

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROGRAMA DE DOCTORADO Y MAGISTER EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES



**SEMOQUÍMICOS ASOCIADOS A LA CONDUCTA SEXUAL DEL
INSECTO *Aegorhinus superciliosus* (GUÉRIN, 1830) (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

ANA ALICIA MUTIS TEJOS

TEMUCO-CHILE

2009

**SEMOQUÍMICOS ASOCIADOS A LA CONDUCTA SEXUAL DEL
INSECTO *Aegorhinus superciliosus* (GUÉRIN, 1830) (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Esta tesis es presentada bajo la supervisión del Director de Tesis, Dr. ANDRES QUIROZ CORTEZ, del Departamento de Ciencias Químicas para su aprobación por la comisión.

ANA ALICIA MUTIS TEJOS

DIRECTOR DEL PROGRAMA
DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE
RECURSOS NATURALES

Dr. ANDRES QUIROZ

DIRECCIÓN DE POSTGRADO
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

MSc. FERNANDO PARDO

Dra. GRACIELA PALMA

Dr. EDUARDO FUENTES

Dr. ALEJANDRO URZÚA

A mis Ángeles,

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi tutor, Dr. Andrés Quiroz, por haberme permitido ser parte y desarrollar esta tesis en su grupo de Ecología Química; así como por su apoyo, comprensión y colaboración durante el desarrollo de esta investigación.

Con mucho cariño, agradezco al Profesor Fernando Pardo, por su entrega, comprensión, paciencia y sabiduría, así como por su gran contribución a la formulación y desarrollo de esta tesis.

A los profesores integrantes de la comisión; Dra. Graciela Palma, Dr. Alejandro Urzúa, y Dr. Eduardo Fuentes, gracias por sus valiosos aportes en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al proyecto MECESUP FRO 0309, al proyecto AT 23070010 CONICYT y al proyecto Fundación Andes C14055, por hacer posible la realización de esta tesis.

A mi familia, pilar fundamental en mi vida, en especial a Héctor gracias por su paciencia, amor y entrega. A mi bebé gracias por existir y llenar mi vida. A mis padres y Mamá, gracias por su amor incondicional, motivación y apoyo.

Mis más sinceros agradecimientos a Leo, Marcelo y Angela, por su valiosa e inestimable ayuda en el trabajo de campo y laboratorio. A cada integrante de la “Comunidad Científica”, en especial a Rubén, Aixa, Loreto y Gustavo, por su amistad, ayuda desinteresada, palabras de aliento y hacer más agradable las jornadas académicas.

A la Dra. Juanita Freer, de la Universidad de Concepción, mis sinceros agradecimientos por facilitarnos el electroantenógrafo.

Finalmente, a los funcionarios del Departamento de Ciencias Químicas, gracias por su amabilidad y colaboración.

RESUMEN

El cabrito del frambueso, *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae), es un insecto nativo, que se encuentra presente en el sur de Chile. Esta especie es considerada plaga de arándanos, frambuesos y berries en general. Aunque los adultos suelen causar daño al alimentarse de brotes y hojas, el daño más serio es provocado por las larvas que se alimentan de las raíces, pudiendo llegar a causar la muerte de las plantas.

Tratamientos químicos y biológicos han sido empleados para controlar esta plaga. Si bien la aplicación de insecticidas principalmente del grupo de los organofosforados, al follaje antes y después de la floración logra reducir la población de insectos adultos, éstos no son efectivos para controlar la actividad de las larvas en las raíces, además del prolongado efecto residual que afecta a insectos polinizadores. Por su parte, la aplicación en campo, tanto de hongos como nemátodos entomopatógenos, descritos como agentes de control para este insecto, no han logrado replicar los resultados obtenidos a nivel de laboratorio debido a la variabilidad de condiciones abióticas y tipos de suelo.

Otra forma de manejo, es la manipulación de poblaciones con compuestos semioquímicos, en particular, la interrupción de la comunicación sexual con feromonas sintéticas es reconocida como un método de control de plagas ambientalmente amigable, tanto por su acción específica, como por la reducción en el uso de pesticidas.

A la fecha, no ha sido estudiada la conducta de apareamiento de *A. superciliosus*, así como tampoco los posibles compuestos semioquímicos involucrados; a pesar de ser reconocida la importancia de las feromonas para el apareamiento de otras especies de curculiónidos.

En el presente trabajo se muestra evidencia de la existencia de una feromona de contacto presente en la cutícula de hembras, asociada a la conducta de apareamiento de *A. superciliosus*. Por su parte, el estudio de feromonas de largo alcance, sugiere que las hembras liberan *R*-limoneno, el que posiblemente han acumulado a partir de su hospedero como una estrategia para incrementar sus posibilidades de apareamiento.

La información generada contribuye al entendimiento del comportamiento sexual de *A. superciliosus* y podría ser empleada en una estrategia para el control de esta plaga.

SUMMARY

The raspberry weevil, *Aegorhinus superciliosus* (Guerin) (Coleoptera: Curculionidae), is native to southern Chile. This insect is a pest of blueberries, raspberries, and similar berry crops. Although adults cause some damage by chewing leaves and shoots, serious damage is caused by the root-feeding larvae, which can kill plants. Chemical and biological treatments have been used to control this pest. Application of azinphosmethyl or diazinon insecticides to the foliage before and after flowering reduces adult weevil populations. However, sprays are not effective at controlling the root-boring larvae, and long-lasting residual pesticides are not used because of concerns of toxicity to pollinators. In addition, both fungi and entomopathogenic nematodes have been tested as biological control agents of weevil populations, but results have been unreliable due to the variability of abiotic conditions and soil types.

Manipulation of populations with semiochemicals is another possible method for pest management. In particular, interruption of sexual communication with synthetic pheromones is well-known as an environmentally benign method of pest control that allows for species-specific control and concomitant reduction in the use of pesticides.

To date, there have been no studies concerning the mating behavior of *A. superciliosus* or the possible semiochemicals that are involved, although long-range pheromones are known to be important to the mating of other curculionids.

In the present research, is showed the evidence of a female contact pheromone, and associated male behavior for *A. superciliosus*. The study of long range semiochemicals, suggest that females release *R*-limonene that they previously have accumulated from their host as a strategy to increase their mating probability.

The information generated in this study contributes to understanding sexual behavior of the species *A. superciliosus* and could be used in a strategy of control of this pest.

INDICE

1	Capítulo 1. Antecedentes generales y planteamiento de objetivos	1
1.1	Introducción	2
1.2	Antecedentes bibliográficos	3
1.2.1	Situación actual de los berries en Chile	3
	1.2.1.1 Producción nacional de arándano	4
	1.2.1.2 Producción nacional de frambuesa	5
1.3	Descripción y ciclo de vida de <i>A. superciliosus</i>	6
1.4	Hospederos	9
1.5	Métodos de control de <i>A. superciliosus</i>	10
1.5.1	Control natural	10
1.5.2	Control mecánico	11
1.5.3	Control químico	11
1.5.4	Control biológico	12
	1.5.4.1 Utilización de hongos entomopatógenos	12
	1.5.4.2 Utilización de nematodos entomopatógenos	13
1.6	Feromonas sexuales en coleópteros	15
1.6.1	Feromonas de contacto	15
	1.6.1.1 Síntesis de lípidos cuticulares en insectos	18
	1.6.1.2 Ruta biosintética de hidrocarburos cuticulares en insectos	18
1.6.2	Feromonas de largo alcance	22
	1.6.2.1 Secuestro de compuestos desde hospederos	24
	1.6.2.2 Modificación de compuestos provenientes de hospederos	24
	1.6.2.3 Biosíntesis <i>de novo</i>	25
1.6.3	Regulación de la biosíntesis de feromonas	31
1.6.4	Regulación de la liberación de feromonas	32
1.7	Hipótesis	35
1.8	Objetivos	35
1.8.1	Objetivo general	35
1.8.2	Objetivos específicos	35
1.9	Referencias	36

Capítulo 2. Feromonas de corto alcance asociadas a la conducta de apareamiento de <i>A. superciliosus</i>	44
Resumen	45
Abstract	46
2.1 Introducción	47
2.2 Materiales y métodos	47
2.2.1 Insectos	47
2.2.2 Obtención y análisis de extractos cuticulares de cuerpo entero	48
2.2.3 Protocolo de apareamiento	49
2.2.4 Bioensayos con hembras	49
2.2.5 Bioensayos con cápsula de vidrio que simula una hembra	50
2.3 Resultados	51
2.3.1 Conducta de apareamiento	51
2.3.2 Función de componentes cuticulares	53
2.3.3 Análisis químico de extractos cuticulares	54
2.3.4 Actividad feromonal	56
2.4 Discusión	57
2.5 Referencias	59

Capítulo 3 Feromonas de largo alcance asociadas a la conducta de apareamiento de <i>A. superciliosus</i>	62
Resumen	63
Abstract	64
3.1 Introducción	65
3.2 Materiales y métodos	66
3.2.1 Insectos	66
3.2.2 Atrapamiento de volátiles	66
3.2.3 Ensayos olfatométricos	66
3.2.4 Identificación química	67
3.2.5 Electroantenografía	67
3.2.6 Bioensayos con estándares	68

3.2.7 Evaluación en terreno de los compuestos activos como feromonas sexuales	69
3.2.7.1 Dispositivos de liberación	69
3.2.7.2 Ensayo de campo	70
3.3 Resultados	74
3.3.1 Conducta de <i>A. superciliosus</i> frente a volátiles	74
3.3.2 Análisis químico de extractos de volátiles	78
3.3.3 Respuesta electrofisiológica	79
3.3.4 Conducta de <i>A. superciliosus</i> frente a compuestos terpénicos identificados en extractos de volátiles	82
3.3.5 Ensayos de campo	84
3.4 Discusión	87
3.5 Referencias	91
<i>Capítulo 4 Conclusiones generales</i>	95
<i>Capítulo 5 Proyecciones</i>	98
<i>Capítulo 6 Anexos</i>	100
Anexo 1. Cinéticas de liberación desde septas	101
Anexo 2. Publicaciones	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Ciclo estacional observado para <i>A. superciliosus</i>	7
Figura 1.2	Ciclo de desarrollo de <i>A. superciliosus</i>	9
Figura 1.3	Síntesis de n-pentacosano a partir de ácidos grasos	19
Figura 1.4	Ruta biosintética propuesta para 2-metilalcanos	20
Figura 1.5	Ruta propuesta para la biosíntesis de 13-metilpentacosano	21
Figura 1.6	Conversión de mirceno a ipsdienol e ipsenol	26
Figura 1.7	Biosíntesis <i>de novo</i> de feromonas de origen isoprenoides	28
Figura 1.8	Biosíntesis de buibuilactona	30
Figura 2.1	Etograma de apareamiento de <i>A. superciliosus</i>	52
Figura 2.2	Respuesta de un macho de <i>A. superciliosus</i> a una cápsula de vidrio cubierta con extracto cuticular de hembra	57
Figura 3.1	Trampa PHEROCON BW	71
Figura 3.2	Trampa adaptada	71
Figura 3.3	Disposición de trampas comerciales y adaptadas en el huerto	73
Figura 3.4	Disposición de trampas adaptadas en el huerto	74
Figura 3.5	Respuesta olfatométrica de machos de <i>A. superciliosus</i> a extractos de volátiles emitidos por hembras conespecíficas	75
Figura 3.6	Respuesta olfatométrica de hembras de <i>A. superciliosus</i> a extractos de volátiles emitidos por hembras conespecíficas	76
Figura 3.7	Respuesta olfatométrica de hembras de <i>A. superciliosus</i> a extractos de volátiles emitidos por machos conespecíficos	77
Figura 3.8	Respuesta olfatométrica de machos de <i>A. superciliosus</i> a extractos de volátiles emitidos por machos conespecíficos	78
Figura 3.9	Respuesta electrofisiológica de machos de <i>A. superciliosus</i> a compuestos presentes en extracto de volátiles emitidos por hembras conespecíficas	80
Figura 3.10	Respuesta electrofisiológica de hembras de <i>A. superciliosus</i> a compuestos presentes en extracto de volátiles emitidos por hembras conespecíficas	81

Figura 3.11	Representación gráfica de la respuesta de machos de <i>A. superciliosus</i> frente a hexano y <i>R</i> -limoneno	82
Figura 3.12	Porcentaje de respuesta de machos de <i>A. superciliosus</i> frente a compuestos sintéticos identificados en extractos de volátiles	83
Figura 3.13	Porcentaje de captura de hembras de <i>A. superciliosus</i> frente a distintos tratamientos en ensayo de campo	85
Figura 3.14	Porcentaje de captura de machos y hembras de <i>A. superciliosus</i> frente a distintos tratamientos en ensayo de campo	86

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Superficie total de berries, y principales zonas de producción a nivel nacional	4
Tabla 1.2	Feromonas sexuales de corto alcance en coleópteros	17
Tabla 1.3	Diversidad estructural de feromonas sexuales en insectos del orden Coleóptera	23
Tabla 2.1	Respuesta de machos <i>A. superciliosus</i> a diferentes tratamientos	53
Tabla 2.2	Abundancia relativa de hidrocarburos cuticulares de hembras y machos de <i>A. superciliosus</i>	55
Tabla 2.3	Respuesta de machos de <i>A. superciliosus</i> a compuestos sintéticos, extracto cuticular de hembras y extracto cuticular de machos	56
Tabla 3.1	Monoterpenos identificados en extractos de volátiles de machos y hembras de <i>A. superciliosus</i> por GC-MS	79

Capítulo 1

Antecedentes generales y planteamiento de objetivos

1.1 Introducción

Mientras que algunas frutas tienen problemas de comercialización, y no logran remontar a pesar de los esfuerzos en mejorar varietal o la presentación del producto, la categoría de berries experimenta una verdadera explosión en los mercados. A la fecha, Chile es el primer productor de berries del Hemisferio Sur y tercero a nivel mundial, detrás de Estados Unidos y Canadá (Kong, 2009). Actualmente en nuestro país existen más de 27.000 hectáreas plantadas con berries, principalmente framuesa (46%) y arándano (39%) (Kong, 2009), distribuidas mayoritariamente entre las regiones del Maule y Los Lagos; con retornos que superan los 300 millones de dólares anuales. El aumento en la superficie plantada de estos monocultivos ha generado hábitat favorables para especies de insectos, especialmente nativos que tenían como únicos hospederos árboles y plantas autóctonas (Parra et al., 2009). Este es el caso de la especie *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae), la cual se encuentra presente en Chile como insecto nativo desde Curicó a Chiloé. El daño causado por este insecto se debe principalmente a que en su estado larval se encuentra en el suelo consumiendo raíces y raicillas (Cisternas et al., 2000; France et al., 2000); perforando finalmente la raíz principal cerca del cuello donde construye una cámara para pupar. Toda esta actividad larvaria subterránea provoca un detrimiento en la planta, que puede terminar con su muerte. Es por esta acción que ha sido considerado como el insecto plaga de mayor importancia económica en este tipo de frutales (Guerrero y Aguilera, 1989; Aguilera y Rebolledo, 2001).

El control químico dirigido a los insectos adultos se basa en la aplicación de insecticidas, principalmente del grupo organofosforados, los cuales actúan por contacto o ingestión. Si bien estos productos logran reducir las poblaciones de adultos, tienen un efecto nocivo para

las abejas polinizadoras dado el largo efecto residual que presentan (Aguilera, 1995; Guerrero y Aguilera, 1989; France et al., 2000), además no tienen acción sobre el estado larval, que es el causante del mayor daño a los cultivos.

Otros métodos de control para esta plaga, consisten en el uso de hongos y nemátodos como controladores biológicos, los cuales infectan a adultos y larvas provocando su muerte (France et al., 2000; Gerding, 1999). A pesar que los resultados obtenidos a nivel de laboratorio son satisfactorios, a nivel de campo son muy dependientes de las condiciones abióticas, además de la toxicidad de los insecticidas y fungicidas sobre estos controladores (Molina, 1997).

El no contar con un método eficiente para el control de *A. superciliosus*, la escasa información disponible sobre aspectos relacionados con la biología y conducta del insecto, abre una nueva línea de investigación tendiente a establecer la participación de compuestos semioquímicos, específicamente feromonas que controlan la conducta sexual de *A. superciliosus*. Esta investigación se ve respaldada por numerosos antecedentes bibliográficos que dan cuenta de la existencia de feromonas sexuales que median la comunicación química intraespecífica en coleópteros y particularmente en otras especies de curculiónidos (Stevens, 1998; Seybold y Vanderwel, 2003).

1.2 Antecedentes bibliográficos

1.2.1 Situación actual de los berries en Chile

El sector de los berries concentra a nivel nacional una superficie de aproximadamente 22.300 ha, según los registros del VII Censo Agrícola, INE 2007 (Zschau, 2009), cultivándose principalmente frambuesa, arándanos, moras y frutillas, existiendo otros

berries que tienen menor importancia en cuanto a superficie, tales como zarzaparrilla, murtilla y grosella (Tabla 1.1) (Zschau, 2009).

