

CONTROL BIORRACIONAL DE PLAGAS DEL GÉNERO *Coroebus*

ENCOMIENDA DE GESTIÓN DIRECCIÓN GENERAL PARA LA BIODIVERSIDAD-CSIC

MEMORIA DE LOS TRABAJOS REALIZADOS EN EL IIQAB (CSIC) (2007)

Indice

1. Recolección de larvas y pupas de *Coroebus florentinus* y *C. undatus* en el campo
2. Emergencia de adultos de *C. florentinus* en laboratorio
3. Material biológico aportado por las diferentes Comunidades Autónomas
4. Colocación de trampas en el campo para capturar adultos de *C. undatus*
5. Obtención de extractos de abdómenes y heces de machos y hembras de *C. florentinus*. Análisis por CG y CG-EM
6. Desarrollo de un bioensayo específico en el laboratorio de atracción de *C. florentinus*
7. Recogida de volátiles de machos y hembras de *C. florentinus*
8. Actividad biológica de los extractos anteriores de *C. florentinus* por técnicas electrofisiológicas (electroantenograma, EAG)
9. Análisis de dos productos comerciales como posibles atrayentes de *Coroebus* por CG-EM
10. Conclusiones

1. Recolección de larvas/pupas de *C. florentinus* y *C. undatus* en el campo

En el caso de *C. florentinus* se han buscado y detectado árboles afectados en la zona de Llagostera (comarca del Gironés) y se han cortado las ramas afectadas aprox. a 30 cm. del daño (Fotos 1-2). Durante la campaña 2007 se han efectuado 6 viajes al campo y se han conseguido en total alrededor de unas 900 ramas, las cuales se han mantenido en diferentes condiciones de temperatura (apartado 2) en espera de la emergencia de los adultos. La probabilidad de emergencia de adultos de pupas posiblemente presentes en las ramas, según experiencia de años anteriores, es alrededor de un 50% de promedio.

Para obtener larvas y pupas de *C. undatus* se tiene que descorchar el tronco de *Q. suber* y buscar dentro de las galerías. La recogida de las mismas así como la recepción y acondicionamiento de las obtenidas en otros lugares de España para una posible cría en el laboratorio figura en el informe adjunto de la Universidad de Lleida.



Foto 1. *Quercus suber* atacado por *C. florentinus*



Foto 2. Pupa de *C. florentinus* en una rama de *Q. suber*

2. Emergencia de adultos de *C. florentinus* en laboratorio

Una parte de las ramas afectadas y recogidas en el campo fue colocada directamente en insectarios/cajas de cartón selladas en el laboratorio para conseguir adultos vivos. El resto de las ramas recolectadas se mantuvo en neveras a 10°C durante 4, 5, 7, y 8 semanas para frenar el desarrollo de los insectos y de esa manera alargar la emergencia de los adultos, ya que su ciclo de vida es corto y los insectos sólo tienen una generación anual. De esta manera se podrían hacer un mayor número de bioensayos.

Los resultados indican que, como se esperaba, el nivel de emergencia de las ramas conservadas a temperatura ambiente ha sido de un 52% de adultos (Figura 1). Al mismo tiempo se ha constatado que a mayor tiempo de conservación en nevera le corresponde un menor número de adultos emergidos. Por tanto, no es aconsejable mantener los adultos más allá de las 4 semanas. Por otro lado no se han mostrado diferencias esenciales de comportamiento en insectos mantenidos en nevera o no, por lo que para disponer de insectos el mayor tiempo posible se habrá de seguir manteniendo en nevera a pesar del menor índice de emergencias.

