



**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
INSTITUTO DE QUÍMICA AVANZADA DE CATALUÑA (IQAC)  
Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona (España)  
Tel. (34) 93 400 6100/120. Fax (34) 93 204 59 04  
e-mail: agpqob@iqac.csic.es

## **CONTROL BIORRACIONAL DE PLAGAS DEL GÉNERO *Coroebus***

### **ENCOMIENDA DE GESTIÓN DIRECCIÓN GENERAL PARA LA BIODIVERSIDAD-CSIC**

### **MEMORIA DE LOS TRABAJOS REALIZADOS EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA AVANZADA DE CATALUÑA (CSIC) (2010)**

#### **INDICE**

- 1. Recolección de insectos de *C. florentinus* y *C. undatus***
- 2. Recogida de volátiles**
  - 2.1 Volátiles de *C. undatus* recogidos con SPME
  - 2.2 Volátiles de *Q. suber* recogidos por el método Dynamic Headspace
- 3. Actividad electrofisiológica de volátiles de *Q. suber* sobre antenas de machos y hembras de *C. florentinus***
  - 3.1 En electroantenograma acoplado a un cromatógrafo de gases (GC-EAD)
  - 3.2 En electroantenograma (EAG)
- 4. Bioensayo de atracción de machos y hembras de *C. florentinus* en olfactómetro de doble elección**
  - 4.1 Volátiles de *Q. suber*, extractos y compuestos sintéticos
  - 4.2 Compuestos encontrados en volátiles de ambos sexos
- 5. Pruebas de campo para capturar *C. undatus***
  - (a) Compuestos encontrados en volátiles de machos y hembras de *C. florentinus*
  - (b) Volátiles encontrados en la planta huésped *Q. suber*

5.1 Evaporación de etanol a través de diferentes dispensadores en túnel de viento

5.2 Tipos de trampas

5.3 Resultados en Cataluña

5.3.1 Influencia del tipo de trampa

5.3.2 Influencia del tipo de atrayentes

5.4 Resultados en Andalucía

## 6. Conclusiones

### 1. Recolección de insectos de *C. florentinus* y *C. undatus*

a) *C. florentinus*. Como en años anteriores, se han efectuado varios viajes al campo a partir de finales de mayo en busca de árboles de *Quercus suber* atacados por *C. florentinus* para obtener insectos adultos. En Catalunya se han detectado árboles afectados en la zona de Llagostera y Romanyà (comarca del Gironés) y se han cortado un total de 624 ramas, las cuales se han mantenido a diferentes condiciones de temperatura para la emergencia de los adultos. Además, se han cortado 306 ramas de *Q. ilex* en Valencia (véase Tabla 1.). Una parte de las ramas afectadas y recogidas en el campo se han colocado directamente a temperatura ambiente en cajas en el laboratorio del CSIC y del Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya (DMAH) (Foto 1.). El resto de las ramas recolectadas se han mantenido como en años anteriores en Tossa del Mar en nevera a 10°C durante 4 semanas para frenar el desarrollo de los insectos y de esa manera alargar la emergencia de los adultos. De las 930 ramas cortadas en las dos CCAA han emergido un total de 461 adultos lo que representa un 50% de emergencias (Tabla 1), concordante con los resultados obtenidos en 2007, 2008 y 2009. También se ha confirmado el hecho de que a mayor tiempo de conservación en nevera le corresponde un menor porcentaje de adultos emergidos.

**Tabla 1.** Emergencia de adultos de *C. florentinus* en el laboratorio

Origen/destino	Guarda	Nº ramas	M	H	Total	%
Cataluña/CSIC	Ambiente	207	78	68	146 <sup>a</sup>	<b>71,6</b>
Cataluña/CSIC	4 sem. Nevera	242	73	62	135 <sup>b</sup>	<b>55,8</b>
Cataluña/DMAH	Ambiente	175	-	-	108	<b>61,7</b>
Valencia/DMAH	Ambiente	306	-	-	72	<b>23,5</b>

<sup>a</sup>Emergencia en el laboratorio (CSIC) (08.06 – 08.07.2010)

<sup>b</sup>Emergencia en el laboratorio (CSIC) (09.07 – 30.07.2010)



+-+



Foto 1. Cajas de emergencia en el laboratorio

Foto 2. Trampas tela para capturar *C. undatus*

b) *C. undatus*. En Cataluña y Extremadura se han colocado trampas de tela blanca (mosquitera) alrededor de troncos de *Q. suber* para intentar capturar adultos vivos de *C. undatus* en el momento de la emergencia (Foto 2). Una parte de los insectos capturados en Extremadura y Cataluña fue enviada al CSIC para la realización de ensayos biológicos y la otra a la Universidad de Cádiz (Israel Sánchez) para reanudar los ensayos de cría. Entre los 12 individuos enviados desde Extremadura al CSIC se encontraron 5 machos y 7 hembras mientras los insectos de Cataluña han sido 4 machos y 7 hembras (Tabla 2).

**Tabla 2.** Recepción de adultos de *C. undatus* en el IQAC (CSIC)

Origen	Fecha	Machos	Hembras	Total
Extremadura	3.06. – 16.06.2010	5	7	<b>12</b>
Cataluña	25.06. – 30.06.2010	4	7	<b>11</b>

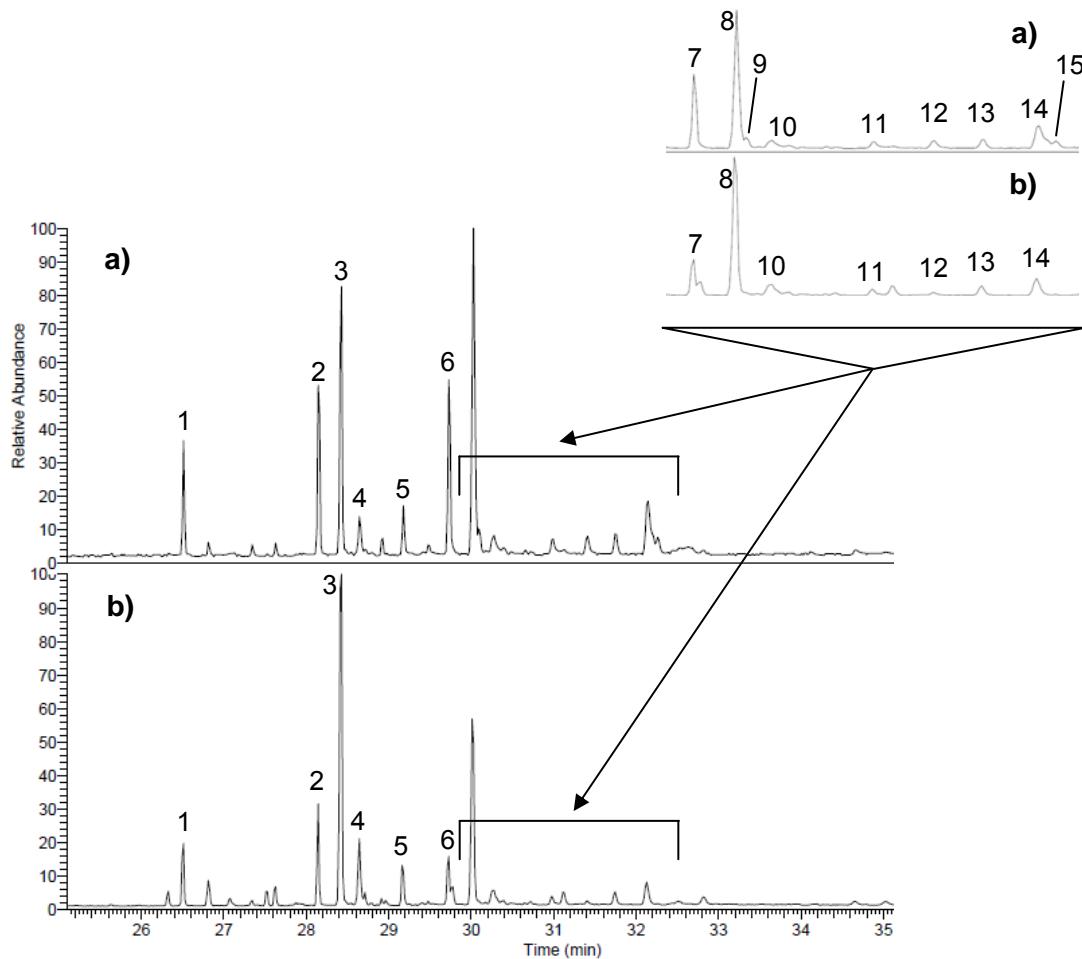
## 2. Recogida de volátiles

Se ha llevado a cabo la recogida de volátiles de insectos vivos de *C. undatus* y de ramas de su planta huésped *Quercus suber* por dos métodos diferentes. El método utilizado para recoger volátiles de *C. undatus* es por microextracción en fase sólida (solid phase microextraction, **SPME**) con tres tipos de fibras de diferente polaridad, que absorben las sustancias volátiles que emiten los insectos colocados en el interior de un vial conteniendo un papel de filtro para un mejor acomodo de los mismos. Los insectos permanecieron en el vial durante 6 h y se utilizaron 3 machos y 3 hembras por separado. Para la recogida de volátiles de *Q. suber* se aplicó el denominado “**Dynamic Headspace Method**”, en el que se hace pasar una corriente de aire purificado [500 mL/min] durante 24h por ramas con hojas de *Q. suber* colocadas en el interior de un Erlenmeyer de 2 L (Foto 3). Los volátiles se recogieron en cartuchos de vidrio conteniendo 30 mg del absorbente Super Q. Los volátiles

se extrajeron con 200 µL de diclorometano (DCM). Las fibras y los extractos (1 µL) se inyectan en cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y se comparan los espectros de masas con los descritos en la bibliografía, así como los tiempos de retención (RI ó índices de Kovats) en comparación con los de muestras auténticas.

