



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

**ESTUDIO DEL EFECTO DE USO DE
ULTRASONIDOS EN LA
COMUNICACIÓN QUÍMICA ENTRE
ORGANISMOS VIVOS.**

Alumno: Rafael Mellado Hernández

Tutor: Damián Martínez Muñoz
Antonio J. Ortiz Hernández

Depto.: Ingeniería de telecomunicación
Química inorgánica y orgánica

Febrero, 2017

Universidad de Jaén
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO DEL EFECTO DE USO DE ULTRASONIDOS EN LA COMUNICACIÓN QUÍMICA ENTRE ORGANISMOS VIVOS

Alumno: Rafael Mellado Hernández
Tutor: Prof. D. Damián Martínez Muñoz
Tutor: Prof. D. Antonio J. Ortiz Hernández
Depto.: Ingeniería de la Telecomunicación
Química Inorgánica y Orgánica

Visto bueno a la defensa del TFG

Firma autor/a

Firma tutor/a

El presente Trabajo Fin de Grado fue realizado bajo la supervisión de mis dos tutores: D. Damián Martínez Muñoz y D. Antonio J. Ortiz Hernández. Sin ellos, su realización no habría sido posible.

A Doña María Pilar Medina Vélez y a Sergio de la Universidad Politécnica de Madrid, gracias por vuestra inestimable colaboración y predisposición. A Nacho y a José Ramón Verdú por vuestra ayuda y conocimientos de estadística.

Gracias a todos y cada uno por formar parte de este trabajo de investigación.

Gracias a toda mi familia, en especial a mis padres. A ellos se lo debo todo por muchas razones, entre ellas, porque son los pilares fundamentales en los que me apoyo, porque sin ellos no habría alcanzado todas mis metas y porque su ejemplo me impulsa a ser mejor cada día. Mi mayor deseo es que podáis sentirlos orgullosos de mí.

A mis amigos y compañeros, gracias por haber sido el mejor apoyo que he tenido durante todos estos años.

ÍNDICE GENERAL

1	Resumen.....	10
2	Introducción	11
2.1	Comunicación Química	11
2.2	Semioquímicos	11
2.3	Clasificación de los semioquímicos.....	12
2.3.1	Feromonas.....	12
2.3.2	Aleloquímicos.....	12
3	Motivación del estudio.....	14
4	Objetivos.....	16
5	CERATITIS CAPITATA.....	17
5.1	Introducción	17
5.2	Distribución geográfica.....	19
5.3	Ciclo biológico.....	20
5.3.1	Huevo	21
5.3.2	Larva.....	21
5.3.3	Pupa	22
5.3.4	Adulto	22
5.4	Comportamiento	23
5.5	Daños	24
5.6	Métodos de control.....	25
5.6.1	Mosqueros y trampas cazamoscas	26
5.6.2	Lucha química.....	27
5.6.3	Lucha biológica.....	27
5.6.4	Lucha autocida.....	28
6	RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS OLIVIER	29
6.1	Introducción	29
6.2	Distribución geográfica.....	29

6.3	CICLO BIOLÓGICO	31
6.3.1	Huevo	31
6.3.2	Larva.....	32
6.3.3	Pupa	32
6.3.4	Adulto	33
6.4	Comportamiento	33
6.5	Daños	34
6.6	Métodos de control.....	36
6.6.1	Control cultural.....	36
6.6.2	Control biológico	36
6.6.3	Trampeo con feromona.....	37
6.6.4	Control químico.....	37
7	Electrofisiología: herramienta en el estudio de la respuesta antenal	39
7.1	Introducción	39
7.2	Electrofisiología. Definición y origen.....	39
7.3	Electroantenograma.....	39
7.4	Procedimiento de EAG.....	41
8	Materiales y Métodos	44
8.1	Generación de señales ultrasónicas.....	44
8.1.1	Convertor Analógico – Digital / Digital - Analógico (AD/DA).....	45
8.1.2	Amplificador PM40C	46
8.1.3	Altavoz de ultrasonido Vifa.....	49
8.1.4	Sonómetro RION NL-32.....	51
8.2	Características de las señales ultrasónicas utilizadas	52
8.2.1	Modulación	53
8.2.2	Modulación AM de doble banda lateral (DSB-SC).....	54
8.2.3	Modulación FM	58
8.3	Uso potencial de ultrasonidos en el control de <i>Ceratitis capitata</i>	62
8.3.1	Insectos	62

8.3.2	Equipo de ultrasonidos.....	62
8.3.3	Cámaras	63
8.3.4	Bioensayo	63
8.4	Ensayo de comportamiento en <i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	66
8.4.1	Insectos	67
8.4.2	Equipo de Ultrasonidos	68
8.4.3	Estudio de aislamiento acústico	68
8.4.4	Olfactómetro de 4 vías	76
8.4.5	Bioensayo	78
9	Resultados y Discusión	81
9.1	Resultados y discusión ensayo de oviposición de <i>Ceratitis Capitata</i>	81
9.2	Resultados y discusión ensayo de comportamiento de <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> . 83	
9.2.1	Resultados con modulación AM	83
9.2.2	Resultados con modulación FM	84
10	Conclusiones.....	88
11	Bibliografía	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Categorías de semioquímicos	11
Figura 5.1 Ceratitis Capitata Wied.....	18
Figura 5.2 Dacus oleae Gmel.	18
Figura 5.3 Rhagoletis cerasi L.	18
Figura 5.4 Distribución geográfica de Ceratitis Capitata.	19
Figura 5.5 Ciclo biológico de Ceratitis Capitata.	20
Figura 5.6 Mosca de la fruta ovipositando.	21
Figura 5.7 Huevos de Ceratitis Capitata.	21
Figura 5.8 Larvas de Ceratitis Capitata.....	22
Figura 5.9 Devaluación de la calidad del fruto.	22
Figura 5.10 Pupa de Ceratitis.....	22
Figura 5.11 Pupas en el suelo.	22
Figura 5.12 Hembra Ceratitis Capitata.....	23
Figura 5.14 Apareamiento.	23
Figura 5.13 Macho Ceratitis Capitata.....	23
Figura 5.14 Hembras C.Capitata ovipositando sobre especie hospedante.	24
Figura 5.15 Daños ocasionados por mosca de la fruta.	24
Figura 5.16 Umbrales de daños producidos en una cosecha debido a una plaga.....	25
Figura 5.17 Trampas Cazamoscas.....	27
Figura 6.1 Mapa de origen del Picudo Rojo.....	29
Figura 6.2 Países infectados por la plaga.....	30
Figura 5.3 Expansión del Picudo Rojo en España	31
Figura 6.4 Huevo de Rhynchophorus ferrugineus Olivier.....	32
Figura 6.5 Diferentes estados de crecimiento de larva de Rhynchophorus ferrugineus Olivier	32
Figura 6.6 Adulto emergiendo de la pupa.....	33
Figura 6.7 Adulto de Rhynchophorus ferrugineus Olivier.	33
Figura 6.8 Phoenix Canariensis afectado por el picudo rojo	35
Figura 6.9 Phoenix dactylifera afectada por el picudo rojo.....	35
Figura 6.10 Trampa cónica con difusor de feromonas [11]	37
Figura 6.11. Relación entre el umbral de tratamiento (UT) y el nivel económico de daños (NED). Cuando la densidad de plaga alcanza en umbral de tratamiento (UT) se aplica una técnica de control.....	38
Figura 7.1 Aspecto de un electroantenograma y proceso de quimiorrecepción	40
Figura 7.2 Sistema de control de estímulos.....	41

Figura 7.3 Principio del registro de señales mediante EAG.	42
Figura 7.3 Monitorización de la respuesta de una antena a un compuesto.....	42
Figura 7.4 Efecto del ruido en EAG.	43
Figura 8.1 Roland UA-1010 Octa-Capture.....	45
Figura 8.2 Roland UA-1010 Octa-Capture.....	45
Figura 8.3 Respuesta en frecuencia de Roland UA-1010 Octa-Capture.....	46
Figura 8.4 Diferente puntos de vista del Amplificador PM40C.	47
Figura 8.5 Amplificador PM40C.....	48
Figura 8.6 Respuesta en frecuencia del amplificador.	48
Figura 8.7 Generación de ondas mecánicas en el interior del altavoz.	49
Figura 8.8. Altavoz ultrasonido Vifa.	50
Figura 8.9 Respuesta en frecuencia del altavoz Vifa	50
Figura 8.10 Diagrama polar del altavoz	51
Figura 8.11 Proceso de modulación	53
Figura 8.12 Modulación AM.....	54
Figura 8.13 Espectro de una señal AM.....	55
Figura 8.14 Espectro de potencia AM DSB-SC. ($F_p = 5\text{Khz}$ y $F_m = 125$)	56
Figura 8.15 Espectro banda lateral superior AM DSB-SC. ($F_p = 5\text{Khz}$ y $F_m = 125$)	57
Figura 8.16 Modulación FM	58
Figura 8.17 Espectro de señal modulada en FM	59
Figura 8.18. Nº de componentes espectrales significativas de señal FM en función de β	60
Figura 8.19 Espectro señal modulada FM.	61
Figura 8.20 Zoom espectro señal modulada en FM.....	61
Figura 8.21: Equipo emisor de ultrasonidos al completo.....	62
Figura 8.22: Jaula montada (izquierda) y ponedero (derecha).....	64
Figura. 8.23: La puesta de Ceratitis preparada para contar a la lupa.....	65
Figura 8.24 Evaluación de la fertilidad	66
Figura 8.25 Recipiente con Picudo rojo en el interior.....	67
Figura 8.26. Ubicación del altavoz Vifa.....	68
Figura 8.27 División de energía acústica cuando incide con un obstáculo.....	69
Figura 8.28 Calibrador acústico NC-74.....	70
Figura 8.29 Alturas y situación de las medidas tomadas.	71
Figura 8.30. Posición del sonómetro para toma de medidas	72
Figura 8.31 Gráfico de líneas de pérdidas por absorción.....	73
Figura 8.32 Diagrama de barras de pérdidas por absorción en modulación AM. ..	73
Figura 8.33 Grafico de líneas de pérdidas en FM	74

Figura 8.34 Diagrama de barras de pérdidas en modulación FM.....	75
Figura 8.35 Esquemático de Olfactómetro de 4 vías.	76
Figura 8.36 Tubo de metacrilato usado para el Olfactómetro	76
Figura 8.37 Contenedor de plástico usado para capturar los insectos que caen ..	77
Figura 8.38 Estructura del 4-metil-5-nonanol.	78
Figura 8.39 Cámara central rellena de vermiculita deshidratada.	78
Figura 8.40 Picudos en contenedor con Feromona.	79
Figura 8.41 Picudos en contenedor sin feromona.....	79
Figura 9.1. Representación gráfica comparativa en modulación FM.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1. Expansión territorial y evolución temporal de <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> Olivier.	30
Tabla 8.1 Mediciones en modulación AM.	72
Tabla 8.2 Mediciones en modulación FM.	74
Tabla 9.1. Fecundidad media acumulada para el testigo y las moscas que se han sometido a ultrasonidos.....	82
Tabla 9.2. Fertilidad media del sexto día de experimento, para el testigo y el tratamiento de ultrasonidos.	82
Tabla 9.3. Fertilidad media del octavo día de experimento, para el testigo y el tratamiento de ultrasonidos.	82
Tabla 9.4. Resultado del contraste estadístico ANOVA de un factor.	83
Tabla 9.5 Resultados Test ANOVA GLM.	84
Tabla 9.6. Resultados del test de Levene para Modulación FM.....	85
Tabla 9.7 Resultado del contraste post-hoc.....	86

1 RESUMEN

La comunicación es una cualidad innata de todo ser vivo y se produce debido a la necesidad de relacionarse tanto con su entorno físico, en el que vive en comunidad, como con su entorno biológico. El proceso de comunicarse es imprescindible para el desarrollo normal de la vida, ya sea para alimentarse, reproducirse, entrar en contacto con otros seres vivos o eludir la depredación por parte de otro organismo.

Basándonos y tomando de premisa esta idea, este Trabajo Fin de Grado se apoya en el uso de los ultrasonidos, modulados tanto en AM como en FM para el estudio y análisis del comportamiento en organismos vivos. Estamos ante una línea bastante novedosa, ya que nunca antes se han realizado ensayos de tales características en organismos vivos, por lo que partimos sin referencias previas.

Este Trabajo Fin de Grado está compuesto de dos partes bien diferenciadas:

- Bioensayo de ovoposición en *Ceratitis Capitata* (Mosca de la fruta).
- Bioensayo con *Rhynchophorus ferrugineus* (Picudo de la palmera).

Nos apoyaremos para la consecución de los objetivos propuestos en dos campos bastante diferentes entre sí, como son el de las Telecomunicaciones y el de la Química. En esta línea, se proporciona una metodología basada en ensayos no destructivos. Es decir, aplicamos señales de excitación en el rango de frecuencia de los ultrasonidos para obtener un patrón de comportamiento y así poder enfocarlos al control de plagas pudiendo repelerlos, atraerlos o aturdirlos.

Además, se llevará a cabo una evaluación estadística comparativa, para así conseguir caracterizar los efectos y comprobar si realmente son significativos y de esta forma considerar esta técnica como una solución dentro de las tantas que existen actualmente para el combate de las distintas plagas que aquí se estudian.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Comunicación Química

Hay un tipo de comunicación que todos los seres vivos tenemos en común desde el origen de la vida: comunicación química o semioquímica. Distintas señales químicas son utilizadas para revelar y enviar información de nuestro estado o para informar a otros organismos que tienen que cambiar de conducta. Solo existe una condición para que esta comunicación se pueda llevar a cabo y es que exista un emisor capaz de mandar información y un receptor que sepa interpretarla. La comunicación química es el primer paso que los organismos vivos establecen para comunicarse.

Esta introducción nace de la necesidad de realizar una breve presentación a los semioquímicos y su clasificación ya que no dejan de ser compuestos químicos que intervienen de alguna u otra forma en la vida de los insectos y a cómo hacen posible la interacción y comportamiento gregario en los insectos que estudiamos en este trabajo.

2.2 Semioquímicos

Los semioquímicos son los compuestos químicos implicados en la comunicación entre insectos (Howse, 1998) [12]. Es un término usado para una sustancia que incluye un mensaje determinado y orienta el comportamiento de estos.

Las variedades y funciones que pueden desempeñar los semioquímicos ha hecho necesario definir los tipos más comunes:

1. Feromonas: sustancias que intervienen en la comunicación e interacción de una misma especie.
2. Aleloquímicos: sustancias químicas liberadas por un organismo que ejercen efectos conductuales o fisiológicos, por lo general desfavorable, en otro organismo. Suelen involucrar a organismos de distintas especies.

En la Figura 2.1 se ilustran las distintas clases de semioquímicos, de las que pasaremos a dar una pincelada en el siguiente epígrafe de este documento.

Semioquímicos	Tipos	
Feromonas	Inductoras	De alarma, sexuales, agregación...
	Primarias	De maduración sexual, desarrollo...
Aleloquímicos	Kairomonas	Benefician al receptor
	Alomonas	Benefician al emisor
	Sinomonas	Benefician a ambos
	Antimonas	No benefician a ninguno

Figura 2.1 Categorías de semioquímicos

2.3 Clasificación de los semioquímicos

2.3.1 Feromonas

El término *feromona* hace referencia a las sustancias que un animal segrega y que provocan una reacción o comportamiento específico en un miembro de la misma especie [12]. Podríamos extendernos hablando de los distintos tipos en los que se subdividen las feromonas —inductoras y primarias—, pero nos vamos a centrar principalmente en las feromonas inductoras que son las que nos interesan ya que son las que usaremos para realizar el bioensayo del picudo rojo.

2.3.1.1 Feromonas sexuales

Sustancia química producida por las glándulas sexuales de algunos organismos vivos para atraer a otro de distinto sexo con el fin último de originar una conducta como la orientación, copulación entre individuos de la misma especie entre otros. Son emitidas generalmente por las hembras para atraer a los machos e indicarles que están disponibles para la cópula.

2.3.1.2 Feromonas de alarma

Algunos seres vivos son capaces de segregar una feromona para comunicar a otro miembro de su misma especie que existe algún tipo de peligro. Estas feromonas emitidas van a orientar y modificar la pauta de comportamiento entre individuos de la misma especie.

2.3.1.3 Feromona territorial

Se utiliza para marcar la frontera del territorio de un determinado organismo vivo. En perros y gatos, por ejemplo, están presentes en la orina, que se deposita en distintos puntos y que sirven para marcar el perímetro del territorio que se quiere reivindicar.

2.3.1.4 Feromona de camino

Es bastante usual en los insectos con comportamientos gregarios. Por ejemplo, las hormigas marcan su camino con estas feromonas, que son hidrocarburos volátiles. Estas siguen el rastro dejado por la feromona y les sirve como una guía para volver al nido.

2.3.2 Aleloquímicos

Son diversas sustancias que operan entre organismos o miembros de especies distintas. La agricultura ecológica hace un buen uso de este tipo de sustancias ya que sirven para proteger los cultivos del asedio de algunas plagas de insectos mediante el método de intercalar plantas aromáticas dentro del cultivo [14].

2.3.2.1 Alomonas

Una alomona es una sustancia química que produce o adquiere un individuo y, al entrar en contacto con individuos de otra especie, provoca en su receptor un comportamiento o una reacción fisiológica adoptiva favorable al organismo emisor.

Cuando un organismo vegetal emite una alomona, resulta beneficiada puesto que reduce la posibilidad de que un herbívoro o polífago pueda utilizar esa planta como fuente de alimento, ya que lo repele, evitando la alimentación o la oviposición, e impide su desarrollo, entre otros efectos, por el cual las alomonas actúan como defensas químicas naturales contra los herbívoros [13].

2.3.2.2 *Kairomonas*

Son una clase de compuestos que son ventajosas para el receptor. El término "kairomona" se deriva de la palabra griega "kairós", que significa "oportunist" (Nordlund et al. 1981, 18). Kairomonas benefician a muchos depredadores e insectos, por ejemplo, guiar a sus presas o insectos potenciales receptores. [13]

Los volátiles de plantas son de principal importancia en la selección de huéspedes por parte de muchos insectos fitófagos. Este comportamiento está condicionado por las kairomonas propiamente dichas, pero también se ha encontrado que la inhibición o atracción hacia especies hospedantes puede estar determinada por la existencia en el medio de sustancias volátiles procedentes de especies no hospedantes. [15]

La dispersión de Kairomonas por parte de la planta beneficia al insecto porque lo orienta hacia ella, o induce su alimentación u oviposición, entre otros beneficios. Como podremos ver más adelante en el caso de las palmeras, ya que una simple herida puede provocar una liberación de kairomonas que son capaces atraer al picudo rojo y romper las barreras de la propia palmera, acabando así con ella.

2.3.2.3 *Sinomonas*

Es un aleloquímico perteneciente a la propia fisiología de un organismo y que cuando entra en contacto con un individuo de distinta especie provoca en el receptor comportamiento que es adaptativamente favorable para ambos organismos 1 y 2. (Dicke y Sabelis, 1989).

3 MOTIVACIÓN DEL ESTUDIO

Este proyecto emerge de la necesidad de crear un nuevo camino, o un inicio al menos, al inconveniente de las plagas y sus consecuencias negativas tanto en ámbitos biológicos como económicos, intentando repeler las plagas sin necesidad de pesticidas, lo que ayudará al medio ambiente y evitará así la contaminación del mismo. La hipótesis general de partida es que las señales ultrasónicas afectan en mayor o menor medida al comportamiento de los insectos previamente seleccionados. Por ende, nos centraremos en dos plagas de gran interés internacional como son la del picudo rojo en palmeras y en mosca de la fruta en cultivos frutícolas.

El picudo rojo o *Rhynchophorus ferrugineus* y la mosca mediterránea de la fruta o *Ceratitis capitata* (Wiedemann) son importantes plagas que golpean nuestro ecosistema, produciendo numerosos daños económicos e importantes daños a plantas cultivadas. A pesar de que se intenta detener esta situación, los medios empleados no resultan efectivos, ya que, puesto que la mayoría son pesticidas o semioquímicos, no acaban con las plagas, sino que perjudican las cosechas.

La lucha química muchas veces es en vano. Es por ello por lo que se intentan estudiar o plantear otro tipo de alternativas al uso de semioquímicos perjudiciales que dañan gravemente el entorno biológico, para intentar reducir los impactos o efectos negativos que tendrían en éste, como pueden ser las técnicas ultrasónicas —entre otras— que son prácticamente inertes al medio, son capaces de llegar a todos los lugares y no provocan daño por donde se propagan.

A pesar del uso de productos químicos o pesticidas, alrededor de un 35% de los cultivos mundiales son destrozados debido a distintos tipos de plagas, algunas bastante agresivas, que ocasionan graves problemas económicos a escala mundial. Se trata de un problema del que no existen armas efectivas para combatirlo. Aunque también hay que decir que el efecto económico varía según qué plaga sea con lo que es bastante complicado medir con precisión los efectos económicos que puede tener una plaga sobre un determinado cultivo.

El picudo rojo es, a día de hoy, uno de los insectos más dañinos para las palmeras en todo el mundo, ya que la invaden y solo la abandonan cuando ya no queda apenas tejido vegetal para alimentarse.

La afección de este insecto supone un peligro para la conservación de la especie, ya que producen daños que no son visibles a simple vista y perjudica principalmente a especies de la familia *Chamaerops humilis* y la palmera de Canarias, *Phoenix canariensis* así como a las palmeras datileras, *Phoenix dactylifera*, entre otras. Estos dos tipos de palmeras se encuentran entre las más utilizadas como plantas ornamentales en jardinería.

Por otro lado, tenemos a la mosca de la fruta, otra plaga también bastante peligrosa ya que ataca a todos los cultivos que disponen de frutos, entre los que hay que destacar los cítricos, los frutales y la vid. El problema es que puede reproducirse fácilmente, y ello puede conllevar a tener una población abundante a lo largo de todo el año.

Este tipo de plagas son bastante preocupantes ya que suponen un aumento en los costes de producción por los gastos que llevan en prevención y en su tratamiento como para su posterior eliminación. Además las pérdidas por productos que no pueden ser comercializados debido a su infección pero sobre todo a que esto afecte a todo el cultivo lo que supondría un desastre económico, como ya hemos comentado con anterioridad.

Estudiaremos el comportamiento que tienen los insectos para ver cuál es la forma más efectiva para combatirlos, si existiera, a parte de las bandas de frecuencia y modulación a las que son más vulnerables este tipo de organismos, basándonos en herramientas tan útiles como la electroantenografía.

Para poder estudiar el comportamiento lo que vamos a realizar son distintos bioensayos. Además tenemos que cumplir una serie de requisitos en el laboratorio para su puesta a punto, ya que si el bioensayo no se desarrolla en condiciones óptimas, estos experimentos no serían nada fiables. Por ello pasamos a describir en que consiste.

Los bioensayos son experimentos que se realizan bajo determinadas condiciones de laboratorio con el deseo de evaluar cualitativa y cuantitativamente el efecto que excitaciones externas (en nuestro caso señales de ultrasonidos) producen sobre los distintos organismos vivos seleccionados.

En esta línea, nos vamos a centrar en estudiar y realizar bioensayos de dos tipos de insectos de dos familias distintas, dípteros y coleópteros:

- Análisis y estudio del comportamiento en *Rhynchophorus ferrugineus* o *picudo rojo*.
- Bioensayo de oviposición de mosca de la fruta o *Ceratitis capitata* para ver de qué forma afectan los ultrasonidos en mortalidad, fecundidad y fertilidad.

4 OBJETIVOS

La hipótesis general de trabajo es el estudio de la intercepción entre los impulsos generados por la estimulación simultánea de quimiorreceptores y mecanorreceptores. La variable a estudio es el comportamiento aunque también nos basaremos en la señal electroantenográfica. La electroantenografía (EAG) es una técnica registran los cambios de potencial eléctrico (ΔmV) entre los extremos de la antena, que resultan de una estimulación química, suministrando así información sobre la sensibilidad y especificidad de los receptores olfatorios a las moléculas químicas (Schneider, 1957; Schneider et al., 1977).

En nuestro estudio, intentamos confirmar investigaciones previas relativas a la interacción entre señales acústicas y químicas, en concreto el principal objetivo es, confirmar si los rangos de frecuencia que más interfieren las señales químicas en el caso de Dípteros, también lo son en el caso de otros órdenes tales como *Coleopterae* y *Lepidoptera*.