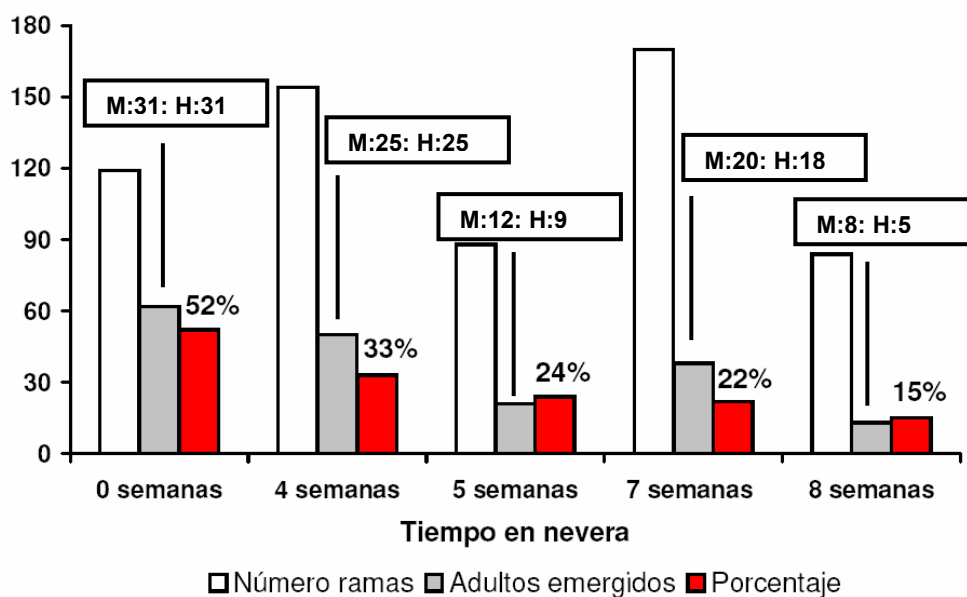


Fig. 1. Emergencia de adultos de *C. florentinus* después de 0, 4, 5, 7 y 8 semanas en nevera (M = machos, H = hembras). El porcentaje indicado hace referencia al número de individuos emergidos con respecto al número de ramas cortadas

3. Material biológico aportado por las Comunidades Autónomas

El material aportado tanto de *C. florentinus* como de *C. undatus* por las diferentes Comunidades Autónomas durante el año 2007 se refleja en las siguientes tablas.

<i>Coroebus florentinus</i>	Ramas
Cataluña	957
César Gemenó (UDL)	101
Josep M ^a Riba (Forestal Catalana)	413
Ángel Guerrero	443
Madrid	83
Valencia	152
TOTAL	1.192

<i>Coroebus undatus</i>	Larvas
Andalucía (Cádiz)	419
Cataluña (Forestal Catalana)	222
Extremadura	28
Valencia	29
TOTAL	698

4. Colocación de trampas en el campo para capturar adultos de *C. undatus*

Como se cita en el informe de la Universidad de Lleida, se han probado trampas de color púrpura, por primera vez en España, para evaluar una posible atracción visual de las mismas hacia insectos de la familia *Buprestidae*, ya que existen precedentes bibliográficos positivos a este respecto (Francese et al., J. Ent. Sci. 40: 93, 2005). Se han colocado en la zona de Arbúcies (Cataluña) un total de 14 trampas, enlazadas entre sí con dos cuerdas que las atravesaban por arriba y por debajo y que se ataron a dos árboles contiguos (foto en informe de la UdL). La separación entre ellas fue aprox. de unos 100 metros. Como se indica en el informe adjunto, se han capturado un total de 12 *C. undatus*, 8 en trampas pintadas y 4 en trampas originales. Aunque el número de adultos capturados es bajo, hay que tener en cuenta que no contenían atrayente sintético alguno por lo que consideramos podrían ser trampas válidas en principio para futuros ensayos.

5. Obtención de extractos de abdómenes y heces de machos y hembras de *C. florentinus*. Análisis por CG y CG-EM

Los extractos de abdómenes (2 abdómenes de machos y de hembras) y heces (entre 150 y 300 mg por extracto) de ambos sexos como posibles fuentes de feromonas han sido obtenidos por extracción de los mismos en hexano durante 20 h. Los insectos se habían mantenido sobre ramas y hojas de la planta huésped. Se han llevado a cabo 3 repeticiones para los extractos de abdomen y 5 para los de heces. Antes de inyectar en CG-EM, los extractos fueron concentrados hasta aproximadamente 50 µl. A efectos comparativos se trituraron hojas de *Q. ilex* (564 mg) y se extrajeron con 1 mL de hexano durante 4 h. Se inyectó 1 µl de cada extracto en CG y CG-EM y los análisis mostraron que los extractos de heces y de abdómenes contienen casi los mismos compuestos, y que algunos de ellos coinciden con los correspondientes del extracto de la planta huésped *Q. ilex* (Figuras 2 y 3). Las ligeras diferencias observadas en los extractos de machos y hembras no son significativas.