## 2.1 Volátiles de *C. undatus* recogidos con SPME

Para la recogida de volátiles con SPME se han utilizado fibras de sílice activada, Carbowax y Carboxen. Tras el análisis por CG-EM se observan diferencias cuantitativas entre los 15 compuestos detectados (Fig. 1). Además se han destacado 2 compuestos sólo presentes en hembras (9 y 15) y no en machos. Se trata de hidrocarburos ramificados aún para identificar. La gran mayoría de los compuestos identificados son hidrocarburos de cadena larga saturados lineales o ramificados y monoinsaturados (un doble enlace). Es probable que los hidrocarburos provengan de la cutícula del cuerpo del insecto y no de volátiles del mismo, toda vez que estos hidrocarburos no son demasiados volátiles. La composición de los volátiles es muy similar a la de los volátiles y extractos de cuerpo entero de *C. florentinus* (véase informes 2008 y 2009).



**Fig. 1.** Cromatogramas de volátiles de (a) hembras y (b) machos adultos de *C. undatus* recogidos por SPME. Compuestos identificados 1-15.

## 2.2 Volátiles de *Q. suber* recogidos por el método Dynamic Headspace

Se han colocado 3 ramas [ $36,5 \pm 2,1$  g] de *Q. suber* en 3 erlenmeyers diferentes para la recogida de volátiles durante 24h. Los 33 compuestos identificados se muestran en la tabla 3. Los índices de retención (RI) en una columna DB-5ms se han calculado según Van den Dool y Kratz (J. Chromat. 11:463, 1963). Entre los compuestos se encuentran típicos volátiles de árboles y plantas, la mayoría denominados *green leaf volatiles* (GLVs), que son alcoholes, aldehídos y esteres de 6 a 10 átomos de carbono. Además se han detectado mono-, homo- y sesquiterpenos. Para la cuantificación de los compuestos identificados se añadió a los extractos 50 ng de acetato de dodecilo como estándar interno (EI) y se relacionan las áreas de los compuestos con el área del EI en CG-EM (Fig. 2.). Los GLVs de 6 carbonos, con más de 20 µg por 36,5 g de peso fresco de ramas de *Q. suber*, representan la mayor parte de los compuestos volátiles obtenidos. Además, destaca la presencia del homoterpeno (3E)-4,7-dimethyl-1,3,7-nonatriene con 3 µg por 36,5 g de peso fresco, un compuesto generalmente inducido en plantas después de un ataque de herbívoros y muy atractivo para muchos insectos.



Foto 3. Recogida de volátiles de *Q. suber*

## 3. Actividad electrofisiológica de volátiles de *Q. suber* sobre antenas de machos y hembras de *C. florentinus*

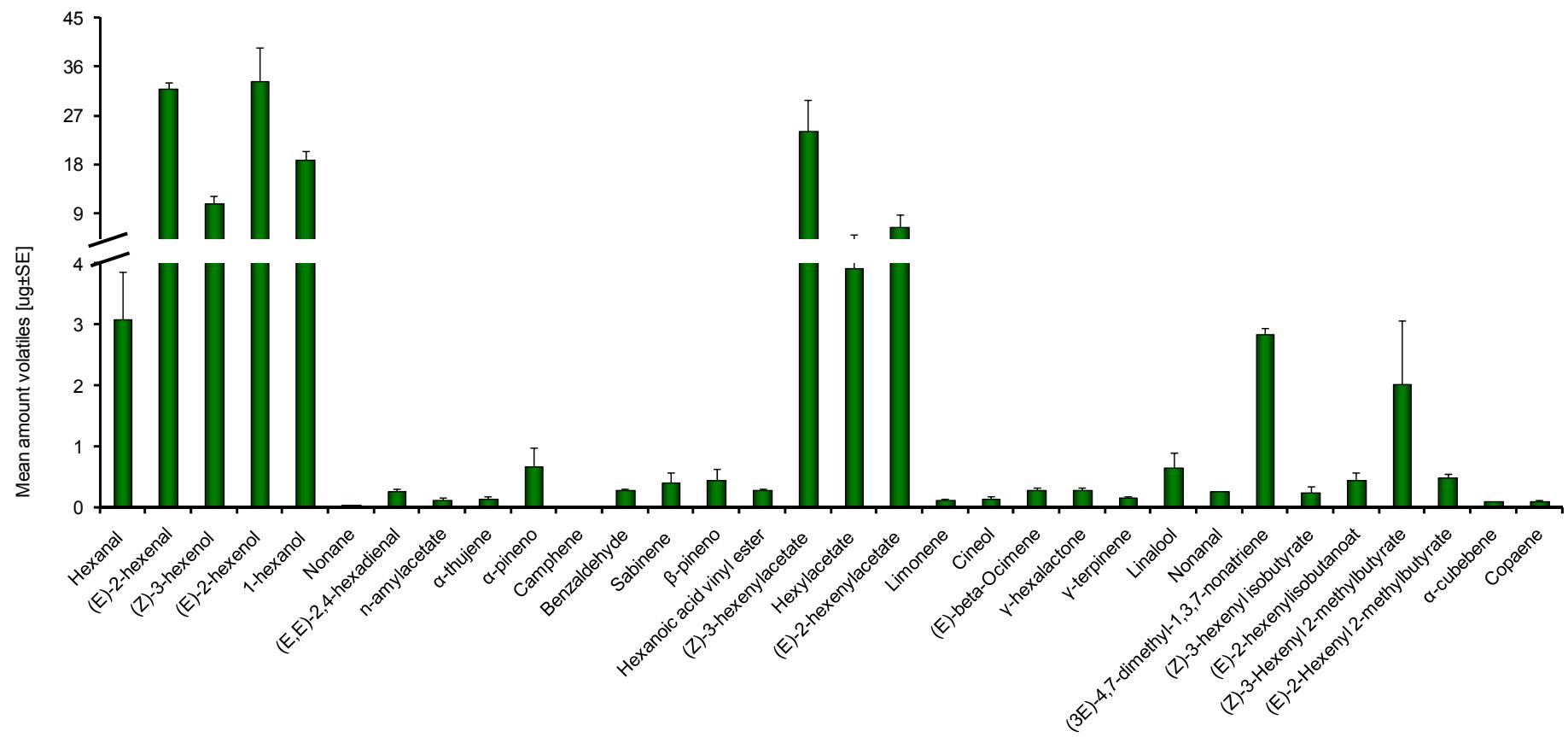
### 3.1 En electroantenograma acoplado a un cromatógrafo de gases (GC-EAD)

Mediante GC-EAD se han investigado los compuestos individuales que forman parte de los volátiles de *Q. suber* y que desencadenan una determinada respuesta electrofisiológica sobre la antena de machos y hembras de *C. florentinus*. Se han confirmado los resultados de la campaña 2009 en que los compuestos **3**, **5**, **6**, **7** y **8** provocan respuestas electrofisiológicas en antenas de machos y hembras (Fig. 3). Los compuestos son el (E)-2-hexenal (**3**), (E)-2-hexenol (**5**), 1-hexanol (**6**), acetato de (Z)-3-hexenilo (**7**) y el acetato de hexilo (**8**), típicos “green leaf volatiles”, compuestos ubícuos de plantas con actividad en la mayoría de los insectos.

