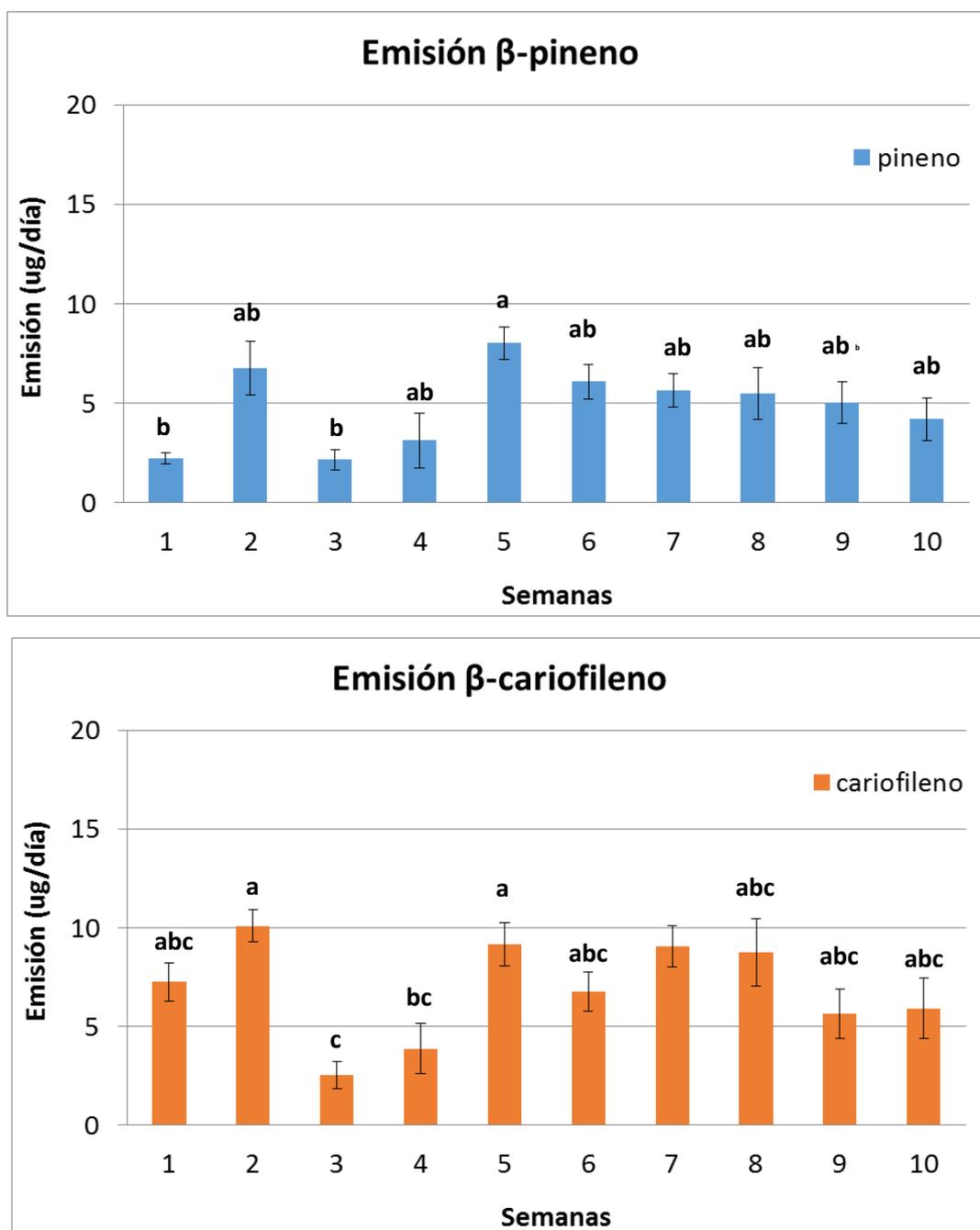


Figura 20: Nivel de emisión ($\mu\text{g}/\text{día}$) medio de β -pineno y β -cariofileno a lo largo del ensayo.