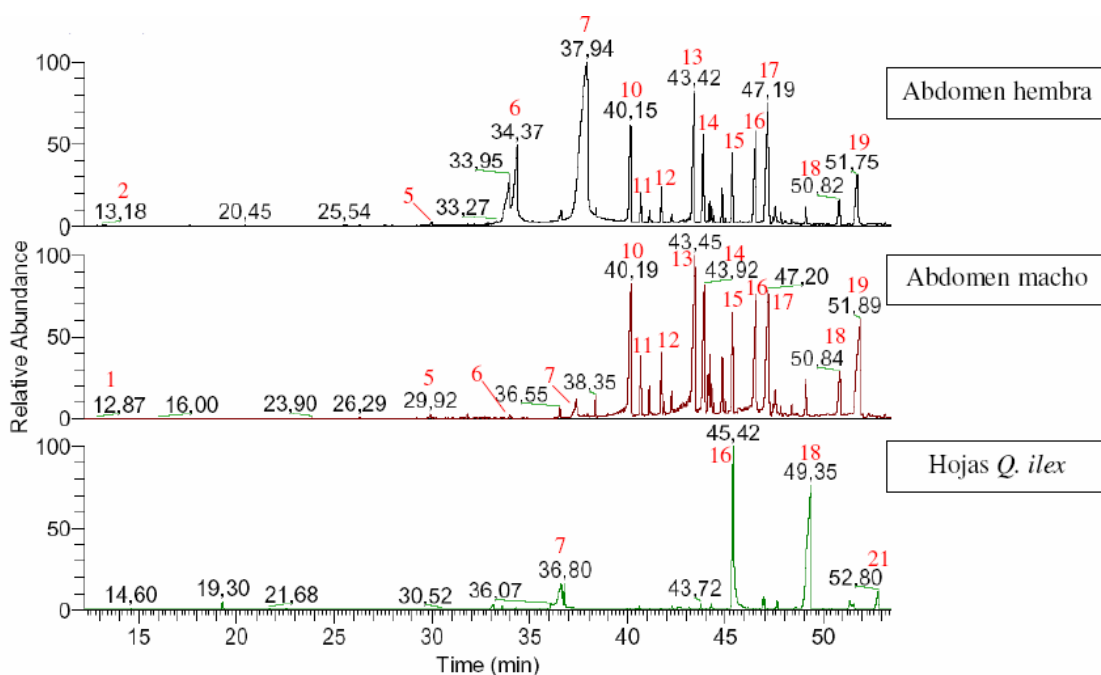


Fig. 2. Cromatogramas de extractos de abdómenes de machos y hembras de *C. florentinus* y de *Q. ilex* con la siguiente asignación preliminar de los compuestos 1-19: 1) nonanal; 2) benzenoetanol; 5) ácido tetradecanoico; 6) ácido hexadecanoico; 7) ácido (*E*)-9-octadecenoico; 10) tricosano (C23); 11) 11-metiltricosano; 12) tetracosano (C24); 13) pentacosano (C25); 14) 13-metilpentacosano; 15) 13-metilhexacosano; 16) heptacosano (C27); 17) 11,13-dimetilhexacosano; 18: nonacosano (C29); 19) 13-metilnonacosano; 21) octacosanal

La caracterización se ha llevado a cabo por comparación de los espectros de masas con los descritos en la bibliografía, así como de los tiempos de retención (RI ó índices de Kovats) en comparación con los mostrados por muestras auténticas. Un listado de los compuestos identificados tanto en extractos de abdómenes y de heces como de volátiles se muestra en la tabla 1. Los índices de retención (RI) se han calculado según Van den Dool y Kratz (J. Chromat. 11:463, 1963).