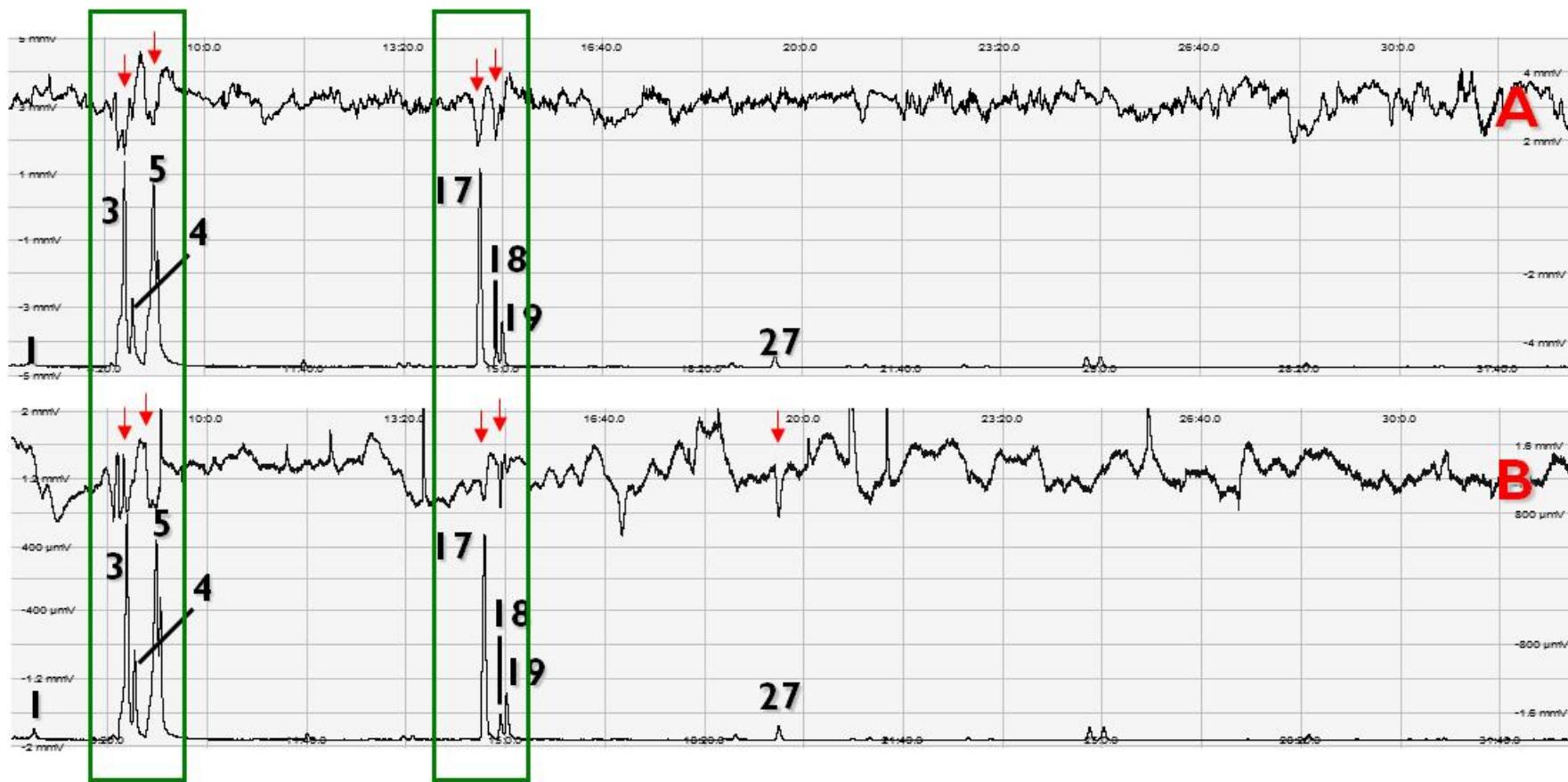
**Tabla 3.** Masa molecular, pico base e índices de retención de los compuestos identificados en volátiles de *Q. suber*

No.	Compuesto	$M_r$	BP	Indice de retención
<b>Green Leaf Volatiles (GLVs)</b>				
<i>Aldehidos</i>				
<b>1</b>	hexanal	100	41	813
<b>2</b>	(Z)-3-hexenal	98	41	849
<b>3</b>	(E)-2-hexenal	98	41	856
<i>Alcoholes</i>				
<b>4</b>	(Z)-3-hexenol	100	67	859
<b>5</b>	(E)-2-hexenol	100	57	870
<b>6</b>	1-hexanol	102	56	872
<i>Esteres</i>				
<b>7</b>	(Z)-3-hexenyl acetate	142	43	1009
<b>8</b>	hexyl acetate	144	43	1014
<b>9</b>	(E)-2-hexenyl acetate	142	43	1016
<b>10</b>	(Z)-3-hexenyl isobutyrate	170	67	1143
<b>11</b>	(E)-2-hexenyl isobutanoat	170	71	1150
<b>12</b>	(Z)-3-hexenyl 2-methylbutyrate	184	67	1232
<b>13</b>	(E)-2-hexenyl 2-methylbutyrate	184	57	1238
<b>Monoterpenos (C10)</b>				
<b>14</b>	$\alpha$ -thujene	136	93	925
<b>15</b>	$\alpha$ -pineno	136	93	932
<b>16</b>	camphene	136	93	946
<b>17</b>	sabinene	136	93	972
<b>18</b>	$\beta$ -pineno	136	93	975
<b>19</b>	limonene	136	68	1028
<b>20</b>	cineol	154	81	1030
<b>21</b>	(E)- $\beta$ -ocimene	136	93	1047
<b>22</b>	$\gamma$ -terpinene	136	93	1057
<b>23</b>	linalool	154	71	1100
<b>Homoterpenos (C11)</b>				
<b>24</b>	(3E)-4,7-dimethyl-1,3,7-nonatriene	150	69	1117
<b>Sesquiterpenos (C15)</b>				
<b>25</b>	$\alpha$ -cubebene	204	105	1352
<b>26</b>	copaene	204	161	1377
<b>Otros</b>				
<b>27</b>	nonane	128	43	900
<b>28</b>	(E,E)-2,4-hexadienal	96	81	909
<b>29</b>	n-amyl acetate	130	43	912
<b>30</b>	benzaldehyde	106	77	959
<b>31</b>	hexanoic acid vinyl ester	142	60	983
<b>32</b>	$\gamma$ -hexalactone	114	85	1053
<b>33</b>	nonanal	142	41	1104

$M_r$ , relative molecular mass; BP (m/z), base peak of the mass spectrum.



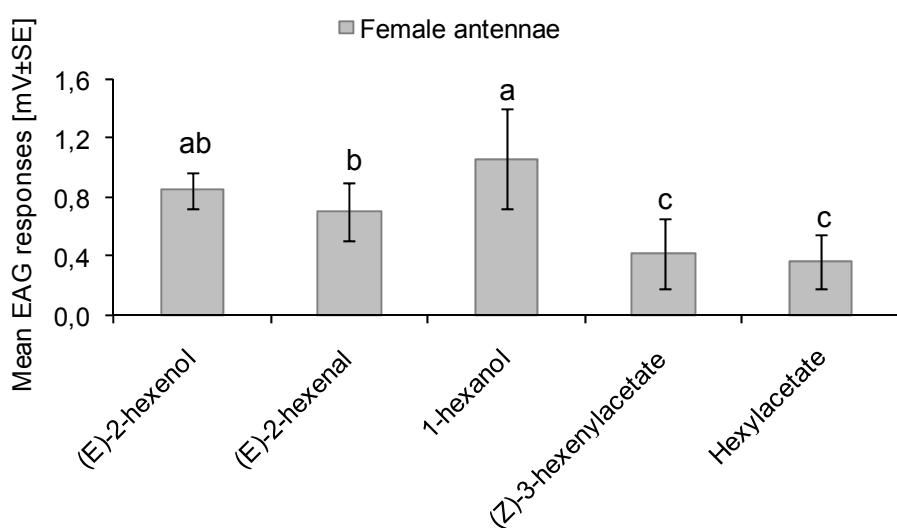
**Fig. 2.** Cantidad media obtenida [ $\mu\text{g} \pm \text{SE}/36,6 \text{ g peso fresco}$ ] de los 33 compuestos detectados e identificados en volátiles de ramas de *Q. suber*.



**Fig. 3.** Respuesta en GC-EAD de antenas de machos (**A**) y hembras (**B**) de *C. florentinus* a volátiles de *Q. suber* (**3**: (*E*)-2-hexenal; **5**: (*E*)-2-hexenol; **6**: 1-hexanol; **7**: acetato de (*Z*)-3-hexenilo; **8**: acetato de hexilo).

### 3.2 En electroantenograma (EAG)

En electroantenograma y sobre 11 antenas de hembras de *C. florentinus* se ha comprobado la actividad de 5 µg de los GLVs identificados (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexenol, 1-hexanol, acetato de (*Z*)-3-hexenilo y acetato de hexilo. Los resultados indican que todos los compuestos han provocado respuestas en EAG (Fig. 4) siendo el 1-hexanol el que genera la mayor respuesta (>1 mV), que es significativa respecto al aldehído y los dos acetatos. Además, los acetatos provocaron las menores respuestas (<0,5 mV) significativas entre todos los compuestos ensayados.



**Fig. 4.** Promedio de respuesta en EAG ( $\pm$  SE) de antenas de hembras (N=11) a diferentes GLVs. Barras con letras diferentes representan diferencias significativas. (DMS post-hoc test,  $P \leq 0.05$ ).