Los objetivos de este Trabajo fin de Grado, son los siguientes:

1. Estudio EAG de semioquímicos del insecto objetivo.
2. Se buscarán patrones de señal que sirvan para repeler, atraer o aturdir a estos insectos.
3. Se grabarán los ultrasonidos que ésta genera, analizándolos e intentando asociarlos a diferentes contextos.
4. Estudio de comportamiento que comprende dos partes diferenciadas:
 - a. Estudio de la interacción entre los ultrasonidos modulados y el comportamiento de especies de dos familias distintas: Díptera y Coleóptera.
 - b. Incidencia de la radiación ultrasónica sobre fertilidad, mortalidad y emergencia del díptero *Certatitis Capitata*. Estudio de inocuidad del entorno de insectos no objetivo.

5 CERATITIS CAPITATA

5.1 Introducción

Dentro de los dípteros, la familia *Tephritidae*, es la más peligrosa debido a que es la que ocasiona mayor número de daños, en términos económicos y de producción, en especies frutales. De ahí el nombre coloquial que se le ha dado a esta familia de dípteros mejor conocida como *mosca de la fruta*.

La mosca mediterránea de la fruta o *Ceratitis capitata* (Wiedemann) es una importante plaga que ataca a plantas de 55 familias. Entre ellas se encuentran importantes especies cultivadas como albaricoque, pimiento, caqui, ciruela, pera, o cítricos. En 2001 el bloqueo a la exportación de clementinas españolas por EE.UU. ocasionó pérdidas económicas que podrían haber alcanzado, según algunas fuentes, los 300 millones de euros. De ahí que capte la atención de investigadores de todo el mundo pero en particular de los investigadores de países que sufren esta terrible plaga.

Este insecto es un díptero cuyo origen se encuentra, muy probablemente, en el África Centro-oriental, aunque las rutas de comercio global abiertas por el hombre la han convertido en una especie bastante extendida internacionalmente.

Al ser una especie que está presente en multitud de áreas geográficas, y que en cada una de estas haya una variedad especial, no ha impedido que científicos e investigadores de todo el mundo hayan acercado posturas para intentar obtener soluciones comunes que permitan enfrentar este tipo de plagas.

La gran variedad de géneros y especies y el tipo de daño que causan, constituyen además uno de los factores que limitan en mayor grado la movilización y el comercio de fruta fresca por las restricciones que imponen los países que se encuentran libres de la plaga. (Malavasi et al. 1980, citado por Martínez, 1998)[1]

El intercambio de conocimientos, expertos, y demás factores han propiciado grandes avances en la lucha. Gracias a toda esta sinergia el esfuerzo se ha visto recompensado con un éxito parcial y un futuro claramente esperanzador.

España, al ser un país de clima mediterráneo y también por su privilegiada situación geográfica se ha visto sacudida por la severa acción de este tipo de plagas en campos y cultivos frutícolas, llevando a ello una bajada del índice de producción bastante preocupante. Además afectando en gran medida a las exportaciones que son llevadas a cabo desde nuestro país ya que algunos países han puesto sus propias barreras fronterizas, en términos de tolerancia y en inspecciones fitosanitarias para impedir que este tipo de plagas sigan extendiéndose de esta forma tan peligrosa.

Concretamente, insectos tan peligrosos como *Dacus oleae* Gmel, o «mosca del olivo» (Figura 5.2) que afecta fundamentalmente al cultivo del olivo en la cuenca mediterránea, *Rhagoletis cerasi* L, o «mosca de la cereza » (Figura5.3) además de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Figura 5.1), en la actualidad prácticamente cosmopolita, son 3 de las figuras más representativas de esta familia que son conocidas desgraciadamente por los daños que ocasionan.



Figura 5.1 *Ceratitis Capitata* Wied.



Figura 5.2 *Dacus oleae* Gmel.



Figura 5.3 *Rhagoletis cerasi* L.

Ceratitis capitata es la especie más polífaga y la que presenta un área de distribución más extensa, resultando, por tanto, la especie de mayor importancia económica y la cual ha sido uno de los insectos seleccionados para trabajar e investigar sobre ella en este trabajo fin de grado.

5.2 Distribución geográfica

Como ya hemos comentado, *Ceratitis capitata* es considerada una especie bastante cosmopolita, a ello ha contribuido la ayuda del hombre (de forma involuntaria) debido al transporte de productos de un país contaminado a otro.

Partiendo de la zona Africana de donde es originaria, se extendió de forma indiscriminada a todos los lugares, no solo de climas cálidos sino a zonas con climas templados además de clima tropicales y subtropicales del mundo, estando solo ausentes en zonas de clima polar. De esta forma la podemos encontrar ocupando zonas del sur y del este de África y Madagascar, prácticamente toda Europa meridional y norte de África, (de ahí la denominación inglesa de “Mediterranean Fly”). También se puede encontrar en el este de la India, Nueva Zelanda, Argentina, Centroamérica, también en las Bermudas, Canarias, Azores e islas Hawai. Actualmente, el insecto se encuentra ampliamente distribuido en América del Sur, con la excepción de Chile, entre otros países, tal y como podemos ver en la siguiente imagen (Figura 5.4)

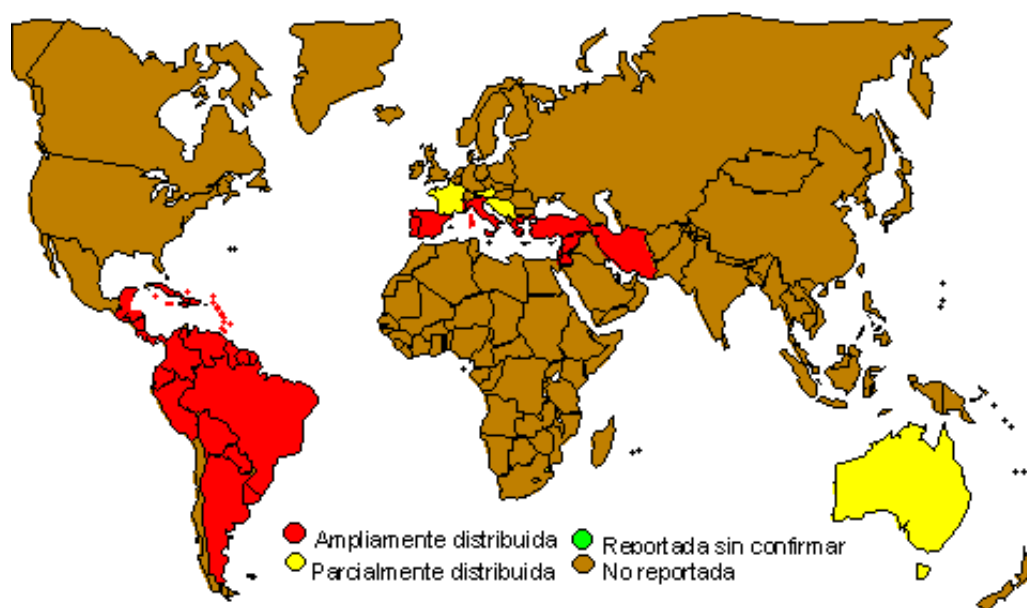


Figura 5.4 Distribución geográfica de Ceratitis Capitata.

Se ha reportado su presencia, pero no se ha logrado establecer en países como: Alemania, Bélgica u Holanda, entre otros, ya que estos países poseen un clima oceánico, con inviernos y veranos frescos, lo cual es poco favorecedor para que estos insectos puedan establecer colonias.

En nuestra península se distribuye por toda la zona sur y regiones mediterráneas, alcanzando en condiciones bastante propicias regiones situadas más profundas.

Este insecto, dándose las condiciones propicias, tiene un alto índice reproductor. Posee gran adaptabilidad alimentaria y además la casi ausencia de enemigos naturales

explican su enorme expansión alcanzando así un poder altamente destructivo al pasar de plantas silvestres hospedantes como el café (*coffea arábica L*) a los cultivos frutícolas cultivados por la mano del hombre. [1]

5.3 Ciclo biológico

La mosca de la fruta es un insecto que posee un tipo de desarrollo holometábolo, es decir, es un tipo de desarrollo característico de los insectos en el que se suceden todas las fases de desarrollo biológico posibles, como se puede ver en la siguiente figura:

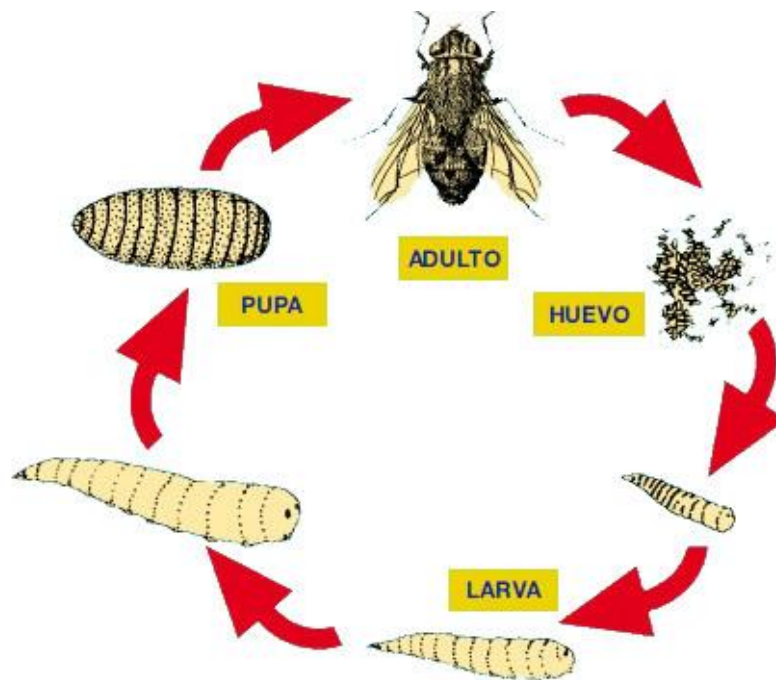


Figura 5.5 Ciclo biológico de Ceratitis Capitata.

En la figura 5.5 contemplamos gráficamente, los procesos biológicos por los que pasa este insecto que como se puede advertir, presenta una metamorfosis completa.

Todas las moscas de la fruta se reproducen rápidamente, sin embargo, los rituales de apareamiento varían desde danzas intrincadas al control territorial hasta al tradicional vuelo nupcial, donde el macho simplemente fecunda a la hembra. [3]

El ciclo de vida de la mosca de la fruta se inicia con la oviposición, cuando las hembras ya en estado biológico de adultas ovipositan (Figura 5.6).



Figura 5.6 Mosca de la fruta ovipositando.

5.3.1 Huevo

Con forma elíptica, de color blanco perla recién puesto (Figura 5.7) para luego amarillearse después. Su tamaño suele ser menor de 2mm, usualmente del orden de un grano de arroz. Estos huevos son generalmente puestos en trozos de fruta o materia orgánica azucarada que las hembras perforan con su oviscapto para introducirlos y que queden dentro. Suelen escoger estos sitios debido a que tienen los suficientes alimentos para brindarles una fuente de alimentación fija después de dejar el cascaron, así como protección frente a especies depredadoras.



Figura 5.7 Huevos de Ceratitis Capitata.

5.3.2 Larva

La larva (Figura 5.8) tiene forma alargada y mide 10 mm de longitud. Es de color blanco o blanco amarillento y tiene un periodo de duración de 6 a 11 días para alcanzar su completo desarrollo. En este estado del ciclo biológico, las larvas ya poseen antenas y papilas sensitivas. Conforme crecen y se alimentan, van desarrollando una especie de galerías dentro del propio fruto que al oxidarse producen la proliferación de bacterias y otros microorganismos, provocando la pudrición del fruto en cuestión. (Figura 5.9)



Figura 5.8 Larvas de Ceratitis Capitata Figura 5.9 Devaluación de la calidad del fruto.

5.3.3 Pupa

Terminada ya la última muda, se desarrolla un proceso con multitud de transformaciones en el cuerpo del insecto, en la que culminarán con la consecución de la fase adulto. Cuando éste emerge el pupario se abre de manera transversal y permanece durante 6 días aproximadamente en este estado. (Figura 5.10 y Figura 5.11)



Figura 5.10 Pupa de Ceratitis. Figura 5.11 Pupas en el suelo.

5.3.4 Adulto

El adulto mide aproximadamente unos 6-8 mm de longitud, con ojos bastante apreciables y bien pigmentados, tórax pardo o gris claro con manchas negras y abdomen marcado, portando una tonalidad definida. El primer par de alas, bien desarrollado, está suficientemente capacitado para permitir el vuelo sostenido, y continuo, que permite a estas moscas desplazamientos importantes, a veces de muchos kilómetros de recorrido.

La hembra posee un abdomen en forma cónica terminando en un fuerte ovíscapo (Figura 5.12) en el que se insertan abundantes sedas sensoriales amarillas y negras. El

macho (Figura 5.13), algo más pequeño, se caracteriza por poseer sobre la frente dos largas sedas que culminan en una paleta romboidal. Y en la figura 5.14 podemos apreciar el apareamiento de moscas de la fruta.



Figura 5.12 Hembra Ceratitis Capitata. Figura 5.14 Apareamiento.



Figura 5.13 Macho Ceratitis Capitata.

5.4 Comportamiento

Después de un tiempo, la mosca ya adulta emprende el vuelo, ya que sus alas perfectamente desarrolladas permiten el vuelo aunque normalmente se suele posar sobre algún objeto que le sea próximo, para ir en busca de materia orgánica azucarada que le permita desarrollar sus órganos sexuales completamente. Las fuentes principales de estos azúcares son principalmente los frutos aunque también suelen aprovechar el néctar de las plantas. El encuentro sexual entre dos moscas se produce cuando el macho moviendo sus alas de manera continuada, segrega una determinada feromona, la cual permite atraer a la hembra hasta llegar al momento del apareamiento.

Una vez que la hembra es fecundada, inmediatamente se pone a buscar un fruto en condiciones favorables para poder desarrollar su linaje, introduce el ovipositor a la especie hospedante para introducir los huevos (Figura 5.14)



Figura 5.14 Hembras C.Capitata ovipositando sobre especie hospedante.

5.5 Daños

El poder de albergar en un fruto multitud de larvas y el alimentarse de la propia pulpa del fruto, puede hacer que quede inutilizado para el consumo. Por ello, cuando un fruto es infectado de esta manera por la mosca de la fruta, provoca su caída del árbol. Esto puede conllevar a la entrada de organismos patógenos dentro, capaces de ocasionar enfermedades bastante graves a quien lo consuma (Figura 5.15)



*Fuente: XV Curso Internacional sobre moscas de la fruta,
Memorias. Metapa de Domínguez, Chiapas, México. 2003*

Figura 5.15 Daños ocasionados por mosca de la fruta.

Luego los destrozos que afectan indirectamente a los productos vegetales son los daños puramente económicos. Ya que al ser infectados, pierden valor comercial de cara

a su posterior venta, lo que conlleva a una baja productividad y a un balance negativo, pudiendo esto provocar nuevos daños o la intensificación de otras plagas, existentes en la actualidad. La presencia de la plaga en el cultivo, implica unos gastos adicionales de productos químicos de control, al igual que unos daños medioambientales que son difíciles de asumir en muchas ocasiones.

Otros daños indirectos que se forman son los debidos a las restricciones en productos de importación por parte de los organismos fitosanitarios de los distintos países del planeta, ya que en algunas áreas del planeta (como Sudamérica o África) ha resultado imposible la libre circulación de productos vegetales.

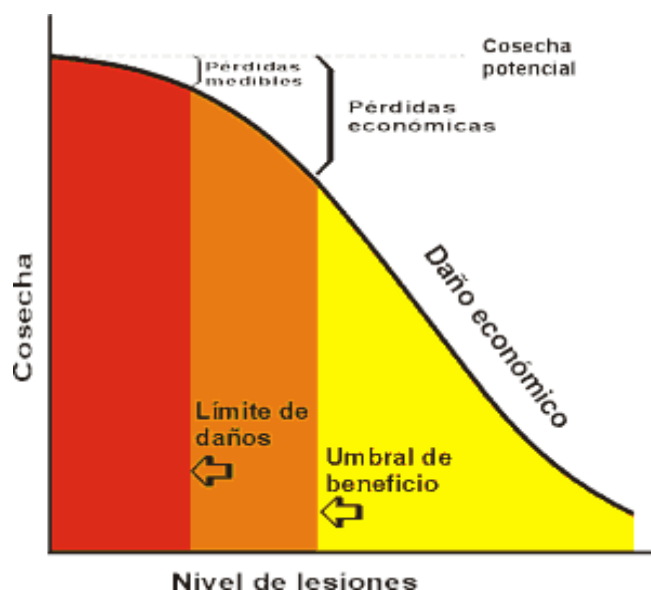


Figura 5.16 Umbrales de daños producidos en una cosecha debido a una plaga.

5.6 Métodos de control

La dificultad que supone enfrentarse a esta plaga en forma de larva es bastante compleja, debido a que muchas veces el cambio biológico de larva a pupa se realiza bajo tierra. Por ello, los ataques más directos se realizan en moscas con ciclo biológico de forma adulta, ya que son más vulnerables y visibles.

Existen bastantes métodos, ya que uno de los componentes fundamentales es el control ya sea a través de trampas o atrayentes según la especie para así poder realizar un tanteo aproximado de número de adultos, área afectada y el avance que haya de la plaga. Realizar un programa de control comprende una serie de características:

- Conocimiento de las características climáticas, geográficas y socioeconómicas del área. [2]
- Conocimiento de la época de producción de la zona. [2]

- Distribucion de los hospedantes naturales para poder decretar, tipo de trampa, atrayente, recursos físicos y químicos. [2]

Pero vamos a hablar de los métodos más utilizados:

5.6.1 Mosqueros y trampas cazamoscas

Es uno de los primeros métodos utilizados. Consiste en detectar la presencia de *Ceratitis Capitata* en su ciclo biológico de adulto, mediante un atrayente hacia una fuente específica. Entre los principales y más comunes tipos de atrayentes podemos destacar los alimenticios y sexuales que son la base fundamental en las trampas usadas en este tipo de insecto. Con ello, obtenemos información valiosa como densidad de adultos en campo o proporción sexual entre otros y también podemos determinar el nivel de infección de esta plaga. [2]

Este tipo de trampas se suelen colocar a 2 metros de altura, cerca de la zona del árbol en cuestión a medio día en un sitio donde no se impida la circulación del aire y que le proporcione sombra la mayor parte del tiempo además de procurar que el follaje no obstruya la libre entrada de moscas en la trampa [6]. Así se consigue la captura de los adultos además del seguimiento de las poblaciones para realizar los tratamientos en el momento adecuado.

Son muchos los cebos utilizados: vinagre al 25%, agua de salvado, fosfato amónico al 2 por 100, o proteínas hidrolizadas ya comercializadas para este objeto, que se muestran más eficaces y conservan más tiempo su poder de atracción. Estas proteínas son extractos de diferentes productos básicamente vegetales como maíz y caña de azúcar que al descomponerse desprenden amonio (NH_4) como componente orgánico volátil.

Los atrayentes sexuales, como el trimedlure, adaptados en mosqueros de diferentes tipos (Nadel, Steiner, etc.), han constituido una gran ayuda para determinar la densidad de las poblaciones en los trabajos científicos y al mismo tiempo han resulta do un medio de lucha indirecta contra la plaga, pues, al ser selectiva su atracción sólo para los machos, la proporción de éstos en el ecosistema desciende considerablemente, quedando, por tanto, muchas hembras sin fecundar. La microencapsulación de este atrayente, lograda recientemente, mejora aún más su persistencia y su manejo, al no tener que recebar constantemente los mosqueros.

Finalmente, a partir de los estudios del espectro visual sensitivo de los adultos, se han desarrollado también en los últimos años trampas cromotrópicas diseñadas con los colores que resultan más atrayentes para la mosca (generalmente la gama de amarillos). Por este medio se elimina un buen número de ejemplares de uno y otro sexo. [5]

En la figura 5.17 vemos un claro ejemplo de trampa cazamoscas.



Figura 5.17 Trampas Cazamoscas.

5.6.2 Lucha química

La pulverización total consiste en mojar todo el árbol con una vaporización de insecticida de gota más o menos fina. La cantidad de caldo necesario para el tratamiento de un extenso cultivo, que frecuentemente exige dos e incluso tres pases, hace que sea un tratamiento poco rentable económicamente.

Otro problema que conlleva este método de control es que al rociar todo el árbol puede contaminar el fruto, de tal forma que aparezcan residuos tóxicos en la pulpa puesto que estos absorben los principios activos de los insecticidas.

Un insecticida potente irradiado de manera descontrolada y de manera frecuente sobre una zona pueden terminar con una plaga pero de alguna manera pueden terminar con un entorno biológico que es necesario para mantener el equilibrio del ecosistema e incluso para mantener el propio cultivo. Y por ende el abuso de insecticidas de cualquier tipo y de cualquier potencia, haría por crear especies resistentes a tales productos, lo que originaría una situación cuyas consecuencias pueden ser verdaderamente desastrosas tanto a nivel económico como sobre todo y mayormente, ecológico.

5.6.2.1 Tratamiento cebo

Mediante este método se resuelven en parte o al menos se mitigan los inconvenientes enumerados hasta aquí. Consiste en humedecer una rama o una determinada zona del árbol que más esté orientada con dirección al sol con una combinación de insecticida y cebo atrayente, generalmente proteína hidrolizada. [5]

Este tratamiento se aplica cada 7-10 días [4]

5.6.3 Lucha biológica

Los métodos de control biológico se han desarrollado como nuevos métodos de control de insectos. El control biológico se define como la utilización de otros insectos, como depredadores, parásitos o patógenos, para que devoren las plagas de plantas ya cultivadas. Este tipo de lucha comprendería, la lucha autocida (empleo de machos

estériles), la microbiológica (empleo de virus, bacterias y protozoos entre otros), utilización de hormonas y atrayentes etc.

Mucho se ha investigado sobre los parásitos naturales que pudieran limitar las poblaciones de *Ceratitis* en los países que soportan sus desastrosos ataques. La lista de parásitos, principalmente himenópteros, es bastante numerosa. No obstante, debido a la escasa eficiencia que produce la cría artificial, los resultados obtenidos están lejos de lo que se esperaba.

5.6.4 *Lucha autocida*

La lucha autocida se define como el método de control poblacional mediante la técnica de machos estériles, sugiere el empleo de insectos para controlarse a sí mismos. Este método se puede describir como la cría masiva de insectos a cuales se manipula genéticamente, esterilizándolos, para luego, cuando son liberados y en gran número, estos insectos esterilizados puedan competir y aparearse con insectos salvajes. Y por ello se producirá una disminución de la fertilidad de la población, reduciendo el tamaño de la misma, hasta incluso hacerla desaparecer.

La esterilización se puede producir por dos vías: medios físicos y medios químicos, entre los primeros están las radiaciones ionizantes producidas por isótopos radiactivos, y en los segundos se incluyen sustancias químicas que al ser engullidas por el insecto determinan su esterilidad.

Si este control se lleva a cabo durante el tiempo que sea necesario, la relación de machos estériles a machos fértiles aumentará, provocando con ello una desaceleración en el proceso de la ovoposición y por consiguiente de la densidad de población.

6 RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS OLIVIER

6.1 Introducción

El picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1970) es un coleóptero de origen tropical, originario del sudeste asiático y Oceanía. Es, a día de hoy, uno de los insectos más dañinos para las palmeras en el mundo, provocando por lo general la muerte de la palmera. Comenzó su expansión hace 25 años atacando a palmeras datileras de los países del sur de Asia para más tarde ser introducido en el norte de África, y continuar así su expansión hacia los países Europeos y siempre ligados a importación de palmeras

La entrada de este coleóptero a España es fruto del trasiego del comercio internacional a bajo coste y sin ningún tipo de control fitosanitario producido por el boom inmobiliario. Poco a poco, esta plaga fue extendiéndose por una gran cantidad de países siendo por ello una clara amenaza en toda la cuenca mediterránea ya que en ella encuentra las condiciones perfectas para su avance.

6.2 Distribución geográfica

Originaria del Sureste Asiático donde es una plaga de las palmeras de coco (Figura 6.1). La plaga de *Rhynchophorus ferruginosus* se introdujo a través de palmeras infectadas procedentes de Egipto u otros países del norte de África en nuestro país. Siendo la importación de ejemplares de palmeras infectadas, la vía de entrada en las distintas poblaciones. Su expansión se produce a partir de las palmeras introducidas en las distintas zonas, debido en su mayoría a las importaciones ilegales por la demanda masiva de palmera para el ajardinamiento de nuevos espacios urbanos. [6]



Figura 6.1 Mapa de origen del Picudo Rojo

Las primeras noticias de invasión se remontan al año 1906 cuando la especie fue declarada plaga severa para las palmeras de coco en la India y en 1917 se consideró plaga también en las palmeras de dátiles. En 1918 se detectó en Irak y alrededor de los años 80 la especie se detectó en gran parte de la península arábiga desde donde se expandió al resto de los países de Oriente Medio. (Figura 6.2) [6].