Tabla 1.1 Superficie total de berries, y principales zonas de producción a nivel nacional.

Berrie	Superficie Nacional (has)	Regiones
Cranberry	567,50	Región de La Araucanía y Región de Los Lagos.
Arándano	10.762,65	Región del Maule, región del Bíobío, Región de La Araucanía, y Región de Los Lagos.
Frambuesa	7.550,34	La producción se concentra entre las Regiones del Maule y Los Lagos.
Frutilla	1.853,46	La producción se concentra desde la Región de Coquimbo a la Región del Bíobío.
Mora	1.243,00	La producción se concentra desde la Región Metropolitana a la Región del Bíobío.
Murtilla	257,00	El cultivo está centrado en la Región de La Araucanía y Región de Los Lagos.
Zarzaparrilla	43,36	Desde la Región de Coquimbo hasta la Región de Los Lagos.

Fuente: Zschau, 2009.

1.2.2 Producción nacional de arándano

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es un arbusto frutal nativo de norteamérica. En los últimos años la producción de este fruto ha experimentado un considerable crecimiento debido a sus beneficios en la salud humana debido a sus propiedades antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinogénica y de prevención de infecciones urinarias, entre otras (Ofek et al., 1996; Wedge et al., 2001; Wang et al., 2005). En la actualidad, Estados Unidos es el principal productor y consumidor de arándanos, sin embargo existen otros países que lo están demandando, especialmente Europa y Asia.

En Chile, la producción es exportada casi en su totalidad y en la presente temporada la producción aumentó en 40%, las que debieran mantenerse en el futuro próximo. Dentro de las 10.762 hectáreas de arándanos, el 56% se encuentran en etapa de formación; de ellas, 4.232 (39% del total) fueron plantadas en la temporada 2006/2007. Por lo tanto se estima que para 2010-2011 la producción sobrepasará a las 95.000 toneladas (Fedefruta, 2008). En 1995 se exportaban US\$ 4 millones, mientras que en la temporada 2007/2008 los retornos fueron de 194,5 millones de dólares (Pino, 2007; Reyes, 2009). Es importante destacar que aproximadamente el 50% de las exportaciones proviene del territorio comprendido entre La Araucanía y Los Lagos (Sánchez, 2006).

1.2.3 Producción nacional de frambuesa

La frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es en la actualidad un cultivo de gran importancia económica y social en Chile, principalmente porque representa un importante ingreso de divisas y genera una alta demanda de mano de obra estacional (Ovalle et al., 2007). Chile se encuentra en tercer lugar de importancia en volumen como país exportador de frambuesa congelada (15%), después de Polonia (24%) y Serbia (22%), abasteciendo al principal poder comprador que es Estados Unidos y Canadá, seguido por países de Europa y Asia (Kong, 2009).

Al igual que el arándano, el consumo de frambuesa se ha visto favorecido gracias a sus propiedades antioxidantes, que previenen el daño de membranas celulares, el crecimiento de hongos y de bacterias. Las frambuesas también son excelentes fuentes de manganeso y vitaminas C y B (Ancos et al., 1999; Beekwilder et al., 2005).

En los últimos diez años el volumen de frambuesa congelada se duplicó, mientras que su valor aumentó 1,5 veces. En la temporada 2007/2008 el volumen de exportaciones de la fruta congelada fue de 42.500 toneladas equivalentes al 94%, con un retorno de 122,8 millones de dólares; mientras que el volumen de fruta fresca sólo alcanzó las 2.500 toneladas, equivalentes al 6%, con un retorno de 16,6 millones de dólares (Kong, 2009).

1.3 Descripción y ciclo de vida de *Aegorhinus superciliosus*

Kuschel en el año 1951, señala que *Aegorhinus superciliosus* se distribuye desde Curicó (Región del Maule) hasta Chiloé (Región de Los Lagos), encontrándose también en Neuquén, provincia de Argentina.

En relación al ciclo de desarrollo para esta especie, existe una aproximación descrita por Aguilera (1988) para la temporada 1986-1987, en la que se señala que el insecto tendría una generación anual pasando el invierno preferentemente al estado larvario, aunque se han encontrado adultos vivos entre terrones de suelo durante el mes de julio, lo que indica que también pueden invernar en dicho estado (Figura 1.1).

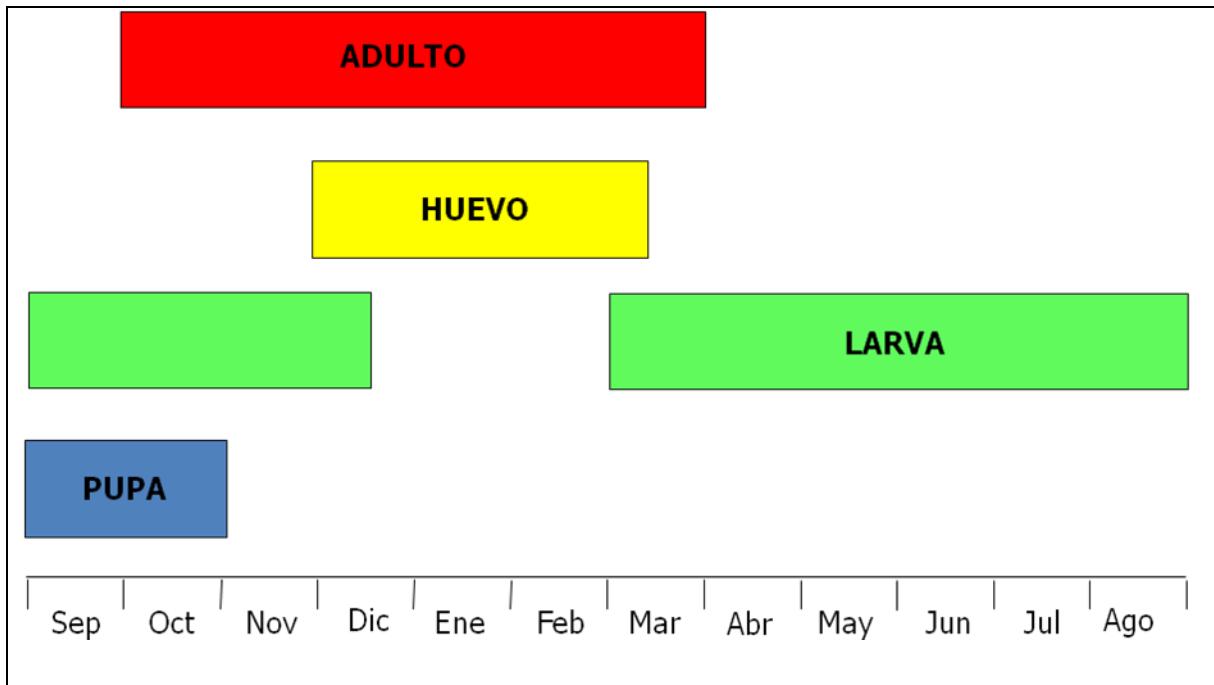


Figura 1.1. Ciclo estacional observado para *A. superciliosus*, según Aguilera, 1988.

La hembra adulta ovipone muy cerca del cuello de la planta (Aguilera, 1988), o sobre la superficie del suelo (Carrillo et al., 2002). Los huevos (Figura 1.2, A), son casi esféricos, color amarillo pálido, de aproximadamente 1 mm de tamaño, los cuales son depositados en forma aislada o bien formando pequeños grupos de 4 o 5 huevos, los que son recubiertos por un material membranoso transparente, que les permite protegerse de predadores, altas temperaturas, y pérdida de humedad (Aguilera, 1995; Pérez, 1994). Las larvas (Figura 1.2, B), que emergen del huevo se desplazan al interior del suelo, hasta la zona radical de la planta, su tamaño varía entre 1,5 mm a 2 cm cuando está plenamente desarrollada, es de color blanco cremoso, ápoda, con la cabeza quitinizada de color café, provista de poderosas mandíbulas con las cuales corta y tritura raíces y raicillas de la planta, horadando finalmente la raíz principal cerca del cuello donde construye una cámara para pupar (Aguilera, 1988; Elgueta, 1993). El cuerpo de la pupa (Figura 1.2, C), es robusto, color

blanco crema, curvado en el tercio terminal y provisto de setas robustas de color café, con forma de aguja y montadas en tubérculos. Su tamaño es de aproximadamente 1,5 cm de largo (Meynet, 1997). El insecto adulto (Figura 1.2, D), mide entre 10,5 – 17 mm de longitud (Elgueta, 1993). El dorso del cuerpo es de color gris oscuro a negro, rugoso, muy quitinizado, con patas de aproximadamente 10 mm de largo (Reyes, 1993), destacándose notoriamente los tarsos (Aguilera, 1988). La cabeza es esférica, con la frente hundida y con ojos convexos y muy prominentes (Reyes, 1993). Las piezas bucales se encuentran en el ápice del rostro o trompa, las mandíbulas son marcadamente articuladas hacia arriba y abajo (Pérez, 1994). Las antenas son del tipo geniculada, es decir acodadas y con sus antenitos distales formando una cabezuela. Todos los antenitos son pilosos y el escapo presenta escamas blancas. Las antenas presentan 11 antenitos y se inserta en la mitad del rostro hacia delante (Reyes, 1993).



A



B



C



D

Figura 1.2. Ciclo de desarrollo de *A. superciliosus*. A) Huevo. B) Larva. C) Pupa. D) Adulto.

1.4 Hospederos

La presencia de *A. superciliosus* ha sido determinada en arándano (*Vaccinium corimbosum*), frambueso (*Rubus idaeus*), avellano europeo (*Corylus avellana*), grosellero (*Ribes grossularia*) frutilla (*Fragaria ananassa*), zarzaparrilla roja (*Ribes rubrum*) y mora (*Rubus* sp.) (Meynet, 1997). También se indica al maitén (*Maytenus boaria*) como

hospedero en el bosque nativo, desde donde el insecto migraría hacia los huertos frutales. Ocasionalmente se han encontrado adultos alimentándose de hojas de sauce (*Salix* sp.), duraznero (*Prunus pérsica*) y perales (*Pyrus communis*) (Aguilera, 1988), así como también de abedul (*Betula pendula*), rosa (*Rosa* sp) y zarzamora (*Rubus constrictus*) (Meynet, 1997).

1.5 Métodos de control de *Aegorhinus superciliosus*

1.5.1 Control natural

Respecto a enemigos naturales de *A. superciliosus*, Prado (1991) señala a *Centistes* sp. (Hymenoptera: Branconidae) y al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* atacando el estado larvario (Carrillo, 1993). Cisternas (2009) señala que a la fecha se han encontrado los siguientes enemigos naturales: (1) hongos entomopatógenos (*M. anisopliae* y *B. bassiana*) atacando huevos, larvas, pupas y adultos; (2) nemátodos entomopatógenos (Rhabditidae: Steinernematidae: *Xenorhabdus* spp. y *Steinernema carpocapsae* cepa INIA 810), atacando larvas, pupas y adultos tenerales; y (3) un parasitoide de la familia Tachinidae (no identificado), atacando adultos. Se ha constatado la depredación de adultos por aves como *Gallus gallus* (gallina doméstica). También se ha encontrado asociado a las larvas, pupas y adultos de *Aegorhinus* spp. el ácaro, *Pyemotes* sp. Los porcentajes de mortalidad natural determinados han sido muy bajos, sin embargo porcentajes mayores se han obtenido posteriormente a la aplicación de controladores biológicos (hongos y nemátodos entomopatógenos). No se ha recuperado *Centistes* sp. indicado como parasitoide de la especie ni se ha determinado la actividad depredadora de *Gryllus fulvipennis*.

1.5.2 Control mecánico

Las medidas mecánicas son en general efectivas, pero exigen gran inversión de trabajo y mano de obra (Meynet, 1997). Aguilera (1995) señala como control mecánico de *A. superciliosus* la colecta manual y periódica, incinerando adultos, y el uso de barreras físicas para evitar la entrada de individuos al huerto.

1.5.3 Control químico

Principalmente dirigido al adulto, se basa en la utilización de insecticidas del grupo organofosforado, como azinfosmetil y diazinon, los cuales son aplicados al follaje antes y/o después de la floración (Aguilera, 1988; Guerrero y Aguilera, 1989). Los productos comerciales actualmente disponibles (ej. Acifon 35WP, Cotnion 35%WP, Diazinon 40WP, Gusathion M 35%WP), presentan períodos de carencia que fluctúan entre los cuatro y quince días (AFIPA, 2006). Carrillo (1993) recomienda el uso de insecticidas del grupo de los carbamatos, como carbofurán. Actualmente los productos disponibles comercialmente para el control de este insecto (ej. Carbaryl 85WP, Sevin XLR plus), presentan períodos de carencia que varían entre uno y siete días (AFIPA, 2006). El mayor problema de estos productos son su alta toxicidad, larga carencia y persistencia, lo que limita su aplicación en periodos de cosecha, precisamente cuando se produce la mayor emergencia de adultos en el cultivo (Aguilera et al., 2009).

Dado el inconveniente que presentan los insecticidas de amplio espectro, se ha experimentado con insecticidas orgánicos sintéticos conocidos como reguladores del crecimiento, que inhiben la formación de quitina, actuando principalmente sobre el estado larval. En ensayos de laboratorio, aplicando el inhibidor de quitina, directamente sobre

huevos de *A. superciliosus*, tal como triflumuron, se obtuvo entre un 95-100% de efectividad. Sin embargo, este producto no tiene efecto sobre los adultos. Estos ensayos motivaron la realización de experimentos de campo con otros reguladores de crecimiento, como flufenoxuron y diflubenzuron, con el objeto de inhibir el desarrollo embrionario del insecto, pero la efectividad de estos productos no superó el 70% como promedio para las dos temporadas evaluadas (Soler, 1994; Aguilera, 1995). Actualmente los estudios están centrado en evaluar la efectividad de azadirachtina como regulador de crecimiento, ensayos realizados por Aguilera et al. (2009) a nivel de laboratorio indican que la azadirachtina, formulada como Neem, tiene un efecto en la inhibición de la embriogénesis en *A. superciliosus*, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ovipostura y porcentaje de emergencia de larvas, entre muestras con aplicación de Neem, versus el testigo sin aplicación.

1.5.4 Control biológico

1.5.4.1 Utilización de hongos entomopatógenos. Dentro de este control destacan principalmente la utilización de los hongos *Metarhizium* spp y *Beauveria* spp. Estos hongos entran al insecto adulto mediante aberturas naturales (boca, espiráculo y ano) o a través del integumento. Durante el proceso de infección, el hongo produce toxinas que causan la muerte del insecto, para luego colonizar el interior del hospedero y emerger en forma de micelio al exterior para producir esporas (France et al., 2000). Desde 1996, el programa de Patología de Insectos, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación (CRI) Quilamapu, Chillán, ha realizado prospecciones en el país, encontrando con relativa frecuencia hongos entomopatógenos, dentro de los cuales destacan por su abundancia *Metarhizium* y *Beauveria*. Estudios realizados por France et al. (2000), en los cuales evaluaron la susceptibilidad de adultos de *A. superciliosus* mediante

ensayos de inoculación con nueve cepas de *Beauveria* y diez cepas de *Metarhizium*, les permitió contar con dos cepas que arrojaron índices de mortalidad¹ de 0,92 y 1,00. Actualmente, INIA Quilamapu masifica y produce esporas para el control de importantes plagas de insectos en Chile (Sepúlveda et al., 2008). La utilización de hongos está limitada por una serie de factores bióticos y abióticos. Dentro de los factores bióticos destacan antagonismo microbiano sobre el tegumento del hospedero o dentro del suelo, la condición fisiológica, incluyendo las reacciones humorales y de inmunidad celular. Los factores abióticos por su parte incluyen la inactivación por luz solar, desecación, acción de ciertos insecticidas y fungicidas, y los factores de humedad y temperatura para el crecimiento del hongo (Molina, 1997). Es por ello que INIA trabaja con diferentes formulaciones de hongos sólidas o líquidas, con el fin de mantener la viabilidad del hongo por sobre el 95%, el contenido de humedad entre 4-6%, protegerlo de la radiación ultravioleta y la deshidratación por viento cuando son aplicados en el campo (Urtubia y France, 2007).

1.5.4.2 Utilización de nemátodos entomopatógenos. Los nemátodos entomopatógenos, corresponden a gusanos microscópicos habitantes del suelo. Poseen la habilidad de alimentarse de insectos valiéndose para esto de una asombrosa asociación con una bacteria simbionte de la cual se alimentan y que a su vez transportan e inoculan como una verdadera "inyección biológica" (Gerding, 1999; Merino y France, 2009). El estado juvenil infectivo del nemálogo entra al hospedero larval a través de aberturas naturales como el ano, espiráculos o boca. Estos nemátodos están en asociación mutualista con bacterias del género *Xenorhabdus* en el caso de nemátodos del género *Steinernema* y bacteria del género

¹ $\sum (n^{\circ} \text{ de insectos muertos} / (n^{\circ} \text{ día} \times n^{\circ} \text{ total de insectos}))$, calculado hasta 6 días después de la inoculación.