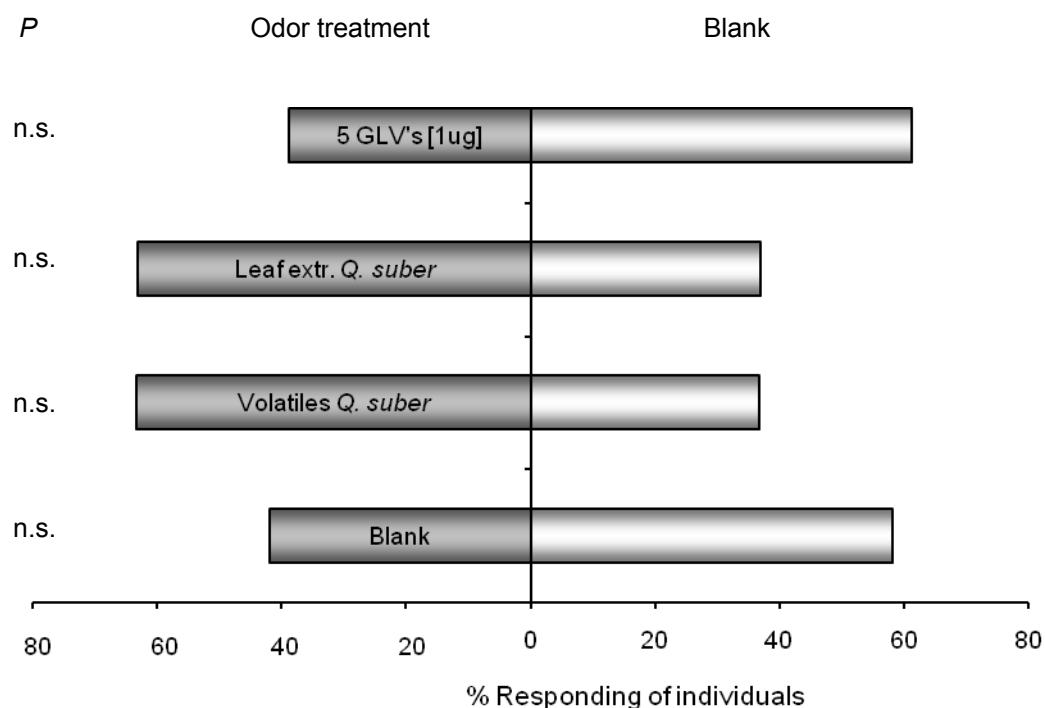
### 4. Bioensayo de atracción de machos y hembras *C. florentinus* en olfactómetro de doble elección

Los bioensayos de comportamiento se han llevado a cabo sobre un olfactómetro de vidrio en forma de Y de doble elección (Foto 4), siguiendo un protocolo ya comentado en memorias anteriores. Para los ensayos de este año se han utilizado 30 insectos por sexo y tratamiento y se ha estudiado la atracción de machos y hembras hacia volátiles, extracto de hojas y diferentes cantidades de compuestos sintéticos de la planta huésped *Q. suber*. El método estadístico utilizado para determinar diferencias significativas en la elección de los insectos entre ambos brazos ha sido el de  $\chi^2$  para  $P \leq 0,05$ . Los ensayos en blanco han

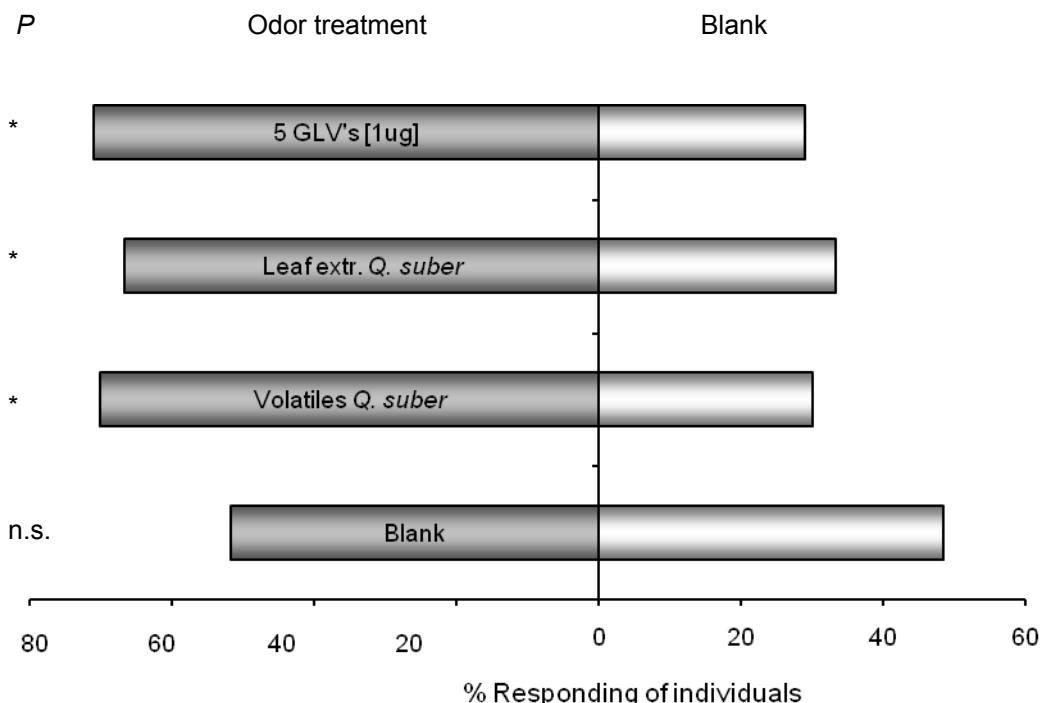
demostrado que la elección de los insectos no estaba influida por factores externos, como preferencia por uno de los dos brazos, incidencia de la luz, etc. (Figs. 5, 6).

#### 4.1 Volátiles de *Q. suber*, extractos y compuestos sintéticos

Los volátiles y extracto de hojas de *Q. suber* y la mezcla de los 5 compuestos sintéticos (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexenol, 1-hexanol, acetato de (*Z*)-3-hexenilo y acetato de hexilo (1 µg), que se mostraron activos en EAG (apartado 3.2), no inducen ningún tipo de efecto sobre machos de *C. florentinus* (Fig. 5). Sin embargo, las hembras se dirigen de manera significativa hacia todos los estímulos de la planta huésped ofrecidos ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 6). Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que las hembras tienen una mayor necesidad que los machos de alimentarse y encontrar un árbol adecuado para la puesta y así garantizar el alimento de sus crías.



**Fig. 5.** Respuesta (%) de machos de *C. florentinus* en un olfactómetro de doble elección (N=30) a volátiles del árbol huésped, extracto de hojas y una mezcla de 5 GLVs sintéticos [1 ug]. A cada experimento se aplicó el método estadístico  $\chi^2$  (n.s. = no significativo).

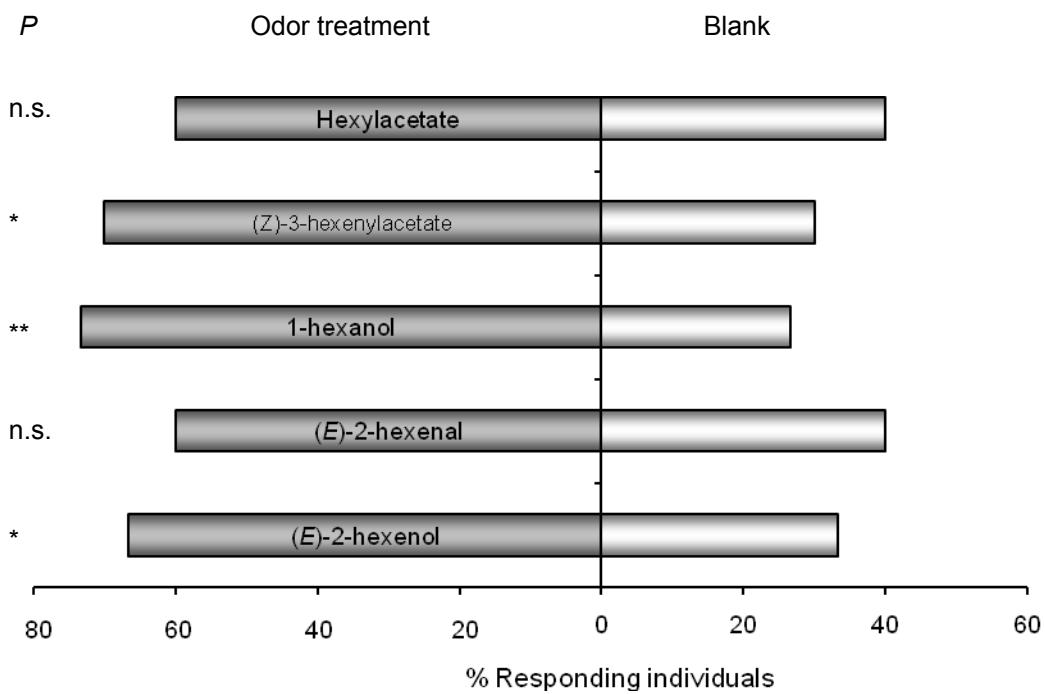


**Fig. 6.** Respuesta (%) de hembras de *C. florentinus* en un olfactómetro de doble elección (N=30) a volátiles del árbol huésped, extracto de hojas y una mezcla de 5 GLVs sintéticos [1 ug]. A cada experimento se aplicó el método estadístico  $\chi^2$  (\* $P < 0.05$ , n.s. = no significativo).

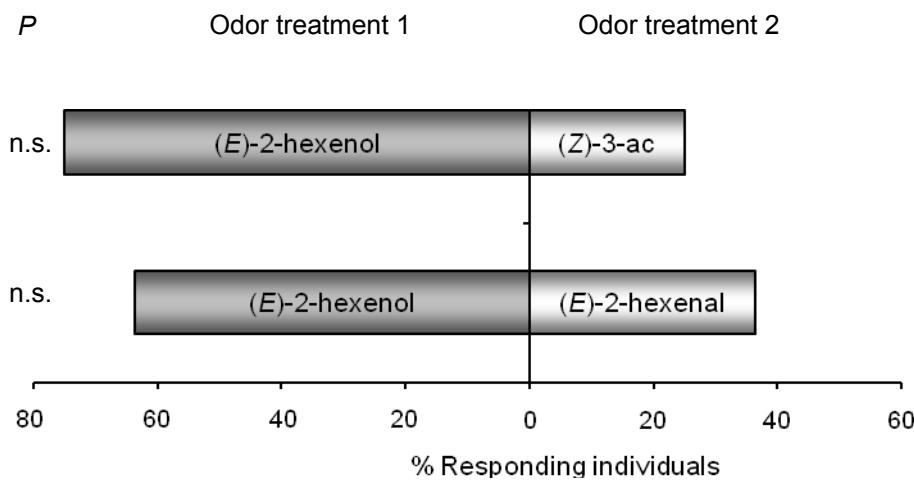
Dados los resultados obtenidos, se ha determinado el efecto sobre las hembras de 1  $\mu$ g de los 5 compuestos anteriores por separado. En todos los casos las hembras prefieren el brazo del estímulo frente al control (Fig. 7) aunque las respuestas al acetato saturado y al  $\epsilon$ -2-hexenal no son significativas. Las hembras demuestran una mayor respuesta hacia el alcohol saturado ( $P < 0,02$ ) conforme con la respuesta electrofisiológica en EAG (apartado 3.2). Adicionalmente, se ha comparado la atracción entre (*E*)-2-hexenol y acetato de (*Z*)-3-hexenilo y entre (*E*)-2-hexenal y (*E*)-2-hexenol no observándose ninguna preferencia significativa entre ellos (Fig. 8).