4.7. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EMISIÓN DEL LIMONENO EN CAMPO.

Los dispositivos emisores de limoneno seleccionados, los botes de polietileno de 100 mL, proporcionaron un nivel de emisión en campo, según los requerimientos que se establecieron antes del ensayo (aproximadamente 200 mg/emisor/día), durante prácticamente todo el periodo de vuelo de la procesionaria. A partir de los 55 días, la cantidad emitida se redujo prácticamente a la mitad de la requerida a pesar de que todavía quedaba carga de limoneno en los emisores (figura 21). Se observó, de esta forma, el mismo efecto visto durante el ensayo en laboratorio según el cual, este tipo de emisor requiere un contenido mínimo de limoneno para mantener constante su velocidad de emisión.

En los estudios realizados por Panzavolta *et al.* (2015), en los que trataron grupos de pinos con, (1S)-pineno y (R)-(+)-limoneno, en un experimento realizado durante dos años, se demuestra el efecto disuasorio de la oviposición del limoneno. De esta manera, afectaron a las puestas de huevos de la procesionaria, disminuyéndolas entre 37-57% en comparación con los pinos control, lo que contradice a la teoría de la oviposición no selectiva de la procesionaria del pino (Hórdar *et al.*, 2002). Efectivamente, esto indicaría un comportamiento selectivo de la polilla, atacando preferentemente a los pinos con menor concentración de estos volátiles. Por ello, Panzavolta *et al.* (2015), sugiere tras este estudio, que dicho monoterpeno puede ser una herramienta potencial para el control de la procesionaria del pino a través del efecto disuasorio de la oviposición de las hembras, ya que el número de huevos por árbol podría disminuir hasta un 67%, con la consiguiente reducción de la alimentación de las larvas en los pinos.

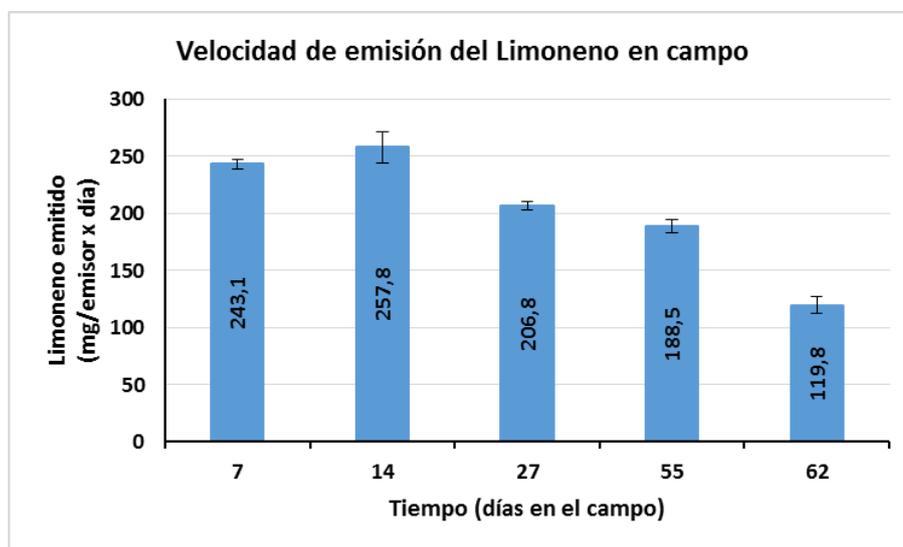


Figura 21: Velocidad de emisión de los dispositivos de limoneno en campo.

En el presente estudio, nuestra hipótesis era que la barrera de limoneno impediría la puesta de la procesionaria en la zona central de la masa forestal “empujando” a las polillas a realizar la puesta en el borde de la masa, donde las hembras tienen ya una predisposición natural para hacerlo. En nuestro caso, además, colocamos los emisores de extracto de *P. brutia* en dicho borde para potencial, todo lo posible, este efecto. Los resultados, sin embargo,

fueron los contrarios a los esperados ya que, en la Sección en la que se colocó la barrera de limoneno, las puestas en los árboles cebados con el extracto fueron inferiores. Este hecho ha podido deberse a varias razones que comentamos a continuación.