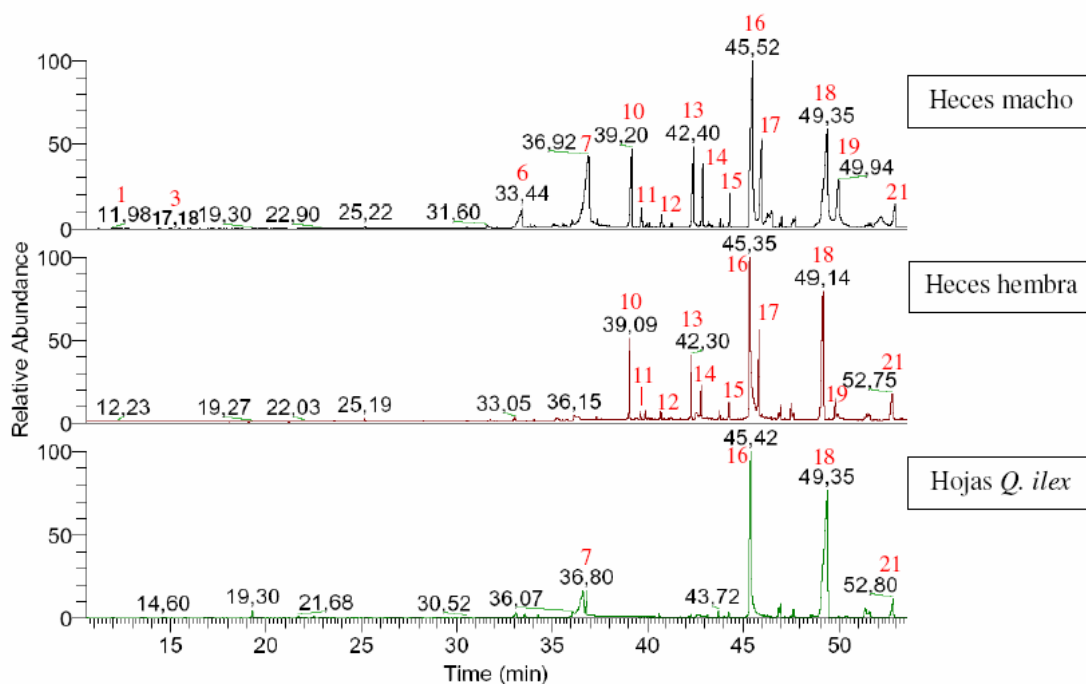


Fig. 3. Cromatogramas de extractos de heces de machos y hembras de *C. florentinus* y de *Q. ilex* con la siguiente asignación preliminar de los compuestos 1-21: 1) nonanal; 3) ácido nonanoico; 6) ácido hexadecanoico; 7) ácido (*E*)-9-octadecenoico; 10) tricosano (C23); 11) 11-metiltricosano; 12) tetracosano (C24); 13) pentacosano (C25); 14) 13-metilpentacosano; 15) 13-metilheptacosano; 16) heptacosano (C27); 17) 11,13-dimetilhexacosano; 18: nonacosano (C29); 19) 13-metilnonacosano; 21) octacosanal

6. Desarrollo de un bioensayo específico en el laboratorio de atracción de *C. florentinus*

Los bioensayos de laboratorio se han llevado a cabo con la ayuda de un olfactómetro de vidrio en forma de Y de doble elección (Afora). El olfactómetro, que nos ha permitido cuantificar el número de individuos que son atraídos por la fuente de volátiles (brazo B) frente al control (brazo A) (Foto 3), tiene las siguientes características: tubo principal: 10 cm, brazo izquierdo y derecho: 8 cm, diámetro interno: 18 mm, ángulo entre los 2 brazos: 90°. Cada brazo se conectó a un adaptador de 6 cm de longitud que contenía una fuente de volátiles (extractos o insectos vivos) y un control. A través de ambos brazos se hizo pasar previamente una corriente de aire purificado a través de un lecho de carbón activo (flujo 2,5 l/min). El olfactómetro fue colocado en posición vertical y en su interior se colocó un alambre para facilitar la locomoción de los insectos.

Tabla 1. Compuestos detectados e identificados por espectro de masas (MS) e índice de retención (RI) en volátiles y en extractos de abdomen y de heces de *Coroebus florentinus*

Compuestos detectados		RI _{HP-5} ^a	MS/RI ^b	M _r ^c	BP _(m/z) ^c
1	Nonanal ^{A, H}	1103	MS/RI	142	57
2	Phenylethyl alcohol ^A	1112	MS	122	91
3	Nonanoic acid ^H	1282	MS/RI	158	60
4	BF01 ^V	1635	MS	242	43
5	Tetradecanoic acid ^A	1767	MS/RI	228	73
6	Hexadecanoic acid ^{A, H}	1985	MS/RI	256	73
7	(E)-9-Octadecanoic acid ^{A, H}	2183	MS	282	55
8	Henicosane ^V	2100	MS/RI	296	57
9	Docosane ^V	2200	MS/RI	310	57
10	Tricosane ^{A, H, V}	2300	MS/RI	324	57
11	11-Methyl tricosane ^{A, H, V}	2330	MS/RI	338	57
12	Tetracosane ^{A, H, V}	2400	MS/RI	338	57
13	Pentacosane ^{A, H, V}	2500	MS/RI	352	57
14	13-Methyl pentacosane ^{A, H, V}	2529	MS/RI	366	57
15	13-Methyl hexacosane ^{A, H, V}	2625	MS	380	57
16	Heptacosane ^{A, H, V}	2700	MS/RI	380	57
17	11,13-Dimethyl hexacosane ^{A, H, V}	2728	MS	394	57
18	Nonacosane ^{A, H, V}	2900	MS/RI	408	57
19	13-Methyl nonacosane ^{A, V}	2943	MS	422	57
20	Triacosane ^{A, V}	3000	MS/RI	422	57
21	Octacosanal ^H	3135	MS	408	57

^A Extracto de abdomen

^H Extracto de heces

^V Volátiles recogidos con SPME

^a Índice de retención en una columna HP-5

^b Tipo de identificación por espectro de masas (MS) y/o índice de retención (RI) de patrones