**Foto 4.** Olfactómetro de vidrio en forma de Y de doble elección



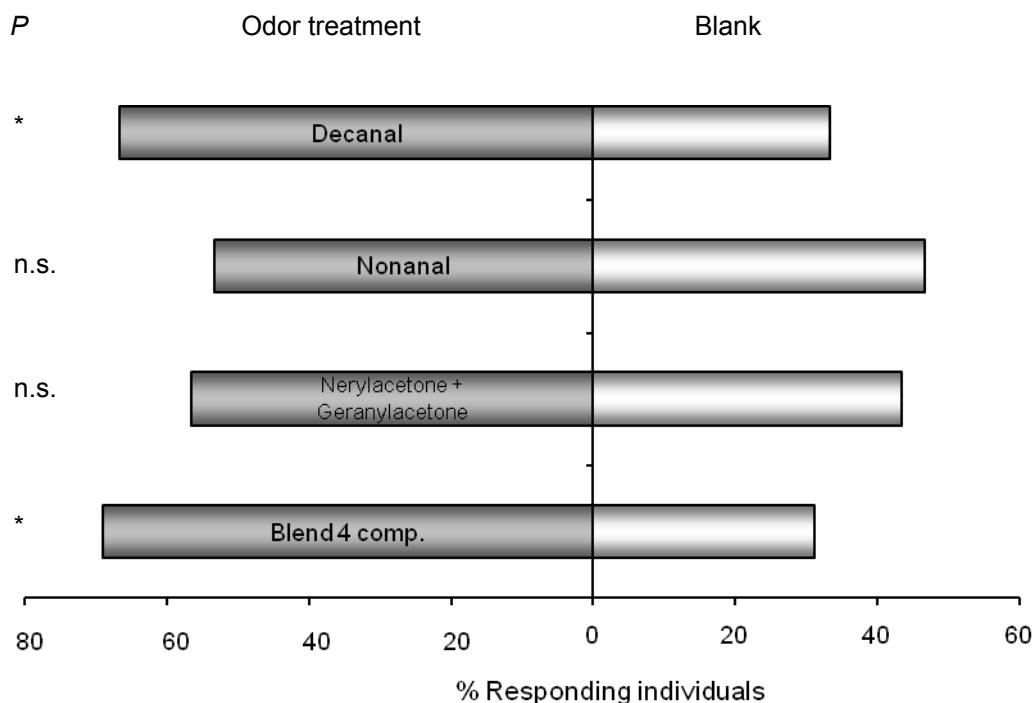
**Fig. 7.** Respuesta (%) de hembras de *C. florentinus* en un olfactómetro de doble elección (N=30) a 5 GLVs sintéticos [1 ug] por separado. A cada experimento se aplicó el método estadístico chi-cuadrado (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ , n.s. = no significativo).



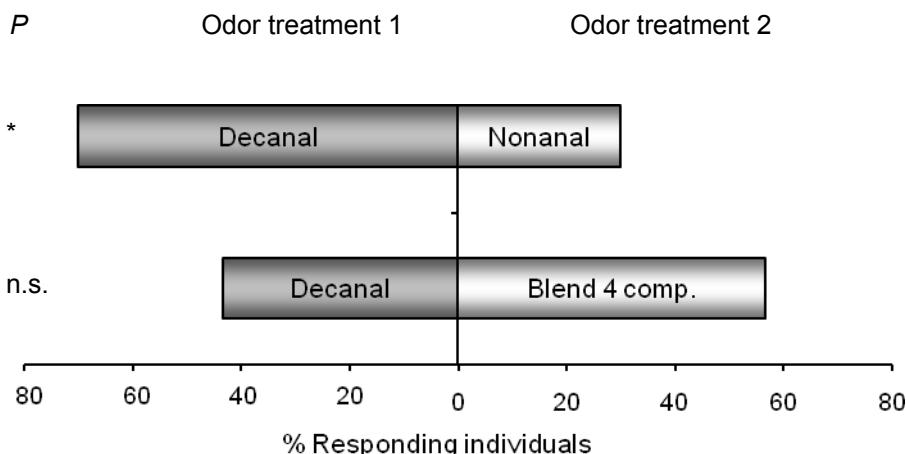
**Fig. 8.** Respuesta (%) de hembras de *C. florentinus* en un olfactómetro de doble elección (N=30) a 3 GLVs sintéticos [1 ug]. A cada experimento se aplicó el método estadístico chi-cuadrado (n.s. = no significativo).

#### 4.2 Compuestos encontrados en volátiles de ambos sexos

En la campaña 2009 se ensayó el efecto atrayente de una mezcla de compuestos sintéticos (geranilacetona, nerilacetona, nonanal y decanal) encontrados en volátiles de machos y hembras de *C. florentinus* y de los compuestos por separado. En hembras se probaron cantidades de 100 ng y 1 µg mientras en machos sólo se aplicó la cantidad mayor. Este año se ha repetido el experimento sobre machos con 100 ng de la mezcla y de los compuestos por separado. Al igual que con 1 µg, los insectos prefieren significativamente la mezcla de los compuestos y el decanal (Fig. 9). Teniendo en cuenta que en EAG se había observado la mayor respuesta de antenas de machos ( $> 1,5\text{mV}$ ) hacia 100 ng del decanal (véase informe 2009), este año se ha estudiado la respuesta relativa de machos a decanal frente a nonanal y a decanal frente a la mezcla de los 4 compuestos. Los machos prefieren claramente el decanal sobre el nonanal y no muestran preferencia entre decanal y la mezcla de los productos (Fig. 10).



**Fig. 9.** Respuesta (%) de machos de *C. florentinus* en un olfactómetro de doble elección (N=30) a compuestos sintéticos [100 ng] (Blend cuatro comp. = nerilacetona, geranilacetona, nonanal y decanal). A cada experimento se aplicó el método estadístico chi-cuadrado (\* $P \leq 0.05$ , n.s. = no significativo).



**Fig. 10.** Respuesta (%) de hembras de *C. florentinus* en un olfactómetro de doble elección (N=30) a nonanal frente decanal y a decanal frente a la mezcla de 4 compuestos sintéticos [100 ng] encontrados en volátiles de ambos sexos. A cada experimento se aplicó el método estadístico chi-cuadrado (n.s. = no significativo).

## 5. Pruebas de campo para capturar *C. undatus*

El protocolo detallado de las pruebas de campo en Cataluña para la captura de *C. undatus* se presenta en el informe de J. M<sup>a</sup> Riba. En las zonas de (A) Arbúcies (Mollfulleda) y (B) Santa Coloma de Farners (Can Boix) se ha probado el efecto de diferentes tipos de trampas púrpura y de diferentes atrayentes. Los dispensadores utilizados han sido tubos blancos semipermeables C-Flex<sup>®</sup>, (Masterflex<sup>®</sup> Cole-Parmer Inst. Co. USA) cortados de 55 cm de longitud, diámetro interior: 3,1mm a los que se añadieron diferentes cantidades de los atrayentes. A efectos comparativos se añadió el atrayente comercial Pherotech descrito para capturar insectos perforadores. Como control se ha utilizado etanol.

### (a) Compuestos encontrados en volátiles de machos y de hembras de *C. florentinus*

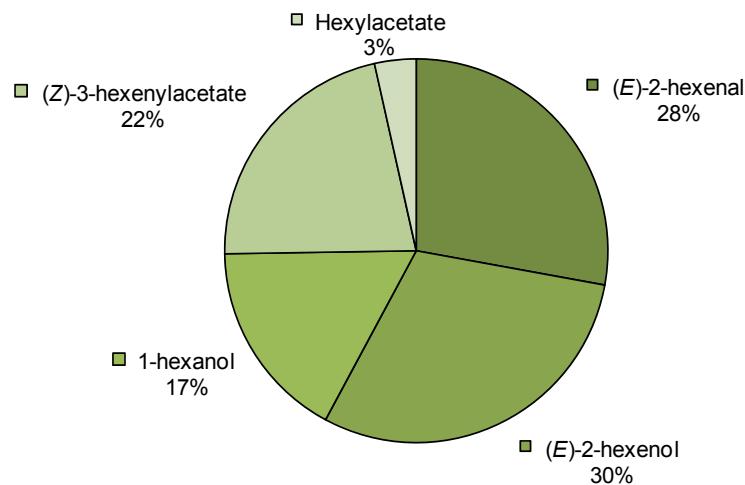
Se preparó una mezcla de los 4 compuestos encontrados en los volátiles de ambos性os de *C. florentinus* y activos sobre machos y hembras en ensayos electrofisiológicos (EAG y GC-EAD) y de comportamiento (olfactómetro de doble elección). Se añadieron 10 mg de geranilacetona, nerilacetona, nonanal y decanal disueltos en 2,4 mL de etanol a cada uno de los dispensadores.