Figura 6.2 Países infectados por la plaga

País		Año de aparición
Emiratos Árabes Unidos		1986
Irán		1992
Egipto		1993
España	Comunidad Autónoma de Andalucía	1995
	Comunidad Valenciana	2004
	Comunidad de Murcia	2005
	Comunidad Autónoma de Canarias	2005 (Septiembre)
	Cataluña	2006
Italia	2006	
Grecia		
Turquía		

Tabla 6.1. Expansión territorial y evolución temporal de *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier.

En el año 2005, la plaga fue descubierta en el palmeral de Elche, patrimonio cultural de la humanidad por la UNESCO y considerada el mayor palmeral de Europa. En las islas

Canarias amenaza a la especie autóctona de palmeras *Phoenix canariensis* (palmera canaria), que podría verse en peligro si la plaga continúa avanzando. En 2011, la plaga se detectó en Jerez de la Frontera donde afectó a un gran número de palmeras y continua si ritmo imparable hacia el interior de nuestro país. [6]

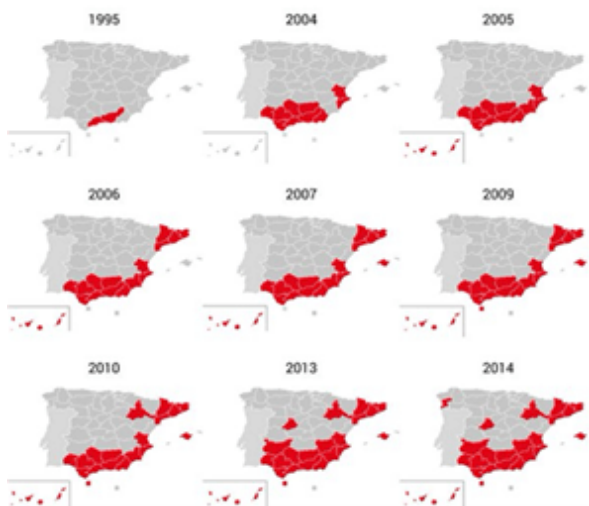


Figura 5.3 Expansión del Picudo Rojo en España

6.3 CICLO BIOLÓGICO

El picudo rojo es una especie coleóptera que pertenece a la familia *Curculionidae*, familia de coleópteros polífagos. Como todos los coleópteros, posee un desarrollo holometábolo, es decir, presentan una metamorfosis completa. Además se puede encontrar en los 4 estadios posibles: huevo, larva, pupa y adulto conviviendo entre sí al mismo tiempo. El interior de la palmera le confiere protección y una fuerte adaptabilidad a diferentes zonas geográficas con distintas condiciones climáticas, las cuales influyen en los periodos de desarrollo de las fases de su ciclo biológico.

Es un tipo de insecto que posee una gran capacidad reproductiva, esto es, que en tan solo unos pocos meses desarrollan todo su ciclo biológico al completo, generalmente son de unos 3 a 4 meses. Lo cual quiere decir que en un año pueden llegar a tener 3 generaciones completas como mínimo. Los únicos que dejan la palmera son los adultos y lo hacen cuando ésta no puede acoger a la próxima generación o cuando han destruido la palmera en su totalidad. Una vez sobre ellas, los machos liberan feromonas para atraer a las hembras para agregarse y aparearse con lo que las hembras salen ya con los huevos fertilizados, lo que las convierte potencialmente en colonizadoras de nuevas palmeras.

6.3.1 Huevo

El huevo, de color amarillo claro, cilíndrico, blanco y muy brillante, tiene forma elíptica y mide de 1 a 2,5 mm. Se localizan en el interior de grietas, heridas o de pequeñas cámaras en forma de agujero realizadas por las hembras. Realizan puestas de 300 a 400 huevos de media y esta fase suele tener una duración de 3 a 4 días. (Figura 6.4)



Figura 6.4 Huevo de Rhynchophorus ferrugineus Olivier

6.3.2 Larva

De color crema en un principio para más tarde oscurecerse en su desarrollo. Presentan una gran cápsula cefálica parda, con potentes mandíbulas, y se desarrollan en varios estadios hasta superar los 5 cm de longitud. Las larvas excavan galerías (que pueden llegar a medir hasta un metro de longitud) desde las axilas de las hojas hasta la corona, en cuyo interior se alimentan vorazmente. Es la fase del ciclo biológico que más daño provoca. (Figura 6.5)



Figura 6.5 Diferentes estados de crecimiento de larva de Rhynchophorus ferrugineus Olivier

6.3.3 Pupa

Una vez completado el desarrollo larvario, fabrican un capullo con fibras extraídas de las galerías internas de la palmera donde experimentan una metamorfosis completa. Estos capullos tienen una longitud de 4 a 6 cm, se localizan en las bases de las hojas y en su interior se encuentra la larva-pupa. Esta fase dura aproximadamente de unos 15 a 30 días.



Figura 6.6 Adulto emergiendo de la pupa

6.3.4 Adulto

Tras su transformación, aproximadamente un mes después, los picudos adultos salen de los capullos para acabar de completar su ciclo de vida y reproducirse.

Puede vivir de 45 a 90 días, tiene el cuerpo oval alargado de 19 a 45 mm de longitud, de coloración variable; pardo anaranjado claro o rojo ferruginoso, con o sin manchas negras en el pronoto de forma y números variables. Poseen fototropía negativa, es decir, que realizan sus actividades de forma diurna. Se pueden desplazar tanto andando como volando, siendo capaces de alcanzar grandes distancias para afectar a otra palmera. (Figura 6.7)



Figura 6.7 Adulto de Rhynchophorus ferrugineus Olivier.

6.4 Comportamiento

Algunos aspectos del comportamiento de *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier hacen extremadamente compleja la lucha contra esta plaga: Debido a su biología y a su carácter de vivir en comunidad, una palmera plagada de estos insectos puede ser el inicio de una gran plaga, ya que en su interior pueden desarrollarse hasta más de mil individuos, conviviendo entre si diferentes generaciones y coexistiendo todos los estadios posibles de su ciclo en una misma palmera. Así mismo, las hembras salen de las plantas ya fecundadas

y preparadas para colonizar nuevos huéspedes. Se trata de una plaga oculta que encuentra en la palmera alimento suficiente para desarrollarse y protección ante posibles enemigos naturales o tratamientos fitosanitarios. Además los síntomas son visibles con un retraso que puede ir desde los 3 meses hasta 1 año, obligando en cierto modo a ir desarrollando los trabajos de control por detrás de la plaga. Este insecto demuestra una gran capacidad de adaptarse a entornos distintos y que, en principio, podrían parecer desfavorables para su supervivencia. Siendo su clima originario tropical, se ha establecido exitosamente en zonas desérticas con temperaturas extremas, en zonas mediterráneas y en zonas templadas como las Islas Canarias. Su adaptabilidad queda patente además en el gran número de especies palmáceas que ha parasitado. La dispersión la realiza volando, con una capacidad de vuelo que pueden estar entre los 3 y 5 Km aproximadamente [8]. El viento juega un papel importante en la dispersión, los adultos de *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier vuelan contra el viento siguiendo el olor que desprenden las palmeras (Kairomonas) y por sustancias que ellos mismos emiten para atraer a otros individuos (feromonas). Pero sin duda, el factor principal en la dispersión de esta plaga es la acción del hombre, que mediante el transporte de plantas infestadas le abre la posibilidad de conquistar nuevos territorios. [9]

6.5 Daños

Como ya hemos comentado con anterioridad, los daños originados por este insecto son producidos por las larvas al alimentarse en el interior de la palmera y generando las galerías. Sus efectos parten desde la corona de la palmera y se extienden por todo el tronco.

Es bastante difícil de apreciar cuando una palmera esta infestada de estos insectos, ya que los síntomas visibles en las palmeras afectadas no aparecen hasta pasados varios meses de la colonización.

Se ha podido constatar que la sintomatología ocasionada por la presencia de *Rhynchophorus ferrugineus* es diferente según la especie hospedante. En el caso de *Phoenix canariensis*, la corona muestra un aspecto caído, con desgarramientos en la zona de unión de las hojas con el tronco y folíolos amarillos y pardos con zonas comidas, tal y como podemos ver en la figuras 6.8.



Figura 6.8 Phoenix Canariensis afectado por el picudo rojo

Como síntomas específicos en el caso de ejemplares afectados de *Phoenix dactylifera* destacan la presencia de exudados gomosos de color rojizo o negro, de hijuelos secos o sueltos y de serrín en el tronco. En ambos casos se pueden localizar restos de pupas en la base y abundantes larvas en el interior de la copa como podemos ver en la figura 6.9.



Figura 6.9 Phoenix dactylifera afectada por el picudo rojo

La palmera es una especie vegetal con tan sólo una yema terminal que es el único punto de crecimiento de la palmera; por ello, un ataque localizado en esta zona causa la muerte del árbol. A veces los síntomas se pueden confundir con la presencia de hongos o que la palmera se esté secando.

En conclusión, *Phoenix canariensis* muestra una mayor susceptibilidad al ataque de *Rhynchophorus ferrugineus*, el cual le provoca la muerte irremediablemente.

En términos económicos, el coste de una palmera de la variedad más atacada suele estar en torno los 2.000/2500€ por metro de tronco al tener un desarrollo en su crecimiento más lento comparado con el de otras especies. De forma análoga a las consecuencias por la pérdida de ejemplares, que ya de por sí supone un coste elevado y a veces difícil de asumir por parte de las autoridades correspondientes, hay que añadir el importe de los procesos y tratamientos que se están aplicando para combatir la plaga, tanto químicos como preventivos y curativos.

6.6 Métodos de control

Debido a lo peligrosa que resulta la plaga en palmeras, el paso más importante es detectarla a tiempo ya que cuando los efectos son ya visibles, es demasiado tarde para salvar la palmera.

Los daños y destrozos ocasionados por esta plaga han dado lugar a una búsqueda de alguna solución por parte de expertos de todo el mundo. Se ha conseguido llegar a distintas alternativas para intentar parar de alguna forma a esta plaga.

6.6.1 Control cultural

El momento de realizar este tipo de tratamiento, con el fin último de evitar que la plaga infecte a la palmera, es teniendo en cuenta el pico de actividad del picudo rojo ya que una de las posibles entradas del insecto es en la época de poda. Ya que están sometidas a grandes labores estéticas en la jardinería urbana. Por ello, teniendo en cuenta este detalle, se debe evitar la poda de la planta desde principio de abril hasta finales de noviembre en la medida de lo posible, para eludir posibles heridas ya que son focos susceptibles a la posible infección de la palmera.

6.6.2 Control biológico

Tras diversos experimentos, se ha podido localizar algunos organismos que actúan de manera eficaz contra la plaga reduciendo su población de manera significativa en una palmera afectada.

Uno de ellos es el *Steinernema carpocapsae*, un nematodo que se ha mostrado muy efectivo en el control del picudo rojo. Es un organismo microscópico que parasita las formas vivas del picudo rojo, resultando de esta manera una alternativa a los insecticidas químicos, aplicándose de manera reiterativa pulverizados en la corona de la palmera. [10]

Este tratamiento a diferencia de otros, resulta bastante económico ya que su aplicación se realiza aproximadamente cada 6 meses.

Es importante no aplicar este método con ningún fungicida y nematicida puesto que éstas acabarían con los organismos introducidos, dejando sin efecto al tratamiento.

6.6.3 *Trampeo con feromona*

Las trampas con feromonas son un método que combinado con otros métodos de control, resulta bastante efectivo. Aunque no se considera una solución a la plaga podemos obtener información constante de la presencia o no de la plaga y la evolución del ataque en su caso del picudo en una zona determinada.

Los componentes fundamentales de estas trampas son los siguientes: difusor de feromonas de agregación, difusor de kairomonas sintéticas, agua y un retardante de la evaporación. [11]

De esta forma los picudos son atraídos a la trampa y capturados, siendo eficaz también el uso de hongos en su interior de forma que los insectos sean atacados. En la figura 6.10 podemos ver una trampa cónica, de las que mejor resultado han dado.



Figura 6.10 Trampa cónica con difusor de feromonas [11]

6.6.4 *Control químico*

El tratamiento químico, posee una eficiencia bastante baja debido a la dificultad de alcanzar las larvas que se encuentran en el interior de las galerías. Hace ya unos años, uno de los métodos permitidos era la aplicación de Clorpirifos (un insecticida) se ha utilizado como método químico de control de los picudos rojos pero este producto fue eliminado de la lista de productos fitosanitarios permitidos. Otras alternativas serían las aplicaciones foliares, la inyección directa al tronco o la combinación de ambas. En este último caso, la eficacia del tratamiento roza el 100 % en cuanto a mortalidad de las larvas, pudiendo eludir los adultos el efecto del insecticida y desarrollando las pupas resistencia. Inyectar al tronco como método único presenta dificultad de acceso a algunas zonas de las percas de la palmera.

Por lo tanto se debe intentar reservar este método para palmeras afectadas y no usarlo como método preventivo.

A través del uso de uno de estos métodos de control de población, se puede llegar a un óptimo control de la plaga que permita salvar a las palmeras de su feroz ataque. Sin embargo, es necesario la actuación de forma preventiva o cuando la plaga no ha causado

daños excesivos, de manera que la planta atacada pueda recuperarse tras el control del picudo.

Para ello se necesita detectar de forma temprana para poder actuar. Aparte del control meramente visual de los síntomas producidos en las palmeras, otros métodos distintos se están desarrollando como el uso de diferentes trampas, la detección del olor producido por la fermentación que se genera al ingerir las larvas de los insectos gracias al uso de perros entrenados para tal fin.

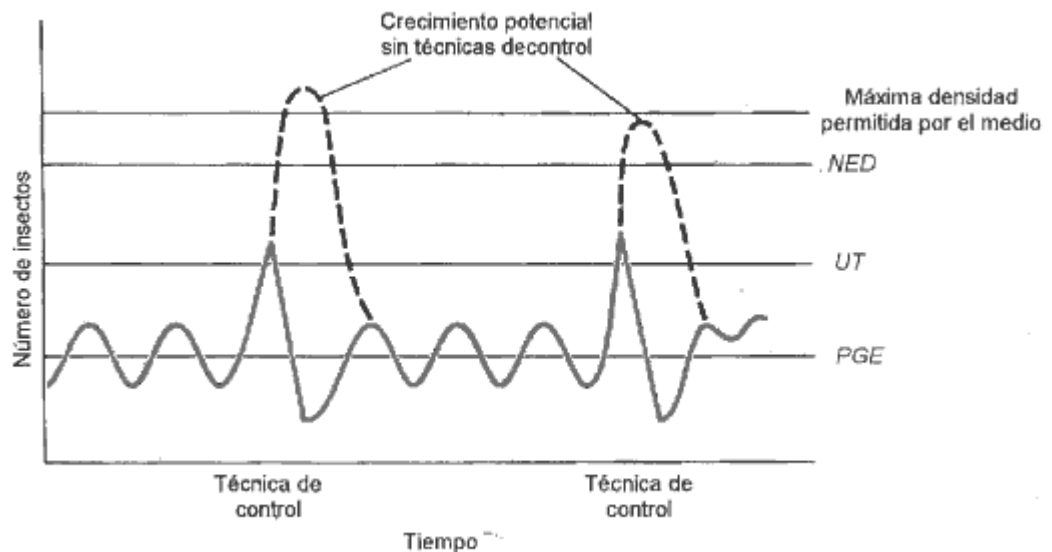


Figura 6.11. Relación entre el umbral de tratamiento (UT) y el nivel económico de daños (NED). Cuando la densidad de plaga alcanza en umbral de tratamiento (UT) se aplica una técnica de control.

7 ELECTROFISIOLOGÍA: HERRAMIENTA EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTENAL

7.1 Introducción

Los métodos de electrofisiología, nos permiten analizar el proceso de asimilación y captación de compuestos químicos por un determinado organismo vivo. El propósito es ofrecer un panorama de los procedimientos que existen dentro del campo de la electrofisiología, basándonos en la electroantenografía, como una herramienta en el análisis de semioquímicos en insectos y en la que nos hemos basado para realizar estos estudios de comportamiento. Necesitamos saber que efectos tienen los semioquímicos aplicados a los ultrasonidos en la antena del insecto, como una fase previa del bioensayo de comportamiento

7.2 Electrofisiología. Definición y origen.

La electrofisiología se define como el estudio de las señales eléctricas en el material biológico, como pueden ser, las distintos tipos de células nerviosas, incluyendo los receptores sensoriales periféricos de los insectos.

El origen de los estudios de esta rama en insectos, se remonta a los años 50 donde un zoólogo alemán Schneider se planteó desarrollar un test electro-fisiológico para analizar la eficacia de distintas fracciones químicas procedentes de extractos de glándulas de *Bombyx mori*.

El material de trabajo original de Schneider fue una lupa monocular, un amplificador, un osciloscopio y una cámara. Para realizar esto, montó la antena del macho entre dos electrodos y como estímulo usaba la feromona desprendida de las glándulas de las hembras. Se aplicaba un pulso de aire hacia la antena mediante una varilla de vidrio que transportaba el olor de la feromona de la hembra y de esta manera comprobó que se producía una perturbación en la señal del osciloscopio, que se mantenía en el tiempo de aplicación del estímulo.

Con lo que Schneider denominó, a esta respuesta eléctrica, electroantenograma o EAG por sus iniciales en inglés (electroantennogram recording).

7.3 Electroantenograma

El sistema quimiosensorial de los insecto detecta y selecciona entre una diversidad de moléculas químicas. Dicha habilidad de respuesta es conferida a los receptores de la familia OR (Hallem et al., 2006; Nichols et al., 2011). En la mayoría de los insectos los receptores a volátiles se encuentran en órganos como son las antenas y los palpos maxilares, estos cuentan con una cubierta externa de sensilas conectadas a dendritas

neuronales (Clyne et al., 2000). Al entrar las moléculas por las sensilas se desencadena un proceso de intercambio iónico que termina en un potencial de acción que va a transmitir una señal olfativa a diferentes glomérulos de los lóbulos olfativos del deutocerebro del insecto (Hallem et al., 2006; Nichols et al., 2011) Figura 7.1. Bajo este principio se desarrolló el bioensayo de electroantenografía (EAG), el EAG permite estudiar la respuesta general olfativa de los insectos a los compuestos semioquímicos (Park et al., 2002).

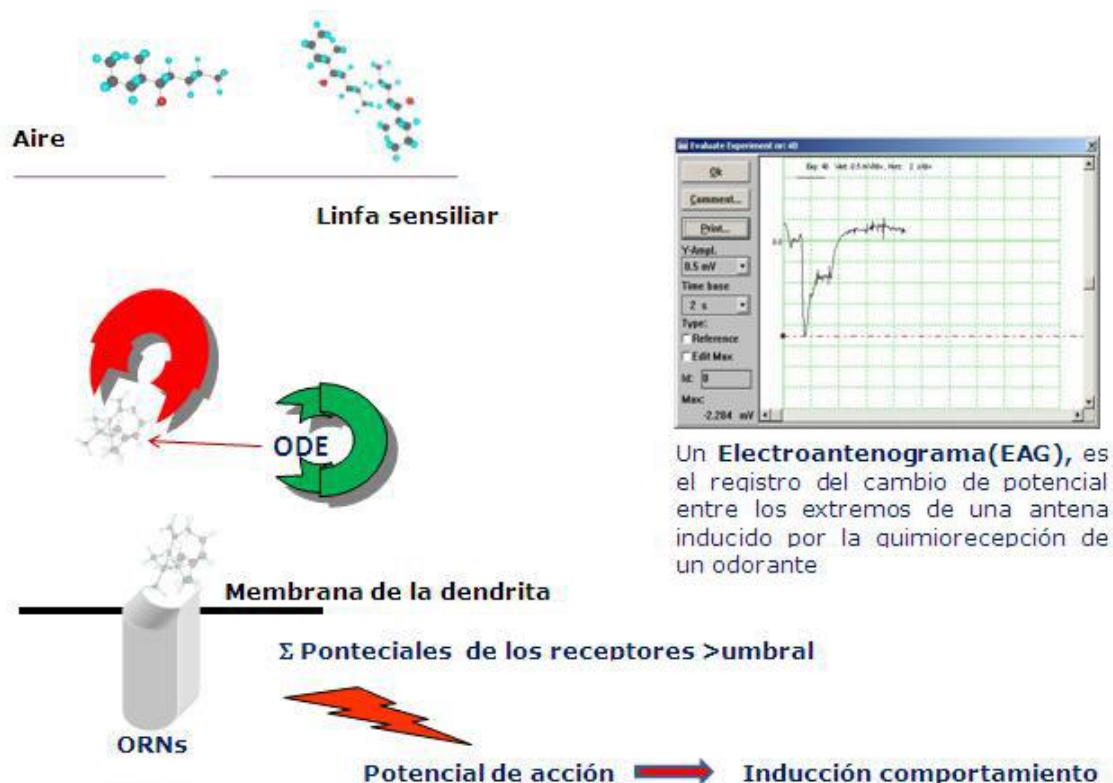


Figura 1b. La acción de las ODEs liberan el odorante, que se une temporalmente con el receptor de la dendrita, y genera una cascada de potenciales que se registran en el electroantenograma

Figura 7.1 Aspecto de un electroantenograma y proceso de quimiorrecepción

En general, para medir la diferencia de potencial que se produce se utiliza la cabeza o en la mayoría de los casos, la antena. Se cortan ambos extremos de la antena a dos electrodos, uno de registro y otro de referencia, los cuales están conectados a un amplificador de alta impedancia que permite detectar fluctuaciones de voltaje (ΔmV) que varían principalmente entre 0.1 y 10 mV por lo general.

Y las diversas diferencias de potencial se debe a que cuando una antena detecta algún principio químico activo, se desencadena un proceso de intercambio iónico por parte de los receptores olfativos situados en las neuronas olfativas, con la generación de una serie de potenciales de acción que transmiten la información hasta los glomérulos antenales, situados en los lóbulos antenales. La amplitud obtenida en el electroantenógrafo EAG es directamente proporcional a la duración de aplicación del estímulo, siendo esta amplitud mayor cuanto mayor sea la concentración del principio químico activo aplicado

hasta alcanzar el nivel de saturación en los receptores antenales. Pero no obstante, la amplitud no solo depende de la concentración sino de la especie, familia, sexo, condición de la antena, entre otros factores. [17]

7.4 Procedimiento de EAG

Las señales de electroantenografía son registradas mediante un sistema EAG (Syntech, Kirchzarten, Germany) consistente en una sonda conectada a un amplificador DC de alta impedancia (Tipo PRG-2), un controlador de estímulos (CS-55) y un software que nos permite visionar, registrar y procesar las distintas señales de las antenas gracias al Software EAG 2010 (Syntech, Kirchzarten, Germany).

En la figura 7.2 se observa mejor el controlador de estímulos, con todos los elementos que lo componen.

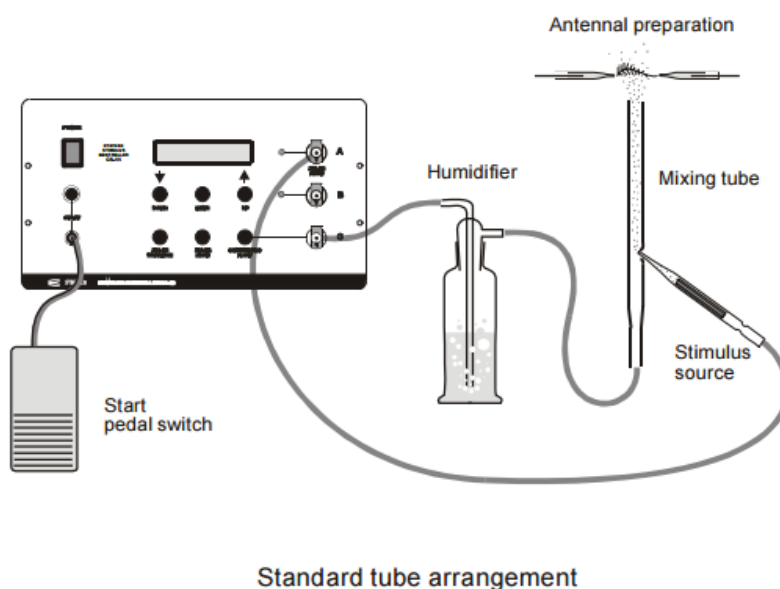
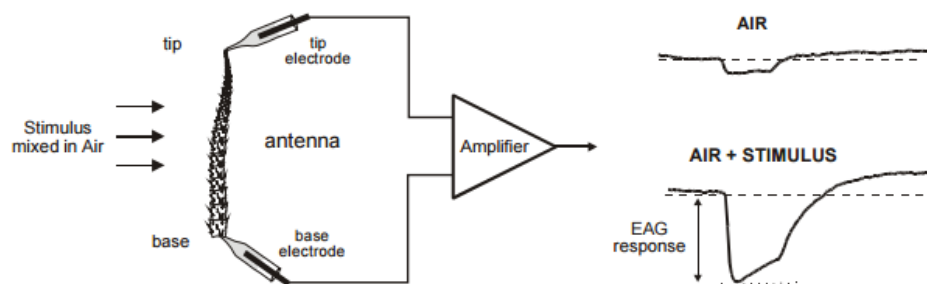


Figura 7.2 Sistema de control de estímulos.