^c (M_r) Peso molecular; (BP_(m/z)) Pico base del espectro de masas

El sistema se iluminó con una lámpara de luz blanca procurando una intensidad lumínica homogénea en el interior y exterior del olfactómetro. Para los ensayos se han utilizado un mínimo de 22 insectos y un máximo de 53. Las cantidades como estímulos empleadas en los ensayos fueron las siguientes: extractos de heces de ambos sexos (≈3 mg), el equivalente a 1/25 de abdomen de ambos sexos, extracto de hojas de la planta huésped *Quercus ilex* (≈1 mg) y R-(+)-limoneno (50 µg). Este compuesto se ha incluido en los ensayos porque se ha encontrado descrito como uno de los compuestos mayoritarios de *Quercus*. Como control se utilizó aire purificado o el disolvente utilizado en los extractos. Todos los bioensayos se han realizado

entre las 10.00 y 17.00 h. Ningún insecto ha sido utilizado 2 veces el mismo día. Un resumen de los resultados se presenta en la tabla 2.



Foto 3. Olfactómetro en Y de doble elección

Los resultados indican que los machos de *C. florentinus* son atraídos por hembras conespecíficas, por extractos de heces y de abdómenes de ambos sexos y por el R-(+)-limoneno. Las hembras por su parte no muestran preferencias significativas en sus ensayos de elección. Antes de llevar a cabo los bioensayos se constató que no existe preferencia alguna por parte de los insectos hacia ninguno de los dos brazos del olfactómetro. El método estadístico utilizado para determinar diferencias significativas ha sido el “Sign Test” de Lienert y un test binomial que se basa en un contraste unilateral de proporciones (One-sided test for proportions). Según el “Sign Test” los machos prefieren de manera significativa dirigirse hacia hembras vivas, extractos de heces y de abdómenes de machos y hembras y hacia el R-(+)-limoneno, mientras que las hembras no presentan diferencias significativas prácticamente en ninguno de los ensayos.

Tabla 2. Resultados de actividad con un olfactómetro de doble elección

Biotest	Sex	N	Stimulus	Insects response	Control	Insects response	Test/Control	Tendency	No response	Sign Test	One-sided test for proportions
Blank	Both	41	Air	18	Air	23	0,8	NO	0	n.s.	n.s.
Living adults	Male	53	3 females	35	Air	16	2,2	attraction	2	0,02	0,01
	Male	30	3 males	15	Air	13	1,2	NO	2	n.s.	n.s.
	Female	30	3 males	12	Air	18	0,7	NO	0	n.s.	n.s.
	Female	22	3 females	7	Air	12	0,6	NO	3	n.s.	n.s.
Extract feces	Male	44	Feces female	30	Solvent	12	2,5	attraction	2	0,01	0,004
	Male	31	Feces male	21	Solvent	9	2,3	attraction	1	0,05	0,02
	Female	30	Feces male	13	Solvent	17	0,8	NO	0	n.s.	n.s.
	Female	40	Feces female	18	Solvent	22	0,8	NO	0	n.s.	n.s.
Extract abdomen	Male	41	Abdm. female	26	Solvent	12	2,2	attraction	3	0,05	0,02
	Male	30	Abdm. male	20	Solvent	7	2,9	attraction	3	0,05	0,01
	Female	30	Abdm. male	18	Solvent	9	2,0	attraction	3	n.s.	n.s.
	Female	40	Abdm. female	17	Solvent	17	1,0	NO	6	n.s.	n.s.
Extract hostplant	Male	30	Leaves <i>Q. Ilex</i>	17	Solvent	11	1,5	NO	2	n.s.	n.s.
	Female	30	Leaves <i>Q. Ilex</i>	20	Solvent	10	2,0	attraction	0	n.s.	0,05
	Male	30	R-(+)-limonene	21	Solvent	9	2,3	attraction	0	0,05	0,02
	Female	24	R-(+)-limonene	12	Solvent	11	1,1	NO	1	n.s.	n.s.

N = nº de repeticiones; n.s. = no significativo. Los números en rojo indican el valor de P y sólo se consideraron significativos los valores de $P \leq 0,05$.

Con el método estadístico del contraste unilateral se han confirmado los resultados significativos obtenidos con el “Sign Test”, si bien en este caso se ha revelado una preferencia también de las hembras hacia extractos de hojas de *Q. ilex*.

7. Recogida de volátiles de machos y hembras de *C. florentinus*

En cuanto a la recogida de volátiles de machos y hembras, ésta se ha llevado a cabo por dos métodos diferentes. El primero es el denominado “Dynamic Headspace Method”, en el que se hace pasar por los insectos (7 machos y 7 hembras en un matraz ovalado) una corriente de aire purificado [350 mL/min] durante 24 h. Los volátiles se recogieron en un absorbente adecuado (carbón activo) (foto 4). El segundo método utilizado es por microextracción en fase sólida (solid phase microextraction, SPME) con una fibra de sílice activada, que absorbe 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 20 h y se utilizaron 5 machos y 5 hembras por separado (foto 5).