### (b) Volátiles encontrados en la planta huésped *Q. suber*

Se ha calculado la proporción de los volátiles encontrados en ramas de *Q. suber* y que son atrayentes de hembras de *C. florentinus* en EAG (apartado 3) y en el olfactómetro de doble elección (apartado 4.1). La proporción obtenida es de (E)-2-hexenol: (E)-2-hexenal: acetato de (Z)-3-hexenilo: 1-hexanol: acetato de hexilo 30:28:22:17:3. De acuerdo con ella, se ha preparado la siguiente mezcla de los 5 compuestos en etanol de manera que el volumen total fuese de 2,5 mL.

- (E)-2-hexenol (100 mg)
- (E)-2-hexenal (93 mg)
- 1-hexanol (51 mg)
- acetato de (Z)-3-hexenilo (66 mg)
- acetato de hexilo (11 mg)

La mezcla así preparada se añadió a cada dispensador.

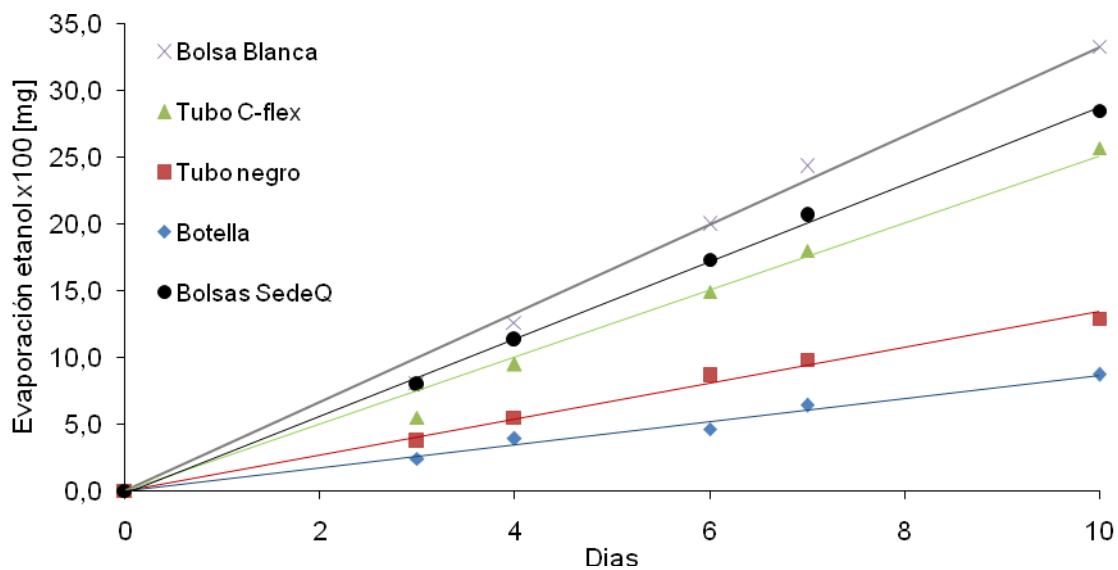


**Fig. 11.** Proporción de 5 GLVs en la emisión de volátiles de *Q. suber*

### 5.1 Evaporación de etanol a través de diferentes dispensadores en túnel de viento

Se han realizado pruebas de evaporación de 2,5 mL de etanol en 5 dispensadores diferentes: (1) bolsa blanca, (2) tubo C-flex, (3) tubo negro utilizado por Forestal Catalana como dispensador para capturar otros tipos de insectos, (4) “botella” semipermeable transparente (frasco de 30 mL Azlon, Barloworld Sci. Ltd Stone, UK) (5) bolsas SEDQ en un túnel de viento para seleccionar el dispensador adecuado para las pruebas de campo. Los dispensadores “bolsas SEDQ” fueron preparados en la propia empresa. Durante 10 días se pasó una corriente de aire

continua de 20 cm/s sobre los dispensadores y se determinó la pérdida de peso de los mismos cada 2 días. Los resultados están resumidos en la figura 12 y se seleccionó el tubo C-flex como el más conveniente para las pruebas de campo.



**Fig. 12.** Evaporación de etanol en diferentes dispensadores durante 10 días en túnel de viento.

## 5.2 Tipos de trampas

Se ha probado el efecto de 3 tipos de trampas de color púrpura: (a) Lindgren, (b) Prisma y (c) Lámina (Fotos 5-7). En la zona de Arbúcies (A) se colocaron 8 trampas de cada tipo con diferentes atrayentes mientras en la zona de Santa Coloma (B) se dispusieron 12 trampas Lindgren y 12 Prisma. Los dispensadores con los atrayentes fueron colocados en el interior de las trampas Lindgren y Prisma o en la cara exterior (trampa Lámina) y para atrapar a los insectos se engomaron las trampas Prisma y Lámina. Las trampas Lindgren contenían Vapona. Las revisiones se llevaron a cabo cada semana. Para más detalles sobre cómo se realizaron las pruebas consultar el informe de J.M. Riba.



**Foto 5.** Trampa Lindgren



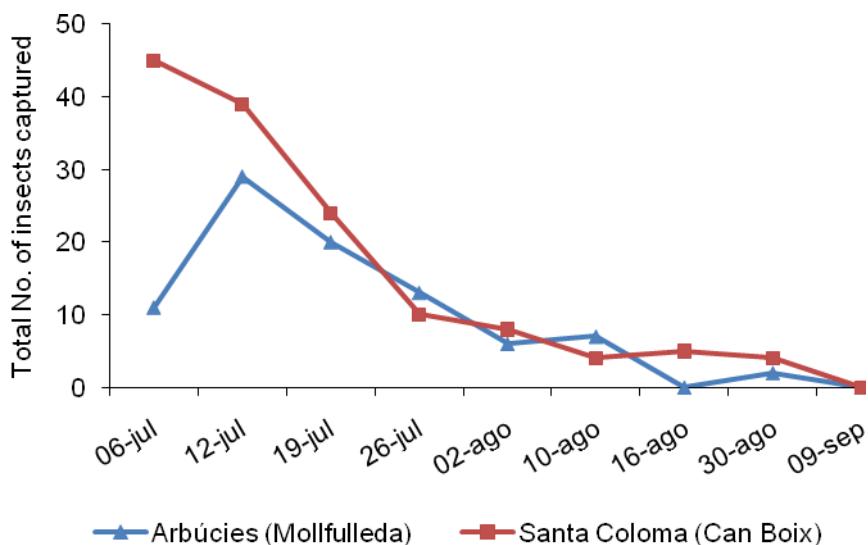
**Foto 6.** Trampa Prisma



**Foto 7.** Trampa Lámina

### 5.3 Resultados en Cataluña

Durante 8 semanas se ha capturado un total de 88 individuos de *C. undatus* en la zona A y 139 en la zona B y en todos los casos *se trata únicamente de hembras*. Las curvas de vuelo en las dos zonas aparecen desplazadas una respecto a otra y se observa que el máximo número de insectos fueron atrapados el 6 de julio (primera revisión) en la zona B y una semana después en la zona A (Fig. 13.). Los resultados en la zona B indican que la emergencia de insectos empieza significativamente antes por lo cual sería conveniente en la próxima campaña empezar con el trámpeo 2-3 semanas antes. A partir de septiembre no se llegó a capturar ningún individuo.