Las antenas son extraídas de la cabeza de los insectos y montadas sobre un soporte con dos electrodos metálicos usando un gel conductor (Spectra 360, Parker Lab, NJ, USA), que registran la diferencia de potencial (EAG response, Figura 7.3) que se genera y bajo un flujo de aire continuo purificado (de $500 \text{ ml}/\text{min}$).



Principle of Electroantennogram (EAG) Recording

Figura 7.3 Principio del registro de señales mediante EAG.

El proceso de aplicación del impulso químico a la antena es bastante sencillo. Mediante el controlador de estímulo CS-55 Syntech, se aplica un soplo de aire (de 2 segundos de duración por estímulo) sobre una pipeta Pasteur (7cm x 5mm de diámetro), que en su interior lleva una pequeña pieza de tiras de papel de filtro (0,5 cm x3, Whatman) y que actúa sobre la antena de forma directa.

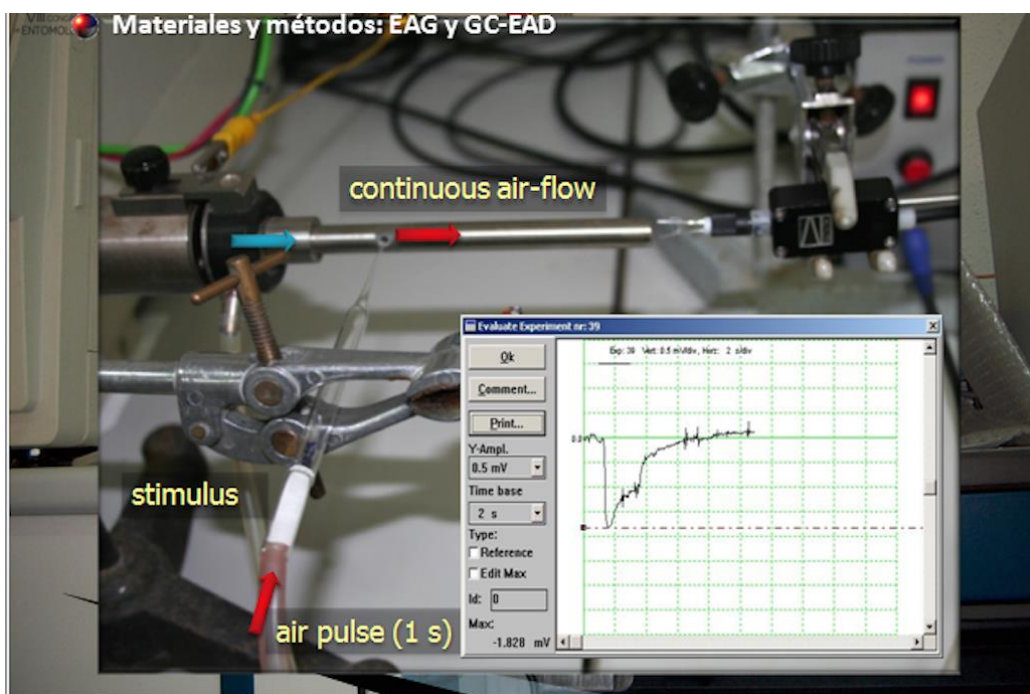


Figura 7.3 Monitorización de la respuesta de una antena a un compuesto.

Hay que tener en cuenta, que la respuesta que el sistema genera debido a la diferencia de potencial, puede estar influido de alguna manera por el ruido.

El ruido es un fenómeno que tiene origen múltiple: desde fuentes acústicas (maquinas, vehículos, parlantes) hasta fuentes eléctricas (líneas de potencia, motores). También puede tener un origen óptico, térmico, magnético, etc.

Sea cual sea este último, el término ruido se aplica, para referirse a cualquier cosa indeseable que se mezcla con la señal útil. De hecho, el ruido puede ser, por sí mismo, otra señal, como las distintas formas de interferencia que se producen en los circuitos electrónicos. [26]

En la figura 7.4, se observa las distintas fuentes de ruido que pueden tener lugar en el proceso de registro de una señal mediante EAG.

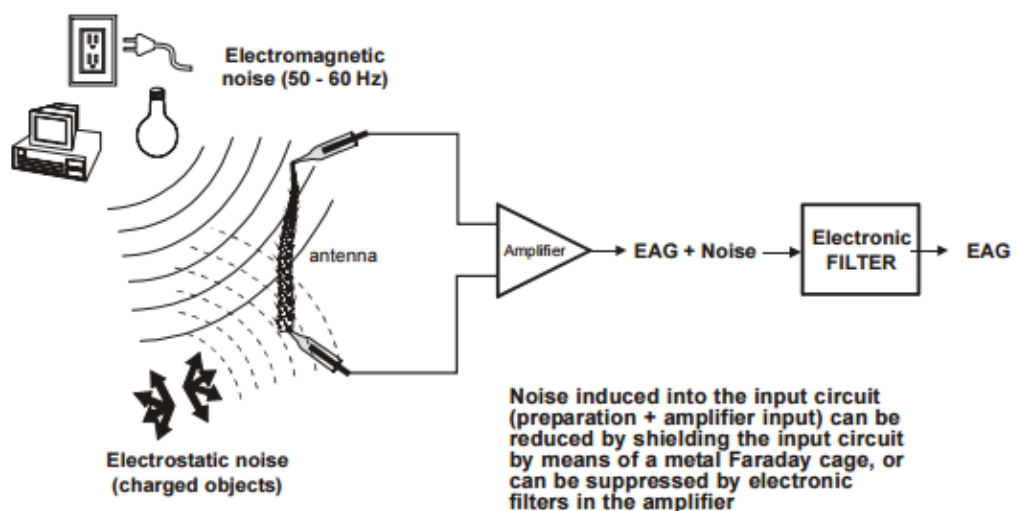


Figura 7.4 Efecto del ruido en EAG.

Debido a esto, cuando se registra una señal en el electroantenógrafo, se registra la señal de la antena y además el ruido que se introduce. Amplificándose, y teniendo que usar un filtro electrónico para eliminar ese ruido, o utilizar directamente una jaula de Faraday que aísla y protege el EAG de los campos eléctricos estáticos, reduciendo en gran parte el ruido que puede interferir.

Podemos afirmar, que las ondas acústicas empleadas no generan ningún ruido, debido a que estas son de naturaleza totalmente distintas y además inertes a la circuitería eléctrica y a cualquier componente que se pueda ver afectado.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo nos vamos a centrar en explicar los materiales y los distintos métodos que hemos usado en este Trabajo Fin de Grado. Para ello vamos a dividir este capítulo en sub-apartados empezando con el fundamento teórico necesario para entender el estudio y luego ir explicando el método utilizado, tanto para el bioensayo de oviposición como para el bioensayo del picudo rojo. Para el desarrollo del presente trabajo, además necesitaremos una serie de Hardware y Software bastante específico con el que podremos realizar los estudios en la condición deseada y aparte, los elementos y condiciones para realizar los bioensayos.

En cuanto al hardware para la generación y reproducción de señales ultrasónicas explicaremos todos los elementos necesarios para hacer esto realidad y generar una onda mecánica cuya frecuencia de vibración sea superior a los 20KHz (Rango de ultrasonidos). Mención especial al sonómetro Rion NL-32 que nos ha permitido tomar mediciones para completar el estudio obteniendo así una valiosa información que nos permite saber el nivel de presión sonora (dBSPL) que le llega al insecto dentro del retículo donde se ha realizado el bioensayo así como las pérdidas que se producen desde la salida de la onda mecánica del altavoz, hasta el interior de la cámara central donde se sitúan los insectos.

También, en el apartado de Hardware deberemos de mencionar el electroantenógrafo, que nos permite caracterizar la respuesta eléctrica de la antena.

En cuanto al software, utilizaremos MATLAB para poder desarrollar las señales de excitación básicas para nuestro estudio. Emplearemos señales moduladas tanto en AM como en FM, que ya explicaremos con más detenimiento.

Y para finalizar se detallara el estudio estadístico en ambos bioensayos según el tipo de modulación empleada.

8.1 Generación de señales ultrasónicas

Ahora procederemos a la preparación y explicación del entorno de trabajo para la consecución de los objetivos planteados en este Trabajo Fin de Grado:

En primer lugar requerimos de un PC para la generación y reproducción de las señales, nos serviría con un ordenador convencional ya que no se necesitan muchos recursos para la reproducción y generación de las señales. Aparte necesitaremos el software Matlab para poder realizar el código necesario y así generar las señales con las características que necesitamos.

En segundo lugar se pasará a describir el equipo experimental para la obtención de las señales ultrasónicas como son el conversor D/A, la tarjeta de sonido, el amplificador y el altavoz.

8.1.1 Conversor Analógico – Digital / Digital - Analógico (AD/DA)

En la actualidad miles de dispositivos, como los ordenadores (PC), los equipos de reproducción y grabación de audio y vídeo modernos, los teléfonos fijos y móviles, así como una gran cantidad de dispositivos destinados a realizar investigaciones científicas y análisis médicos, basan su funcionamiento en la tecnología digital.

Por ello se hace necesario el uso de un conversor analógico/digital - digital/analógico (AD/DA) en la cadena de audio para que la señal sea procesada con la mayor calidad posible.

En nuestro caso en particular, el Octa-capture estará conectado al PC mediante una conexión USB. Gracias a este aparato, seremos capaces de trabajar con señales por encima del rango audible para su posterior amplificación y con la ayuda de un altavoz, convertirla nuevamente en sonido. Su apariencia la podemos ver en las figuras 8.1 y 8.2

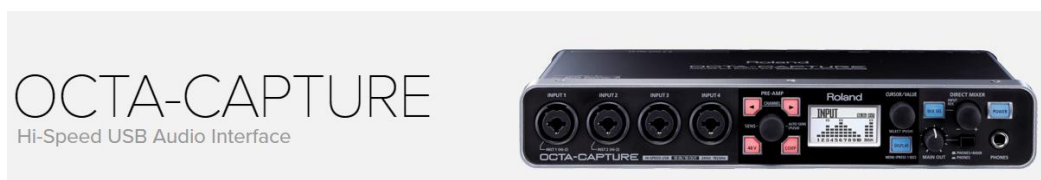


Figura 8.1 Roland UA-1010 Octa-Capture.

Este modelo presenta una buena construcción, muy compacta y sólida. Además de presentar una fácil instalación y una integración perfecta con la mayoría de programas de audio que existen en el mercado.



Figura 8.2 Roland UA-1010 Octa-Capture.

Como podemos observar, en la Figura 8.2, este conversor presenta una amplia conectividad con suficientes interfaces I/O como para llevar a cabo diversos tipos de proyectos. A modo de curiosidad podemos ver que este modelo lleva incorporados puertos MIDI tanto de entrada como de salida, los cuales muy pocas tarjetas llevan.

8.1.1.1 Características técnicas de Roland UA-1010 Octa-Capture

Este modelo nos brinda 10 entradas, 10 salidas y 8 preamplificadores VS con calidad transparente 24-bit/192 kHz de audio y producción de audio de alto nivel, entre otras características detallaremos a continuación:

- 24-Bit.
- 8 entradas premium con preamplificadores de micrófono VS.
- 8 salidas analógicas.
- Salida de auriculares.
- Función AUTO-SENS que establece un nivel óptimo de entrada para cada uno de los previos.
- Baja latencia extrema gracias a los drivers VS Streaming.
- Entrada/salida MIDI.
- Entrada/salida coaxial S/PDIF.
- 4 mezcladores directos independientes controlados por software para crear mezclas de monitorización personalizadas.
- Soporte para la mayoría de plataformas DAW tanto en Mac como en PC incluyendo OSX 10.6 y Windows 7 a través thomann de drivers ASIO 2.0/WDM (Windows) y Core Audio (Mac).
- Dimensiones: 284 x 158 x 50mm.
- Peso: 1,3g.

En la figura 8.3, podemos observar el comportamiento que tiene en frecuencia:

FREQUENCY RESPONSE

192.0 kHz	20 Hz to 90 kHz (+0/-8 dB) 20 Hz to 60 kHz (+0/-2 dB)
96.0 kHz	20 Hz to 40 kHz (+0/-2 dB)
48.0 kHz	20 Hz to 22 kHz (+0/-2 dB)
44.1 kHz	20 Hz to 20 kHz (+0/-2 dB)

Figura 8.3 Respuesta en frecuencia de Roland UA-1010 Octa-Capture.

8.1.2 Amplificador PM40C

Posteriormente a la conversión, se procede con la amplificación de la señal para que suene con más potencia y volumen. Dentro de los parámetros principales, hay que

tener muy en cuenta el tema de la potencia. Es decir, cuanta energía eléctrica puede disipar y que está íntimamente relacionado con el nivel de presión sonora que sale por los altavoces.

Por ello, usaremos un amplificador modelo PM40C que nos va a otorgar la potencia suficiente en las frecuencias a las que vamos a trabajar para realizar nuestros ensayos.



Figura 8.4 Diferente puntos de vista del Amplificador PM40C.

8.1.2.1 Características técnicas del amplificador PM40C

Este amplificador presenta las siguientes características:

- Potencia de salida:
 - 40 RMS / 55 W peak @ 8 Ω
 - 50 W RMS / 86 W peak @ 4 Ω
- Ganancia en voltaje: 26dB
- Impedancia de entrada: 20 k Ω
- THD máximo ruido: 0.03%
- Nivel señal ruido: 92 dB
- Potencia: 75 W.
- Dimensiones (W $\times$ H $\times$ D):
155 $\times$ 166 $\times$ 55.5 mm
- Peso: 1.8 kg.



Figura 8.5 Amplificador PM40C.

La figura 8.6 representa la respuesta en frecuencia del amplificador. Se muestra que su respuesta de frecuencia presenta una ondulación $\pm 0,7$ dB aproximadamente que disminuye como vemos, conforme va aumentando la frecuencia de trabajo.

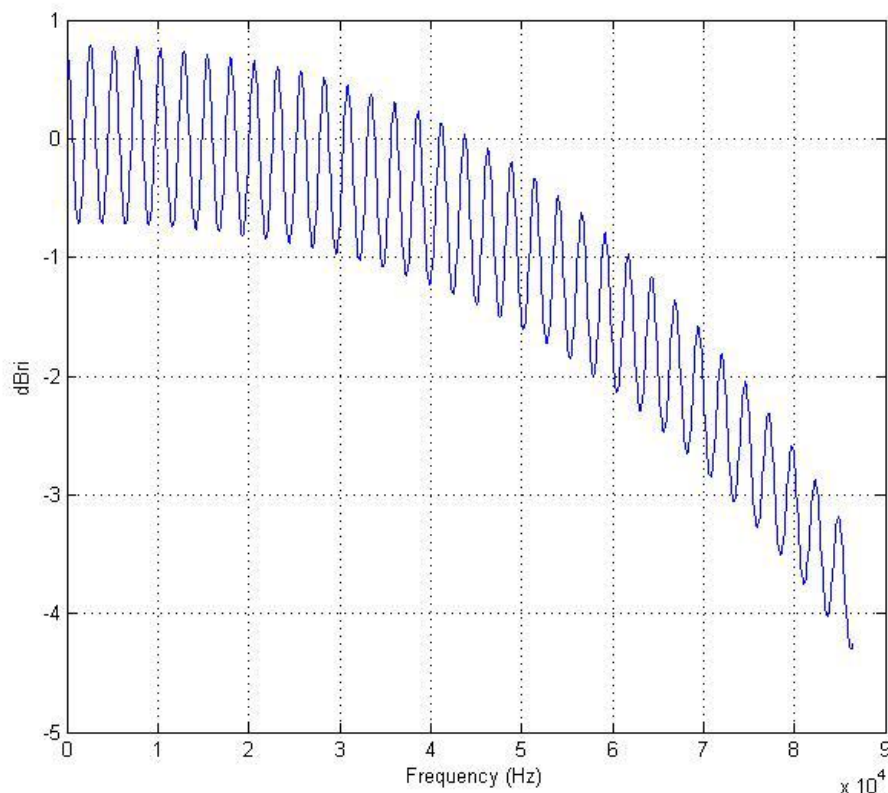


Figura 8.6 Respuesta en frecuencia del amplificador.

8.1.3 Altavoz de ultrasonido Vifa

Es el último eslabón de la cadena de audio. Los altavoces son dispositivos que permiten la amplificación del sonido. El altavoz no es más que una bobina alrededor de un imán que, al recibir una corriente eléctrica (de alta frecuencia en nuestro caso), mueve una membrana que genera ondas sonoras, Figura 8.7 [18]. Este es el proceso de transducción, que no es más que el proceso de conversión de una señal eléctrica a una señal mecánica.

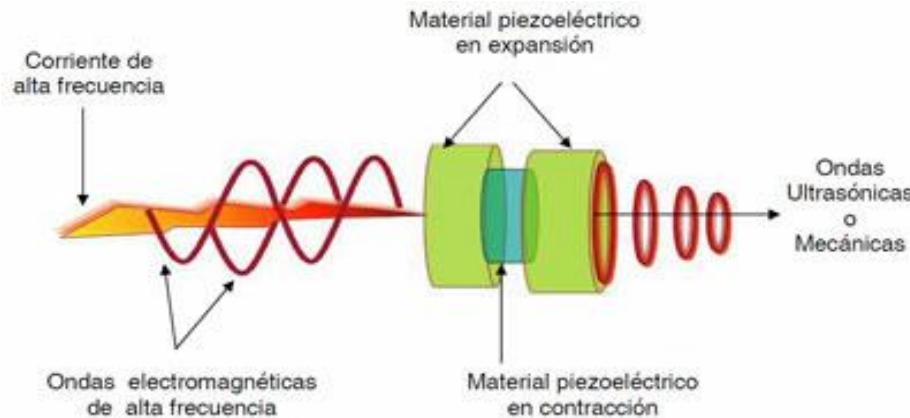


Figura 8.7 Generación de ondas mecánicas en el interior del altavoz.

En nuestro caso, vamos a utilizar un *altavoz dinámico de ultrasonido Vifa* que posee un ancho de banda de hasta los 120KHz. Suficiente para producir los ultrasonidos y barrer todo el rango de frecuencias en los que realmente estamos interesados en trabajar.

8.1.3.1 Características técnicas del altavoz

El altavoz de ultrasonidos Vifa presenta las siguientes características técnicas:

- Rango de frecuencia (+ 12dB): 1 - 120 kHz.
- Impedancia: 4Ω .
- Sensibilidad a 50 kHz: 92 dB / 2,83 V / 1m.
- Máxima capacidad de potencia continua: 10 W (corresponde a una señal sinusoidal a 20 Vpp).
- Nivel máximo de salida de sonido en conjunto con UltraSoundGate jugador (operado de 36V DC): > 98 dB a 1 m de distancia.
- Área del cono efectiva: 7 cm^2
- Robusta caja de aluminio.
- Conector Speakon.
- Trípode 5/8 ".
- Dimensiones físicas (W / H / D) en mm: 90 * 120 * 50.
- Peso: 300 g.



Figura 8.8. Altavoz ultrasonido Vifa.

Ahora, en la figura 8.9 se representa la respuesta en frecuencia del altavoz:

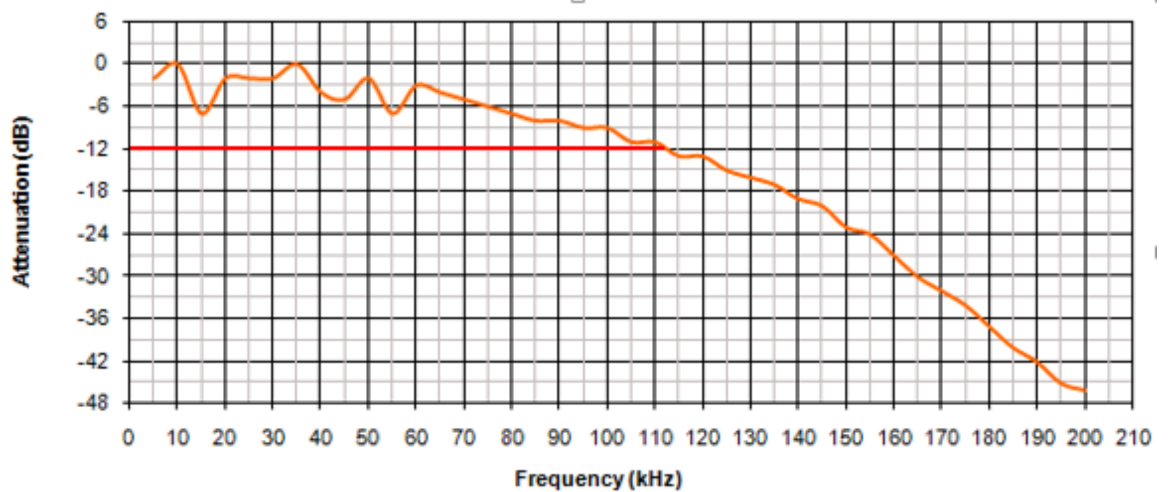


Figura 8.9 Respuesta en frecuencia del altavoz Vifa

Como podemos ver en la figura 8.9, desde los 10 Hz hasta aproximadamente los 120KHz, se puede observar una respuesta prácticamente plana en frecuencia con un máximo de caída de 12dB, con lo que sería válido para las frecuencias utilizadas en nuestro TFG como hemos dicho anteriormente.

A continuación, adjuntamos el diagrama polar del altavoz que nos permite conocer como refleja la energía sonora en el espacio en grados, para cada punto de sus ejes y distintas frecuencias.

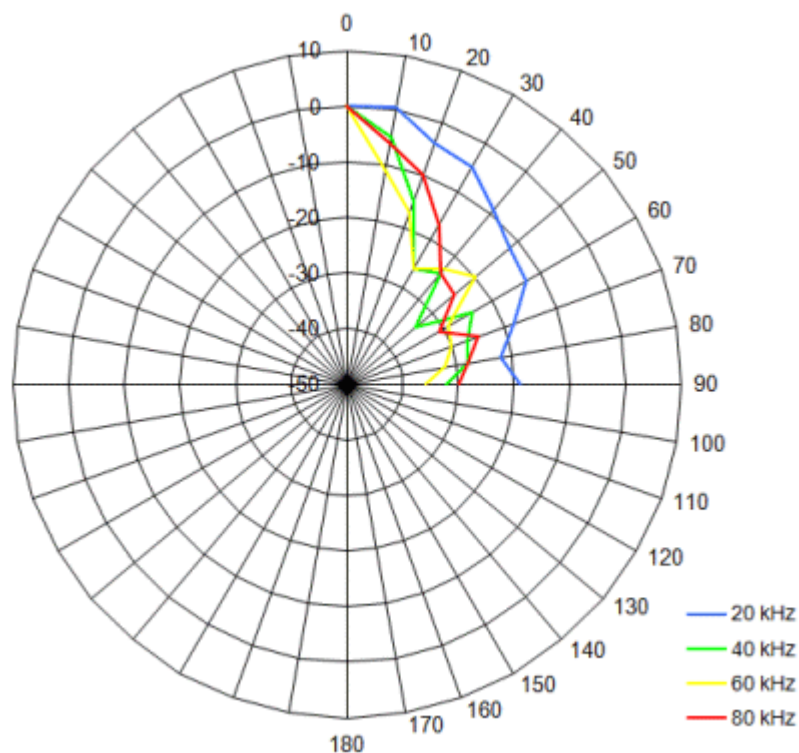


Figura 8.10 Diagrama polar del altavoz

8.1.4 Sonómetro RION NL-32

Los sonómetros RION NL-31 y NL-32 son instrumentos de medida muy sencillos de utilizar gracias al uso de teclas ubicadas convenientemente. Gracias a su sencillez de manejo y a sus características únicas, los sonómetros RION NL-32 son ampliamente utilizados en:



- Labores de medida ambiental en general y en medidas relacionadas con la protección de ruido en el puesto de trabajo.
- Medidas de control de ruido.
- Ruido en puesto de trabajo.
- Acústica industrial y comprobación de mapas acústicos.