Por una parte, y puesto que el análisis estadístico demuestra que en las dos secciones se liberaron cantidades significativamente iguales de extracto de *P. brutia*, la respuesta de disminución de puestas parece deberse a la presencia del limoneno. Probablemente, la zona seleccionada para establecer las secciones de estudio fue demasiado pequeña para probar una estrategia de este tipo, unido al hecho de que, posiblemente, la densidad de emisores de limoneno fue demasiado alta interfiriendo, debido a su proximidad, en la capacidad atrayente de los emisores de extracto de *P. brutia*. De ahí que se redujesen las puestas en esta zona en comparación con la sección sin limoneno.

Otro aspecto a considerar es la cantidad de extracto de *P. brutia* emitida. Como se ha comentado previamente, aunque hubo una tendencia clara a aumentar el número de puestas conforme aumentó la dosis de extracto, no se obtuvieron diferencias significativas. La cuantificación de los volátiles emitidos, considerando los productos mayoritarios del extracto, nos indicó que teníamos una liberación similar, o incluso inferior, a la que se produce de forma natural por parte de las diferentes especies del entorno. Sabillón-Rodríguez (2002) determina que la Emisión Estándar media de α - y β -pineno por parte de *P. halepensis*, que es la especie sobre la que se está evaluando la estrategia de control, es de 1,5 y 0,34 $\mu\text{g} [\text{g.p.s.}]^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. La Emisión estándar representa la liberación, en forma gaseosa, de cada uno de los compuestos bajo condiciones estándar de temperatura (30°C) y luz (radiación fotosintética activa; PAR=1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y se relaciona con la biomasa (gramos por peso seco: g.p.s.) y el tiempo. Según los datos de emisión estándar, nuestras emisiones por día, en torno a 5,0 μg de β -pineno, serían similares a las del pino hospedador del emisor. Considerando el carácter de kairomona del extracto es previsible que se requieran cantidades superiores de emisión para mostrar un efecto atrayente importante.

Por último, hay que considerar la escasa incidencia de la plaga durante esta campaña, lo que no favorece la obtención de resultados concluyentes. Aunque tradicionalmente la zona seleccionada tiene niveles poblacionales muy altos y se han producido constantes defoliaciones masivas, los últimos años ha visto descender estos niveles hasta llegar al mínimo detectado este año debido a las posibles razones ya expuestas a lo largo del trabajo.

5. CONCLUSIONES

El componente “push” (barrera de limoneno), no ejerció el efecto esperado de concentración de las puestas en la zona del componente “pull” (extracto *p. brutia*), inhibiéndolas.

Se consiguió regular la emisión de los componentes volátiles del extracto *p. brutia*, mediante los dispositivos emisores (*rubber septa*) durante más tiempo que los descritos en la bibliografía (más de 48h).

El funcionamiento de la estrategia propuesta en este estudio (“push-pull”), para el control de la procesionaria del pino no ha sido concluyente. pero ha permitido sentar las bases de nuevas condiciones experimentales para conseguir nuestro objetivo:

- Estudios sobre mayores masas forestales.
- Elección de zonas con mayores grados de ataque de procesionaria (grado 3 o 4).
- Diseño de nuevos emisores para el extracto del atrayente, con una mayor capacidad de emisión y con menores reposiciones, para que así la estrategia sea más cómoda, ecológica, menos dependiente del ambiente, y económicamente competitiva.