Photorhabdus para nemátodo del género *Heterorhabditis* (Lacey et al., 2001). Una vez dentro del hospedero el nemátodo libera la bacteria, la que alcanza la hemolinfa, donde se propaga y provoca una septicemia, que mata al hospedero dentro de las 24-72 horas (Smart, 1995).

Los insectos muertos por la acción de nemátodos del género *Steinernerma* se tornan de color ocre, amarillo-café o negros, mientras que los muertos por nemátodos del género *Heterorhabditis* se tornan rojos, púrpuras, naranjas o algunas veces verdes (Molina, 1997).

Las mayores limitantes en la utilización de nemátodos como método de control de plagas corresponden a factores como temperatura y humedad. La exposición a radiación solar inhabilita a los nemátodos para causar infecciones letales, mientras que una falta de humedad provoca la rápida desecación de éstos (Hazir et al., 2003). A partir del año 2006, el programa de patología que impulsa el Centro Tecnológico de Control Biológico de INIA Quilamapu (CTCB), inició un programa de colecta e identificación de nematodos entomopatógenos, lo que le ha permitido obtener 97 nuevos aislamientos de nematodos entomopatógenos, identificándose el primero de ellos como correspondiente a una especie nueva del género *Steinernema*, colectado desde el Parque Nacional Isla Magdalena en la Región de Aysén. Actualmente trabajan en la identificación molecular y su evaluación sobre el control de plagas agrícolas de importancia económica (Merino y France, 2009).

1.6 Feromonas sexuales en coleópteros

Las feromonas sexuales son señales químicas requeridas para el apareamiento de muchas especies de insectos, y son categorizadas de acuerdo a su función en la secuencia de apareamiento. Por ejemplo, una feromona sexual de largo alcance es liberada por un individuo para atraer al sexo opuesto desde una distancia determinada, mientras que las feromonas sexuales de contacto tiene su efecto a corta distancia, incitando una conducta de cortejo y/o copulación en el sexo opuesto. Generalmente las feromonas sexuales de largo alcance son altamente volátiles, y percibidas mediante el sistema olfativo, mientras que las feromonas de contacto poseen una baja volatilidad y son percibidos como estímulos gustativos (Nojima et al., 2007). A la fecha, la mayoría de las feromonas sexuales estudiadas, corresponden a feromonas sexuales de largo alcance, mayoritariamente de especies de insectos que constituyen plagas, siendo el estudio de feromonas de contacto relegadas a un segundo plano, probablemente debido a su bajo potencial para ser utilizadas en programas de control de plagas. Sin embargo, ambos tipos de feromonas pueden ser importantes para el apareamiento, y en algunas especies de insectos, ambos tipos son usadas secuencialmente (ejemplo., *Blattella germanica*, Nojima et al., 2005; *Callosobruchus chinensis*, Tanaka et al., 1981).

1.6.1 Feromonas de contacto

Las feromonas de corto alcance, o también denominadas de contacto, son compuestos hidrocarbonados que forman parte de la cutícula del insecto, y que permitirían reconocer una potencial pareja (Singer, 1998). Estos hidrocarburos usualmente, comprenden mezclas de compuestos que incluyen *n*-alcanos, *n*-alquenos, monometilalcanos, dimetilalcanos y

trimetilalcanos (Blomquist y Jackson, 1979). Si bien la información disponible sobre la existencia de este tipo de feromonas es mayoritariamente en insectos pertenecientes a la familia Carambycidae (Allison et al., 2004), también existen reportes en insectos pertenecientes a las familias, Staphylinidae (Peschke y Metzler, 1987) y Chrysomelidae (Sugeno et al., 2006). Todos los antecedentes concuerdan en que las feromonas de corto alcance estarían presentes sólo en la cutícula de hembras, y podrían estar en menor proporción en cutículas de machos, lo que explicaría conductas homosexuales presentadas por algunos insectos (Singer, 1998). Algunos ejemplos de este tipo de feromonas se muestran en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Feromonas Sexuales de Corto Alcance en Coleópteros

Especie	Familia	Compuestos	Referencia
<i>Anoplophora glabripennis</i>	Cerambycidae	(Z)-9-tricoseno, (Z)-9-pentacoseno, (Z)-7-pentacoseno, (Z)-9-heptacoseno, (Z)-7-heptacoseno	Zhang et al., 2003
<i>Anoplophora malasiaca</i>	Cerambycidae	n-heptacosano, n-nonacosano, 4-metilhexacosano, 4-metiloctacosano, 9-metilheptacosano, 9-metilnonacosano, 15-metilhentriacantano y 15-metiltritriacantano	Fukaya et al., 2000
<i>Psacothea hilaris</i>	Cerambycidae	(Z,S)-(Z,R)-(E,S) y (E,R)-21-metil-8-pentatriacanteno	Allison et al., 2004
<i>Megacyllene robiniae</i>	Cerambycidae	(Z)-9-pentacoseno	Ginzel et al., 2003a
<i>Megacyllene caryae</i>	Cerambycidae	(Z)-9-nonacoseno	Ginzel et al., 2006
<i>Xylotrechus colonus</i>	Cerambycidae	n-pentacosano, 9-metilpentacosano, 3-metilpentacosano	Ginzel et al., 2003b
<i>Aleochara curtula</i>	Staphylinidae	(Z)-7-heneicoseno y (Z)-7-tricoseno	Peschke y Metzler, 1987
<i>Gastrophysa atrocyanea</i>	Chrysomelidae	9-metilheptacosano, 11-metilheptacosano, 9-metilnonacosano y 11-metilnonacosano	Sugeno et al., 2006

1.6.1.1 Síntesis de lípidos cuticulares en insectos

Estudios en diversas especies de insectos, han establecido que la síntesis de lípidos cuticulares, dentro de los cuales destacan los hidrocarburos (Gilby, 1965), tiene lugar, principalmente en células asociadas con la capa epidérmica o cuerpos grasos periféricos, particularmente, los oenocitos. Estudios de incorporación *in vivo* de acetato radiactivo en hidrocarburos de integumento y cuerpos grasos de la cucaracha *Periplaneta americana*, realizados por Nelson (1969), demostraron que los cuerpos grasos y el integumento fueron capaces de incorporar acetato en sus hidrocarburos. Resultados similares han demostrado que la producción de hidrocarburos en *Sarcophaga bullata* y *Musca domestica* tiene lugar en células relacionadas con la epidermis (Blomquist et al., 1987) Por el contrario, estudios realizados por Diehl (1975) en *Schistocerca gregaria*, indican que cuerpos grasos periféricos ricos en oenocitos presentan altas tasas de síntesis de hidrocarburos. Por su parte, Romer (1980), demostró que oenocitos de *Tenebrio molitor*, incorporaron acetato radiactivo en la síntesis de hidrocarburos.

1.6.1.2 Ruta biosintética de hidrocarburos cuticulares en insectos

Los hidrocarburos cuticulares están formados por cadenas que varían entre 17 a 49 átomos de carbono, y en algunas especies de insectos llegan a constituir más del 90% de los lípidos de la superficie del insecto (Blomquist y Jackson, 1979), derivando de ácidos grasos, a través de una ruta que incluye elongación y decarboxilación. Estudios realizados por Major y Blomquist (1978), demostraron la directa decarboxilación del ácido hexacosanoico marcado radioactivamente para dar origen a *n*-pentacosano en *P. americana*, y ácido tetracosanoico marcado radioactivamente para dar origen a *n*-tricosano en *P. fuliginosa*.

En la figura 1.3, se muestra un esquema simplificado de la síntesis de n-pentacosano a partir de la elongación del ácido esteárico por incorporación de grupos acetato y posterior decarboxilación.

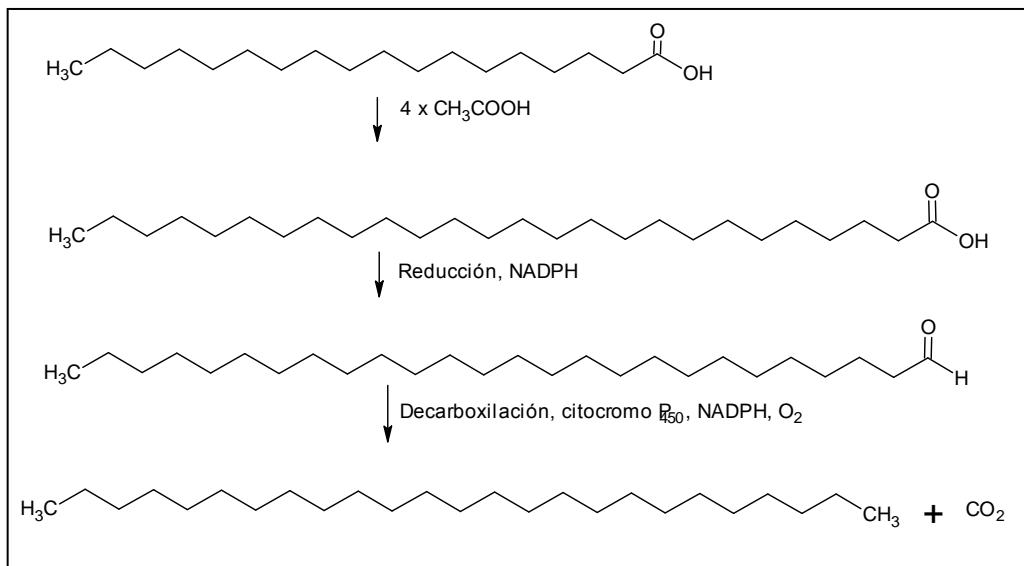


Figura 1.3. Síntesis de *n*-pentacosano a partir de ácido graso, utilizando la ruta elongación-decarboxilación (adaptado de Morgan, 2004).

Por su parte, la biosíntesis de hidrocarburos del tipo 2-metilalcanos, ha sido estudiada en *Nemobius fasciatus* y *Gryllus pennsylvanicus*, 2-metilalcanos de 23 y 25 átomos de carbono comprenden el 20% de los hidrocarburos cuticulares de *N. fasciatus*, mientras que el 80% restante corresponde a *n*-alcanos. Del acetato marcado radioactivamente que fue incorporado en hidrocarburos, solo el 28% fue encontrado en los 2-metilalcanos, y el remanente en los *n*-alcanos. Por el contrario, valina marcada fue preferentemente incorporada en los 2-metilalcanos, con un 98% de la radiactividad encontrada en los hidrocarburos del tipo 2-metilalcanos. Para *G. pennsylvanicus* se encontró la presencia de hidrocarburos del tipo 2-metilalcanos con número par e impar de átomos de carbono en la

cadena, la utilización de los aminoácidos valina y leucina marcados radiactivamente, permitieron sugerir que el esqueleto de carbono de los aminoácidos valina y leucina actúan como precursor de 2-metilalcanos con número de átomos de carbono pares e impares en su cadena, respectivamente (Figura 1.4).

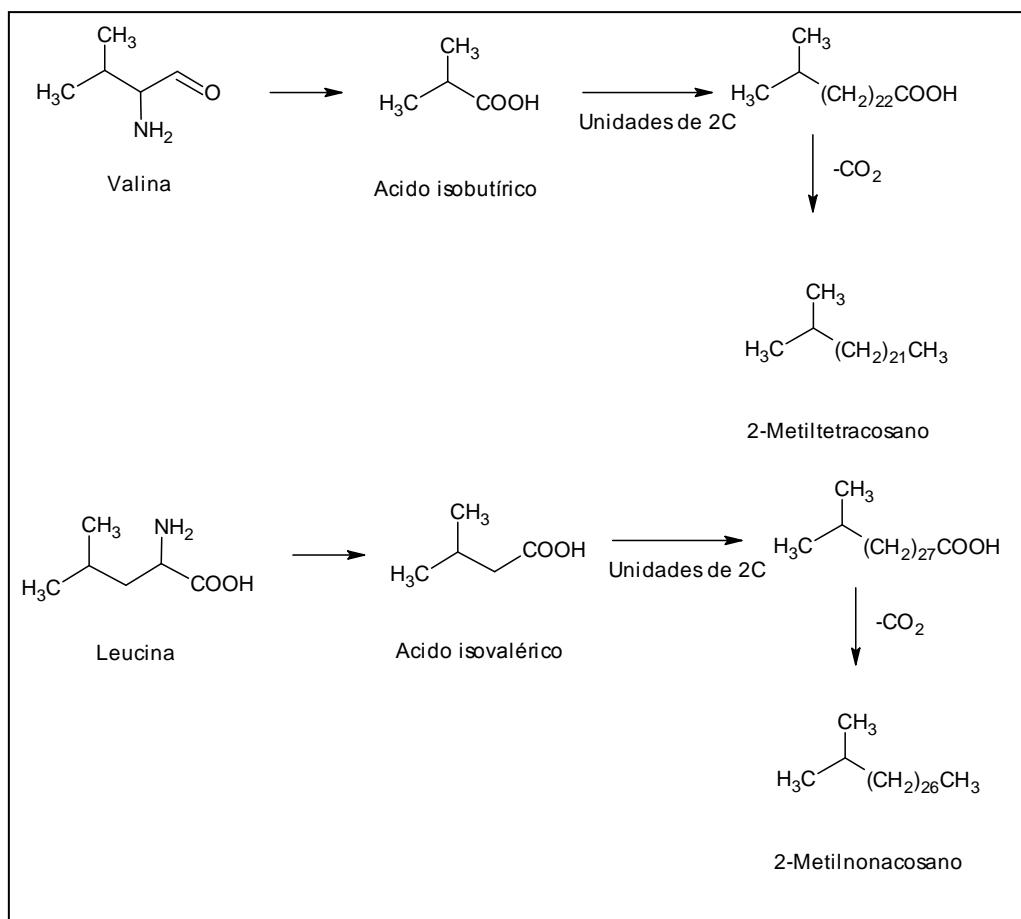


Figura 1.4. Ruta biosintética propuesta para 2-metilalcanos en insectos (Adaptada de Blomquist y Jackson, 1979).

Otro tipo de hidrocarburos cuticulares son monometilalcanos, en los cuales el grupo metil se puede encontrar en las posiciones 5-, 7-, 9-, 11-, 13-, o 15-, de la cadena hidrocarbonada del alcano. El origen del grupo metil se origina durante el proceso de elongación, por

sustitución de una molécula de metilmalonil-CoA en lugar de malonil-CoA (Figura 1.5). Estudios sobre la biosíntesis de 13-metilpentacosano en *P. fuliginosa*, proporciona evidencia sobre la participación de propionato como precursor de metil ramificaciones en los monometilalcanos ramificados internamente. Acetato marcado fue incorporado entre todos los hidrocarburos cuticulares en una proporción similar, mientras que propionato marcado fue incorporado preferencialmente en 3-metiltricosano y 13-metilpentacosano. Resultados similares en *Zootermopsis angusticollis*, indicaron que la incorporación de propionato marcado fue preferentemente en el hidrocarburo 5-metilheneicosano (Blomquist y Jackson, 1979).

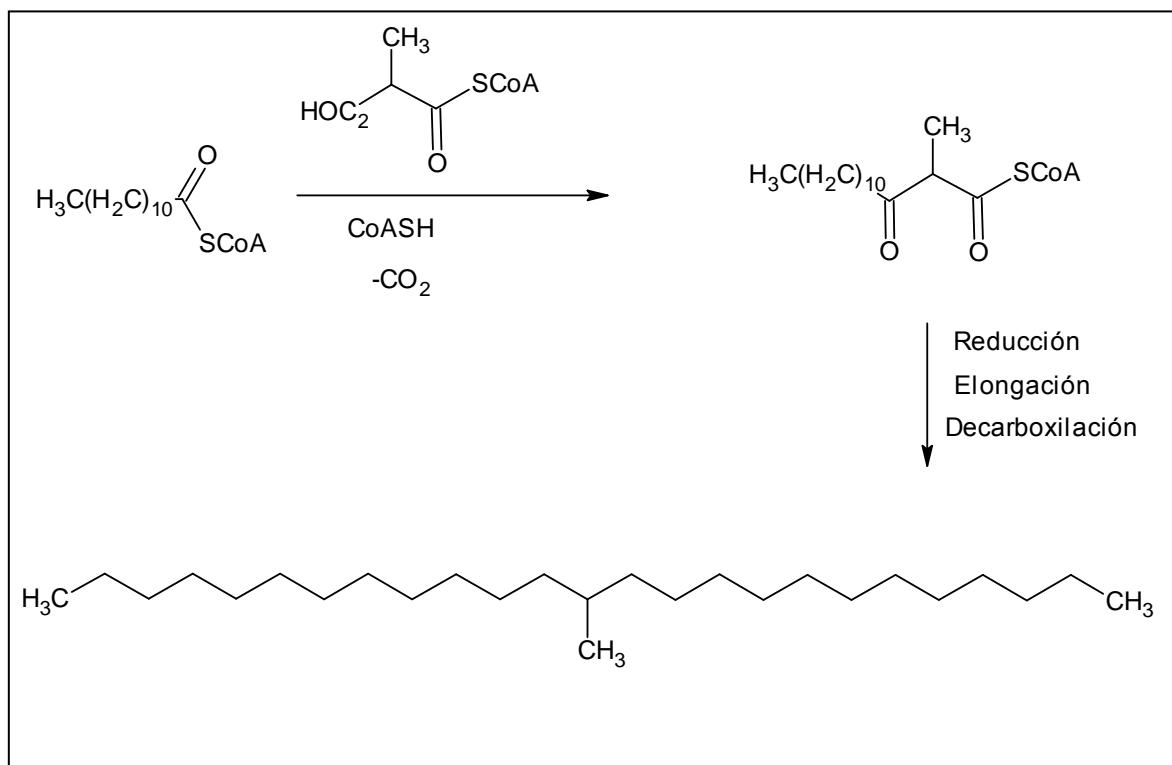


Figure 1.5. Ruta propuesta para la biosíntesis de 13-metilpentacosano en insectos. (Adaptado de Blomquist y Jackson, 1979).