Se ha utilizado este sonómetro para la caracterización acústica del olfactómetro de 4 vías del bioensayo de picudo rojo, ya que necesitamos saber el nivel de presión sonora que llega dentro del receptáculo y así definir las pérdidas en términos de dB SPL además de comprobar el nivel de presión que sale por los altavoces. Pero de esto, ya hablaremos más adelante y con más detenimiento.

8.1.4.1 Características técnicas

- Linealidad de 110 dB.
- Medida y almacenamiento de Leq, Lmax, Lmin, y 5 percentiles Ln.
- Teclas dedicadas (cambio de ponderación frecuencial, temporal, etc).
- Ponderación Temporal: Lento (Slow) y Rápido (Fast).
- Función de disparador de medida interno y/o externo.
- 24 horas de vida de batería con 4 pilas alcalinas estándar (AA).
- Opciones de expansión a través de tarjetas de programa opcionales.
- Rango de medida: 20Hz a 20kHz.
- Memoria interna y CF para almacenamiento de medidas.
- Tiempo de medida desde 1 segundo hasta 24 horas.
- Condiciones de operación: -10°C a 50°C, 10%HR a 90%HR.
- Peso: 400g.
- Dimensiones: 260 x 76 x 33 mm.

8.2 Características de las señales ultrasónicas utilizadas

En este apartado, vamos a explicar las distintas señales con las que hemos trabajado. El patrón usado es común para todas ellas:

- 100 segundos de duración total del archivo.
- 80 intervalos de 1.25 segundos. Existe un silencio entre intervalo e intervalo. En el primer segundo hay una señal activa y en los últimos 0.25 del intervalo se produce un silencio hasta el comienzo del siguiente intervalo.
- Dentro de estos 100 segundos, en cada intervalo de 1 segundo de señal activa, se cogen valores aleatorios dentro del rango de frecuencias en el que estemos trabajando.
- En resumen, en el archivo generado con la señal de excitación para el ensayo, consta de 80 silencios de 0.25 segundos entre intervalo e intervalo y 80 de señales de excitación con un valor en frecuencia aleatorio pero siempre dentro del rango de ultrasonidos en el que estamos trabajando.
- El rango de frecuencias y patrón usado de trabajo será:
 - Modulación AM. Frecuencia de trabajo [20KHz – 40KHz].
 - Modulación FM. Frecuencia de trabajo [20KHz – 40KHz].
- Estas señales están **normalizadas** en potencia, para no saturar al conversor analógico digital. Así nos aseguramos que nuestros aparatos, van a estar funcionando siempre en su zona de trabajo lineal.

Basándonos en la electroantenografía como herramienta y en otros trabajos ya realizados, se ha detectado y estudiado que uno de los rangos de frecuencias que más afectan a los insectos son entre los [20KHz – 40KHz] modulados en AM como en FM.

Una de las razones por las que se han utilizado saltos en frecuencia aleatorios, es debido a que los insectos son capaces de habituarse al sonido que se les está aplicando si estos saltos tienen un patrón monótono y se repite siempre de la misma forma.

Debido a esta problemática se ha utilizado valores aleatorios, ya que así no serán capaces de acostumbrarse al sonido por lo que no habrá dos archivos con el mismo patrón de sonido.

Por lo tanto, para nuestros bioensayos nos basaremos en este rango de frecuencias y con las señales de las características previamente descritas, para estudiar y analizar el comportamiento de los insectos bajo señales de excitación ultrasónicas.

A continuación pasaremos a explicar el proceso de modulación y los distintos tipos que hemos usado.

8.2.1 Modulación

Las señales de información deben ser transportadas entre un transmisor y un receptor sobre alguna forma de medio de transmisión. Las señales de información pocas veces encuentran una forma adecuada para la transmisión, por ello hay que adaptarlas al medio, ya que señales como el habla o la música contenidas en intervalos de baja frecuencia, de 50Hz a 20KHz, es muy costoso; requiere una gran cantidad de potencia y antenas grandes.

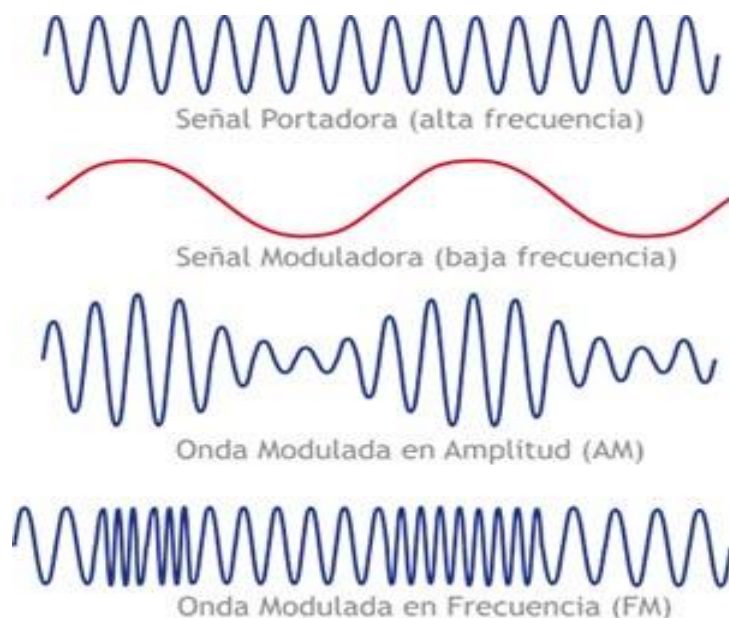


Figura 8.11 Proceso de modulación

Las señales de banda base que generan las distintas fuentes de información por regla general no se prestan a su transmisión de forma directa por el medio. Por esta razón, se deben de modificar para facilitar su transmisión. El proceso de modificación se llama modulación y lo que consiste es en variar algún parámetro de la señal portadora de alta frecuencia (Amplitud, frecuencia o fase) de acuerdo a las características de otra forma de onda de baja frecuencia (la señal mensaje o señal moduladora). A la señal resultante de este proceso se le denomina señal modulada.

Para la generación de nuestras señales utilizaremos el software Matlab, este programa trabaja con señales discretas, por lo tanto, necesitaremos una frecuencia de muestreo para poder generarlas.

El teorema de Nyquist demuestra que la reconstrucción de una señal continua en banda base a partir de sus muestras, es posible si la señal está limitada en banda y además se cumple que la frecuencia de muestreo es superior a la máxima frecuencia de las señales con las que vamos a trabajar que, en nuestro caso, utilizaremos como máximo hasta los 60 KHz, con lo que elegiremos una frecuencia de muestreo de 192KHz para que cumpla dicho teorema, coincidiendo así con la frecuencia de muestreo del conversor digital analógico.

8.2.2 Modulación AM de doble banda lateral (DSB-SC)

En primer lugar, utilizaremos la modulación AM de doble banda lateral de portadora suprimida DSB-SC, generando así una señal de amplitud modulada.

La modulación de amplitud consiste en cambiar la amplitud de una portadora de frecuencia elevada de acuerdo con la información de la señal moduladora. Con este tipo de modulación, la información se plasma sobre la señal portadora en cambios de amplitud.

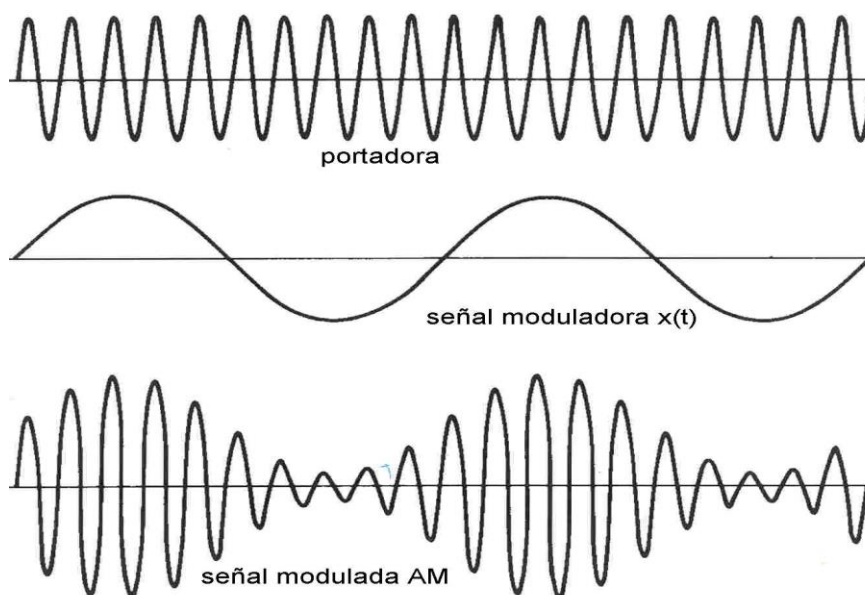


Figura 8.12 Modulación AM

La modulación AM convencional es un método bastante ineficaz de modulación debido a la vulnerabilidad que presenta frente al ruido que se puede dar en el canal de transmisión. En este tipo de modulación la portadora no transporta ninguna información, toda la información que se transmite está situada en las bandas laterales. Por lo tanto, la portadora puede suprimirse y no transmitirse, de ahí que se conozca este tipo de modulación como “portadora suprimida”.

Considerando la señal portadora, de alta frecuencia, como 1:

$$X_p(t) = A_p \cdot \sin(2 \cdot \pi \cdot F_p \cdot t) \quad (1)$$

Consideremos pues, que la expresión matemática de la señal modulada en amplitud responde a la expresión dada por 2:

$$X_{AM} = X_p \cdot A_m \cdot \sin(2\pi \cdot f_m \cdot t) \quad (2)$$

A continuación pasamos a detallar todas las variables que conforman la ecuación matemática para generar esta modulación:

- $X_m(t) = A_m \cdot \sin(2 \cdot \pi \cdot F_m \cdot t)$ Señal moduladora con baja frecuencia.
- A_m : Amplitud de la moduladora.
- F_m : Frecuencia de la moduladora.
- $X_p(t) = A_p \cdot \sin(2 \cdot \pi \cdot F_p \cdot t)$ Señal portadora, de alta frecuencia.
- A_p : Amplitud de la portadora.
- F_p : Frecuencia de la portadora.

Se trata pues, de multiplicar la señal moduladora y la señal portadora de forma que obtenemos una señal cuya envolvente es directamente la señal de información multiplicada por la amplitud de la portadora. Espectralmente, esto equivale a convolucionar las dos señales, por tanto desplazar el espectro de la señal moduladora centrándolo en la frecuencia de la portadora, positiva y negativa. [20]

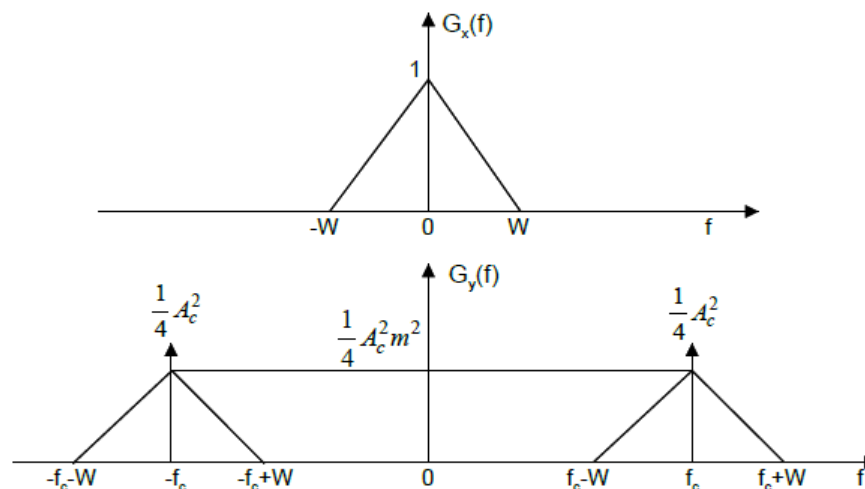


Figura 8.13 Espectro de una señal AM

La señal modulada tiene tres componentes de frecuencias claramente diferenciadas:

- 1) La frecuencia de la portadora F_c . (Que en este caso se suprime y no aparece).
- 2) La frecuencia de la señal moduladora “montada” encima de portadora $F_c + W$.
- 3) La frecuencia de la señal moduladora “montada” debajo de portadora $F_c - W$.

Para dar una mejor visión al proceso, usando como parámetros una frecuencia de portadora, $F_p = 5KHz$, una frecuencia de moduladora $F_m = 125Hz$, la señal normalizada a $0.025W$ y con una $A_p = 2V$ y $A_m = 1V$ obtenemos el siguiente espectro:

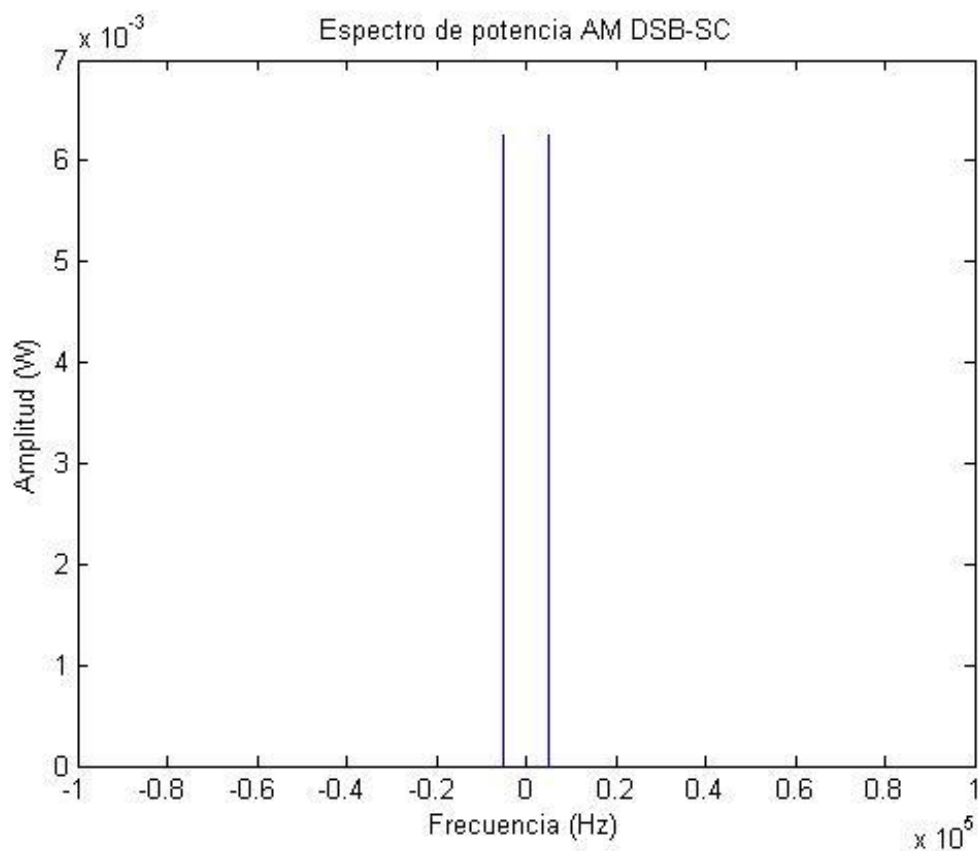


Figura 8.14 Espectro de potencia AM DSB-SC. ($F_p = 5KHz$ y $F_m = 125$)

Hacemos un zoom a la figura 8.14 y obtenemos los dos picos espectrales situados en las frecuencias anteriormente mencionadas (véase Figura 8.15).

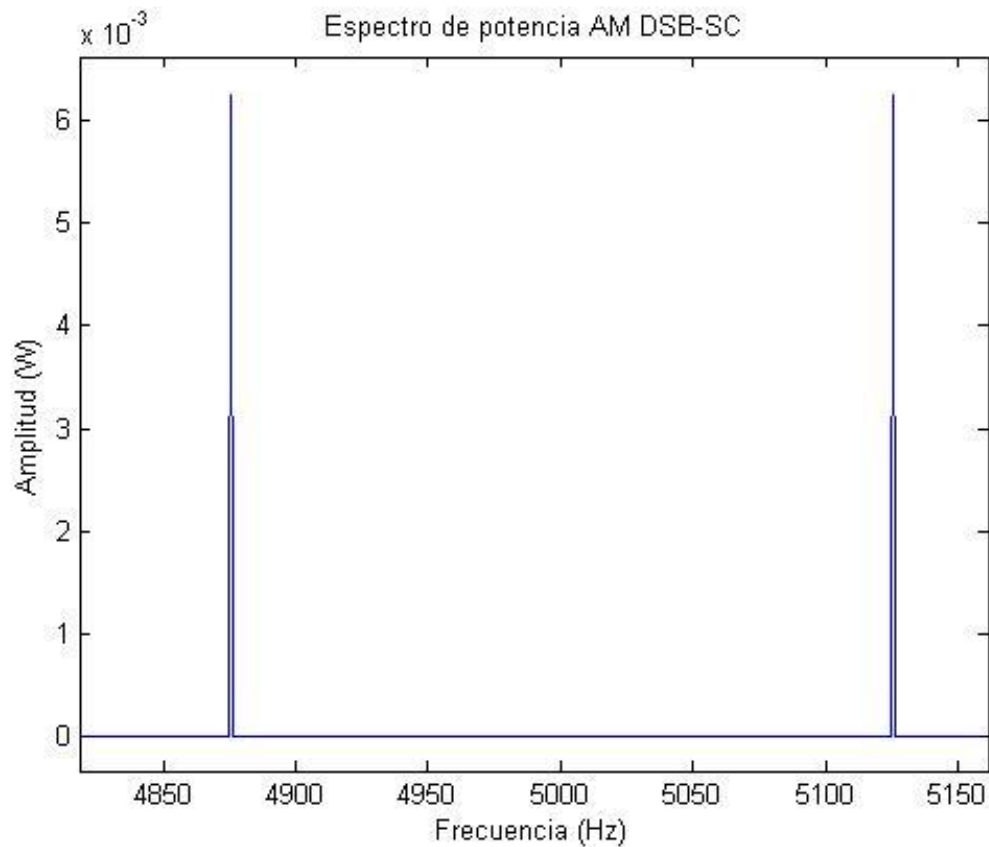


Figura 8.15 Espectro banda lateral superior AM DSB-SC. ($F_p = 5\text{Khz}$ y $F_m = 125$)

La parte de espectro por encima de la portadora se llama banda lateral superior, y su aspecto es idéntico al espectro de la señal moduladora, pero desplazada en frecuencia un valor F_p . Mientras que la parte de espectro por debajo de la portadora se llama banda lateral inferior, y su espectro está invertido respecto a la banda lateral superior (o banda base). El espectro de la señal AM es simétrico respecto a la frecuencia de la portadora F_c . La simetría es par en el módulo e impar en la fase.

La información está duplicada. Cada banda lateral contiene exactamente la misma información que la señal moduladora (banda base) con lo que el ancho de banda es 3:

$$B = 2W \quad (3)$$

De la imagen 8.15, se desprende el ancho de banda de la señal que hemos usado como ejemplo:

$$B = 2 \cdot W = 2 \cdot 125 = 250 \text{ Hz}$$

Otro parámetro que tenemos que tener en cuenta es "m", conocido como el índice de modulación que relaciona en 4:

$$m = \frac{A_m}{A_p} \quad (4)$$

Además las señales generadas con modulación en amplitud para este Trabajo Fin de Grado se generarán cumpliendo la condición de no sobremodulación para señales normalizadas, para ello se tiene que cumplir la relación que sigue:

$$m \leq 1 \Rightarrow A_m \leq A_p \quad (5)$$

Si esta expresión no se cumple, existirá sobremodulación y originará la pérdida de información audible, lo que traerá como consecuencia distorsión.

8.2.3 Modulación FM

Otra técnica de modulación analógica usada en este trabajo es la modulación FM o modulación de frecuencia. Consiste en transmitir información a través de una onda portadora variando su frecuencia y manteniendo constante su amplitud.

Los ruidos o interferencias alteran la amplitud de la onda, aunque no afecta a la información transmitida en FM, ya que la información se extrae de la variación de frecuencia y no de la amplitud. Debido a estas características de modulación, podemos ver cómo la calidad de sonido o de imagen es más elevada, cuando modulamos en frecuencia que cuando lo hacemos en amplitud.

Las emisoras de FM pueden trabajar en bandas de frecuencias muy altas, en las que las interferencias en AM son importantes; las estaciones o emisoras comerciales de radio FM usan frecuencias entre 88 y 108 MHz. El alcance en estas bandas es bastante limitado para hacer posible que existan emisoras de la misma frecuencia situadas a decenas de kilómetros sin que produzcan interferencias entre ellas [21].

Podemos encontrar múltiples ventajas de la modulación en frecuencia frente a la de amplitud. La modulación de frecuencia necesita una potencia de modulación menor que las de amplitud. Una de sus mayores ventajas consiste en que las señales moduladas en frecuencia están mucho menos afectadas por los ruidos e interferencias. El motivo por el que las perturbaciones afectan mucho menos a una modulación en frecuencia es porque dichas perturbaciones afectan a la amplitud de la onda, lo que producirá un cambio en el contenido del mensaje y lo distorsionará. Otra de las ventajas es el aumento en el ancho de banda de las señales moduladas en frecuencia, como luego veremos.

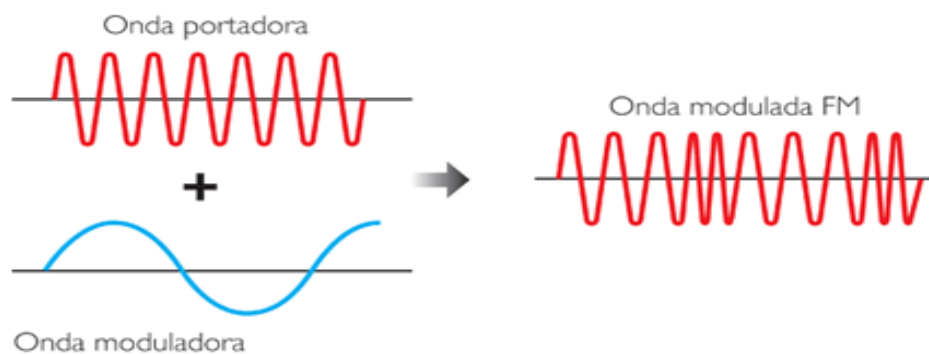


Figura 8.16 Modulación FM

De acuerdo a lo que hemos comentado anteriormente, la frecuencia de la señal modulada, F_m , variará en torno a la frecuencia de la señal portadora, como vemos en la siguiente expresión matemática (6):

$$f = F_p + \Delta f \sin(2\pi f_m t) \quad (6)$$

Donde Δf se define como la máxima desviación de frecuencia que puede experimentar la onda portadora.

La onda modulada en FM tiene finalmente la siguiente expresión:

$$X_{FM} = A_p \cdot \cos(2\pi \cdot F_p \cdot t + \beta \cdot \cos(2\pi \cdot F_m \cdot t)) \quad (7)$$

Donde el parámetro β , se define como el índice de modulación de la onda FM, y representa la máxima desviación de fase producida por el tono modulador con frecuencia F_m y corresponde:

$$\beta = \frac{\Delta f}{F_m} = \frac{F_d \cdot A_m}{F_m} \quad (8)$$

En este tipo de modulación tenemos, como en la modulación en amplitud, las frecuencias F_p , de la portadora, $F_p + F_m$ y $F_p - F_m$ pero ahora, además, se van a unir otras frecuencias laterales como, por ejemplo, $F_p + 2F_m$ y $F_p - 2F_m$, $F_p + 3F_m$ y $F_p - 3F_m$ y así hasta $F_p + n \cdot F_m$ y $F_p - n \cdot F_m$, (donde “n” es un número entero), es decir, cualquier múltiplo de las frecuencias de modulación.

Por lo tanto, el número de frecuencias laterales es muy grande, existiendo la suma y diferencia de todos los armónicos posibles, como se ve en la Figura 8.17.

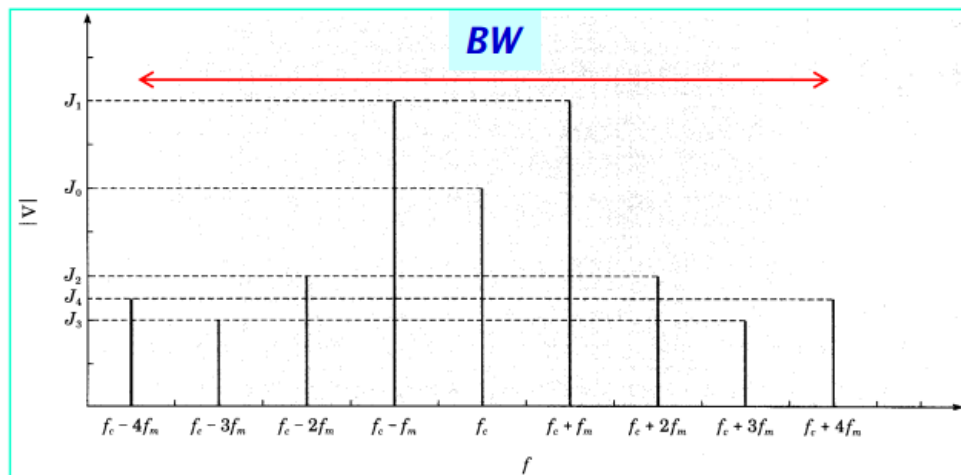


Figura 8.17 Espectro de señal modulada en FM

El ancho de banda de transmisión se define considerando sólo las componentes espectrales más significativas. El hecho de eliminar una parte del espectro en la transmisión causará cierta distorsión en la señal modulada.