Foto 4. Dynamic Headspace Method



Foto 5. SPME con adultos de *C. florentinus*

Con el método “Dynamic Headspace” no se han podido recoger cantidades suficientes de volátiles de machos y hembras para su análisis. Sin embargo, con el método del SPME se han encontrado algunos compuestos interesantes en los volátiles de *C. florentinus* (Figura 4). Uno de ellos es posiblemente el dodecanoic acid, 1-methylethyl ester (dodecanoato de isopropilo, RT: 21.46), que se ha detectado también en ambos sexos. La mayoría de los compuestos identificados son hidrocarburos saturados lineales o ramificados. En general los cromatogramas de machos y hembras indican que no hay diferencias apreciables entre los distintos extractos.

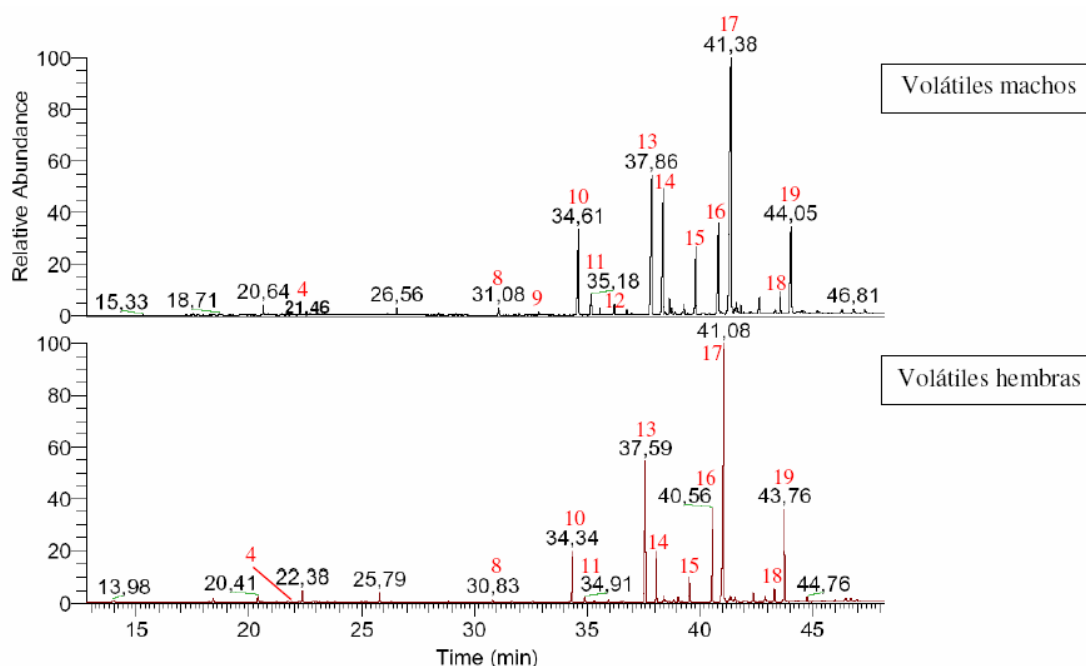


Fig. 4. Cromatogramas de volátiles de machos y hembras obtenidos por SPME. Se han asignado los siguientes compuestos: 4) BF01; 8) hencicosano (C21); 9) docosano (C22); 10) tricosano (C23); 11) 11-metiltricosano; 12) tetracosano; 13) pentacosano (C25); 14) 13-metilpentacosano; 15) 13-metilhexacosano; 16) heptacosano; 17) 11, 13-dimetilhexacosano; 18) nonacosano (C29); 19) 13-metilnonacosano; 20) triacontano (C30)

El dodecanoato de isopropilo ha resultado ser feromona del larder beetle, *Dermestes lardarius* (Coleoptera, Dermestidae) (Imai, T. Appl. Entomol. Zool. 25:113 (1990) y del hide beetle *Dermestes maculatus* (Coleoptera, Dermestidae) (Francke, W., Angew. Chem. 18:796 (1979).

La actividad electrofisiológica de los diferentes extractos se presenta en el apartado 7.

8. Actividad biológica de los extractos anteriores de *C. florentinus* por técnicas electrofisiológicas (electroantenograma, EAG)

La actividad de los diferentes extractos en antenas de machos se evaluó en EAG, utilizando el Z-(3)-hexenol como compuesto estándar, ya que es muy frecuente en volátiles y por tanto activo sobre las antenas de muchos insectos (Figura 5). Sólo se utilizó una antena por cada individuo de *C. florentinus* y se hicieron “puffs” a través de diferentes cantidades de los extractos que aparecen en la figura 5.