1.6.2 Feromonas de largo alcance

Feromonas, un compuesto químico o mezcla de ellos liberado(s) por un organismo que provoca una reacción específica en un individuo receptor de la misma especie (Nordlund y Lewis, 1976), son importantes mediadores de la comunicación para insectos en su ambiente. Aunque las estructuras químicas de las feromonas presentan una amplia gama de funciones químicas, las feromonas pueden ser clasificadas en seis grupos de comportamiento: agregación, alarma, maduración, reclutamiento, territorial y sexual (Tillman et al., 1999). Las feromonas sexuales descritas para insectos pertenecientes al orden Coleóptera, corresponden a estructuras químicas complejas y diversas, desde cadenas acíclicas (ramificadas, no ramificadas con o sin grupos funcionales), a lactonas monocíclicas, macrólidos, compuestos aromáticos y heterociclos emitidos tanto por hembras como por machos (Stevens, 1998; Seybold y Vanderwel, 2003). Estas feromonas pueden producirse a través de modificaciones en la ruta biosintética de ácidos grasos, compuestos isoprenoides y metabolismo de aminoácidos, y estas modificaciones a menudo incluyen formación estereoespecífica de los productos finales. La abundancia de centros quirales en los componentes de feromonas de coleópteros, incrementa su complejidad y diversidad (Vogt, 2003). Algunos ejemplos se señalan en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Diversidad estructural de feromonas sexuales en insectos del orden Coleóptera (Stevens, 1998; Seybold y Vanderwel, 2003).

Especie	Familia	Compuestos	Emisor
<i>Xylotrechus pyrrhoderus</i>	Cerambycidae	(2S,3S)-octan-2,3-diol (2S)-2-hidroxioctan-3-ona	Macho
<i>Anthrenus flavipes</i>	Dermestidae	Ácido (3Z)-decenoico	Hembra
<i>Gnathotrichus sulcatus</i>	Curculionidae	(2S) y (2R)-6-metil-5-hepten-2-ol	Macho
<i>Sitophilus oryzae</i>	Curculionidae	(4S,5R)-5-hidroxi-4-metilheptan-3-ona	Hembra
<i>Diabrotica virgifera</i>	Chrysomelidae	Propionato de (1R,7R)-1,7-dimetildecilo	Hembra
<i>Lasioderma serricorne</i>	Anobiidae	(4S,6S,7S)-7-hidroxi-4,6-dimetilnonan-3-ona	Hembra
<i>Stegobium paniceum</i>	Anobiidae	2,3-dihidro-2,3,5-trimetil-6-(1-metil-2-oxabutil)-piran-4-ona	Hembra
<i>Holotrichia parallelia</i>	Scarabaeidae	(2S,3S)-2-amino-3-metilpentanoato de metilo	Hembra
<i>Exomala orientalis</i>	Scarabaeidae	7-(Z) y 7-(E)-tetradecen-2-ona	Hembra

Un tema a dilucidar en la producción de feromonas es determinar el origen de sus componentes, específicamente establecer si los componentes de las feromonas son sintetizados *de novo* o son derivados desde precursores obtenidos de la dieta, y utilizados directa o mínimamente alterados por el sistema enzimático de los insectos. Esta simple interrogante ha resultado difícil de responder y diferentes respuestas se han obtenido para los diferentes grupos de insectos (Blomquist y Vogt, 2003). A continuación se detallan algunos mecanismos.

1.6.2.1 Secuestro de compuestos desde hospederos

En Coleóptera, la secuestración de compuestos desde el hospedero para su posterior uso como feromona en su forma intacta parece ser poco común (Vanderwel y Oehschlager, 1987), quizás por la dificultad de distinguir experimentalmente, entre compuestos del hospedero que son liberados desde los alimentos masticados por el insecto, o desde las heces producidas por éste, y aquellos que son secuestrados por el insecto y liberado posteriormente. Por ejemplo, es posible que el escarabajo *Dendroctonus pseudotsugae* obtenga y secuestre el monoterpeno, limoneno desde su hospedero *Pseudotsuga menziesii*, durante la alimentación. Ambos sexos de *D. pseudotsugae* liberan limoneno con sus respectivos componentes de agregación en presencia de señales acústicas desde el sexo opuesto (Rudinsky et al., 1977). Por su parte, ambos sexos de *Scolytus multistriatus* responden al sesquiterpeno (2)- α -cubebeno, un atrayente que contiene su hospedero (*Ulmus* spp.). Quizás, como resultado del secuestro y liberación, el nivel de este compuesto a partir de *Ulmus* spp. no infestados e infestados se ve aumentado por el ataque de estos escarabajos (Tillman et al., 1999).

1.6.2.2 Modificación de compuestos provenientes de hospederos

La biosíntesis de feromonas derivadas de terpenos vía modificación de los compuestos provenientes de hospederos, ha sido estudiada mayoritariamente en el curculiónido *Anthonomus grandis*, y algunos escolítidos (Vanderwel y Oehschlager, 1987). La feromona sexual liberada por machos de *A. grandis* está compuesta por cuatro monoterpenos cíclicos (Tumlinson et al., 1969). Estudios de biosíntesis han indicado que dos isómeros geométricos, geraniol (*E*-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) y nerol (*Z*- 3,7-dimetil-2,6-octadien-

1-ol), son capaces de actuar como precursores de la feromona para *A. grandis* (Thompson y Mitlin, 1979). Cuando machos de *A. grandis* fueron inyectados o alimentados con geraniol y nerol, marcados radioactivamente, esta radioactividad fue incorporada en los cuatro componentes de la feromona. Otros estudios relacionados con biosíntesis de feromonas derivadas de terpenos, indican que machos de *Cryptolestes ferrugineus*, alimentados con farnesol marcado radioactivamente, fue incorporado en uno de los componentes de su feromona de agregación (4-E,8-E-4,8-dimetildecadien-10-olido) (Tillman et al., 1999).

1.6.2.3 Biosíntesis *de novo*

Las dos clases principales de feromonas de coleópteros, que se creen son sintetizadas *de novo*, son aquellas de origen isoprenoides y las derivadas de ácidos grasos.

Feromonas de origen isoprenoides. Estudios utilizando acetato, mevalonato y glucosa marcada radiactivamente, indicaron que machos de *A. grandis*, incorporaron el sustrato marcado en su feromona, estableciendo así, la capacidad de producción *de novo* en este coleóptero (Tillman et al., 1999). Por su parte, estudios de biosíntesis de la feromona de agregación en *Ips paraconfusus* indicaron que ipsdienol e ipsenol fueron producidos por los machos cuando éstos fueron expuestos a vapores de mirceno (Tillman et al., 1999) (Figura 1.6). Hendry et al. (1980) demostraron que la conversión de mirceno marcado radioactivamente a ipsdienol e ipsenol en machos de *I. paraconfusus* otorga un soporte directo al estudio antes señalado. Sin embargo, Byers y Birgersson (1990) cuestionaron si todo el mirceno proveniente del hospedero podría justificar el ipsenol e ipsdienol producido por los machos de *I. paraconfusus*. Estudios posteriores han demostrado que la producción de ipsdienol y E-mircenol por machos de *I. duplicatus* ocurre *de novo*, mediante la ruta

isoprenoide (Ivarsson et al., 1993). Otro estudio utilizando acetato y mevalolactona marcados radiactivamente, establecieron la síntesis *de novo* del componente de la feromona de agregación ipsdienol en machos de *I. pini*, e ipsenol e ipsdienol en machos de *I. paraconfusus* (Seybold et al., 1995).

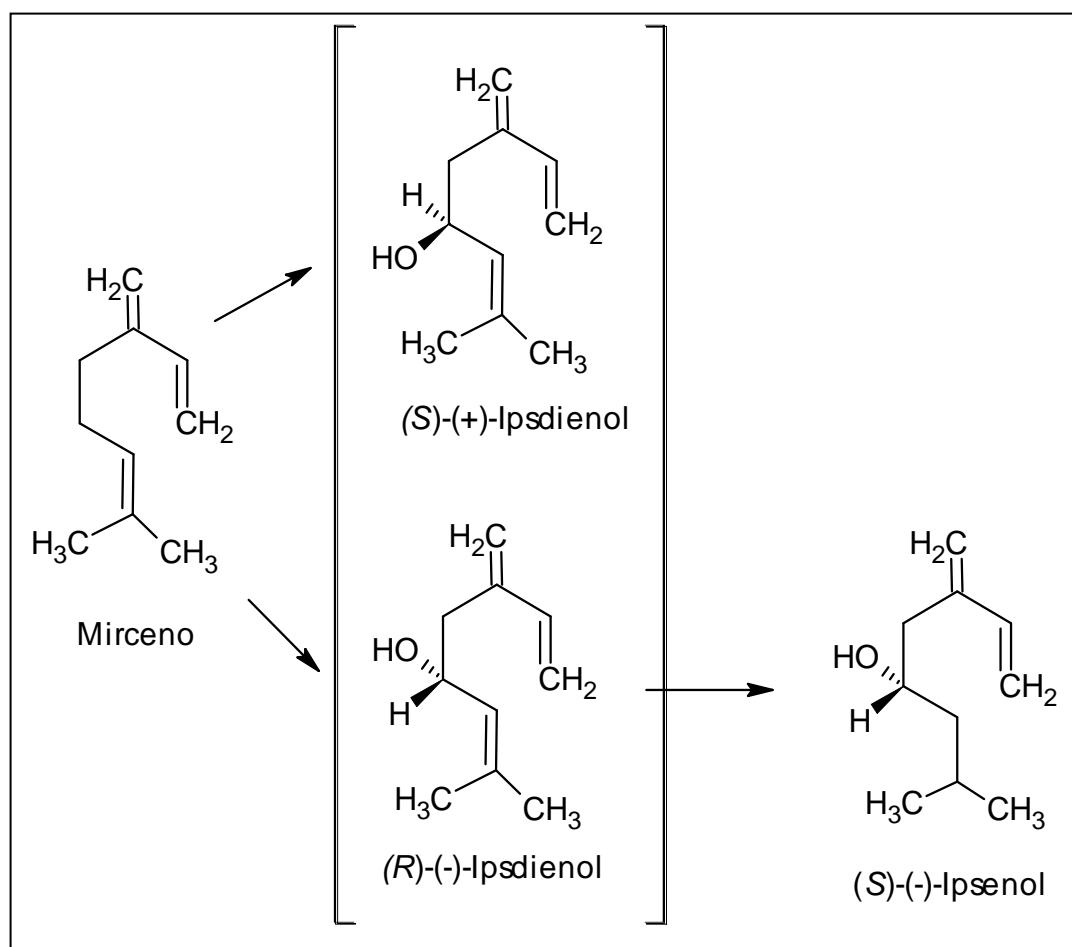


Figura 1.6. Conversión de mirceno a (S)-(+)-ipsdienol e (S)-(-)-ipsenol por machos de *Ips paraconfusus* (Adaptado de Tillman et al., 1999).

Así, *A. grandis* e *Ips* spp., son ejemplos de coleópteros que utilizan dos posibles rutas de biosíntesis de feromonas; modificación de terpenos obtenidos del hospedero, y producción *de novo*. En la ruta isoprenoide, la síntesis de isopentenil difosfato, se origina desde acetil-CoA vía HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A) y mevalonato como intermediarios centrales. La alta incorporación de ambos, acetato y mevalonato marcados radioactivamente en ipsdienol en machos de *I.pini*, indica la utilización de la ruta mevalonato para la síntesis de isopentenil difosfato y posteriormente los alcoholes monoterpénicos (Figura 1.7).

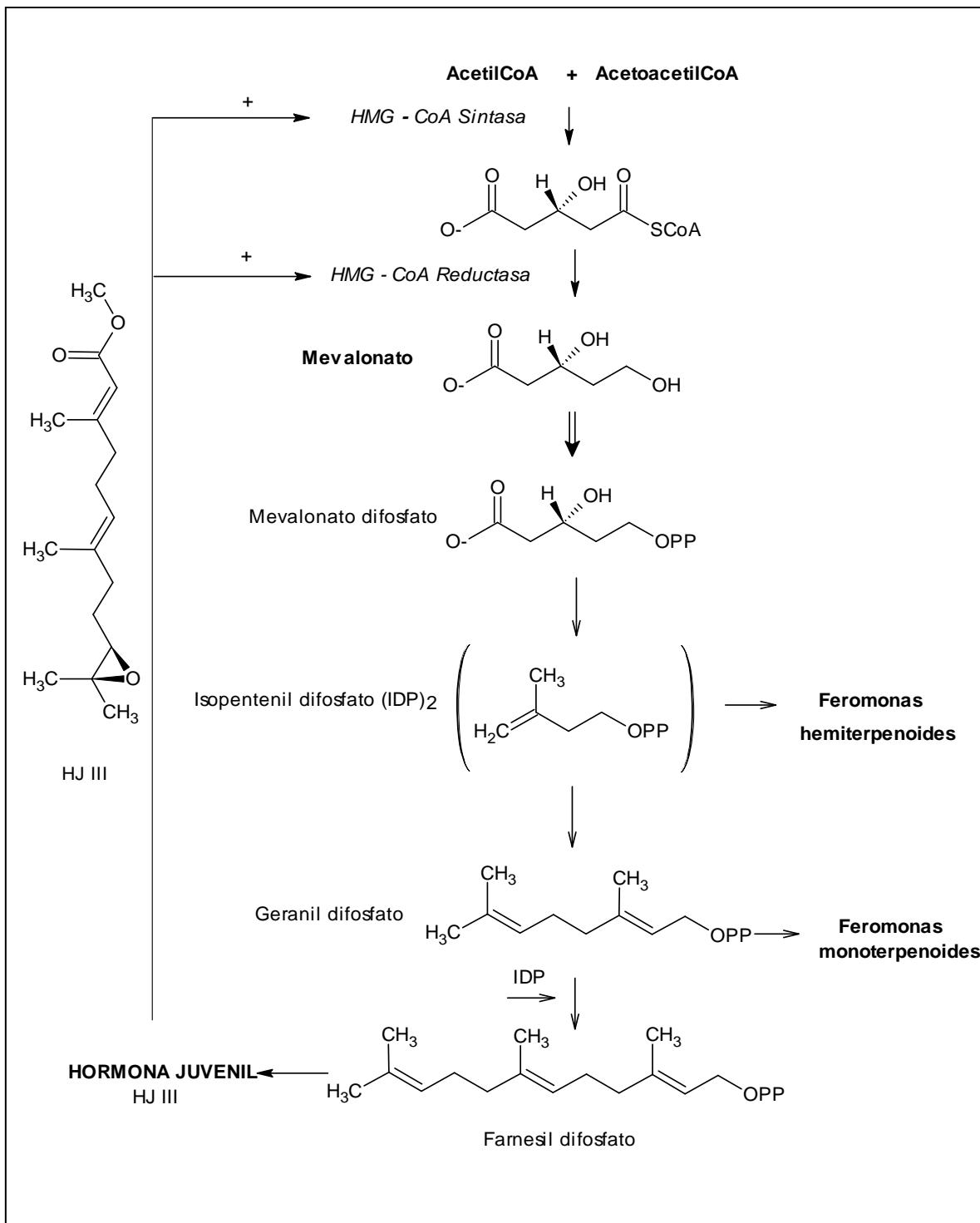


Figura 1.7. Esquema de biosíntesis *de novo* de feromonas de origen isoprenoide a través de la ruta de mevalonato en escarabajos (Adaptado de Seybold y Vanderwel, 2003).