6. BIBLIOGRAFÍA

- BATTISTI, A., AVCI, M., AVTZIS, D. N., JAMAA, M. L. B., BERARDI, L., BERRETIMA, W., & HÓDAR, J. A. (2015).** “Natural history of the processionary moths (*Thaumetopoea* spp.): new insights in relation to climate change.” *In Processionary moths and climate change: An update* (pp. 15-79). Springer, Dordrecht.
- BATTISTI, A., STASTNY, M., BUFFO, E., & LARSSON, S. (2006).** “A rapid altitudinal range expansion in the pine processionary moth produced by the 2003 climatic anomaly.” *Global change biology*, 12(4), 662-671.
- BATTISTI, A., STASTNY, M., NETHERER, S., ROBINET, C., SCHOPF, A., ROQUES, A., & LARSSON, S. (2005).** “Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures”. *Ecological applications*, 15(6), 2084-2096.
- 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.
- FLORES CATALÁN, J. (2019).** “*ECOFORREST: Proyecto de empresa de Control Biológico de la procesionaria (Thaumetopoea pityocampa)*. Trabajo Fin de Máster: Escuela Politécnica Superior de Orihuela.
- FRANKIS, M. (1999).** “Plate 367. PINUS BRUTIA: Pinaceae.” *Curtis's Botanical Magazine*, 173-184.
- GARCIA MARI, F., & FERRAGUT, F. (2002).** “Las plagas agrícolas.” MV Phytoma-Espana SL, Valencia.
- HÓDAR, J. A. Z. (2009).** “Influencia de los factores abióticos y bióticos en la defoliación por la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) en los pinares andaluces”. In *Congresos Forestales*.
- HÓDAR, J. A., & ZAMORA, R. (2004).** “Herbivory and climatic warming: a Mediterranean outbreaking caterpillar attacks a relict, boreal pine species.” *Biodiversity & Conservation*, 13(3), 493-500.
- HÓDAR, J. A., CASTRO, J., & ZAMORA, R. (2003).** “Pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* as a new threat for relict Mediterranean Scots pine forests under climatic warming.” *Biological conservation*, 110(1), 123-129.
- HÓDAR, J. A., ZAMORA, R., & CASTRO, J. (2002).** “Host utilisation by moth and larval survival of pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* in relation to food quality in three *Pinus* species.” *Ecological Entomology*, 27(3), 292-301.
- HÓDAR, J.A., TORRES-MUROS, L., SENHADJI, K., CAYUELA, L., ZAMORA, R., (2012B).** “Interacción planta-herbívoro y dinámica poblacional de la procesionaria del pino en el Parque Nacional de Sierra Nevada en el marco del cambio global.” *En: Proyectos de investigación en parques Nacionales: 2008-2011*, págs. 388. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. EGRAFSA, Madrid.

- HOWSE, P.E. (1998).** "Pheromones and behavior". p. 1-130. In P.E. Howse, I. Stevens and O. Jones (eds.) *Insect pheromones and their use in pest management*. Chapman & Hall, London,UK.
- JACTEL, H., MENASSIEU, P., VÉTILLARD, F., BARTHÉLÉMY, B., PIOUS, D., FRÉROT, B., & BATTISTI, A. (2006).** "Population monitoring of the pine processionary moth (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) with pheromone-baited traps." *Forest Ecology and Management*, 235(1-3), 96-106.
- LÓPEZ SEBASTIÁN, E. (2014).** *Estudio de la dinámica poblacional del lepidóptero Thaumetopoea pityocampa (Denis & Schiffermüller, 1775) en la provincia de Valencia*. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- NICCOLI, A., PANZAVOLTA, T., MARZIALI, L., PEVERIERI, G. S., FLORENZANO, G. T., & TIBERI, R. (2008).** "Further studies on the role of monoterpenes in pine host selection and oviposition of *Thaumetopoea pityocampa*." *Phytoparasitica*, 36(4), 313-321.
- PAIVA, M. R., MATEUS, E., SANTOS, M. H., & BRANCO, M. R. (2011).** "Pine volatiles mediate host selection for oviposition by *Thaumetopoea pityocampa* (Lep., Notodontidae)." *Journal of applied entomology*, 135(3), 195-203.
- PANZAVOLTA, T., FLORENZANO, G. T., & TIBERI, R. (2015).** "Pine monoterpene deterrence of pine processionary moth oviposition." *Urban Forestry & Urban Greening*, 14(3), 538-543.
- PÉREZ-CONTRERAS, T., SOLER, J. J., & SOLER, M. (2014).** "Host selection by the pine processionary moth enhances larval performance: An experiment." *Acta oecologica*, 55, 15-22.
- PIMENTEL, C., CALVÃO, T., & AYRES, M. P. (2011).** "Impact of climatic variation on populations of pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* in a core area of its distribution." *Agricultural and Forest Entomology*, 13(3), 273-281.
- ROQUES, A. (ED.). (2015).** "Processionary moths and climate change: an update" (Vol. 427). Springer Netherlands.
- SABILLÓN-RODRÍGUEZ, D. (2002).** *Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea, Pinus pinea, Pinus halepensis y Quercus ilex*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).
- SALVATO, P., BATTISTI, A., CONCATO, S., MASUTTI, L., PATARNELLO, T., & ZANE, L. (2002).** "Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa*—*wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers." *Molecular Ecology*, 11(11), 2435-2444.
- STASTNY, M., BATTISTI, A., PETRUCCO-TOFFOLO, E. D. O. A. R. D. O., SCHLYTER, F., & LARSSON, S. (2006).** "Host-plant use in the range expansion of the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa*." *Ecological entomology*, 31(5), 481-490.