Si $\beta \ll 1$, sólo son significativos los términos de orden 0 y 1, con lo cual el ancho de banda es $B_T = 2F_m$, es decir, el doble de la frecuencia del tono modulador.

Esta es una modalidad de FM que se aproxima a la AM.

Sin embargo, en el caso de que $\beta > 1$, esto no es así y habrá que considerar un número suficiente de rayas espectrales. Estamos en el caso de FM banda ancha (WFM, Wide FM) y el espectro y el ancho de banda es distinto y mayor.

En general, podemos afirmar que el ancho de banda de transmisión efectivo de una señal FM modulada con un tono de frecuencia F_m está dada por la **Regla de Carson**:

$$B_T = 2 \cdot (\beta + 1) \cdot F_m \quad (9)$$

Otra forma más precisa para el cálculo del ancho de banda se basa en un criterio numérico. La llamada **Regla del 1%** consiste en tomar un valor de M tal que:

$$|J_M(\beta)| > 0.01 \quad (10)$$

Eliminando no obstante las componentes que cumplen:

$$|J_{M+1}(\beta)| < 0.01 \quad (11)$$

El valor de M que cumpla esta condición se toma como valor a elegir. De esta manera habrá M parejas de componentes espectrales significativas, además de la portadora. En total $2M + 1$ rayas espectrales a tener en cuenta.

Indice de modulación β	Nº de componentes espectrales significativas $2M_{1\%}$
0.1	2
0.3	4
0.5	4
1.0	6
2.0	8
5.0	16
10.0	28
20.0	50
30.0	70

Figura 8.18. Nº de componentes espectrales significativas de señal FM en función de β

En la figura 8.19 se muestra un ejemplo de la densidad espectral de potencia correspondiente a una señal FM modulada por un tono de variación armónica. La frecuencia portadora es 5 KHz y la frecuencia del tono modulador 100 Hz, con $\beta = 0.5$.

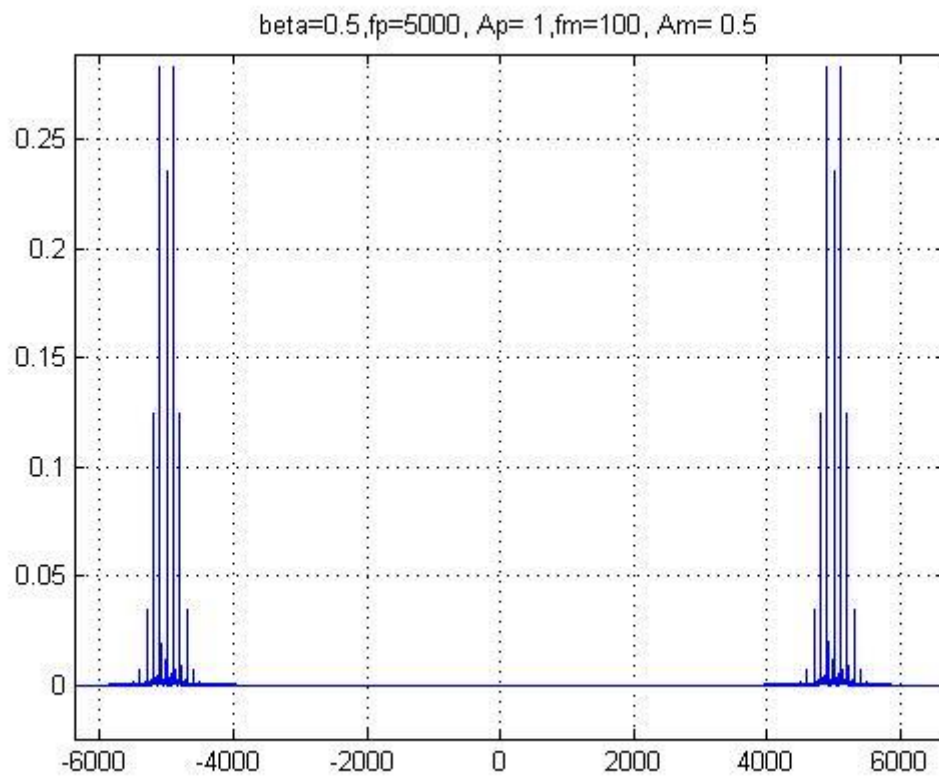


Figura 8.19 Espectro señal modulada FM.

Quedándonos con la banda lateral superior y haciendo un zoom a esta imagen:

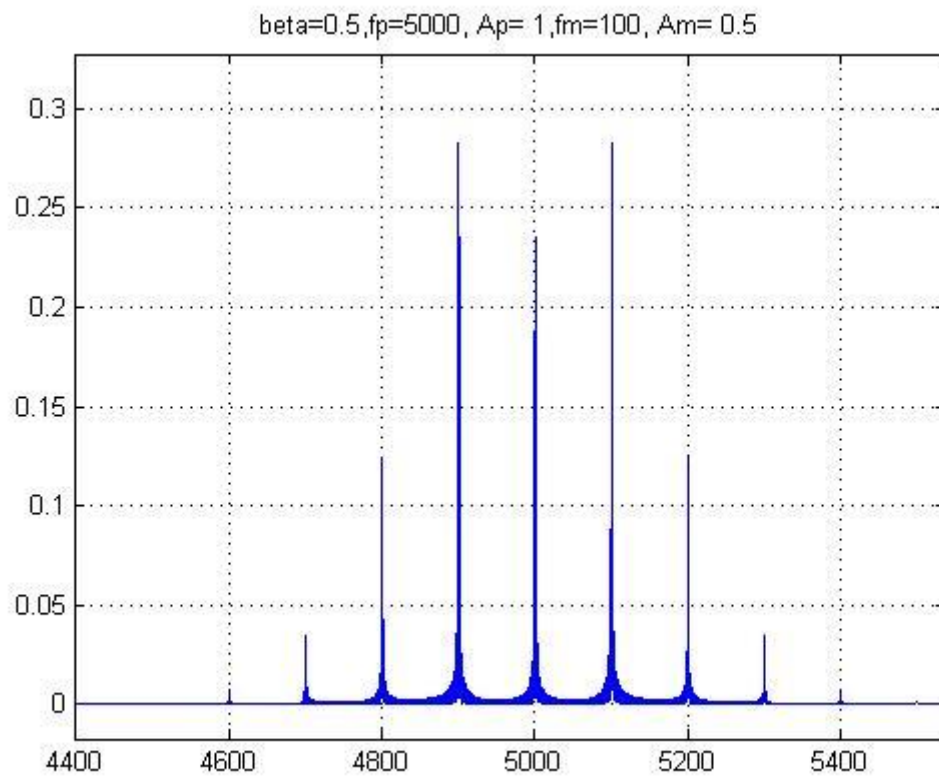


Figura 8.20 Zoom espectro señal modulada en FM

Observamos en la Figura 8.20, que centrado a la frecuencia de portadora y con $\beta = 0.5$ tenemos que considerar según la tabla de la Figura 8.18, 4 componentes espectralmente significativas más la portadora.

8.3 Uso potencial de ultrasonidos en el control de *Ceratitis capitata*

8.3.1 Insectos

El método de cría sigue los procedimientos ya descritos por Albajes y Santiago-Álvarez (1980) y Viñuela (1981). Se colocan aproximadamente 2.000 pupas de *Ceratitis capitata* en la jaula rectangular de metacrilato (50 x 40 x 40 cm.) con el frente protegido por una tela de visillo a través de la cual las moscas introducen su ovipositor para poner los huevos hacia el exterior. En el interior se coloca un gran bebedero con agua destilada, diseñado para que el agua ascienda por capilaridad hacia el exterior. La dieta consiste en una mezcla de levadura de cerveza hidrolizada y azúcar en proporción 1:4 respectivamente.

La caja va colocada sobre una bandeja de plástico con agua destilada en la que caen los huevos puestos a través de la malla frontal y así no se deshidratan. En las jaulas las moscas salen del pupario a los 8-9 días de la pupación.

8.3.2 Equipo de ultrasonidos

Se localiza en una cámara especial para los insectos que son sometidos a frecuencias ultrasónicas.



Figura 8.21: Equipo emisor de ultrasonidos al completo.

En este ensayo, se ha utilizado el mismo patrón de señales que hemos descrito con anterioridad en otro capítulo, pero con la diferencia que solo se ha usado modulación AM en rango de 20KHz a 40KHz, ya que se decidió así debido al margen de tiempo que había para hacer el ensayo. Además también influyó los resultados que se obtuvieron en la electroantenografía de *Ceratitis* que dieron mayor respuesta en modulación AM que en FM.

8.3.3 Cámaras

La cría de *C. capitata* se lleva a cabo en una cámara climática visitable, cuyas condiciones ambientales son las siguientes:

- Temperatura: 24 ± 2 °C.
- Humedad relativa: 74 ± 5 %.
- Fotoperiodo: 16 h L: 8 h O.

La cámara tiene las dimensiones de 4,3 m de largo, 2 m de ancho y 2,5 m de alto y se encuentra aislada en paredes y techo. Para el mantenimiento de la temperatura adecuada, renovación y movimiento del aire, la cámara cuenta con un equipo de “ventilación-bomba de calor” (Interclisa®, modelo CUCVO26M3 + CXE026M3) cuyo funcionamiento es regulado por un termostato (Sunvic®).

El nivel de humedad está regulado por un higrostató conectado a un humidificador (Defensor® modelo 505). Para el control, tanto del sistema de regulación de temperatura como del de humedad, se utiliza un termohigrógrafo (modelo 1750 de Salmoiraghi®) y un termohigrómetro digital con memoria para máximas y mínimas.

La iluminación se consigue con un par de tubos fluorescentes (Gro-Lux® de Sylvania) encima de cada estante, que proporcionan a 20 cm de distancia una iluminación de unos 2500 lux. Mediante un reloj conmutador (Orbis®) se automatiza el encendido y apagado de las luces para conseguir el fotoperiodo deseado.

Los ensayos se realizarán en dos cámaras climáticas:

- Cámara climática control (cámara descrita anteriormente).
- Cámara climática ultrasonidos, con condiciones ambientales:

Temperatura: 23 ± 2 °C.

Humedad relativa: 55 ± 5 %.

Fotoperiodo: 16 h L: 8 h O.

8.3.4 Bioensayo

Se seleccionan 30 cajas cilíndricas de plástico, que servirán como jaula, con unas dimensiones de 12 cm de diámetro x 5 cm de altura. Cada una tiene, además, una tapa de 12 cm de diámetro, en la cual se localiza una malla metálica de 5 cm de diámetro cuya función es de ventilación.

En la parte lateral de la caja, a 1,35 cm de la base se ha realizado un agujero, por el cual se introducirá el ponedero. El ponedero es un tubo cilíndrico de plástico de 2,3 cm de diámetro de base y 5,2 cm de altura, al que se le ha practicado unos pequeños agujeros de 1,5 mm de diámetro en la parte lateral. La función del ponedero es albergar la puesta para su posterior recolección mediante un pincel.

Antes de colocar el ponedero en la caja, se debe introducir algodón en la base del tubo sin que llegue a sobrepasar los agujeros establecidos para la puesta, ya que dificulta el proceso de recogida si los huevos se pegan al algodón. El algodón, debe estar humedecido con agua destilada en todo momento hasta alcanzar casi el punto de saturación del mismo.

Posteriormente el tubo se cerrará con un tapón de plástico de 2,3 cm de diámetro para mantener unas buenas condiciones de humedad de cara a la puesta y así evitar que las hembras depositen sus huevos en otras partes de la jaula.

En la siguiente figura, a la izquierda, se pueden observar la jaula ya terminada y puesta a punto y a la derecha, el ponedero.



Figura 8.22: Jaula montada (izquierda) y ponedero (derecha).

En el interior de las cajas se introducirán los comederos. Para ello se emplearán tapones de las mismas características que los que cierran los ponederos. Estos comederos quedan adheridos a la base de la caja mediante plastilina y previamente han sido llenados con la dieta para adultos.

Otro de los elementos que componen la jaula del ensayo son los bebederos, que son vasos de cristal de 20 ml de capacidad, los cuales son adheridos a la base de la caja mediante plastilina, al igual que los comederos.

Montada la jaula al completo, antes de realizar el ensayo, se lleva a cabo el sexado de adultos de menos de 24 horas que han sido criados en la cámara climática. Por cada repetición que se va a realizar se seleccionan 3 hembras y 3 machos perfectamente formados, recién emergidos y sin alimentación alguna, que se liberan en las jaulas. 15

repeticiones permanecerán en la cámara control y 15 más en la cámara ultrasonidos. Siempre debe permanecer un Tynitag en cada cámara en la balda donde se esté realizando el experimento. Se debe comprobar antes en qué balda de todas las disponibles en cada cámara ha de utilizarse para que las Ceratitis estén en unas condiciones de temperatura y humedad lo más homogéneas posible.

El seguimiento del ensayo consistirá en la **evaluación diaria de la mortalidad y la recogida y recuento de la puesta realizada (ver, en la figura 8.23, los huevecillos en un cilindro de plástico con agua destilada)**, así como la evaluación de la fertilidad de al menos 2 días no consecutivos en huevos de menos de 24 horas.



Fig. 8.23: La puesta de Ceratitis preparada para contar a la lupa.

Por tanto, pasadas las primeras 72 horas desde que se monta el ensayo, diariamente se procede a la recogida de los huevos del ponedero mediante un pincel, depositándolos en un cilindro de plástico, que se rellena con agua destilada para separar los huevos que se encuentren pegados y con ello facilitar el recuento de los mismos bajo la lupa. Realizada la recogida de la puesta mediante una pipeta de plástico, se humedece el algodón con agua destilada para preservar las condiciones de humedad del ponedero. El recuento de huevos puestos y larvas emergidas podrá realizarse fuera del insectario, pero los adultos de Ceratitis no podrán salir del mismo en ningún momento.

Para evaluar fertilidad, se eligen 30 placas Petri de 9 cm de diámetro por día de evaluación. Después se seleccionan 30 papeles de filtro de color negro (Filter-Lab®) de 90 mm de diámetro. Cada papel de filtro se dividirá en 5 sectores trazados con un rotulador y se introducirá en la placa correspondiente. Se añade sobre el papel de filtro 1 ml de agua destilada para mantener los huevos turgentes. Con ayuda de un pincel y bajo la lupa se escogen 30 huevos por repetición que estén perfectamente formados y completamente turgentes, y se descartan los aplastados, vacíos o de tonalidad parduzca, colocando 6 huevos por cada sector trazado en el papel de filtro negro para facilitar el recuento posterior. Una vez finalizado este paso se sella la placa petri mediante Parafilm® cortado previamente en tiras.



Figura 8.24 Evaluación de la fertilidad

Realizada la misma operación en todas las repeticiones, las placas se localizarán en una bandeja en la parte intermedia de la cámara climática. A las 72 horas se procederá al primer recuento de larvas emergidas. Se continuará el recuento 24 horas más.

8.4 Ensayo de comportamiento en *Rhynchophorus ferrugineus*

A continuación, nos vamos a centrar en describir la metodología desarrollada para el estudio de comportamiento de picudo rojo.

Este tipo de ensayo se utiliza para medir, en condiciones de laboratorio, las reacciones de rechazo o aceptación por parte de un organismo vivo a las señales ultrasónicas aplicadas. Para su diseño se debe de tener en cuenta, al objeto de tener respuestas reproducibles, que el comportamiento de un insecto es el resultado de la interacción de factores externos (estímulos) y factores internos (estado fisiológico). [24]

Hay también que tener en consideración que el comportamiento o estado interno del insecto a lo largo del día puede variar debido a sus ritmos circadianos o a la incidencia de diversos factores ambientales.

En este tipo de prueba se contempla el comportamiento de atracción o rechazo, generalmente se suele responder a un tipo de patrón, permitiéndonos conocer la porción de población que no presentaría perjuicios al estar expuesta a estas señales de excitación. También nos permitiría conocer la proporción que por rechazo abandonaría la zona de actividad, escondiéndose o evitando en la medida de lo posible todos los agentes que perturben su comportamiento, en este caso las ondas mecánicas o la propia luz que alteran su pauta de alguna forma. [23]

Para iniciar estas pruebas, un criterio bastante importante a tener en cuenta, es que las funciones biológicas del insecto sean conocidas y además sean fáciles de definir y

observar. Además estas pruebas deberían de realizarse en el periodo del tiempo en el que el insecto muestra la respuesta más intensa a la feromona. [24]

Los bioensayos se han realizado con corriente de aire y con registro del desplazamiento del insecto.

En este ensayo, Si se ha usado las señales, con el patrón previamente descrito en el anterior capítulo, y también hemos aplicado las señales ultrasónicas moduladas tanto en amplitud AM como en FM. A diferencia del anterior ensayo, que solo se aplicaron señales de excitación ultrasónicas moduladas AM.

8.4.1 Insectos

Para empezar, los organismos seleccionados para este bioensayo, se deben de observar durante un corto periodo de tiempo que depende del organismo, con el fin de determinar su buena condición, comprobando que no han sido dañados durante el transporte ni por el cambio de condiciones ambientales.

Los picudos se han capturado mediante una trampa atrayéndolos con feromona en una zona y época del año que cumplen con el auge de este tipo de insectos. Trasladándolos hasta el laboratorio con las condiciones climáticas adecuadas para su supervivencia y así poder realizar las pruebas.

Al interior de los recipientes, se depositaron tiras de papel humedecidas para que en ellas encontraran también el índice de humedad necesario aportándoles además materia orgánica para su alimentación (Figura 8.25) En este caso, el material añadido es un trozo de plátano para satisfacer sus necesidades de aportes proteicos para aguantar el tiempo del ensayo y recuperar fuerzas, ya que los ensayos a los que han sido sometidos han sido de 2 horas.



Figura 8.25 Recipiente con Picudo rojo en el interior.

8.4.2 Equipo de Ultrasonidos

Para este bioensayo, el emplazamiento de trabajo y el equipo de señales ultrasónico se localizan en el laboratorio de investigación de Química Orgánica e Inorgánica, para que los insectos sean sometidos a frecuencias en el rango de los ultrasonidos. Insertado encima de la placa de metacrilato y sobre un soporte que lo sostiene, se orienta hacia el recipiente para que haya una óptima recepción de las señales de excitación por parte de los insectos. En la figura 8.26, se muestra la ubicación del altavoz Vifa.

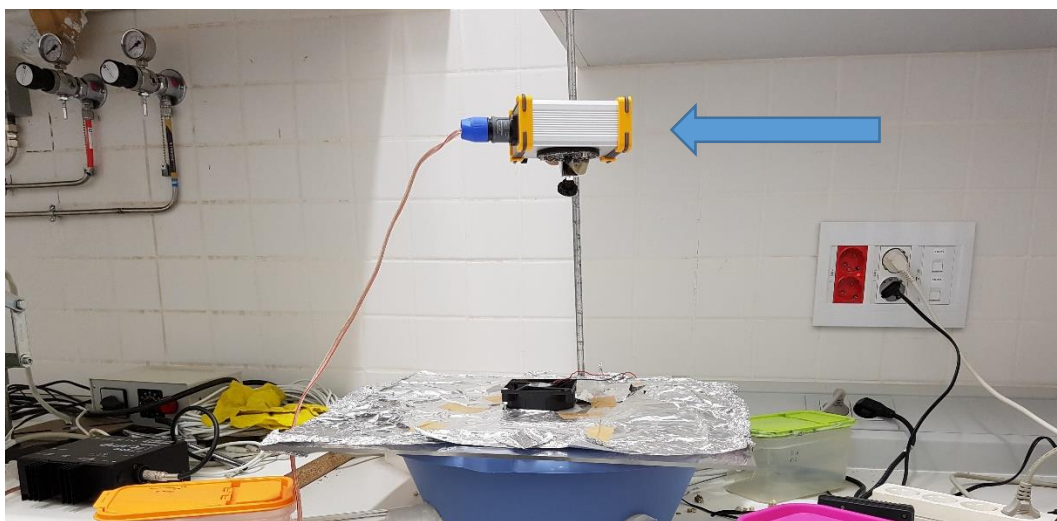


Figura 8.26. Ubicación del altavoz Vifa.

8.4.3 Estudio de aislamiento acústico

Para caracterizar en mayor medida y hacer un estudio completo, mediante el sonómetro RION NL-32 hemos realizado un estudio de absorción acústica para comprobar el nivel de presión sonora que sale por los altavoces y el que le llega a los insectos por debajo de la placa de metacrilato. Así podremos caracterizar las pérdidas que tenemos debido a la presencia de este material además de comprobar la respuesta en frecuencia del altavoz.

Si no existen obstáculos, el sonido emitido por una fuente se propaga en campo libre por el aire hasta alcanzar al receptor sin más atenuación que la debida a la distancia entre ambos y a la absorción del aire.

Cuando las ondas sonoras chocan con un obstáculo u material, las presiones sonoras variables que actúan sobre él hacen que éste vibre. Una parte de la energía vibratoria transportada por las ondas sonoras se transmite a través del obstáculo y pone en movimiento el aire situado del otro lado, generando sonido. Parte de la energía de las ondas sonoras se disipa dentro del mismo, reduciendo la energía irradiada al otro lado.

La absorción del material depende bastantes parámetros, tales como rugosidad, porosidad, flexibilidad y del grado de porosidad de la superficie. Los poros hacen que la energía sonora quede atrapada en ellos con múltiples reflexiones. Dentro del poro, esta energía se convierte en energía calorífica debido al rozamiento de la energía con los límites del poro al ir rebotando en su interior, y esta energía se disipa. [27]

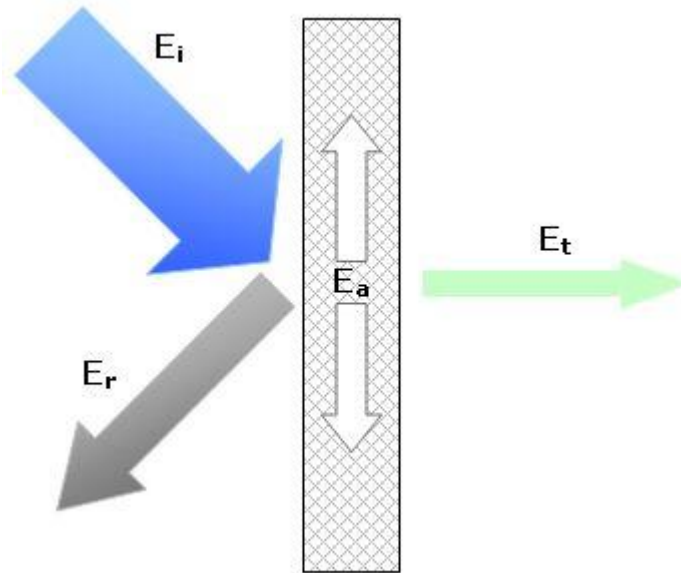


Figura 8.27 División de energía acústica cuando incide con un obstáculo.

En la figura 8.27 podemos observar como la energía incidente (E_i) colisiona con el obstáculo y se distribuye en tres energías diferentes. Como solo queremos conocer el aislamiento que nos proporciona este elemento, nos fijamos en la energía que se transmite a través de él (E_t).

$$E_i = E_r + E_a + E_t \quad (12)$$

La pérdida por transmisión (TL) es la relación entre la energía sonora incidente y la energía sonora transmitida y se expresa en decibelios.

$$TL = 10 \log \frac{E_i}{E_t} \quad (13)$$

Como nos interesa solo E_t , y teniendo en cuenta que disponemos del sonómetro, vamos a proceder a tomar medidas fuera de la placa (cerca del altavoz) y dentro. Estas medidas son tomadas haciendo una pequeña modificación en el código de Matlab de las señales de excitación. Es decir, lo que vamos a hacer ahora es variar la frecuencia de portadora dentro del rango de sonidos audibles (Solo para este apartado del presente trabajo).

Como las características técnicas del sonómetro, no permite la medición de señales de ultrasonidos, tomaremos frecuencias dentro del rango audible y registraremos el nivel de presión sonora que obtendremos, fuera y dentro.