Feromonas derivadas de ácidos grasos. Machos del género *Cryptolestes* y *Oryzaephilus* producen varios macrólidos como feromona de agregación, con dobles enlace en posiciones y geometría (Z), que podría indicar su origen en ácidos grasos como oléico y linoléico. Es más, ha sido demostrado que machos de *Cryptolestes ferrugineus* incorporaron ácidos oleico, linoleico y palmítico, marcados radioactivamente en su feromona macrocíclicas (Vanderwel et al., 1990). Estructuras similares de feromonas sexuales producidas por un número de especies pertenecientes a la familia Scarabaeidae, subfamilia Rutelinae, son lactonas de cinco miembros con una larga cadena hidrocarbonada insaturada, tal como (*R,Z*)-5-(-)-(1-octenil)oxaciclopantan-2-ona (buibuilactona) y (*R,Z*)-5-(-)-(1-decenil)oxaciclopantan-2-ona (japonilure). Utilizando precursores deuterados, se ha demostrado que la biosíntesis de estos compuestos lactónicos comienza con los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, involucrando desaturación seguida por 8-hidroxilación estereoespecífica, acortamiento de la cadena y ciclación (Leal, 1998) (Figura 1.8). Por su parte, hembras de *Tenebrio molitor*, sintetizan su feromona sexual, 4-metil-1-nonanol *de novo* a través de una modificación en la biosíntesis de ácidos grasos: La iniciación de la ruta con una unidad de propionato genera una cadena con número impar de carbono, la incorporación de una nueva unidad de propionato durante la elongación de la cadena, otorga la metil ramificación; la reducción del ácido metilnonanoico produce la feromona (Islam et al., 1999).

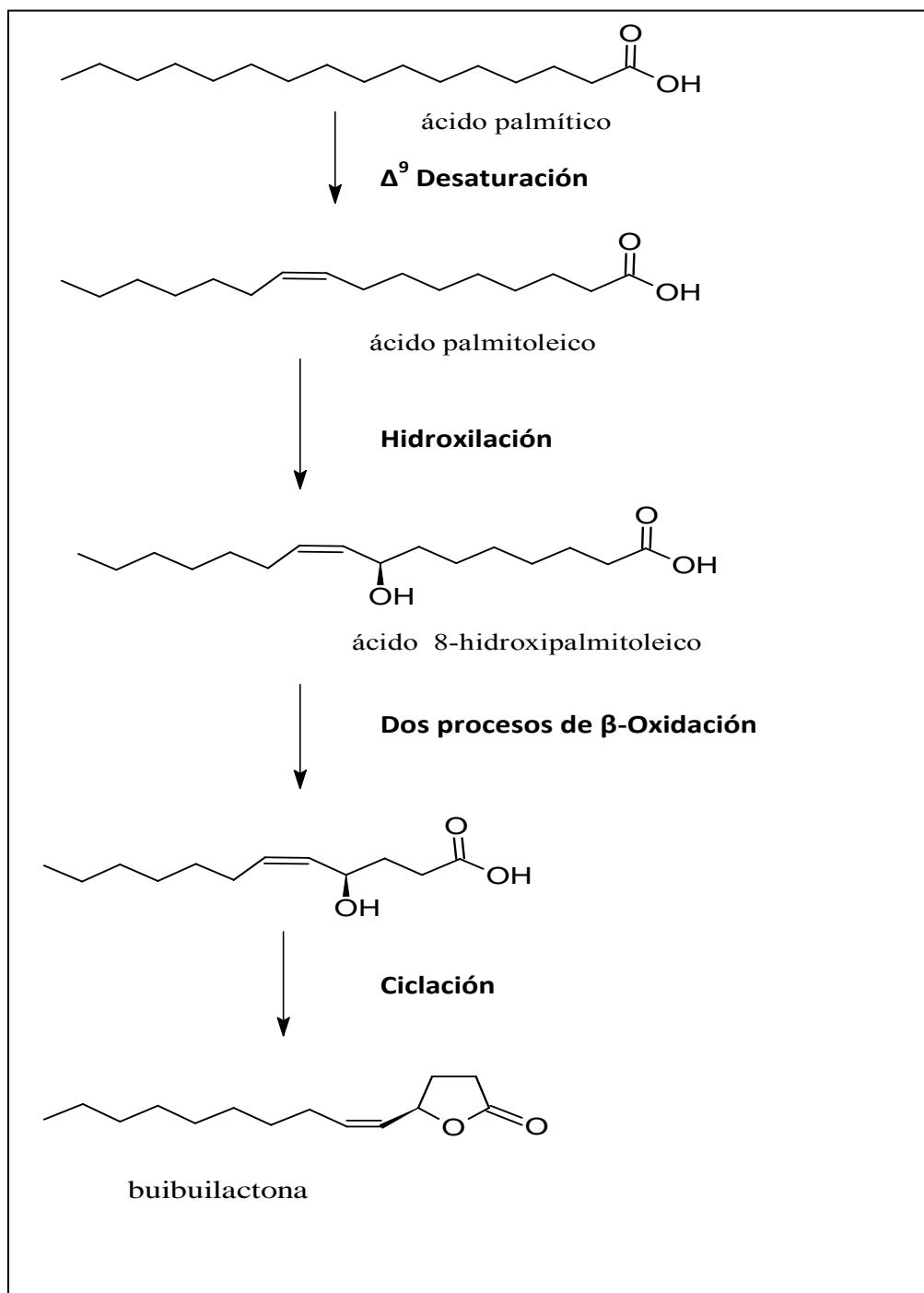


Figura 1.8. Biosíntesis de buibuilactona (Adaptado de Leal, 1998).

1.6.3. Regulación de la biosíntesis de feromonas

Se ha reportado que insectos pertenecientes al orden Coleóptera producen y/o emiten feromonas en respuesta a factores ambientales o fisiológicos. Estos factores incluyen la madurez del insecto, la presencia (o ausencia) del sexo opuesto, presencia (o ausencia) de alimento, y densidad de población; factores que pueden gatillar la biosíntesis de feromonas.

A la fecha, han sido propuestos dos mecanismos básicos para la regulación de la biosíntesis de feromonas en escarabajos. En algunos casos, la biosíntesis puede ser simplemente dependiente de la disponibilidad de precursores biosintéticos, Por ejemplo, *Dendroctonus ponderosae* y *D. brevicomis*, producen su feromona trans-verbenol cuando son expuestos a α -pineno, mientras que machos de *Ips Cembrae* expuestos a vapores de mirceno producen ipsenol e ipsdienol (Renwick y Dickens, 1979). En estos casos, la biosíntesis de feromona es aparentemente dependiente de la disponibilidad de precursores biosintéticos indicando que la producción de feromonas no es regulada directamente por el insecto. Sin embargo esta situación no es tan simple, ya que las enzimas responsables de la conversión no están permanentemente activas a través de la vida del escarabajo. Por ejemplo, sólo machos maduros de *I. paraconfusus* producen ipsdienol a partir de mirceno, mientras que machos inmaduros y hembras de todas las edades no producen ipsdienol, incluso si el precursor está presente (Byers, 1983). Claramente la habilidad para sintetizar feromonas debe ser gatillada en algún momento. Por más de dos décadas, ha existido el cuestionamiento sobre la capacidad de los escarabajos de corteza para secuestrar monoterpenos desde el hospedero encontrado durante la alimentación de larvas y adultos jóvenes que posteriormente liberan intermediarios secuestrados como feromonas cuando han alcanzado su madurez. Por su parte, se ha reportado que el tratamiento de *I. paraconfusus* con hormona juvenil III se

tradujo en la producción de ipsdienol incluso cuando los escarabajos no fueron expuestos a mirceno; más aún, no se encontró mirceno en los extractos de escarabajos. Una interpretación de estos resultados es que la hormona juvenil estimuló la conversión de un derivado de mirceno secuestrado, en feromona. Otros reportes, son también difíciles de interpretar a menos que se asuma que los escarabajos de corteza son capaces de almacenar monoterpenos del hospedero para su uso posterior (Vanderwel, 1994).

El mecanismo por el cual la hormona juvenil regula la biosíntesis de feromonas aún no es bien dilucidado. Dickens et al. (1988) han propuesto que la hormona juvenil puede regular la respuesta antenal frente a la feromona y de esta manera regular su producción. Así la producción de feromona de agregación en machos de *A. grandis*, es estimulada por antenectomía, y el tratamiento tópico con análogo de la hormona juvenil (JHA), estimula la producción de feromona y disminuye la sensibilidad de los receptores olfativos de la antena. Un segundo mecanismo de regulación propuesto indica que la hormona juvenil puede actuar indirectamente a través de una hormona cerebral (BH), para estimular la biosíntesis de feromona en machos de *Ips paraconfusus* (Tillman et al., 1999).

1.6.4. Regulación de la liberación de feromonas

La síntesis de feromonas puede ocurrir durante la vida del insecto adulto, pero la liberación de la feromona sintetizada generalmente ocurre solo durante ciertas circunstancias ambientales y fisiológicas. Por ejemplo, los escarabajos de la corteza solo liberan su feromona durante el día, mientras que polillas adoptan una conducta de llamado y liberación de feromona solo por la noche. Por su parte, hembras que se aparean en más de una

oportunidad liberan su feromona periódicamente, mientras que hembras que se aparean una sola vez, usualmente terminan su liberación después del apareamiento (Klowden, 2007).

Raina et al. (1994), señalan que la producción y liberación de feromonas sexuales en muchas especies de insectos son claves en la secuencia de eventos que llevan al apareamiento. En general, el apareamiento causa en las hembras un cambio de conducta, desde sexualmente receptiva a carente de receptividad, llegando a la oviposición. Estudios sobre factores que afectan la producción o emisión de feromona en el coleóptero *Bruchidius atrolineatus*, realizados por Nammour et al. (1988), indican que la emisión de la feromona sexual por hembras, depende de la edad y se correlaciona con la actividad ovárica. Hembras en diapausa no producen feromona, sin embargo, todas las hembras se vuelven atractivas dentro del primer o segundo día después de la inducción de la vitelogénesis. En Coleóptera, la vitelogénesis y producción de feromonas están bajo el control de Hormona Juvenil, que podría explicar la sincronización entre los dos fenómenos (Menon, 1970). Qi y Burkholder (1982), señalan que en varios insectos, particularmente en Coleóptera, el atractivo de las hembras desaparece de manera rápida durante la primera hora después del apareamiento. Esto puede deberse a una disminución en la cantidad de feromona producida o a una interrupción de su emisión, como ocurre con *Dacus oleae* (Mazomenos, 1984) o *Drosophila melanogaster* (Tompkins y Hall, 1981). Esta inhibición es temporal, y algunas hembras recuperan su capacidad de atraer dentro de las 48 horas posteriores al apareamiento. La desaparición del atractivo después del apareamiento puede atribuirse a una estimulación mecánica durante la copulación o la distensión de la bursa copulatrix después de la emisión del espermatóforo, como ocurre en *Acanthoscelides obtectus* (Nammour et al., 1988). En *D. melanogaster*, la inhibición de la capacidad de las hembras de aparearse por más de una vez,

ha sido atribuida tanto al péptido sexual (Acp70A), producido por la glándula accesoria de machos, como por el esperma almacenado (Yamane et al., 2008); en este punto se han descrito dos mecanismos alternativos; el primero relaciona el número de espermatozoides con la estimulación del receptáculo ventral de las hembras. Este receptáculo es inervado por neuronas que responden al movimiento de los espermatozoides, activando centros inhibitorios a nivel del sistema nervioso central (SNC). El segundo, bioquímicamente indirecto, se relaciona con un químico inhibitorio liberado por el esperma o producido por las hembras en respuesta a la presencia de éste. Dicho químico sería transportado por la hemolinfa hasta el SNC (Scott, 1987).

1.7 Hipótesis

La conducta sexual de individuos de *A. superciliosus* está mediada por feromonas de corto y largo alcance responsables del apareamiento entre machos y hembras.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Identificar feromonas asociadas a la conducta de apareamiento entre individuos adultos de *A. superciliosus*.

1.8.2 Objetivos específicos

- i.** Establecer el protocolo de conducta de apareamiento de *A. superciliosus*.
- ii.** Identificar feromonas de corto alcance asociadas a la conducta de apareamiento de *A. superciliosus*.
- iii.** Identificar feromonas de largo alcance asociadas a la conducta de apareamiento de *A. superciliosus*.
- iv.** Evaluar en terreno la efectividad de los compuestos activos como feromonas sexuales durante la temporada Diciembre 2008 – Febrero 2009.

1. 9 Referencias

- Allison, J., J. Bordenand, y S. Seybold. 2004.** A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). Chemoecology. 14: 123-150.
- AFIPA. 2006.** Manual Fitosanitario. Asociacion de Distribuidores de Plaguicidas, Santiago, Chile, 677 pp.
- Aguilera, A. 1988.** Plagas del Arándano en Chile. En Lobos, W. (Ed). Seminario: El Cultivo del Arándano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca.Temuco, Chile. Serie N°2. pp. 109- 131.
- Aguilera, A. 1995.** Control selectivo de plagas en frutales de la zona sur, 141-180, *en* A. Aguilera, A. Andrade, J. Díaz, N. Espinoza, R. Galdames y H. Norambuena (Ed). *Seminario de Protección Vegetal*. Offset Carillanca, Temuco.
- Aguilera, A., y R. Rebolledo. 2001.** Estudios Larvarios de *Aegorhinus superciliosus* (GUERIN, 1830) (Coleoptera: Curculionidae) Revista Chilena de Entomología 28: 5-8.
- Aguilera, A., M. Zampezz, X. Araneda, C. Klein, y R. Rebolledo. 2009.** Efectividad de la azadirachtina en la inhibición de la embriogénesis de *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera : Curculionidae). Idesia. 27: 47-55.
- Ancos, B., E. González, y P. Cano. 1999.** Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A. 208:33-38.
- Beekwilder, J., R. Hall, y C. Ric de Vos. 2005.** Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. BioFactors 23:197–205.
- Blomquist, G., y L. Jackson. 1979.** Chemistry and biochemistry of insect waxes. Progress in Lipid Research. 17: 319-345.
- Blomquist, G., D. Nelson, y M. de Renobales.1987.** Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 6: 227-265.
- Blomquist, G., y R. Vogt. 2003.** Biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles- introduction and overview. In Insect pheromone biochemistry and molecular biology. G. Blomquist and R. Vogt (Eds). Elsevier, The Netherlands. 3-18.
- Byers J., y G. Birgersson. 1990.** Pheromone production in a bark beetle independent of myrcene precursor in host pine species, Naturwissenschaften 77: 385.

Byers, J. 1983. Influence of sex, maturity and host substances on pheromones in the guts of the bark beetles, *Ips paraconfusus* and *Dendroctonus brevicomis*. Journal of Insect Physiology. 29 : 5-13.

Carrillo, R. 1993. Plagas insectiles en arbustos frutales menores, pp.63-86. En P. Barriga y M. Neira (eds.), Cultivos no tradicionales. Uniprint, Valdivia, Chile.

Carrillo, R., H. Pérez, y M. Neira. 2002. Comportamiento de oviposición de *Aegorhinus superciliosus* (Guerin) (Coleoptera: Curculionidae). *Agro sur* 30: 47-50.

Cisternas, E., A. France, L. Devotto, y M. Gerding. 2000. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas a la frambuesa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chillán., Chile. Boletín INIA N° 37. 126 pp.

Cisternas, E. 2009. Controladores biológicos de *Aegorhinus superciliosus* (Guérin-Méneville) (Coleoptera: Curculionidae) en Chile. 2º Simposio Chileno de Control Biológico, Centro Tecnológico de Control Biológico, 12-15 Mayo, Chillán, Chile.

Diehl, P. 1975. Synthesis and release of hydrocarbons by the oenocytes of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Journal of Insect Physiology. 21: 1237-1246.

Dickens J., W. McGovern, y G. Wiygul. 1988. Effects of antennectomy and a juvenile hormone analog on pheromone production in the boll weevil (Coleoptera:Curculionidae). Journal of Entomological Science 23: 52-58.

Elgueta, M. 1993. Las especies de Curculionoidea (Insecta:Coleoptera) de interés agrícola en Chile. Museo Nacional de Historia Natural. Publicación Ocasional 48:1-79.

Fedefruta.2008. Arándanos: Nuevo escenario demanda cambios. Revista Fedefruta. N° 121. 22-25.

France, A., M. Gerding, M. Gerding, y A. Sandoval. 2000. Patogenicidad de una Colección de Cepas Nativas de *Metarhizium* spp Y *Beauveria* spp. En *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* Y *Otiorhynchus sulcatus*. Agricultura Técnica 60: 205-215.

Fukaya, M., H. Yasui, T. Akino, T. Yasuda, S. Wakamura, S. Satoda, y S. Senda. 2000. Hydrocarbon components in contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) and pheromonal activity of synthetic hydrocarbons. Entomological Science 3: 211-218.

Gerding, M. 1999. Agentes de Control Biológico de Plagas. Informativo Agropecuario Bioleche-INIA Quilamapu. Publicaciones Quilamapu.

Gilby, A. 1965. Lipids and their metabolism in insects. Annual Review of Entomology. 10: 141-160.