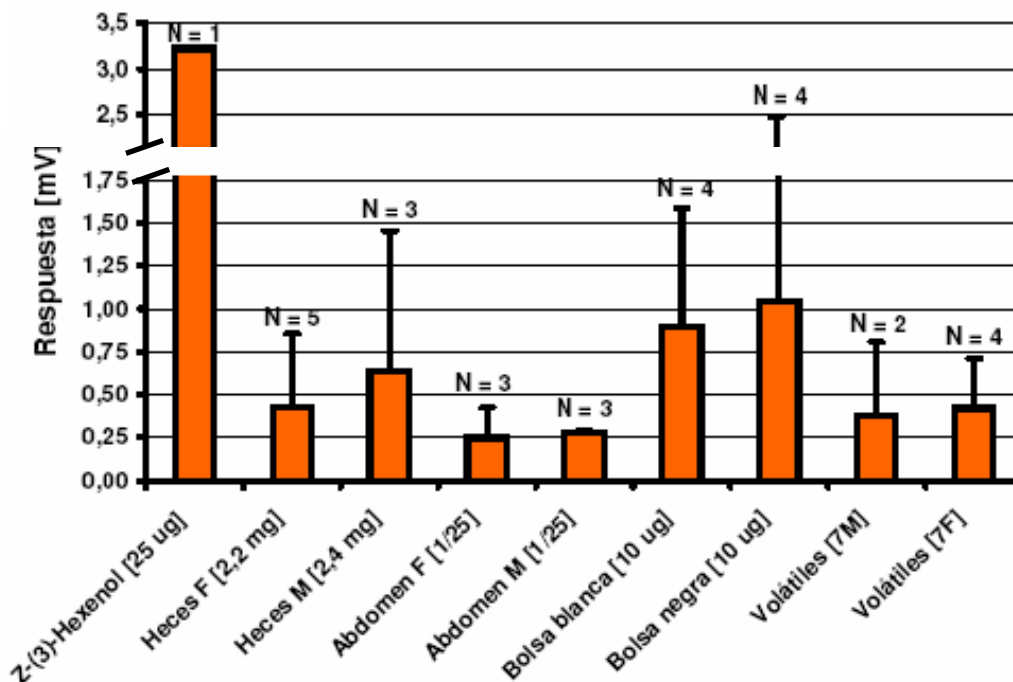


Fig. 5. Promedio de la respuesta electrofisiológica [mV] de antenas de machos de *C. florentinus* a diferentes extractos. Las barras de error representan la desviación estándar. N indica la cantidad de antenas probadas.

La mayor respuesta la proporcionaron los extractos de la “bolsa negra” y “bolsa blanca” (véase más abajo), probablemente por un efecto de cantidad de producto, aunque también los extractos de heces, abdómenes (machos y hembras) y volátiles de hembras producen también algunas pequeñas respuestas antenales, sobre todo las heces de machos. (Figura 5). Estos extractos habían resultado también activos en los bioensayos de doble elección. Hasta el momento presente, no se han podido obtener resultados fiables del análisis de estos extractos por acoplamiento CG-EAG.

9. Análisis de dos productos comerciales como posibles atrayentes de *Coroebus* por CG-EM

Se han analizado dos productos comerciales facilitados por Mariano Rojo, que se denominarán “bolsa negra” y “bolsa blanca”, y que según su procedencia comercial se utilizan como atrayentes en el control de plagas. El contenido de ambas bolsas se había ensayado en el campo con anterioridad para ver su posible actividad atrayente sobre *Coroebus* con resultados negativos.

Del contenido de las bolsas, que se han mantenido a -20°C , se tomó 1 mL y se diluyó 100x con hexano. Las soluciones se analizaron por CG en presencia de un estándar interno (α -pineno). En la bolsa negra el α -pineno coincidió con uno de los productos de la muestra por lo que en adelante se utilizó en esta bolsa el limoneno como estándar interno. En la bolsa blanca se calculó que el componente mayoritario estaba en una concentración de $15\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mientras que en la negra la concentración del producto mayoritario era de $13\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para el análisis por CG-EM las muestras se diluyeron con hexano para obtener una concentración adecuada ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se ha identificado que la “bolsa negra” contiene α ó β -pineno y verbenona, compuestos ausentes, sin embargo, en la “bolsa blanca”. Estos compuestos son volátiles producidos por numerosos árboles cebo y atrayentes de numerosos insectos. En la “bolsa blanca” se han encontrado sólo lo que parecen ser posiblemente impurezas: el tributylacetyl citrate y el 1,2-benzenedicarboxylic acid dioctyl ester (ftalato de dioctilo) (figura 6). Si es posible, el análisis de la “bolsa blanca” se habría de repetir con una muestra nueva y reciente dada su actividad en electroantenograma, ya que los compuestos identificados no son esperables posean actividad electrofisiológica alguna.