- TIBERI, R., NICCOLI, A., CURINI, M., EPIFANO, F., MARCOTULLIO, M. C., & ROSATI, O. (1999).** "The role of the monoterpene composition in *Pinus* spp. needles, in host selection by the pine processionary caterpillar, *Thaumetopoea pityocampa*." *Phytoparasitica*, 27(4), 263-272.
- TORRES MUROS, L. (2016).** *Estudio de la dinámica poblacional de la procesionaria del pino en el espacio natural de Sierra Nevada, dentro del marco de cambio global. Análisis aplicado para una gestión adaptativa.* Tesis Doctoral: Universidad de Granada.
- TREMATERRA, P., COLACCI, M., ATHANASSIOU, C. G., KAVALLIERATOS, N. G., RUMBOS, C. I., BOUKOUVALA, M. C., & GÁLVEZ-SETTIER, S. (2019).** "Evaluation of Mating Disruption For the Control of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) in Suburban Recreational Areas in Italy and Greece." *Journal of Economic Entomology*, 112(5), 2229-2235.
- VACAS GONZÁLEZ, S. (2011).** *Uso de semioquímicos en el control de plagas. Estudios básicos y de aplicación* Tesis Doctoral: Universidad Politécnica de Valencia.
- VEGA, J. M., MONEO, I., ORTIZ, J. C. G., PALLA, P. S., SANCHÍS, M. E., VEGA, J., ... & ROQUES, A. (2011).** "Prevalence of cutaneous reactions to the pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa*) in an adult population." *Contact Dermatitis*, 64(4), 220-228.
- VEGA, J., VEGA, J. M., MONEO, I., ARMENTIA, A., CABALLERO, M. L., & MIRANDA, A. (2004).** "Occupational immunologic contact urticaria from pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa*): experience in 30 cases." *Contact Dermatitis*, 50(2), 60-64.
- VEGA, M. L., VEGA, J., VEGA, J. M., MONEO, I., SANCHEZ, E., & MIRANDA, A. (2003).** "Cutaneous reactions to pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa*) in pediatric population." *Pediatric allergy and immunology*, 14(6), 482-486.
- VILLALVA QUINTANA, S. (1996).** *Plagas y enfermedades de jardines* (No. SB 603.5. V54 1996).
- ZHANG, Q. H., & PAIVA, M. R. (1998).** "Female calling behaviour and male response to the sex pheromone in *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.)(Lep., Thaumetopoeidae)." *Journal of applied entomology*, 122(1-5), 353-360.

Webs consultadas:

CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE, CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL. <<http://www.agroambient.gva.es/es/web/medio-natural/procesionaria-del-pino>> [Consulta: 18 de noviembre de 2019].

JUNTA DE ANDALUCÍA (2013)

<https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal_web/web/temas_ambiental/es/montes/sanidad_forestal/planes_lucha_integrada/pli_procesionaria.pdf> [Consulta: 9 de diciembre de 2019].

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

<<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/conregnom.asp>> [Consulta: 24 de noviembre de 2019].