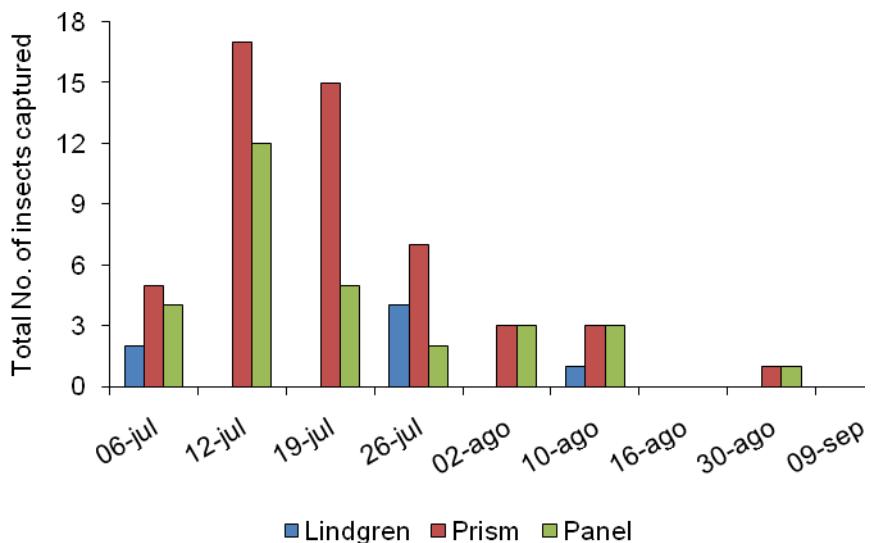


**Fig. 13.** Curvas de las capturas totales de *C. undatus* en las dos zonas A y B (2010)

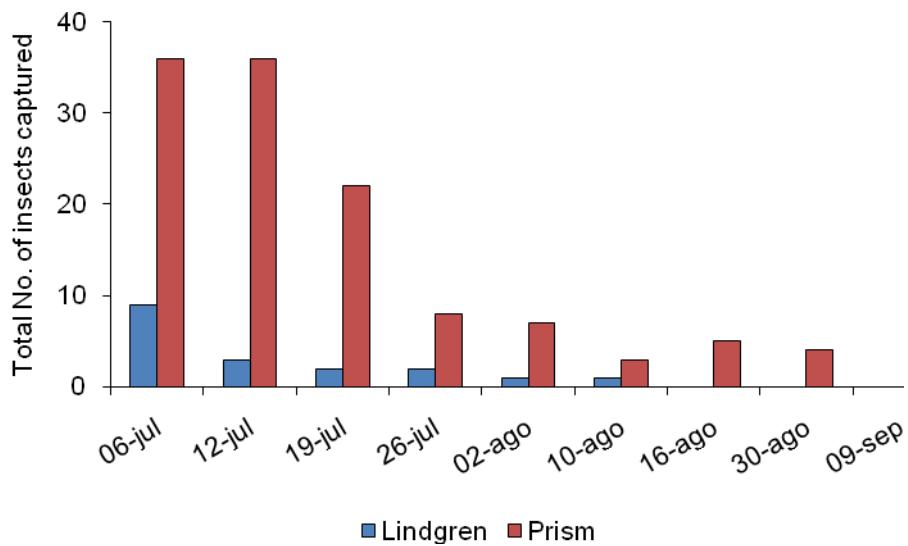
#### 5.3.1 Influencia del tipo de trampa

En la última semana de junio se colocaron 24 trampas (8 de cada tipo) en la zona de Arbúcies cargadas con el atrayente comercial Pherotech (12) o con sólo etanol como control (12). En todas las revisiones se han capturado más insectos en las trampas Prisma y Lámina que en las trampas Lindgren (Fig. 14.), particularmente durante las 4 primeras semanas con las trampas Prisma. Esto se hace especialmente evidente en la zona de Santa Coloma en la que se aplicaron dispensadores conteniendo la mezcla de 4 compuestos del CSIC (8), la mezcla de 5 GLVs (8) y etanol como control (8). Durante los 2 meses de trámpeo en cada

revisión se han encontrado significativamente más insectos en todas las trampas Prisma que en las trampas Lindgren (Fig. 15.).



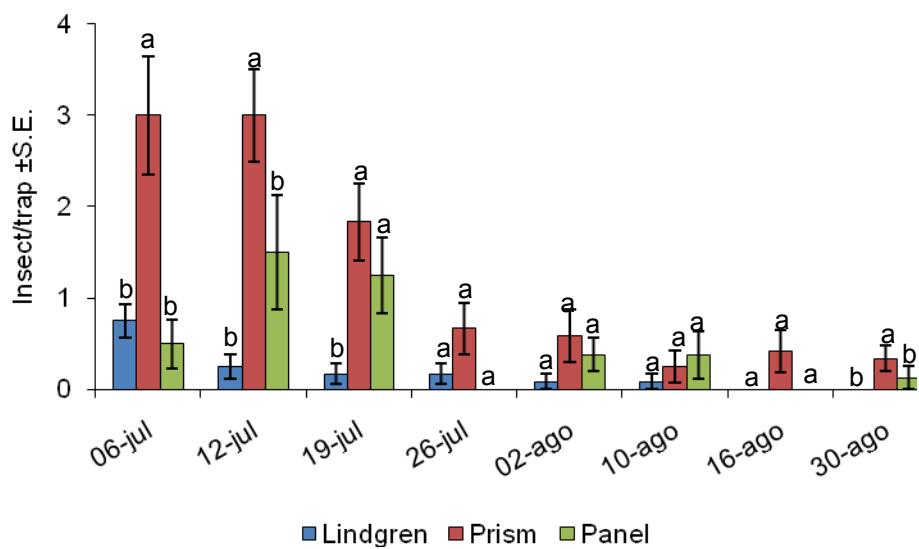
**Fig. 14.** Capturas totales de *C. undatus* por día de revisión con trampas Lindgren, Prisma y Lámina (Panel) en la zona de Arbúcies.



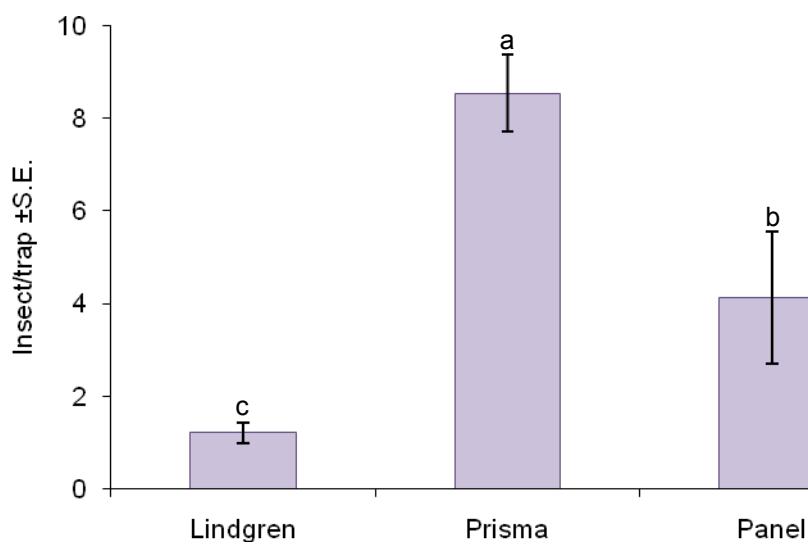
**Fig. 15.** Capturas totales de *C. undatus* por día de revisión con trampas Lindgren y Prisma en la zona de Santa Coloma de Farners.

Para los análisis estadísticos se han utilizado los datos de capturas en las dos zonas calculando el promedio de insectos capturados por trampa. Se aplicó la ANOVA de una vía y el DMS *post-hoc* test para ver diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

En las revisiones del 6 y 12 de julio y 30 de agosto se capturaron significativamente más insectos por trampa con las trampas Prisma que con los otros dos tipos de trampas (Fig. 16). En las otras revisiones se observa una clara preferencia hacia las trampas Prisma y Panel aunque las diferencias no son significativas. En la Figura 17 están visualizadas los promedios de capturas totales de insectos por trampa durante todo el tiempo del ensayo. Se demuestra un clara diferencia significativa entre los 3 tipos de trampa con el siguiente orden de capturas: Prisma > Lámina > Lindgren.



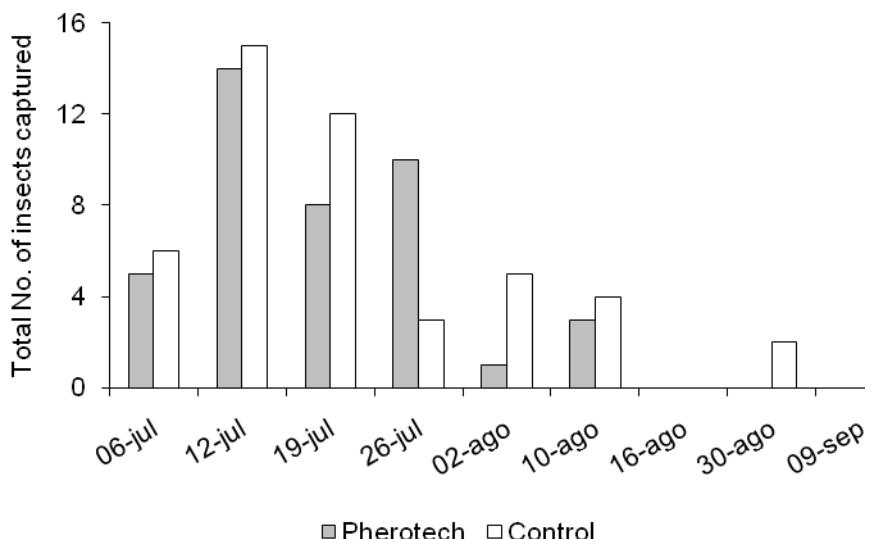
**Fig. 16.** Promedio de capturas por trampa ( $\pm$  SE) y día de revisión de *C. undatus* con trampas Lindgren, Prisma y Lámina en las dos zonas. Barras con letras diferentes representan diferencias significativas. (DMS post-hoc test,  $P \leq 0.05$ ).