Ginzel, M., J. Millar, y L. Hanks. 2003a. (Z)-9-pentacosene - contact sex pheromone of the locust borer, *Megacyllene robiniae*. Chemoecology. 13:135-141.

Ginzel, M., G. Blomquist, J. Millar y L. Hanks. 2003b. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. Journal of Chemical Ecology. 29: 533–545.

Ginzel, M., J. Moreira, A. Ray, J. Millar, y L. Hanks. 2006. (Z)-9-Nonacosene—Major component of the contact sex pheromone of the beetle *Megacyllene caryae*. Journal of Chemical Ecology. 32: 435-451.

Guerrero, J., y A. Aguilera. 1989. Plagas y enfermedades en el arándano chileno. Próxima Década 76:24-29.

Hazir, S., H. Kaya, P. Stock, y N. Keskin. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steiner nematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. Turkish Journal of Biology 27: 181-202.

Hendry, L., B. Piatek, L. Browne, D. Wood, J. Byers, R. Fish, y R. Hicks. 1980. In vivo conversion of a labelled host plant chemical to pheromones of the bark beetle *Ips paraconfusus*. Nature 284: 485.

Islam, N., R. Bacala, A. Moore, y D. Vanderwel. 1999. Biosynthesis of 4-methyl-1-nonanol: Female-produced sex pheromone of the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 29: 201-208.

Ivarsson, P., F. Schlyter, y G. Birgersson. 1993. Demonstration of de novo pheromone biosynthesis in *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae): Inhibition of ipsdienol and E-myrcenol production by compactin. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 23: 655–662.

Klowden, M. 2007. Physiological systems in insects. Second Edition. Elsevier. The Netherlands. 688 pp.

Kong, J. 2009. Análisis económico del rubro berries. Consorcio Tecnológico de la Fruta. Inia Raihuén. <http://www.centrotecnologicoberriesdelmaule.cl/documentos/1.pdf>. Leído: 06 de Agosto de 2009.

Kuschel, G. 1951. La subfamilia Aterpinae en América. Revista Chilena Entomología. 1: 205-244.

Lacey, L., R. Frutos, H. Kaya, y P. Vail. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. Biological Control 21: 230–248.

Leal, W.S. 1998. Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. Annual Review of Entomology 43: 39–61.

Major, M., y G. Blomquist. 1978. Biosynthesis of hydrocarbons in insects: Decarboxylation of long chain acids to n-Alkanes in *Periplaneta*. Lipids. 13: 323:328.

Mazomenos, B. 1984. Effect of age and mating on pheromone production in the female olive fruit fly *Dacus oleae*. Journal of Insect Physiology, 30: 765-769.

Menon, M. 1970. Hormone-pheromone relationship in the beetle, *Tenebrio molitor*. Journal of Insect Physiology. 16:1123-1139.

Merino, L., y A. France. 2009. Nematodos entomopatógenos: Control biológico de insectos plaga de importancia económica. Tierra Adentro. 84:24-25.

Meynet, M. 1997. Preferencia del adulto de *Aegorhinus superciliatus* (Guerin) (Coleoptera:Curculionidae) frente a diferentes cultivares de frambueso y un cultivar de mora híbrida. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de La Frontera Temuco, Chile. 69pp.

Molina, J. 1997. Efectos de la antibiosis vegetal sobre la actividad de nemátodos entomopatógenos (Rhabditida:Steinerinematidae. Heterorhabditidae) en el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Especialidad en biotecnología microbiana). Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. México. 163 pp.

Morales, C. 2009. Berries en la región del Maule: Acción del Inia en un rubro concentrado en la agricultura familiar campesina. <http://nododeberries.cl/documentos/publicacion1.pdf>. Leído: 03 de Agosto de 2009.

Morgan, E. 2004. Biosynthesis in insects. The Royal Society of Chemistry, UK.199 pp.

Nammour. D., J. Huignard, y J. Pouzat. 1988. A female sex pheromone in *Bruchidius atroxlineatus* (Pic) (Coleoptera, Bruchidae): analysis of the factors affecting production or emission of this pheromone Physiological Entomology. 13: 185-192.

Nelson, D. 1969. Hydrocarbon synthesis in the American cockroach. Nature. 221: 854-855.

Nojima, S., C. Schal, F. X. Webster, R. Santangelo, y W. Roelofs. 2005. Identification of sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica*. Science 307: 1104-1106.

Nojima, S., K. Shimomura, H. Honda, I. Yamamoto, y K. Ohsawa. 2007. Contact sex pheromone components of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. Journal of Chemical Ecology. 33: 923-933.

Nordlund, D., y W. Lewis. 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. Journal of Chemical Ecology. 2: 211-220.

Ofek, I., J. Goldhar, y N. Sharon. 1996. Anti *Escherichia coli* adhesion activity of cranberry and blueberry juices. Advances in Experimental and Medical Biology. 408: 179-183.

Ovalle, C., M. González, A. del Pozo, J. Hirzel, y V. Hernaiz. 2007. Cubiertas vegetales en producción orgánica de frambuesa: Efectos sobre el contenido de nutrientes del suelo y en el crecimiento y producción de las plantas. Agricultura Técnica. 67:271-280.

Parra, L., A. Mutis, A. Aguilera, R. Rebolledo, y A. Quiroz. 2009. Estado del conocimiento sobre el cabrito del frambueso (CF), *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae) Idesia. 27: 57-65

Pérez, H. 1994. Descripción de aspectos morfológicos, biológicos y de comportamiento de *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera:Curculionidae). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Agronomía, Universidad Austral de Chile, Valdivia. 102pp.

Peschke, K., y M. Metzler. 1987. Cuticular hydrocarbons and female sex pheromones of the Rove beetle, *Aleochara curtula* (Goeze) (Coleoptera : Staphylinidae). Insect Biochemistry 17: 167-178.

Pino, C. 2007. Descripción del desarrollo vegetativo y de las características físicas y químicas de los frutos de cuatro clones de arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Agronomía, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.74pp.

Prado, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Publicaciones Estación Experimental La Platina, Santiago. 203 p.

Qi, Y., y W. Burkholder. 1982. Sex pheromone biology and behavior of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Journal of Chemical Ecology. 8: 527-534.

Raina, A., T. Kingan, y J. Giebultowicz. 1994. Mating-induced loss of sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantria dispar*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 25:317-327.

Renwick, J., y J. Dickens. 1979. Control of pheromone production in the bark beetle, *Ips cembrae*. Physiological Entomology. 4: 377-381.

Reyes, G. 1993. Aspectos morfológicos y biológicos de la especie *Aegorhinus superciliatus* (Coleoptera:Curculionidae). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Agronomía, Universidad Austral de Chile, Valdivia. 90pp.

Reyes, M. 2009. Comercio exterior frutícola en la temporada 2007/08 y perspectivas para 2009. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 10 pp.

Romer, F. 1980. Histochemical and biochemical investigations concerning the function of larval oenocytes of *Tenebrio molitor L.*(Coleoptera, Insecta). Histochemistry 69: 69-84.

Rudinsky, J., M. Morgan, L. Libbey, y T. Putnam. 1977. Limonene released by the scolytid beetle *Dendroctonus pseudotsugae Z.* angew. Entomol. 82: 376–380.

Sánchez, E. 2006. Diagnóstico y proyección de la producción de arándanos en la zona sur de Chile. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Agronomía, Universidad Austral de Chile, Valdivia. 93pp.

Scott, D. 1987. The timing of the sperm effect on female *Drosophila melanogaster* receptivity. Animal Behaviour. 35: 142-149.

Sepúlveda, M., M. Gerding, y A. France. 2008. Entomopatógenos BioInia: Un Producto de la investigación. Tierra Adentro. 81: 22-24.

Seybold, S., D. Quilici, J. Tillman, D. Vanderwel, D. Wood, y G. Blomquist. 1995. De novo biosynthesis of the aggregation pheromone components ipsenol and ipsdienol by the pine bark beetle *Ips paraconfusus* Lanier and *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). Proceedings of the National Academy of Sciences. 92: 8393-8397.

Seybold, S., y D. Vanderwel. 2003. Biosynthesis and endocrine regulation of pheromone production in the Coleoptera. en: Blomquist, G.J., Prestwich, G.D. (Eds.), Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 137–200.

Singer, T. 1998. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American Zoologist* 38: 394–405.

Smart, G. 1995. Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. Supplement to the Journal of Nematology 27: 529-534.

Soler, A. 1994. Efectividad de algunos reguladores de crecimiento en la inhibición de la embriogénesis de *Aegorhinus superciliatus* (G.) (Coleoptera: Curculionidae). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Stevens, I.D.R. 1998. Chemical structures and diversity of pheromones, 135-179, en P. Howse, I. Stevens and O. Jones.(eds.). Insect pheromones and their use in pest management. Chapman & Hall.London.

Sugeno, W., M. Hori, y K. Matsuda. 2006. Identification of the contact sex pheromone of *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera: Chrysomelidae). Applied Entomology and Zoology. 41: 269–276.

Tanaka, K., K. Ohsawa, H. Honda, y I. Yamamoto. 1981. Copulation release pheromone, erectin, from the azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis* L.). Journal of Pesticide Science. 6:75–82.

Thompson, A., y N. Mitlin. 1979. Biosynthesis of the sex pheromone of the male boll weevil from monoterpenic precursors. Insect Biochemistry. 9: 293–294.

Tillman, J., S. Seybold, R. Jurenka, y G. Blomquist. 1999. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29: 481–514.

Tompkins, L., y J. Hall. 1981. The different effects on courtship of volatile compounds from mated and virgin *Drosophila* females. Journal of Insect Physiology. 27: 17-21.

Tumlinson, J., D. Hardee, R. Gueldner, A. Thompson, P. Hedin, y J. Minyard. 1969. Sex Pheromones Produced by Male Boll Weevil: Isolation, identification, and synthesis. Science. 166: 1010-1012.

Urtubia, I., y A. France. 2007. Formulaciones de hongos entomopatógenos para el control de plagas en agricultura. Tierra Adentro.77:46-49.

Vanderwel, D., y A. Oehschlager. 1987. Biosynthesis of pheromones and endocrine regulation of pheromone production in Coleoptera. In: Blomquist, G.J., Prestwich, G.D. (Eds.), Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 175–215.

Vanderwel, D. 1994. Factors affecting pheromone production in beetles. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 25: 347–362.

Vogt, R. 2003. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. 391–445 pp, in G. J. Blomquist and R. G. Vogt. Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, Oxford.

Wang, Y., C.Chang, J.Chou, H. Chen, X. Deng, B. Harvey, J. Cadet, y P.Bickford. 2005. Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage. Experimental Neurology. 193:75-84.

Wedge, D., K. Meepagala, J. Magee, S. Smith, G. Huang, y L. Larcom. 2001. Anticarcinogenic activity of strawberry, blueberry, and raspberry extracts to breast and cervical cancer cells. Journal of Medicinal Food.4: 49-51.

Yamane. T., Y. Kimura, M. Katsuhara, y T. Miyatake. 2008. Female mating receptivity inhibited by injection of male-derived extracts in *Callosobruchus chinensis*. Journal of Insect Physiology 54: 501–507.

Zhang, A., J. Oliver, K. Chauhan, B. Zhao, L. Xia, y Z. Xu. 2003. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) Naturwissenschaften. 90: 410 - 413.

Zschau, B. 2009. Región del Maule: Su importancia en el crecimiento exportador de las frambuesas. Boletín de gestión digital N°1. Nodo de berries. Disponible en: <http://www.nododeberries.cl/documentos/gestion1.pdf>. Leído: 01 de Agosto de 2009.

Capítulo 2

*Feromonas de corto alcance asociadas a la
conducta de apareamiento de
*A. superciliosus.**

Resumen

Numerosas investigaciones en coleópteros señalan que hidrocarburos cuticulares de hembras son usados como feromonas de corto alcance o de contacto. En este capítulo se entrega evidencia del uso de una feromona de contacto en la conducta de apareamiento de *A. superciliatus*. Los machos montan a las hembras sólo después de tocar su cuerpo con las antenas, y sólo 33% de los machos intentaron copular con hembras muertas lavadas con solvente. Cuando una cápsula de vidrio que simula el cuerpo de una hembra, fue cubierta con extracto cuticular de hembra, los machos mostraron una conducta similar a aquella observada frente a las hembras. El análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) de los extractos cuticulares de insectos de ambos sexos, indicó que machos y hembras comparten una serie de hidrocarburos, pero la abundancia relativa de algunos de estos compuestos difiere entre los sexos. Los resultados de este estudio sugieren que lípidos cuticulares median la conducta de apareamiento del burrito del frambueso, y entrega la primera evidencia de la participación de feromonas de contacto en curculiónidos.

Palabras clave: *Aegorhinus superciliatus*, burrito del frambueso, conducta de apareamiento, feromona de contacto.

Abstract

Numerous investigations of insect species have shown that a subset of female cuticular hydrocarbons is used as short-range or contact pheromones. In this chapter is showed evidence about use of contact pheromones in mating behavior of *Aegorhinus superciliosus*. Males mounted females only after antennal contact with the female's cuticle, and only 33% of the males attempted to mate with dead females washed with solvent. When a glass rod (dummy) was coated with female cuticular extracts, males exhibited behaviors similar to those observed with females. A preliminary gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of cuticular extracts indicated that males and females share a series of aliphatic hydrocarbons, but that the relative abundance of some of these compounds differ between the sexes. These results suggest that cuticular lipids mediate mating behavior of the raspberry weevil and provide the first evidence of contact pheromones in curculionids.

Key Words: *Aegorhinus superciliosus*, raspberry weevil, mating behavior, contact pheromone.

2.1 Introducción

Las ceras superficiales o lípidos de todos los organismos son responsables tanto del carácter impermeable de su superficie, como también evitan la excesiva pérdida de agua cuando la humedad disponibles es baja. Estudios de la cutícula de insectos, señalan que la capa de lípido es una mezcla compleja de hidrocarburos de cadena larga, ácidos grasos, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, que protegen al insecto de la desecación (Gibbs, 1998). Alguno de estos compuestos tienen roles secundarios como: a) barrera de microorganismos; b) barrera contra insecticidas; c) feromonas sexuales de contacto, y d) kairomonas para parásitos de insectos y depredadores (Nelson, 1978). La función de hidrocarburos cuticulares como feromonas de contacto ha sido mayoritariamente reportada para insectos pertenecientes a la familia Cerambycidae, y su estructura química ha sido dilucidada en varias especies (Fukaya et al., 1996; Ginzel et al., 2003; Zhang et al., 2003).

A la fecha no existen estudios sobre la participación de feromonas en la conducta de apareamiento de *A. superciliosus*. Aquí se reporta evidencia de la participación de una feromona de contacto presente en la cutícula de hembras que elicitá una respuesta sexual por parte de machos conespecíficos.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Insectos

Adultos hembras y machos de *A. superciliosus* fueron recolectados en forma manual y provisto de guantes, desde un huerto comercial de frambuesa, ubicado en la comuna de Vilcún, región de La Araucanía, durante el verano de 2007. Los individuos fueron

dispuestos individualmente en placas de Petri, y trasladados al Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de La Frontera. Solo fueron utilizados aquellos insectos que eran capaces de caminar y presentaban su estructura anatómica intacta.

2.2.2 Obtención y análisis de extractos cuticulares de cuerpo entero

Los hidrocarburos cuticulares fueron extraídos según la metodología descrita por Ginzel et al. (2006) con algunas modificaciones. Cinco machos y cinco hembras muertos por congelación (-18 °C por 20 minutos), fueron sumergidos individual y sucesivamente en siete alícuotas de 2 mL de pentano durante 2 minutos cada una. Las siete alícuotas fueron combinadas y concentradas hasta 1 mL con nitrógeno gaseoso a un flujo de 25 mL/min. Los extractos fueron analizados por cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa (GC-MS). El cromatógrafo de gases se encuentra equipado con una columna capilar BP-1 (30 m x 0,22 mm x 0,25 µm), utilizando Helio como gas de arrastre. La columna fue programada desde 40°C hasta 290°C con un incremento de 5°C/min, y permaneciendo a 290°C por 5 minutos. La temperatura del inyector y línea de transferencia hacia el detector de masas se mantuvieron a 250°C.

Los componentes de los extractos cuticulares fueron identificados por comparación de sus índices de Kovats, y espectros de masa con aquellos de estándares comerciales, y espectros de masas presentes en librería (NIST ver. 2.0, pherobase y NIST webbook), citados por Babushok et al. (2007). La abundancia relativa de los hidrocarburos cuticulares fueron calculadas usando los datos obtenidos desde los cromatogramas. Las diferencias entre las medias de las abundancia relativas de los específicos hidrocarburos entre sexos fueron analizadas mediante t-Student ($\alpha = 0,05$, $N = 5$ para cada uno de los sexos).