Para empezar, el sonómetro ha de calibrarse antes y después de cada medición. Para ello dispondremos de un calibrador acústico NC-74 (94 dB a 1KHz) que se puede ver en la siguiente figura 8.28.



Figura 8.28 Calibrador acústico NC-74.

Aunque también hay que añadir que podemos optar por un calibrador eléctrico propio del modelo NL-32, para este caso debe medir 114 dB con descriptor L_c .

Un tema importante dentro de la configuración del sonómetro, es el de la ponderación en frecuencia, debido a que las curvas de ponderación A o C aproximan a los analizadores a la respuesta del oído humano.

Nuestro oído no tiene una respuesta plana en frecuencia además varía con el nivel de presión, por ello se crearon estas curvas de ponderación. Sabiendo esto y como nos permite el modelo en cuestión, indicamos que no deseamos ponderación en frecuencia en la configuración del sonómetro, mediante el indicador de ponderación FLAT (zero weighting). En la figura 8.29 indicamos donde se han realizado las medidas con el sonómetro y las alturas que se han medido para más información.

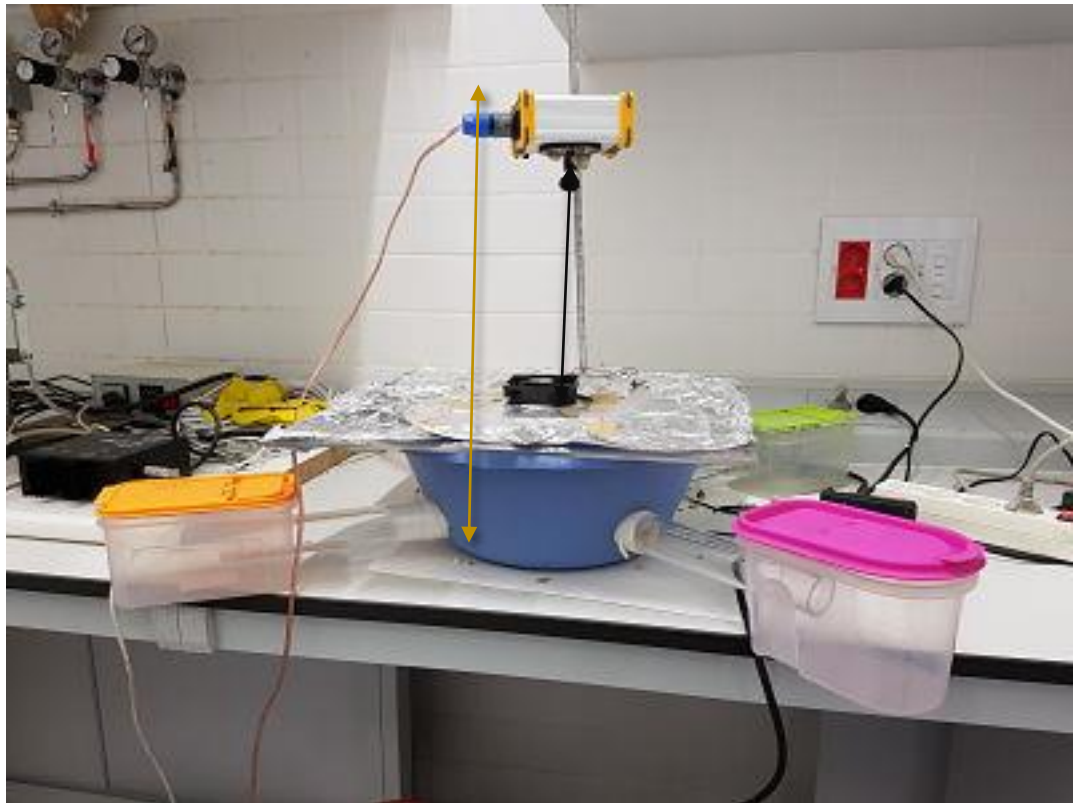


Figura 8.29 Alturas y situación de las medidas tomadas.

Se han tomado los siguientes datos:

- Distancia del altavoz a la placa: 29 cm. (Flecha negra, figura 8.29).
- Distancia del altavoz al fondo de la cámara principal: 41 cm. (Flecha amarilla, figura 8.29).
- Ruido ambiente: 63 dBSPL.
- Distancia del altavoz al sonómetro: 15 cm (Flecha roja, figura 8.30).

Las medidas se han tomado en completo silencio, actuando en el laboratorio, el PC y el altavoz únicamente para una correcta medición de los datos evitando así en la medida de lo posible el ruido de fondo que pueda existir. Las mediciones se han realizado sobre la cámara principal, debajo del haz del altavoz y dentro de la cámara para ser más fieles a la hora de definir aproximadamente las pérdidas.

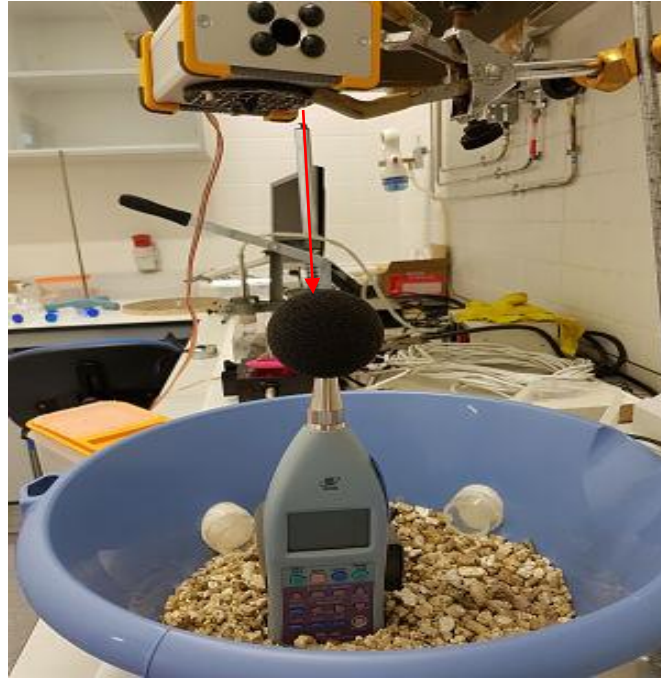


Figura 8.30. Posición del sonómetro para toma de medidas

Ahora pasamos a mostrar las distintas tablas con las respectivas mediciones que se han tomado. Para su mejor comprensión, se adjuntara unos gráficos elaborados para ver que efectivamente el material de metacrilato produce pérdidas en modulación de amplitud conforme vamos aumentando la frecuencia.

A partir de 20KHz es de esperar que se produzcan más atenuación en la señal, debido a que es el límite teórico de medición de este sonómetro con lo que se pierde sensibilidad de medición además también se puede añadir que influye la distancia y presencia del obstáculo.

8.4.3.1 Modulación AM.

Frecuencia (KHz)	1KHz	5KHz	10KHz	15KHz	20KHz
Medida fuera de la caja (dB)	101 dB	101,4 dB	101,3 dB	97,6 dB	97,4 dB
Medida dentro de la caja (dB)	82,6 dB	82,6 dB	75 dB	70,6 dB	64,9 dB
Diferencia (dB)	18,4 dB	18,8 dB	26,3 dB	27 dB	29,5 dB

Tabla 8.1 Mediciones en modulación AM.

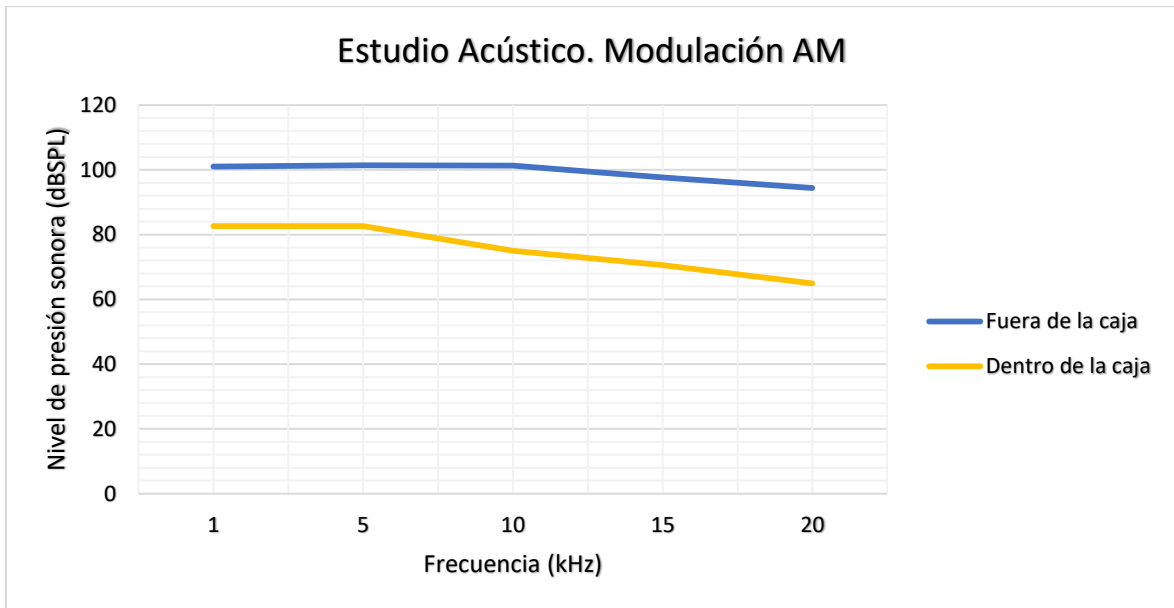


Figura 8.31 Gráfico de líneas de pérdidas por absorción

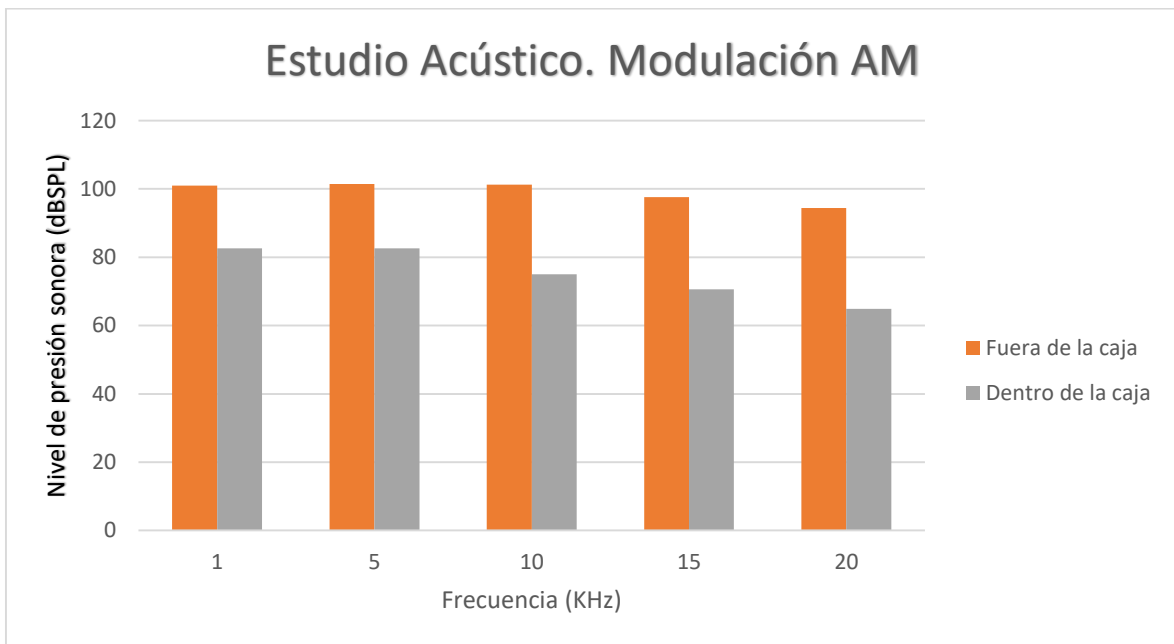


Figura 8.32 Diagrama de barras de pérdidas por absorción en modulación AM.

8.4.3.2 Modulación FM.

A continuación, estudiaremos la caída en dB de la modulación FM. En este caso, como podemos ver seguimos teniendo más pérdidas según se va aumentando la frecuencia, obteniéndose un máximo a la frecuencia de 20KHz de 29,6 dB, cosa razonable por otra parte ya que la distancia, el panel de metacrilato y la frecuencia ayudan a que se produzca esta tendencia descendente presente en las dos modulaciones.

Frecuencia (KHz)	1KHz	5KHz	10KHz	15KHz	20KHz
Medida fuera de la caja (dB)	102,9dB	103,8 dB	103,2 dB	100,5 dB	97,6 dB
Medida dentro de la caja (dB)	93 dB	93,1 dB	78 dB	74.9 dB	68 dB
Diferencia (dB)	9,9 dB	10,7 dB	25,2 dB	25,6 dB	29,6 dB

Tabla 8.2 Mediciones en modulación FM.

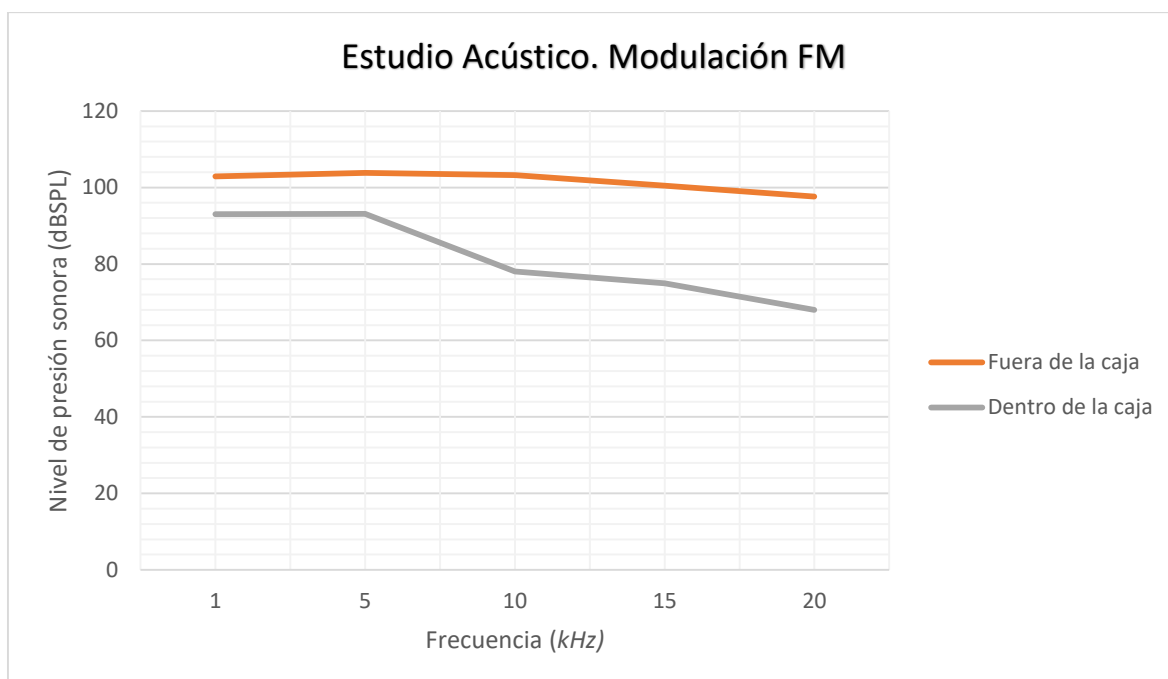


Figura8.33 Grafico de líneas de pérdidas en FM

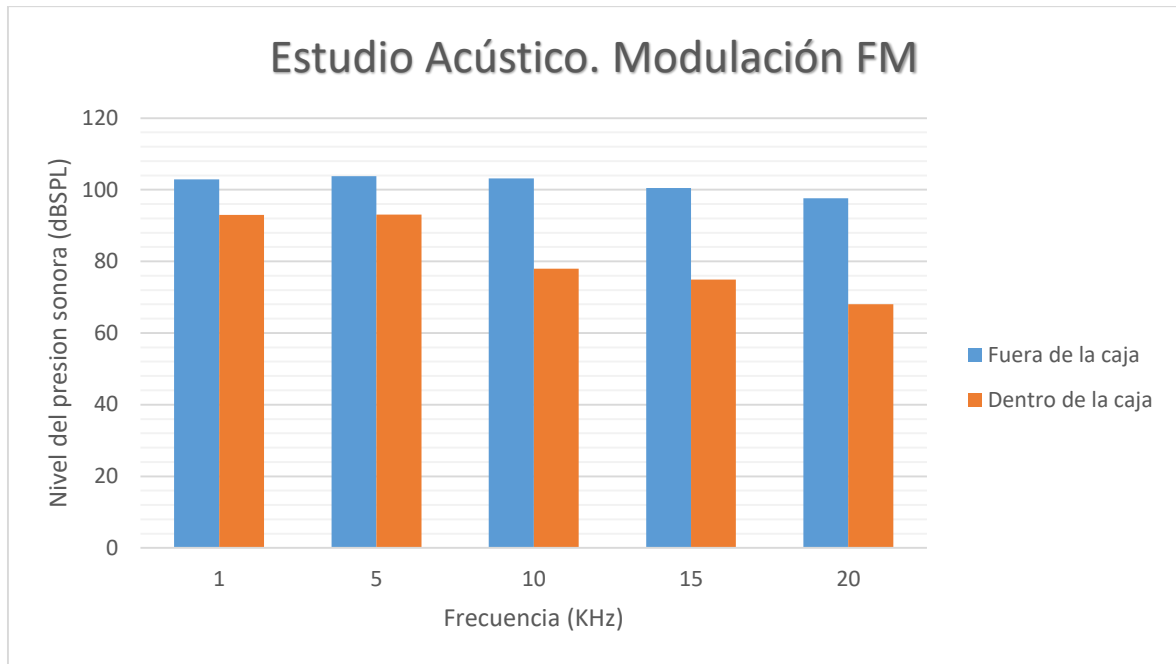


Figura 8.34 Diagrama de barras de pérdidas en modulación FM.

A la vista de los resultados y mediciones, en las dos modulaciones, podemos concluir que la presencia de la placa de metacrilato puesta sobre la cámara central, absorbe parte de la potencia acústica que el altavoz radia en forma de ondas mecánicas. Produciéndose una atenuación de la señal original y aislando más la cavidad interior donde se depositan los insectos para su posterior análisis de comportamiento.

El coeficiente de absorción del material varía con la frecuencia de la onda sonora. La eficacia de una superficie o material absorbente se expresa como un número entre 0 y 1, llamado coeficiente de absorción, α expresado en Sabines. De manera que 0 representa la no absorción, es decir, reflexión total y 1 corresponde a la absorción total.

Caracterizando α de forma matemática:

$$\alpha = \frac{E_a}{E_i} \quad 0 \leq \alpha \leq 1 \quad (14)$$

8.4.4 Olfactómetro de 4 vías

Para investigar la respuesta en el comportamiento a compuestos volátiles sintéticos y a las señales ultrasónicas, hemos usado un olfactómetro de 4 vías. El dispositivo es similar al previamente descrito y usado en [31]. El esquemático que podemos ver en la figura 8.35 muestra la idea que se ha empleado para el diseño del receptáculo usado para el estudio de comportamiento.

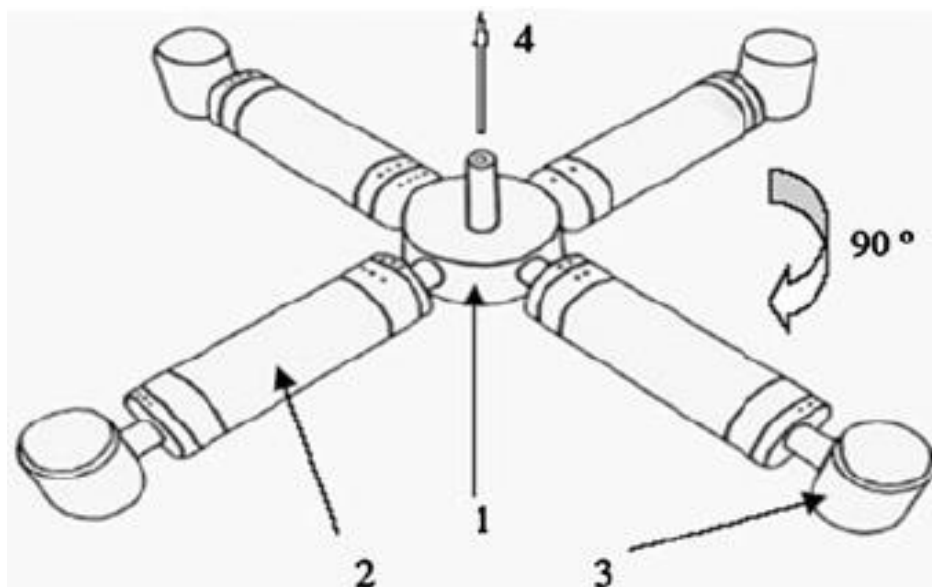


Figura 8.35 Esquemático de Olfactómetro de 4 vías.

El olfactómetro consiste en una cámara principal con vermiculita estéril deshidratada (Fine grade, Egmont Commercial Ltd, Halswell, New Zealand) usado como sustrato, que permite una mayor movilidad del insecto, cuatro tubos de metacrilato (dimensiones: 24.8cm $\times$ 4 cm de diámetro) conectados a recipientes de plástico que contienen distintas fuentes de olor. En la figura 8.36 podemos observar uno de los brazos de metacrilato usado.

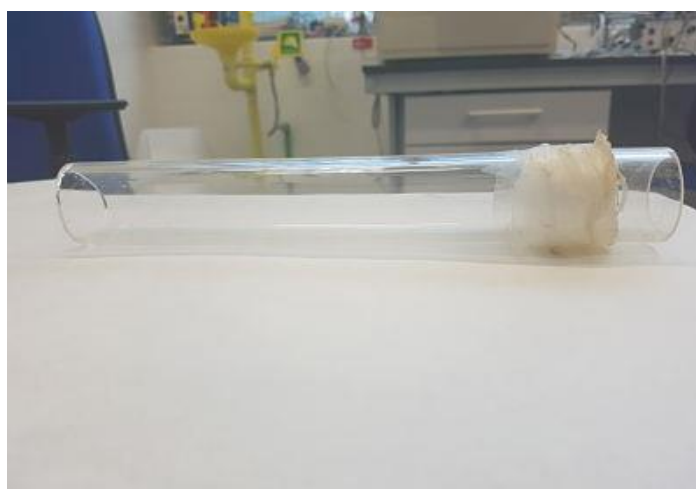


Figura 8.36 Tubo de metacrilato usado para el Olfactómetro

Los contenedores de plástico son usados para capturar los distintos insectos que son atraídos por las distintas fuentes de olor. En la siguiente figura podemos ver, el contenedor de plástico utilizado para tal fin, figura 8.37.



Figura 8.37 Contenedor de plástico usado para capturar los insectos que caen

Para que los insectos caigan en los contenedores, debemos de hacer que el aire circule en todo el receptáculo. Para ello se ha utilizado un ventilador, situado sobre una placa de metacrilato, que desde la cámara central hace circular el aire por los tubos, generando así el flujo de aire necesario para que los insectos sean atraídos a las distintas fuentes de olor y caigan dentro de los contenedores.

La luz es un problema para realizar estos experimentos, por lo que la placa metacrilato se ha envuelto en aluminio para evitar cualquier resquicio que impida el normal desarrollo del ensayo. Cuando estos insectos notan el haz de luz, intenta protegerse de alguna manera, interfiriendo en su normal desenvolvimiento y no siendo posible la realización de manera eficiente.

El compuesto químico que se ha empleado, ha sido utilizado solo con picudo rojo en estado de adultos, y sobre ambos sexos (aunque en mayor proporción de hembras). El compuesto o feromona de agregación que hemos usado, responde a la formula química de 4-metil-5-nonanol. La estructura de este producto químico empleado en el ensayo, se muestra en la figura 8.38:

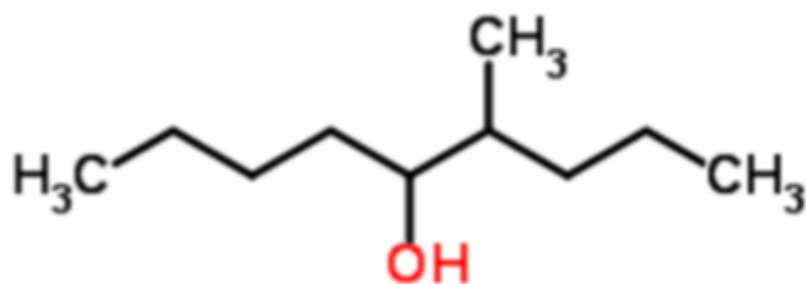


Figura 8.38 Estructura del 4-metil-5-nonanol.