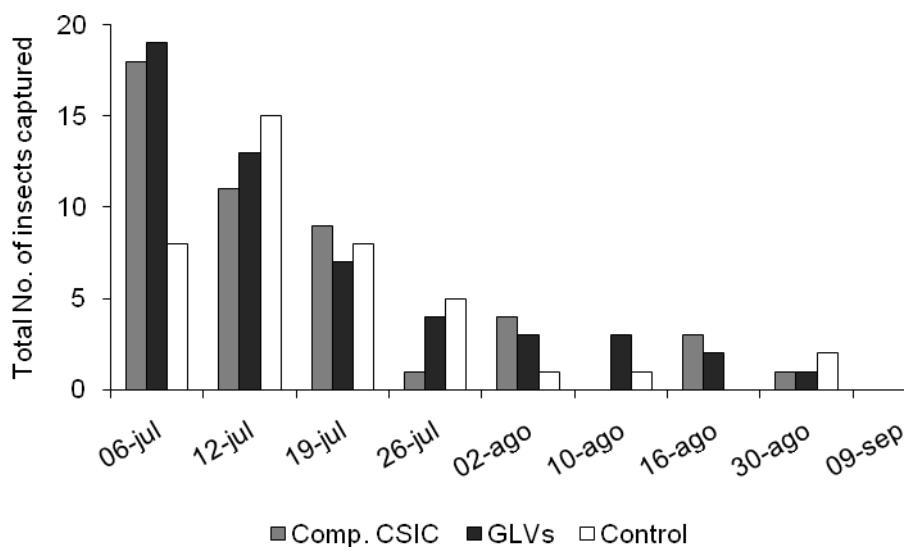
**Fig. 17.** Promedio de capturas totales por trampa ( $\pm$  SE) de *C. undatus* con trampas Lindgren, Prisma y Lámina en las dos zonas. Barras con letras diferentes representan diferencias significativas. (DMS post-hoc test,  $P \leq 0.05$ ).

### 5.3.2 Influencia del tipo de atrayentes

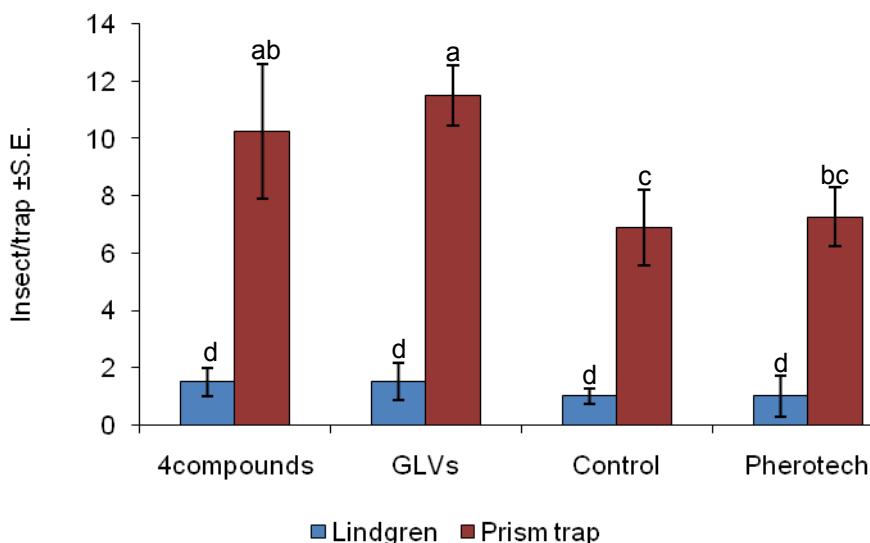
En la zona de Arbúcies se ha comprobado el efecto del atrayente comercial Pherotech (12 trampas) frente a etanol como control (12 trampas) utilizando trampas de los 3 tipos y no se han observado diferencias en el número de insectos capturados en ninguna de las revisiones durante los 2 meses de trapeo (Fig. 18). En Santa Coloma se ha probado con trampas Lindgren y Prisma la atracción ejercida por la mezcla de 4 compuestos [10 mg de cada producto) encontrados en volátiles de *C. florentinus* y activos en ensayos electrofisiológicos y de comportamiento (8 trampas). Además, se colocaron dispensadores con una mezcla de 5 GLVs encontrados en volátiles de la planta huésped *Q. suber* igualmente activos sobre individuos de *C. florentinus* en ensayos de comportamiento (8 trampas). En comparación con etanol, se observa sólo en la primera revisión (6 de julio) una clara preferencia de los insectos hacia los atrayentes del CSIC y los GLVs (Fig. 19). Para conseguir el promedio de capturas totales por trampa y aplicar los métodos estadísticos se han reunido los datos de las 2 zonas y así se ha analizado el promedio de capturas por trampa comparando el efecto de los 4 atrayentes (CSIC, GLV's, Pherotech y etanol como control) con el efecto del tipo de trampa Lindgren y Prisma (Fig. 20). *Las trampas Prisma han resultado ser las más efectivas con cada uno de los atrayentes utilizados* mientras que no se observan diferencias entre atrayentes cuando se utilizan trampas Lindgren. Se han capturado significativamente más insectos por trampa con la mezcla de 4 compuestos del CSIC (10,25 ind./trampa) y la mezcla de 5 GLV's (11,50 ind./trampa) que con la bolsa blanca (Pherotech) (7,25 ind./trampa) y el etanol (6,88 ind./trampa).



**Fig. 18.** Capturas totales de *C. undatus* por día de revisión con atrayente Pherotech y etanol como control en la zona de Arbúcies



**Fig. 19.** Capturas totales de *C. undatus* por día de revisión con la mezcla de 4 compuestos del CSIC (Comp. CSIC), GLVs y etanol como control en la zona de Santa Coloma.



**Fig. 20.** Promedio de capturas totales por trampa ( $\pm$  S.E.) de *C. undatus* con trampas Lindgren y Prisma con la mezcla de 4 compuestos del CSIC, GLV's, etanol como control y bolsa blanca (Pherotech) en las dos zonas. Barras con letras diferentes representan diferencias significativas. (DMS post-hoc test,  $P \leq 0.05$ ).

#### 5.4 Resultados en Andalucía

Las pruebas se han llevado a cabo en dos campos: Las Majadas y El Robledal y los resultados se resumen en las tablas 4 y 5.

**Tabla 4. Capturas de *C. undatus* en Las Majadas (Andalucía, 2010)**

Formulación	Lindgren	Prisma	Nº de capturas
A	0	11	11
B	12	13	25
C	0	7	7
Total	12	31	43

A: volátiles del árbol (8 trampas Prisma, 8 trampas Lindgren)

B: compuestos CSIC (8 trampas Prisma, 8 trampas Lindgren)

C: control (8 trampas Prisma, 8 trampas Lindgren)

**Tabla 5. Capturas de *C. undatus* en El Robledal (Andalucía, 2010)**

Trampa	Formulación	Nº de trampas	Nº de capturas
Lindgren	A	3	1
Lindgren	B	5	2
Lindgren	C	7	2
	Total	15	5

A: volátiles del árbol

B: compuestos CSIC

C: control

## 6. Conclusiones

- (a) Se han confirmado y mejorado los resultados de emergencia de años anteriores de adultos provenientes de ramas afectadas con *C. florentinus*. A temperatura ambiente la emergencia es de un 60-70%, mientras que las ramas que habían permanecido 4 semanas en nevera muestran un porcentaje más bajo de emergencia (<50%). Sin embargo, el porcentaje de emergencia de ramas de *Q. ilex* procedente de Valencia ha sido relativamente bajo (24%). El número de adultos obtenidos ha sido suficiente para trabajar toda la campaña con insectos vivos.
- (b) En volátiles de ambos sexos de *C. undatus* recogidos con diferentes fibras SPME se han detectado un total de 15 compuestos. Los compuestos identificados son mayoritariamente hidrocarburos, de manera análoga a los volátiles de *C. florentinus*. En hembras se han detectado 2 compuestos aún por identificar pero ausentes en machos.
- (c) Los análisis de volátiles de la planta huésped *Q. suber* obtenidos por el método Dynamic Headpsace han permitido la identificación de 33 compuestos. Entre ellos se encuentran principalmente *green leaf volatiles* (GLVs) y mono- y sesquiterpenos. La cuantificación de los resultados revela que los GLVs son los compuestos mayoritarios.
- (d) En GC-EAD se ha confirmado la actividad de 5 compuestos presentes en volátiles de *Q. suber*, los GLVs (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexenol, 1-hexanol, acetato de (*Z*)-3-hexenilo y acetato de hexilo, sobre antenas de machos y hembras de *C. florentinus*. Como se podría esperar, estos compuestos también provocan respuestas electrofisiológicas por separado en EAG observándose diferencias significativas entre ellos.

- (e) En bioensayos de atracción se confirman los resultados de la campaña 2009 en la que las hembras se sienten atraídas significativamente por volátiles y extractos de hojas de *Q. suber*. Además, se observa una atracción significativa de las hembras hacia los 5 GLVs anteriores, en mezcla o por separado, mientras que los machos no demuestran ninguna preferencia hacia la mezcla de los GLVs.
- (f) En machos se ha ensayado la actividad de una menor concentración [100ng] de los 4 compuestos (geranilacetona, nerilacetona, nonanal y decanal) encontrados en volátiles de ambos sexos de *C. florentinus*. Los individuos prefieren significativamente el brazo de la mezcla de los 4 compuestos así como del decanal.
- (g) Las capturas de *C. undatus* en las pruebas de campo de 2010 han sido las más altas obtenidas hasta ahora: 228 individuos en Cataluña y 48 en Andalucía. Se observa una atracción significativa de las trampas Prisma en comparación con las trampas Lindgren. Además, se han capturado significativamente más insectos por trampa con los atrayentes “mezcla de 4 compuestos del CSIC” y “5 GLVs” que con el producto comercial Pherotech y etanol como control. Es de reseñar que todos los individuos capturados son hembras lo que induce a pensar que las hembras son las que se desplazan para encontrar un habitat adecuadoposiblemente para la cópula y la oviposición.