2.2.3 Protocolo de apareamiento

Para crear un etograma que describa la conducta de apareamiento de *A. superciliosus*, se introdujo una hembra viva y un macho en una placa de Petri de 5 cm de diámetro (N=30). La conducta fue registrada por 5 minutos con una cámara de video (SONY DCR-HC46) para confirmar las observaciones visuales. El etograma fue construido usando X^2 test (Martin y Bateson, 1994), y las transiciones individuales fueron determinadas según el método descrito por Sokal y Rohf (1981).

2.2.4 Bioensayos con hembras

Se modificó el método descrito por Ginzel et al. (2003). Los tratamientos aplicados a las hembras fueron: 1) Hembras vivas; 2) Hembras muertas por congelación; 3) Hembras muertas por congelación y lavadas con solvente; y 4) Hembras muertas por congelación, lavadas con solvente y cubiertas con extracto cuticular de hembra. Para el tratamiento 1, una hembra viva fue puesta en una placa de Petri junto a un macho, y la conducta fue registrada con una cámara de video por 5 minutos. Para el tratamiento 2, una hembra muerta por congelación (-18°C por 20 minutos) fue dejada a temperatura ambiente por 25 minutos, para luego ser presentada a un macho, según lo descrito previamente. Para el tratamiento 3, los componentes cuticulares fueron removidos con pentano desde una hembra muerta por congelación según la metodología descrita anteriormente. Esta hembra lavada fue expuesta al aire por 30 minutos para permitir la evaporación del solvente, y luego fue presentada a un macho. En el tratamiento 4, se aplicó 1 mL de extracto cuticular, equivalente a una hembra (FE), sobre una hembra lavada con solvente. Nuevamente se dejó evaporar el solvente y se presentó a un macho. Un ensayo fue designado como un “intento de apareamiento”, si el macho toca a la hembra con sus antenas, la monta, extrude e inserta su edeago (pasos 1 -4

según etograma). Si después de tocar a la hembra con sus antenas, el macho continúa caminando o bien monta a la hembra, pero no extrude su edeago, el ensayo fue catalogado como “no intento de apareamiento” (pasos 1 y 2 en etograma). La frecuencia de machos que intenta y no intentan aparearse fueron analizados usando test de Fisher (Conover, 1999), comparando el tratamiento con el control (hembra viva). Se ensayaron 4 hembras, las que fueron presentadas a 10 machos.

2.2.5 Bioensayos con cápsula de vidrio que simula una hembra.

La actividad como feromona de contacto de los extractos cuticulares, así como la de los hidrocarburos identificados y la mezcla de estos, fue evaluada utilizando la metodología descrita por Fukaya et al. (1999). Una cápsula de vidrio (5 mm de diámetro por 15 mm de largo) fue cubierta con 500 µl de diferentes soluciones: 1) Extracto cuticular de hembra (0,5 FE); 2) Extracto cuticular de macho (0,5 ME); 3) Tricosano, pentacosano, 2-metilhexacosano, heptacosano, 13-metilheptacosano y nonacosano formulados en forma individual en soluciones pentánicas de 10ng/µl, y 4) Mezcla de hidrocarburos señalados en 3 (feromona sintética), formulada según la relación mostrada en los cromatogramas (Tabla 2.2). Un macho fue introducido a una placa de Petri en cuya parte central se fijó una cápsula de vidrio, registrándose la conducta por 10 minutos. A raíz de la ausencia de orificio en la cápsula de vidrio, el macho está impedido de insertar su edeago, por ello, una respuesta se consideró como “positiva” si el macho tocó la cápsula de vidrio con sus antenas, la montó, y eyectó su edeago (pasos 1-3 en etograma).

2.3 Resultados

2.3.1 Conducta de apareamiento

El primer paso de la conducta consistió en el acercamiento del macho hacia la hembra, procediendo a tocarla con sus antenas ya sea desde una posición frontal, lateral o posterior (Figura 2.1, paso 1). Cuando el contacto fue frontal, el macho caminó sobre el cuerpo de la hembra, explorándolo con sus antenas desde la cabeza hasta el final de los élitros, para luego girar y alinear su cuerpo para montar a la hembra. Cuando el contacto fue lateral, el macho giró y alineó su cuerpo para montar a la hembra, por su parte cuando el contacto fue posterior el macho montó a la hembra (Figura 2.1, paso 2), entonces el macho curvó su abdomen exponiendo su edeago (Figura 2.1, paso 3). Finalmente el macho inserta su edeago en el ovipositor de la hembra para llevar a cabo la cópula (Figura 2.1, paso 4). De un total de 30 machos, 28 (95%) alcanzaron el paso 4. El tiempo promedio de copulación en ensayos de laboratorio fue de 91 ± 6 minutos ($N=3$). Durante este tiempo, las hembras generalmente permanecieron inmóviles, o caminaron muy lentamente, y $15,0 \pm 0,6$ minutos antes de finalizar la copulación caminaron rápidamente para separarse del macho.

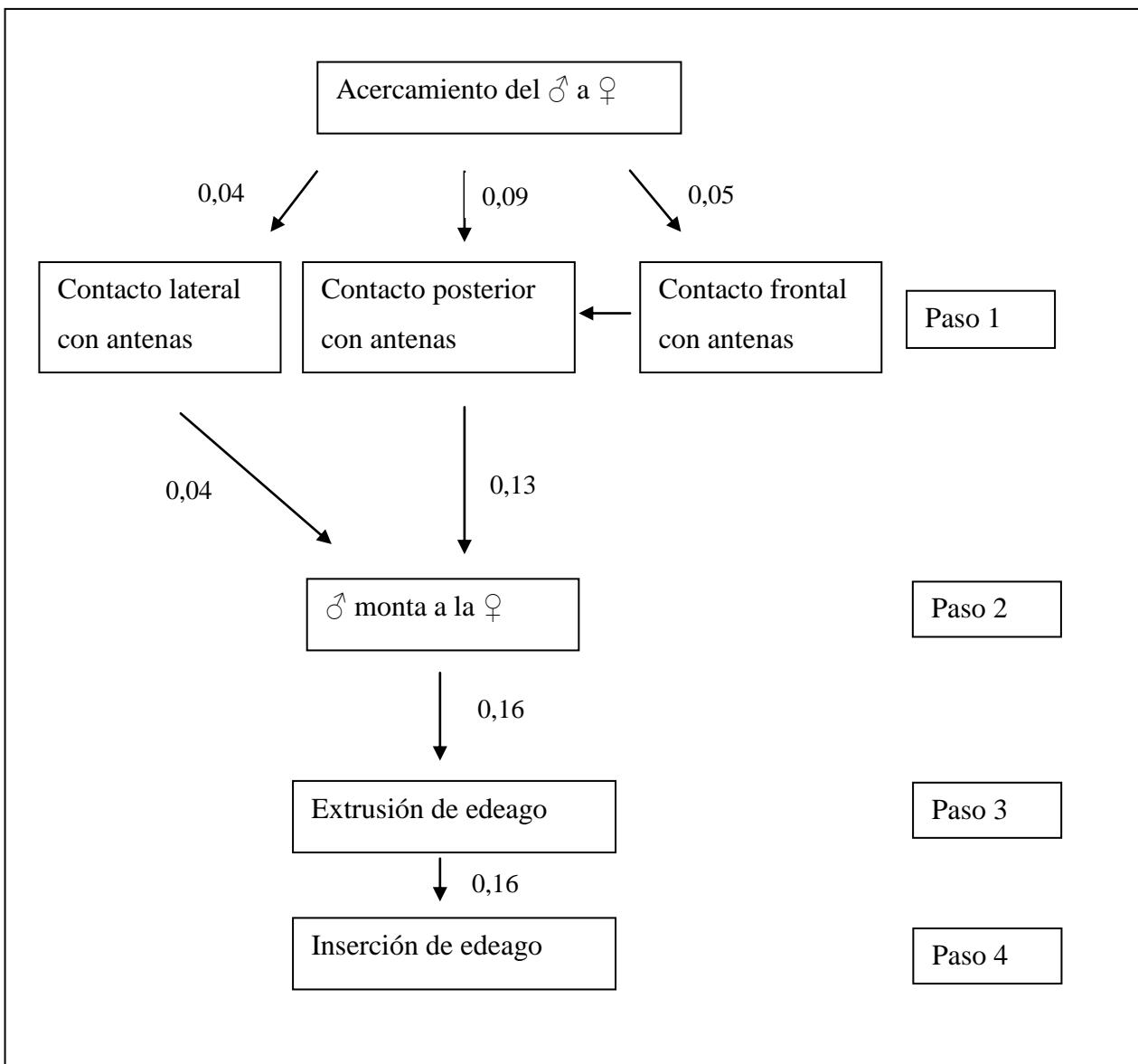


Figura 2.1. Etograma de apareamiento de *A. superciliosus* ($N = 30$ parejas, $P = 0,05$). Los valores indican la probabilidad de transición de un paso al próximo.

2.3.2 Función de componentes cuticulares

Cuando hembras muertas por congelación fueron presentadas a los machos, 80% de estos intentaron aparearse con ellas, conducta similar a la exhibida por los machos frente a hembras vivas ($P = 0,4937$), pero sólo 33% de los machos intentaron aparearse con la misma hembra muerta lavada con pentano ($P < 0,0001$), sugiriendo que las señales para el reconocimiento de la pareja fueron removidas por el solvente. Por su parte, 58% de los machos fueron atraídos por las hembras muertas y lavadas con solvente, cubiertas con extracto cuticular de hembra (1 FE) ($P = 0,0001$) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Respuesta de machos de *A. superciliosus* a diferentes tratamientos.

Tratamientos	Nº de machos testeados	Nº de machos que intentaron aparearse	Respuesta (%)
Hembra viva (control)	40	38	95
Hembra muerta por congelación	40	32 ^{ns}	80
Hembra muerta por congelación-lavada con solvente	40	13 ^a	33
Hembra muerta por congelación-lavada con solvente + extracto cuticular de hembra	40	23 ^a	58

^{ns} Sin diferencia significativa con hembra viva.

^a Diferencia significativa en relación a hembra viva, $P \leq 0,05$ (Fisher test).

2.3.3 Análisis químico de extractos cuticulares

El análisis de extractos cuticulares de machos y hembras por GC-MS, indicaron que machos y hembras de *A. superciliatus* comparten varios hidrocarburos alifáticos de cadena larga como componentes de la cutícula. Aunque la mayoría de los componentes están presentes en ambos sexos, difieren en la abundancia relativa entre ellos (Tabla 2.2). Los hidrocarburos más abundantes en los extractos de machos fueron 2-metilhexacosano y pentacosano, mientras que el alcano más abundante en hembras fue pentacosano. También se identificaron algunos compuestos sexo-específicos, tales como 2-metildocosano, un compuesto no identificado (IK 2586), y octacosano para machos y 13-metilheptacosano para hembras.

Tabla 2.2. Abundancia relativa de hidrocarburos cuticulares de hembras y machos de *A. superciliosus*.

Compuestos	Abundancia relativa (% del total) ^a					
	Hembra	Macho	KI Exp. ^b	KI Lib. ^c	Fiabilidad	P ^e
2-Metildocosano	nd	1,20 ± 0,11	2265	2264	2	
Tricosano	9,90 ± 1,19	11,10 ± 0,50	2300	2300	1	NS
11-Metiltricosano	0,70 ± 0,02	0,80 ± 0,20	2338	2336	2	NS
Tetracosano	1,20 ± 0,19	0,80 ± 0,09	2400	2400	1	NS
No identificado	1,90 ± 0,38	2,30 ± 0,39	2469			NS
Pentacosano	31,9 ± 1,70	22,0 ± 1,37	2500	2500	1	0,004
11-Metilpentacosano	3,10 ± 0,55	3,20 ± 0,36	2533	2533	2	NS
No identificado	nd	1,90 ± 0,12	2586			
Hexacosano	2,70 ± 0,35	2,40 ± 0,19	2600	2600	1	NS
2-Metilhexacosano	16,70 ± 1,44	22,90 ± 2,58	2663	2664	1	NS
Heptacosano	14,40 ± 1,25	19,0 ± 0,96	2700	2700	1	0,028
13-Metilheptacosano	4,30 ± 0,09	nd	2730	2735	1	
Octacosano	nd	3,00 ± 0,47	2800	2800	1	
No identificado	3,70 ± 0,40	1,80 ± 0,15	2862			0,005
Nonacosano	6,20 ± 0,22	5,90 ± 0,36	2900	2900	1	NS

^a Media ± S.E.M.; n = 5; "nd" = No detectado. ^b Kovats Indices Experimental. ^c Kovats Indices Librería. ^d La fiabilidad de la identificación está indicada por los siguientes números: 1) espectro de masa (MS), índices de Kovats y comparación con estandar; 2) MS e indices de Kovats de acuerdo con la correspondiente información de literatura, pero no comparado con compuesto estandar.

^e Significancia estadística entre sexos en relación a abundancias relativas fue testeada con Student t-test (NS, no significante; P ≤ 0,05).

2.3.4 Actividad feromonal.

Se observó que el 70% de los machos extrajeron sus edeagos en respuesta a cápsulas de vidrio cubiertas con extractos cuticulares de hembra (Tabla 2.3, figura 2.2), mientras que no se observó respuesta cuando cápsulas de vidrio fueron cubiertas con extracto cuticular de machos (Tabla 2.3). Por su parte cuando se cubrieron cápsulas de vidrio con la mezcla preparada con los cinco principales hidrocarburos, 55% de los machos emitieron contacto antenal y monta (pasos 1-2), pero no extrusión de edeago.

Tabla 2.3. Respuesta de machos de *A. supercilirosus* a compuestos sintéticos, extracto cuticular de hembras, y extracto cuticular de machos.

Tratamientos	Nº machos testeados	Nº of machos extruden su edeago	Respuesta (%)
Cápsula de vidrio	20	0	0
Cápsula de vidrio + extracto cuticular hembra	20	14 ^a	70
Cápsula de vidrio + tricosano	20	0 ^{ns}	0
Cápsula de vidrio + pentacosano	20	0 ^{ns}	0
Cápsula de vidrio + 2-metilhexacosano	20	0 ^{ns}	0
Cápsula de vidrio + heptacosano	20	0 ^{ns}	0
Cápsula de vidrio + nonacosano	20	0 ^{ns}	0
Cápsula de vidrio + 13-metilheptacosano	20	0 ^{ns}	0
Cápsula de vidrio + mezcla de hidrocarburos	20	0 ^{ns}	0
Cápsula de vidrio + extracto cuticular macho	20	0 ^{ns}	0

^{ns} No diferencia significativa en relación a una cápsula de vidrio.

^a Diferencia significativa en relación a una cápsula de vidrio. $P \leq 0,05$ (Fisher test).



Figura 2.2. Respuesta de un macho de *A. superciliatus* a una cápsula de vidrio cubierta con extracto cuticular de hembra. La figura muestra curvatura de abdomen y extrusión de edeago.

2.4 Discusión

Los machos respondieron a hembras vivas y muertas por congelación sólo después de tocar su superficie corporal con sus antenas, sugiriendo que los quimio-receptores podrían estar ubicados en órganos sensoriales de las antenas como ocurre con los curculiónidos *Hypera meles* (Smith et al., 1976), *Curculio caryae* (Hatfield et al., 1976), *Hypera postica* (Bland, 1981), y *Conotrachelus nenuphar* (Alm y Hall, 1986). Una conducta similar a la encontrada en este estudio fue reportada por Calyecac-Cortero et al. (2004) para el curculiónido *Trischobaris championi*; por Fukaya (2003), Ginzel y Hanks (2003), y Zhang et al. (2003) para cerambícidos.

La respuesta de machos de *A. superciliosus* hacia hembras conespecíficas muertas por congelación (Tabla 2.1), indica que no es necesario una respuesta conductual de la hembra para que ocurra el apareamiento. Por su parte la pérdida de respuesta de machos frente a hembras muertas-lavadas con solvente, indican que las señales de reconocimiento fueron removidas por el solvente, confirmando que los compuestos cuticulares son en gran parte responsables del reconocimiento de la potencial pareja para la especie *A. superciliosus*. El bajo porcentaje (33%) de machos que respondieron a hembras muertas por congelación y lavadas con solvente, puede ser atribuido a estímulos visuales y/o mecanorrecepción (Ginzel et al., 2003). Se ha demostrado que la orientación visual es muy importante en la localización de la potencial pareja en algunos cerambícidos, tales como *Anoplophora malasiaca* (Fukaya et al., 2005) y *A. glabripennis* (Li et al., 1999). La reducción de la respuesta de machos a hembras muertas por congelación-lavadas con solvente y cubiertas con extracto cuticular de hembra (58%), comparado con la respuesta frente a hembras muertas por congelación (80%), sugiere que el proceso de extracción y re-aplicación de hidrocarburos altera la estructura natural de la capa de cera, como es reportado por Ginzel et al. (2003) para el cerambícido *Megacyllene robiniae*. Otra posibilidad es que el proceso de re-aplicación de extracto al cuerpo de la hembra no haya sido homogéneo sobre la cutícula. La diferencia en los patrones y proporciones de los compuestos observados en los extractos cuticulares de machos y hembras, indican que la relación entre compuestos, y/o algún compuesto sexo-específico, son factores importantes para una apropiada actividad de feromona de contacto en este insecto, así como ocurre en otras especies de escarabajos (Zhang et al., 2003; Ginzel et al., 2006). La mayoría de los componentes identificados fueron n-alcanos o monometil-alcanos, este patrón es similar a lo reportado para

hidrocarburos presentes en élitros de los curculiónidos *Diaprepes abbreviates* (Lapointe et al., 2004) y *Cylindrocopturus adspersus* (Pomonis y Hakk, 1984).