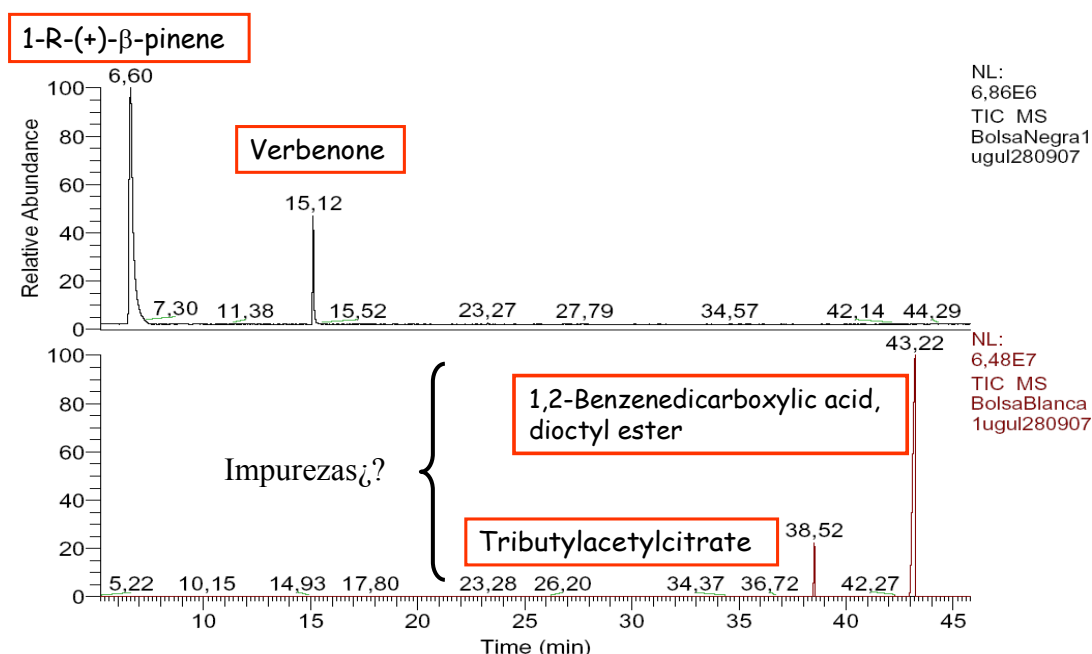


Fig. 6. Compuestos identificados en la “bolsa negra” y “bolsa blanca”.

10. Conclusiones

1. Las trampas de color púrpura ensayadas parecen apropiadas para atraer bupréstidos, como *C. undatus*. Si bien el número de capturas de este insecto ha sido bajo en estos ensayos preliminares, hay que considerar que las trampas no contenían atrayente alguno.
2. Se han confirmado resultados previos de emergencias de adultos, alrededor del 50%, de ramas afectadas con *C. florentinus*. El porcentaje de machos y hembras emergidos es aprox. 1:1. Asimismo, no es aconsejable mantener los adultos en nevera más allá de 4 semanas.
3. El análisis de extractos de abdómenes y de heces de *C. florentinus* ha permitido la identificación de un total de 21 compuestos, en su mayoría hidrocarburos lineales y ramificados de cadena larga, ácidos carboxílicos, un alcohol y dos aldehídos. No se han encontrado diferencias significativas entre machos y hembras.
4. En bioensayos específicos con un olfactómetro de doble elección se ha constatado que los machos se dirigen de manera significativa hacia las hembras, hacia extractos de heces y abdómenes de ambos sexos y hacia el (R)-(+)-limoneno, mientras que las hembras prácticamente no presentan preferencia alguna.
5. La composición de los extractos de volátiles de ambos sexos no presenta diferencias apreciables, si bien se ha identificado, tentativamente hasta el momento, el dodecenoato de isopropilo, el cual merecerá especial atención en los próximos bioensayos a realizar en 2008. Este compuesto ha sido identificado como feromona del larder beetle, *Dermestes lardarius* (Coleoptera, Dermestidae) y del hide beetle, *Dermestes maculatus* (Coleoptera, Dermestidae).
6. En EAG los diferentes extractos presentan una cierta actividad electrofisiológica, pero en todo caso mucho menor que la ofrecida por el (Z)-3-hexenol, un compuesto muy frecuente en volátiles de plantas.
7. El análisis de dos productos comerciales, teóricamente posibles atrayentes de *Coroebus*, ha conducido a la identificación de α ó β -pineno y verbenona como compuestos mayoritarios.