8.4.5 Bioensayo

Para este bioensayo, los insectos se han situado sobre la cámara central (Figura 8.38) y sometidos a las condiciones de señales ultrasónicas y la fuente de agregación, la feromona. Para cada replica, se han usado dos contenedores con feromona y dos sin feromona, asignados aleatoriamente a los tubos del olfactómetro.



Figura 8.39 Cámara central rellena de vermiculita deshidratada.

Tanto machos como hembras, son utilizados una vez por ensayo, es decir, cuando terminamos uno y empezamos otro, usamos insectos diferentes, ya que la duración de cada prueba hace que el insecto no tenga las condiciones óptimas para afrontar otro experimento consecutivo.

Después de introducir los insectos dentro del recipiente, tenemos que esperar unos minutos para empezar la prueba, porque estos necesitan un tiempo de adaptación a las

nuevas condiciones. La duración del ensayo, como ya hemos comentado con anterioridad son de 2 horas, tiempo suficiente para que el insecto explore y seleccione una fuente de feromona, si es posible.



Figura 8.40 Picudos en contenedor con Feromona.

Terminado cada bioensayo, se procede a rotar los tubos del olfactómetro 90°, para comprobar si los ultrasonidos han afectado a la capacidad de localización de la feromona por parte de los picudos. En la siguiente figura se observan, dos picudos que han caído en el contenedor que no contenía la feromona y por ende, han perdido esa localización previamente dicha.



Figura 8.41 Picudos en contenedor sin feromona.

Se han realizado ensayos sin sonido, ya que es importante conocer si el ensayo tiene efecto y así poder tasar mejor las diferencias que se pueden apreciar aplicando técnicas ultrasónicas.

Esta parte es fundamental, ya que si comprobamos que en condiciones de ultrasonidos, han perdido la capacidad de localización de la feromona de agregación, habremos conseguido una modificación en el comportamiento y en la comunicación química de estos insectos de forma controlada. Debido principalmente a que hemos interferido mediante señales de excitación, esa capacidad de atracción del insecto a la feromona, concluyendo positivamente las pruebas realizadas, pero para confirmarlo tendremos que realizar posteriormente un estudio y análisis estadístico para comprobar que realmente tiene sentido nuestra hipótesis de partida.

La habitación donde se han realizado los ensayos, tiene una temperatura de unos $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Temperatura más que suficiente para el correcto desarrollo del ensayo, que permite a los picudos la temperatura necesaria para su actividad normal.

La respuesta medida en cada ensayo, fue calculado como el número de individuos atraídos por la feromona. En total se han realizado 15 ensayos con modulación AM, con una distribución bastante uniforme de los resultados, con lo que no se han necesitado más repeticiones.

Y en FM un total de 30, debido a que obteníamos una mayor varianza de los datos y estadísticamente necesitábamos más experimentos para contrastar que afecta también al comportamiento como en AM, aunque de los resultados ya hablaremos en el siguiente capítulo de este trabajo.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo, vamos a proceder a citar los resultados estadísticos y su discusión del ensayo de oviposición de *Ceratitis* y el ensayo de comportamiento de picudo rojo.

9.1 Resultados y discusión ensayo de oviposición de *Ceratitis Capitata*

El valor medio obtenido para la fecundidad en el testigo es de 167,97 expresado en huevos por hembra y día. En cambio, para las moscas que han estado sometidas a ultrasonidos la fecundidad media es de 203,14 huevos por hembra y día. Las fecundidades de ambos tratamientos no se puede considerar que sean significativamente diferentes entre sí y la de ultrasonidos supone un aumento de casi el 21% respecto del testigo (ver **TABLA 9.1**).

La Organización Internacional de Lucha Biológica e Integrada (OILB, o también IOBC por sus siglas en inglés), establece una clasificación de los tratamientos que asigna un número en función del efecto que tengan sobre el parámetro estudiado, en una escala que va del 1 al 4 y en la cual la máxima toxicidad se corresponde con este último valor. Así, se puede afirmar que los ultrasonidos no tienen efecto sobre la fecundidad de *Ceratitis capitata* ya que la reducción obtenida en la fecundidad respecto del testigo se corresponde con la categoría 1 de esta institución.

Por otro lado, se evaluó también, en dos días no consecutivos, la fertilidad medida como porcentaje de huevos que hacen eclosión. En el sexto día del experimento se registró una fertilidad media para el testigo de 78,33 % (ver **TABLA 9.2**), mientras que para las moscas sometidas a ultrasonidos se obtuvo un 85,64 % de fertilidad. En el octavo día del experimento la fertilidad media fue de 80,39% en el testigo y de 85,75% en el tratamiento de ultrasonidos.

Por último, hay que decir que no se aprecian diferencias significativas entre la mortalidad ocasionada por el tratamiento de ultrasonidos y la observada en el testigo.

En conclusión, para la aplicación de ultrasonidos en la lucha contra la mosca mediterránea de la fruta o *C. capitata* se puede decir que de los tres parámetros evaluados (mortalidad, fecundidad y fertilidad) no se observan efectos en ninguno de ellos.

Tratamiento	Fecundidad ^a (huevos/♀ y día)	Reducción ^b	OILB ^c
Testigo	167,97 _a ± 27,17	-	-
Ultrasonidos	203,14 _a ± 39,22	-20,94 %	1

Tabla 9.1. Fecundidad media acumulada para el testigo y las moscas que se han sometido a ultrasonidos.

Datos (media ± intervalo de confianza al 95%) en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

^a $t = -1,58$; $P = 0,12$.

^b Reducción de la fecundidad con la fórmula de Abbott: $P \text{ reducción (\%)} = [1 - (P_{\text{tratado}}/P_{\text{testigo}})] \times 100$.

^c Categoría toxicológica OILB (laboratorio): (1) Inocuo: <30 % de reducción respecto al control; (2) Ligeramente tóxico: 30-79 %; (3) Moderadamente tóxico: 80-99 %; (4) Tóxico: > 99 %.

Tratamiento	Fertilidad (%) ^a	Reducción ^b	OILB ^c
Testigo	78,33 _a ± 10,20	-	-
Ultrasonidos	85,64 _a ± 6,34	-9,33%	1

Tabla 9.2. Fertilidad media del sexto día de experimento, para el testigo y el tratamiento de ultrasonidos.

Datos (media ± intervalo de confianza al 95%) en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

^a $F = -1,42$; $P = 0,17$.

^b Reducción de la fecundidad con la fórmula de Abbott: $P \text{ reducción (\%)} = [1 - (P_{\text{tratado}}/P_{\text{testigo}})] \times 100$.

^c Categoría toxicológica OILB (laboratorio): (1) Inocuo: <30 % de reducción respecto al control; (2) Ligeramente tóxico: 30-79 %; (3) Moderadamente tóxico: 80-99 %; (4) Tóxico: > 99 %.

Tratamiento	Fertilidad (%) ^a	Reducción ^b	OILB ^c
Testigo	80,39 ± 7,97	-	-
Ultrasonidos	85,64 _a ± 4,77	-9,33%	1

Tabla 9.3. Fertilidad media del octavo día de experimento, para el testigo y el tratamiento de ultrasonidos.

Datos (media ± intervalo de confianza al 95%) en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

^a $F = -1,26$; $P = 0,22$.

^b Reducción de la fecundidad con la fórmula de Abbott: $P \text{ reducción (\%)} = [1 - (P_{\text{tratado}}/P_{\text{testigo}})] \times 100$.

^c Categoría toxicológica OILB (laboratorio): (1) Inocuo: <30 % de reducción respecto al control; (2) Ligeramente tóxico: 30-79 %; (3) Moderadamente tóxico: 80-99 %; (4) Tóxico: > 99 %.

9.2 Resultados y discusión ensayo de comportamiento de *Rhynchophorus ferrugineus*.

Vamos a distinguir dos apartados, análisis y estudio estadístico de comportamiento con modulación AM y otro análisis y estudio con modulación FM. Vamos a comparar y ver si realmente sale estadísticamente significativo la aplicación de estas señales en la forma de conducta. Para ello aplicaremos distintos contrastes estadísticos.

9.2.1 Resultados con modulación AM

Para el caso de la modulación de amplitud, se han realizado 15 experimentos de 2 horas de duración cada uno. Debido a la uniformidad que han presentado los datos, no nos ha hecho falta realizar más experimentos, ya que los datos obtenidos han sido más que suficientes para optar por un análisis estadístico con un grado de fiabilidad aceptable y que además nos permitiera rechazar una hipótesis en favor de otra.

En este caso hemos estudiado si existe algún cambio relevante en el comportamiento mediante este tipo de modulación. Para ello se ha realizado un contraste estadístico ANOVA de un solo factor. Este factor es obviamente el **sonido**, que separa los valores de las variables en dos grupos (Variables con sonido y sin sonido).

Para realizar este estadístico partimos de las dos hipótesis de partida:

- H_0 (Hipótesis nula): La modulación **SI** afecta al comportamiento del picudo.
- H_1 (Hipótesis alternativa): La modulación **NO** afecta al comportamiento del picudo.

Obteniendo los siguientes datos estadísticos resultados de la ANOVA de un factor:

ANOVA	SS	df	VAR	F	P(F)
	0,10	2	0,05	0,22	0,81

Tabla 9.4. Resultado del contraste estadístico ANOVA de un factor.

Arrojando el resultado siguiente:

$$F < P(F) \quad (15)$$

A la vista de la ecuación 15, concluimos que no podemos rechazar la hipótesis nula en favor de la alternativa con un nivel de significación de $\alpha = 0.01$.

Con lo que podemos afirmar que la modulación AM **SI** afecta al comportamiento del picudo.

9.2.2 Resultados con modulación FM

Para este tipo de modulación se han realizado varios análisis estadísticos distintos, ya que la distribución de los datos obtenidos, presentaban una elevada variabilidad unos de otros y por ende no podíamos quedarnos solo con un número de experimentos de 15 como en el caso de la modulación AM. Resultaban insuficientes para realizar cualquier tipo de contraste fiable.

9.2.2.1 Test de ANOVA GLM (Generalized Linear Models)

Los modelos lineales (regresión, ANOVA), se basan en los siguientes supuestos:

1. Los errores se distribuyen normalmente.
2. La varianza es constante.
3. La variable dependiente se relaciona linealmente con la(s) variable(s) independiente(s).

Ciertos tipos de variables dependientes sufren invariablemente la violación de los modelos lineales y los GLM ofrecen una buena alternativa para tratarlos. Por ello estaríamos en el supuesto GLM.

Se utiliza este contraste cuando se dan las siguientes circunstancias en las variables:

- Un variable de conteo, en concreto, casos (ejemplo: número de colisiones, accidentes, viviendas destruidas...)
- Un variable de contero de casos expresados éstos como proporciones (ejemplo; porcentaje de heridos graves en accidentes, porcentaje de no carnet...)
- Una variable establecida como binaria (ejemplo: vivo o muerto)

Por ello, se ha realizado un contraste estadístico con este test. Y se adjunta la tabla 9.6 con los datos obtenidos tras el estudio estadístico.

GLM (ANOVA factorial)					
Univariate Tests of Significance for N (FM_picudosJR_glm)					
Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degree of Freedom	MS	F	p
Intercept	171,8751	1	171,8751	232,7158	0
FM	17,8954	1	17,8954	24,2301	0,000003
tratamiento	33,1169	1	33,1169	44,8397	0
FM*tratamiento	26,0799	1	26,0799	35,3117	0
Error	75,3333	102	0,7386		

Tabla 9.5 Resultados Test ANOVA GLM.

Podemos afirmar que existen diferencias significativas entre los grupos, pero no sabemos en cuales, si es en feromona o no feromona sin sonido o entre feromona y no feromona con sonido. Por ello tendremos que profundizar en el análisis estadístico.

9.2.2.2 Test de Levene para la homogeneidad de las varianzas

Para que el contraste ANOVA sea válido, es necesario que podamos suponer una serie de propiedades sobre la distribución de las variables, como ya hemos comentado anteriormente. La más importante es el Test de Levene.

La prueba de Levene para la igualdad de varianzas nos indica si podemos o no suponer varianzas iguales. Fijando un valor de significación de $\alpha = 0,05$, la probabilidad asociada al estadístico Levene es:

- Si $p - value > 0.05$ suponemos varianzas iguales,
- Si $p - value < 0.05$ suponemos varianzas distintas

Levene's Test for Homogeneity of Variances (FM_picudosJR_glm)				
Degrees of freedom for all F's: 3, 102				
	MS	MS	F	p-value
	Effect	Error		
N	0,582896	0,244512	2,383912	0,073649

Tabla 9.6. Resultados del test de Levene para Modulación FM.

La tabla 9.6 contiene el estadístico de Levene que nos va a permitir contrastar la hipótesis de igualdad de varianzas poblacionales. Como obtenemos que:

$$p - value > 0,05 \quad (16)$$

Según la expresión 16, obtenemos un p-valor mayor que el nivel de significación anteriormente fijado de valor 0,05. Con lo que el test de Levene no sale significativo y, por tanto, la homogeneidad de varianzas se cumple. Concluyendo de esta forma que la varianza de todo el grupo es la misma.

9.2.2.3 Contraste Post-Hoc. Test N-unequal HSD de Tukey

En este contraste, vamos a identificar los grupos en los que se han producido mayores diferencias. Debido a que no tenemos una idea de en qué grupos se van a presentar las mayores diferencias, vamos a usar un contraste no planeado o post-hoc.

Lo que pretendemos es buscar o establecer diferencias entre los grupos basándose en diferencias dos a dos, por lo que se hará una comparación múltiple.

En la tabla 9.7 se adjuntan los datos, resultado de la comparación entre los distintos grupos que hemos tenido.

Post hoc test						
Unequal N HSD; variable N (FM_picudosJR_glm)						
Error: Between MSE = .73856, df = 102.00						
	FM	tratamiento	{1}	{2}	{3}	{4}
			2,7407	0,62963	0,92593	0,8
1	NO	Fero		0,000139	0,000139	0,000139
2	NO	Cont	0,000139		0,586155	0,89658
3	SI	Fero	0,000139	0,586155		0,954657
4	SI	Cont	0,000139	0,89658	0,954657	

Tabla 9.7 Resultado del contraste post-hoc.

A la vista de la tabla 9.7 se puede observar, que existen diferencias entre los grupos con sonido y sin sonido tanto en feromona como en no feromona. Pudiendo aceptar la hipótesis de partida, de que los ultrasonidos han afectado a su desarrollo y comportamiento normales.

9.2.2.4 Conclusión Final. Gráfico comparativo en modulación FM.

Para concluir este capítulo, se adjunta la figura 9.1 que puede ayudar a esclarecer bastante mejor, el análisis de comportamiento empleando señales de ultrasonidos en modulación FM.

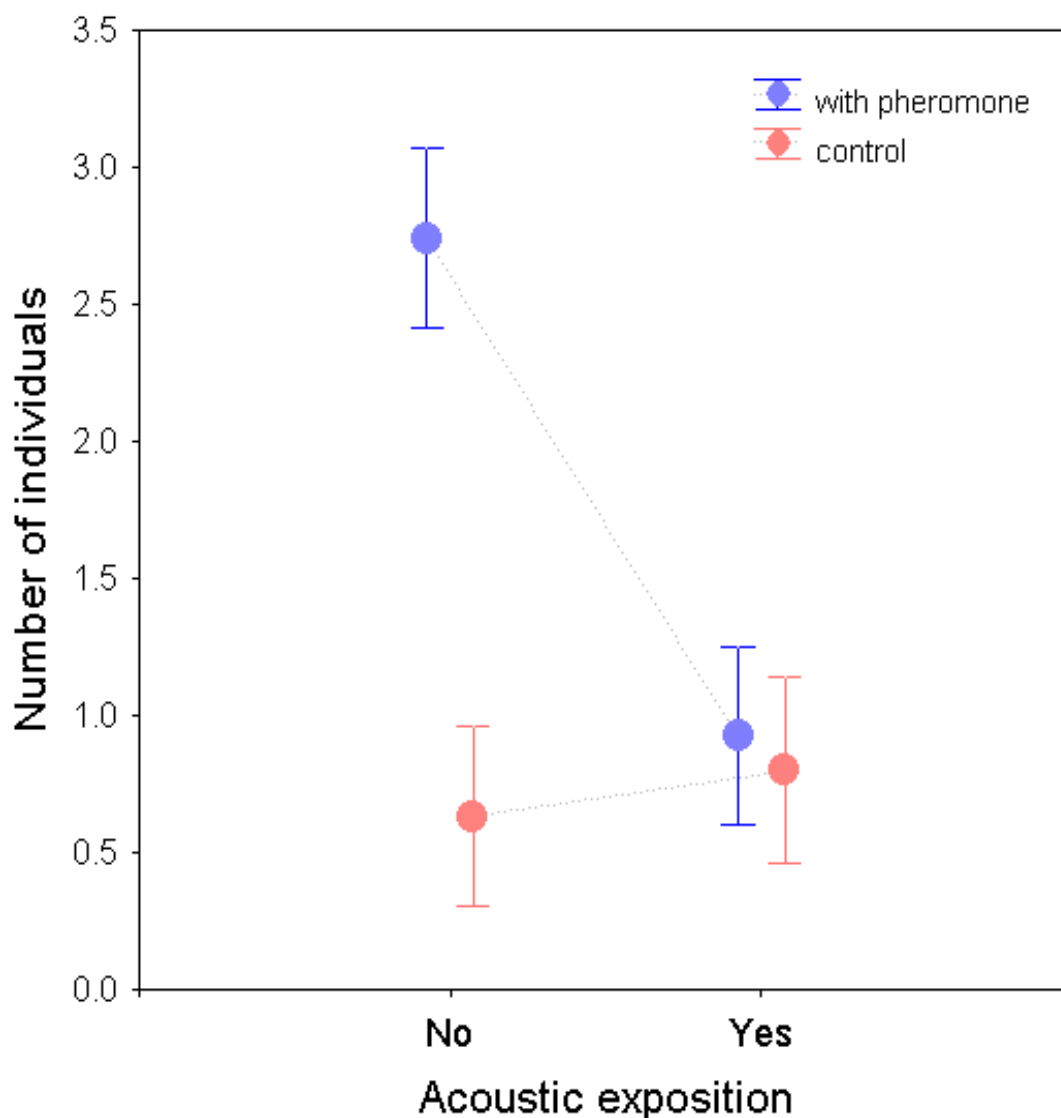


Figura 9.1. Representación gráfica comparativa en modulación FM.

A la vista de esta figura, cuando **no existe exposición acústica**, el número medio de individuos que acuden a la feromona es mayor que sin ella. Es un hecho bastante lógico y evidente, debido a la necesidad puramente biológica que experimentan estos insectos al detectar la feromona.

Cuando existe una **exposición acústica** a esta modulación, se aprecia con bastante rotundidad cómo ha disminuido la media de individuos que acuden a las trampas con feromona y sin ella, a diferencia de cuando no hay exposición acústica. Este hecho reafirma nuestra hipótesis de partida de que existe una perturbación en su comportamiento.

10 CONCLUSIONES

Después de realizar los experimentos y bioensayos citados en capítulos anteriores, hemos llegado a bastantes conclusiones tanto con *Ceratitis Capitata* como *Rhynchophorus Ferrugineus*, ambos objetos de estudio del trabajo.

Basándonos en estudios de electroantenografía de otros Trabajos Fin de Grado realizados, llegamos a la conclusión de que el rango que más perturba la señal del electroantenograma es el rango de ultrasonidos de [20 a 40KHz] usando modulaciones AM y FM.

En *Ceratitis Capitata* o mosca de la fruta se ha realizado un ensayo de fecundidad, fertilidad y mortalidad. Se ha detectado que estos parámetros no se ven afectados por la incidencia de la radiación ultrasónica a las frecuencias previamente dichas. Confirmando su inocuidad para el insecto a estudio.

Gracias, entre otros, al olfactómetro de 4 vías, en el caso de *Rhynchophorus Ferrugineus* o picudo rojo, ha sido posible la realización de esta parte del trabajo. De acuerdo con los resultados, hemos llegado a la conclusión de que el uso continuo de ultrasonidos sobre esta especie ha condicionado su comportamiento de forma significativa.

A la vista de los resultados, se ha obtenido la confirmación de que realmente la aplicación de estas señales junto a los semioquímicos utilizados produce la perturbación de la señal electroantenográfica y, además, experimenta un cambio significativo en su comportamiento, confirmando nuestra hipótesis de partida.

11 BIBLIOGRAFÍA

- [1] http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/mosca_fruta.pdf
- [2] <http://es.slideshare.net/cleiderjamer/monografa-sobre-la-mosca-de-la-fruta>
- [3] <http://es.orkin.com/moscas/moscas-de-la-fruta/los-huevos-de-las-moscas-de-la-fruta/>
- [4] http://www.infoagro.com/documentos/mosca_fruta_parte_ii_.asp
- [5] http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1988_08.pdf
- [6] <http://web2.cba.gov.ar/produccion/sayg/paginas/pag-secundarias/programas/progr-mosca.htm>
- [7] http://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/agricultura/Recomendacion_picudo_rojo.pdf
- [8] CABELLO, T.; MARTÍN, M.M.; URBANEJA, A., 2006. Situación actual del curculiónido rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 1790 (Col.: Dryophthoridae) en España. *Espádice*, 9: 14-17
- [9] <http://www.picudorojocanarias.es/downloads/dossier/Capitulo2.pdf>
- [10] GÓMEZ, S., MUÑOZ, C., FERRY, M., MARTÍNEZ, M.M., 2008. *Bol. San. Veg. Plagas*, 34: 147-149.
- [11] LÓPEZ, J.J., 2013. Feromonas, atrayentes y otros métodos tecnológicos para el control de picudo rojo de las palmeras. *Actas de las III Jornadas Técnicas Internacionales sobre feromonas, atrayentes, trampas y control biológico: herramientas para la gestión integrada*.
- [12] <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12499/tesisUPV3667.pdf>
- [13] <https://semioquimicos.jimdo.com/semioqu%C3%ADmicos-y-clasificaci%C3%B3n/>
- [14] https://www.ecured.cu/Ecolog%C3%ADa_qu%C3%ADmica
- [15] SÁNCHEZ, I., 2005. Orientación olfativa de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean, principales cerambícidos xilófagos de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota*) y alcornoque (*Quercus suber* L.), para la localización de hospedantes.
- [16] Osorio et al., 2006.
- [17] http://digital.csic.es/bitstream/10261/24477/4/Acin_Patricia_4.pdf
- [18] <https://radioslibres.net/article/capitulo-9-como-conecto-los-altavoces/>
- [19] <http://www.avisoft.com/usg/vifa.htm>
- [20] <http://telecomunicacionesunerg.blogspot.com.es/2008/06/modulacin-modulacin-en-doble-banda.html>
- [21] <http://ingeniatic.euitt.upm.es/index.php/tecnologias/item/525-modulaci%C3%B3n-fm>
- [22] <http://www.angelfire.com/al2/Comunicaciones/Sistemas/fm2.html>

- [23] http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/2610/TesisMaestria_GSA.pdf?sequence=
- [24] https://books.google.es/books?id=43lZwoQJzugC&pg=PA276&lpg=PA276&dq=insectos+seleccionados+para+bioensayo&source=bl&ots=8s0sNMy45F&sig=QT_AoQ-nAR2tnPicM4BI_qXn0E4&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjF1Ljbt-DRAhWEvBoKHbJuDP4Q6AEIHDAB#v=onepage&q=insectos%20seleccionados%20para%20bioensayo&f=false
- [25] <https://books.google.es/books?id=NLUVJTK7EIoC&pg=PA148&lpg=PA148&dq=insectos+seleccionados+para+bioensayo&source=bl&ots=eMvdDc-0-3&sig=KgRSVLijzTmRqEi8C0RvU4vmL5l&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjF1Ljbt-DRAhWEvBoKHbJuDP4Q6AEIJTAD#v=onepage&q=insectos%20seleccionados%20para%20bioensayo&f=false>
- [26] <https://ruido.wikispaces.com/RUIDO+EN+COMUNICACIONES>
- [27] <http://www.acusticaweb.com/teoria-acustica/blog/teoracca/absorci-aislamiento-acco.html>
- [28] Nordlund et al. 1981, 18
- [29] Schneider, 1957; Schneider et al., 1977.
- [30] Malavasi et al. 1980, citado por Martínez, 1998.
- [31] Vieyle Cortez, José R Verdú, Antonio Ortiz and Gonzalo Halffter. 2017. Identification and evaluation of semiochemicals for the biological control of the beetle *Omorgus suberosus*(F.) (Coleoptera: Trogidae), a facultative predator of eggs of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). Plos One. Accepted for publication. PONE-D-16-45609R1