La conducta de apareamiento (pasos 1-3) desarrollado por machos expuestos a cápsulas de vidrio cubiertas con extracto cuticular de hembra, confirma que las señales de reconocimiento están presente en el extracto, y que la respuesta de apareamiento está mediada principalmente por señales químicas. A pesar de no observarse extrusión de edeago cuando las cápsulas de vidrio fueron cubiertas con la mezcla o los hidrocarburos individuales presentes en los extractos de hembras, los machos mostraron algunas señales de reconocimiento, tales como acercamiento, contacto antenal y monta la cápsula de vidrio particularmente con la mezcla de hidrocarburos. Estos resultados sugieren que uno o más componentes minoritarios presentes en el extracto de hembras, podrían ser necesarios para inducir la secuencia completa de conductas que culminen en la copulación.

2. 5 Referencias

- Alm, S., y F. Hall. 1986.** Antennal sensory structures of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). Annals of the Entomological Society of America. 79: 324–333.
- Babushok, V., P. Linstrom, J. Reed, I. Zenkevich, R. Brown, W. Mallard, y S. Stein. 2007.** Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. Journal of Chromatography. 1157: 414–421.
- Bland, R. 1981.** Antennal sensilla of the adult alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera : Curculionidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology. 10:265–274.
- Calyecac-Cortero, H., J. Cibrián-Tovar, N. Bautista-Martínez, y J. López-Collado. 2004.** Feeding, courtship and oviposition behavior of *Trichobaris championi* Barber (Coleoptera : Curculionidae). Agrociencia 38: 365-373.

Conover, W. J. 1999. Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, INC., New York.

Fukaya, M., T. Yasuda, S. Wakamura, y H. Honda. 1996. Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothea hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). III. Identification of contact sex pheromone on female body surface. Journal of Chemical Ecology. 22:259-270.

Fukaya, M., T. Akino, T. Yasuda, S. Tatsuki, y S. Wakamura. 1999. Mating sequence and evidence for synergistic component in female contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). Entomological Science. 2: 183-187.

Fukaya, M. 2003. REVIEW. Recent Advances in Sex Pheromone Studies on the White-Spotted Longicorn Beetle, *Anoplophora malasiaca*. JARQ 37: 83 – 88.

Fukaya, M., H. Yasui, T. Yasuda, T. Akino, y S. Wakamura. 2005. Female orientation to the male in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) by visual and olfactory cues. Applied Entomology and Zoology. 40: 63-68.

Gibbs, A. 1998. Water-proofing properties of cuticular lipids. American Zoologist. 38: 471-482.

Ginzel, M., y L. Hanks. 2003. Contact Pheromones as Mate Recognition Cues of Four Species of Longhorned Beetles (Coleoptera: Cerambycidae). Journal of Insect Behavior. 16: 181-187.

Ginzel, M., G. Blomquist, J. Millar y L. Hanks. 2003. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. Journal of Chemical Ecology. 29: 533 – 545.

Ginzel, M., J. Moreira, A. Ray, J. Millar, y L. Hanks. 2006. (Z)-9-Nonacosene—Major component of the contact sex pheromone of the beetle *Megacyllene caryae*. Journal of Chemical Ecology. 32: 435-451.

Hatfield, L., J.Frazier, y L. Coons. 1976. Antennal sensilla of the pecan weevil, *Curculio caryae* (Horn) (Coleoptera: Curculionidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology. 5:279–287.

Lapointe, S., W. Hunter, y R. Alessandro. 2004. Cuticular hydrocarbons on elytra of the Diaprepes root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Agricultural and Forest Entomology. 6: 251-257.

Li, D., M. Tokoro, y T. Nacashima. 1999. Mechanism of mating action of *Anoplophora glabripennis* (Motsch) J Beijing For Univ. 21: 33-36.

Martin, P., y P. Bateson. 1994. Measuring Behaviour: An Introductory Guide. Cambridge University Press. United Kingdom.

Nelson, D. 1978. Long-chain methyl-branched hydrocarbons: Occurrence, biosynthesis, and function. Advances in Insect Physiology. Volumen13, Capítulo 1.

Pomonis, J., y H. Hakk. 1984. Alkanes from surface lipids of sunflower stem weevil, *Cylindrocopturus adspersus* (LeConte). Journal of Chemical Ecology. 10: 1335-1347.

Smith, C., J. Frazier, L. Coons, y W. Knight. 1976. Antennal sensilla of the clover head weevil *Hypera meles* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology. 5: 349–355.

Sokal, R., y F. Rohlf. 1981. Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research. W.H. Freeman, New York.

Zhang, A., J. Oliver, K. Chauhan, B. Zhao, L. Xia, y Z. Xu. 2003. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) Naturwissenschaften. 90: 410 - 413.

Capítulo 3

Feromonas de largo alcance asociados a la conducta de apareamiento de A. superciliosus.

Resumen

Aegorhinus superciliatus (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae), es la principal plaga de arándano y frambuesa en el sur de Chile. En este capítulo se señala la respuesta conductual y electrofisiológica de adultos de *A. superciliatus* a semioquímicos liberados por individuos conespecíficos. Volátiles liberados por hembras, atraen significativamente a machos en bioensayos olfactométricos. Sin embargo, las hembras no atraen a otras hembras, y volátiles de machos no atraen hembras conespecíficas. Análisis de extractos de volátiles de hembras por cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masa (GC-MS) permitieron identificar dos monoterpenos: limoneno y α -pineno. El registro electroantenográfico indicó que machos de *A. superciliatus* es capaz de percibir los compuestos *R*-limoneno y α -pineno, mientras que las hembras sólo presentarían receptores para *R*-limoneno. Por su parte bioensayos olfactométricos con compuestos puros indicaron que, sólo *R*-limoneno es capaz de evocar una respuesta de atracción. Los resultados en los ensayos de campo utilizando trampas con *R*-limoneno, nonanona, eucaliptol y mezcla de estos tres compuestos indicaron que los tratamientos con *R*-limoneno y nonanona permitieron capturar el mayor porcentaje de individuos adultos de *A. superciliatus*.

Palabras clave: *Aegorhinus superciliatus*, electroantenograma, bioensayo de conducta, *R*-limoneno.

Abstract

Aegorhinus superciliosus (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae), is the principal pest of blueberry and raspberry in the South of Chile. In this chapter, are showed electrophysiological and behavioral responses of *A. superciliosus* to the semiochemicals released from adult individuals. Volatiles released from females significantly attracted conspecific males in olfactometric bioassays. However, female volatiles did not attract other females, and male volatiles attracted neither males nor females. Gas chromatographic and mass spectral (GC-MS) analysis of volatile extracts of females revealed the presence of limonene, and α -pinene. Electroantennogram recording indicated that *A. superciliosus* females have the ability to smell *R*-limonene, and males to smell both *R*-limonene and α -pinene. However, olfactometric bioassays with pure compounds indicated that only *R*-limonene is capable of evoking a response, as evidenced by the attraction to the area developed by the stimulus males. The results in field trials using traps baited *R*-limonene, nonanone, eucalyptol and blends of these three compounds showed that treatment with *R*-limonene and nonanone caught the highest percentage of adult individuals of *A. superciliosus*.

Key Words: *Aegorhinus superciliosus*, electroantennogram, behavioral bioassay, *R*-limonene.

3.1 Introducción

Los compuestos químicos involucrados en la interacción entre organismos son denominados semioquímicos (Agelopoulos et al., 1999). Las feromonas (*pherein*: transportar; *hormon*: excitar), una subclase de semioquímicos, son compuestos secretados por un individuo y percibidos por un segundo individuo de la misma especie, provocando una reacción específica de comportamiento (Plettner, 2002; Jurenka, 2004). Cuando el comportamiento es de atracción y copulación se les denomina feromonas sexuales (Guerrero, 1998).

Estas feromonas sexuales pueden producirse a través de modificaciones en la ruta biosintética de ácidos grasos, compuestos isoprenoides y metabolismo de aminoácidos (Vogt, 2003), o bien algunos insectos secuestran o adquieren compuestos provenientes de sus hospederos, pudiendo utilizarlos como feromonas sexuales o como precursores de éstas (Reddy y Guerrero, 2004). Es así como machos del escarabajo *Melolontha hippocastani*, utilizan volátiles de planta inducidos por daño, para localizar a hembras que están alimentándose (Ruther et al., 2002).

El estudio e identificación de compuestos biológicamente activos puede ser una tarea engorrosa si se tiene en cuenta que algunas feromonas sexuales pueden ser mezcla de compuestos activos o bien presentan estructuras complejas (Maarse, 1991). Sin embargo, algunas herramientas analíticas como electroantenografía (EAG) y electroantenografía acoplada a cromatografía gaseosa (GC-EAD), pueden facilitar la rápida identificación de compuestos activos (Malo et al., 2005). La caracterización de feromonas desde una mezcla de compuestos, es simplificada mediante el uso de las antenas como elemento sensitivo en los ensayos de EAG. Si bien, una respuesta electrofisiológica no puede ser asociada a una

respuesta conductual, los ensayos de conducta permiten confirmar la actividad biológica de un compuesto electrofisiológicamente activo (Leal, 2005).

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Insectos

Adultos hembras y machos de *A. superciliosus*, fueron recolectados en un huerto comercial de frambuesa, ubicado en la comuna de Vilcún, IX región, Chile, durante el verano de 2007, 2008 y 2009, los cuales fueron depositados individualmente en placas Petri, y trasladados al Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de La Frontera, en donde fueron alimentados periódicamente con hojas frescas de frambuesa.

3.2.2 Atrapamiento de volátiles

Los volátiles fueron atrapados desde dos fuentes de aromas: 50 individuos machos y 50 individuos hembras. El sistema consistió en permitir circular aire seco y purificado a través de carbón activado por 24 horas y a un flujo de 2 litros/min a través de dos campanas de vidrio que contenían las fuentes de aromas. Los volátiles fueron adsorbidos en Porapak Q y desorбidos por elución con 1 mL de n-hexano (Quiroz et al., 1999).

3.2.3 Ensayos olfatométricos

Los ensayos de comportamiento de *A. superciliosus* frente al extracto hexánico de volátiles fueron realizados en un olfatómetro de cuatro brazos de 40 cm x 40 cm x 2,5 cm, construido en base al modelo descrito por Vet (1983). Mediante una bomba de vacío se succionó aire desde el orificio central del olfatómetro a un flujo de 800 ml/min, produciéndose cuatro

campos de olores. Los estímulos (extractos hexánico de volátiles), y el blanco (n-hexano), fueron colocados dentro de pipetas de vidrio, las que se conectaron a los extremos de los brazos. Un insecto fue introducido por el orificio central del olfatómetro y el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos y en la zona central fue monitoreado durante 20 minutos. Se utilizó un insecto nuevo por bioensayo y el olfatómetro fue rigurosamente lavado con solvente neutro entre cada bioensayo.

3.2.4 Identificación química

Volátiles eluídos con n-hexano fueron inyectados en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masa (GC-MS). El cromatógrafo de gases fue equipado con una columna capilar BP-1 (30m x 0.22 mm x 0.25 µm), utilizando helio como gas transportador. La columna fue programada desde una temperatura inicial de 40 °C a 250 °C a 5 °C/min, permaneciendo a esta temperatura por cinco minutos. Las temperaturas del inyector y detector de masas se mantuvieron a 250 °C. La ionización se produjo por impacto de electrones a 70 eV. Los cromatogramas obtenidos desde extractos de volátiles de machos y hembras fueron comparados para determinar señales diferenciales. Estas señales fueron identificadas por búsqueda en librería y determinación de índices de Kovats (IK), mediante la inyección de una serie de alkanos C₉-C₂₆. La identificación fue corroborada por inyección de estándares puros (99% pureza).

3.2.5 Electroantenografía (EAG)

Se registró la respuesta de las señales eléctricas generadas por las antenas de machos y hembras de *A. superciliatus*, frente a distintos estímulos, según la metodología descrita por

Kalinová et al. (2000). Para ello, se extrajo la antena del insecto, y se montó entre electrodos de plata encapsulados en microcapilares de vidrio llenos con un gel conductor. La base de la antena fue inserta en el electrodo de indiferencia, mientras que el mazo de la antena (club) en el electrodo de registro. Las señales generadas ingresaron a través de un amplificador (UN-03b, Syntech) para ser registradas e interpretadas mediante un software (Version 2.2a, Syntech). Se aplicaron 50 µL de cada compuesto (*R*-limoneno, *S*-limoneno y α -pineno) disuelto en hexano (0,1 ppm, 1 ppm y 10 ppm), sobre tiras de papel filtro de 5 mm de ancho y 50 mm de largo, las cuales fueron insertadas dentro de pipetas Pasteur luego de la evaporación del solvente. La antena fue estimulada por un impulso de aire de 1 segundo a un flujo de 1L/min, liberado desde la pipeta que contiene el estímulo a ensayar. Durante todo el ensayo la antena permaneció humectada, el intervalo entre estímulos fue de aproximadamente 1 minuto. Las respuestas (N = 10 para cada sexo) fueron estandarizadas con el promedio de las respuestas al control hexano. Los datos fueron analizados estadísticamente con la prueba no paramétrica de Wilcoxon ($P \leq 0,05$).

3.2.6 Bioensayos con estándares

La actividad de los compuestos identificados en los extractos de volátiles de machos y hembras fueron analizadas mediante ensayo conductual de elección, utilizando un olfatómetro tipo Tubo-Y, según la metodología descrita por Gunawardena et al. (1998), utilizada para el curculiónido *Rhynchophorus ferrugineus*. Para ello, 50 µL de solución hexánica de los compuestos individuales (*R*-limoneno, *S*-limoneno y α -pineno), en concentraciones de 0,1 ppm, 1 ppm y 10 ppm, fueron aplicados sobre papel filtro de 5 mm de ancho y 50 mm de largo, el que fue introducido en una pipeta Pasteur una vez evaporado

el solvente, y luego insertado en uno de los brazos del Tubo-Y, estos compuestos fueron contrastados contra 50 µL de hexano, aplicado en papel filtro e introducido en una pipeta Pasteur, e insertado en el otro brazo del Tubo-Y. Un insecto fue introducido en la zona baja del tubo-Y, y el sistema fue conectado a una trampa de vacío con un flujo de 800mL/min. Se definió como respuesta, la entrada del insecto a uno de los brazos del Tubo-Y, y como no respuesta, a la ausencia de elección a los 5 min de comenzado el bioensayo, con lo que el experimento fue descartado. Por cada insecto se utilizó un Tubo-Y distinto, y se cambió el brazo con el estímulo, para evitar sesgos de posición (Tooker et al., 2005). Se utilizaron 30 insectos de cada sexo por cada concentración de compuestos a probar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado (Gunawardena et al., 1998).

3.2.7 Evaluación en terreno de los compuestos activos como feromonas sexuales

3.2.7.1 Dispositivos de liberación

Se utilizaron septas de goma, las cuales fueron acondicionadas mediante un proceso de destilación en sistema Soxhlet con CH₂Cl₂ por 12 horas, posteriormente fueron secadas al aire durante 3 días antes de su utilización, según la metodología descrita por Downham et al. (1999). Con el objetivo de establecer la periodicidad de recambio de estos dispositivos en terreno, se estableció la cinética de liberación para *R*-limoneno y 1,8-cineol (limoneno, identificado en extracto de volátiles de hembras, 1,8-cineol, identificado en extracto de volátiles de arándano). Para ello se impregnaron septas con el equivalente a 10 mg de cada compuesto señalado anteriormente. Estas septas impregnadas fueron mantenidas en una estufa a 25°C, y fueron periódicamente retiradas en triplicado y almacenadas a -4°C, hasta

terminado el ensayo. El remanente del compuesto en la septa fue extraído con hexano, y analizados por cromatografía gaseosa (Anexo 1).

3.2.7.2 Ensayo de campo

a) Ubicación del ensayo. El ensayo de campo se llevó a cabo en un huerto comercial de frambuesa, ubicado en la comuna de Vilcún, Región de La Araucanía, durante la temporada Diciembre de 2008 y Febrero de 2009.

b) Trampas. Para el desarrollo de este estudio se emplearon dos tipos de trampas. El primer tipo correspondió a una trampa comercial, ampliamente utilizada para el monitoreo del picudo del algodonero, *Anthonomus grandis*, (Coleoptera: Curculionidae), descrita por Sappington y Spurgeon (2000). Esta trampa, llamada “PHEROCON BW” (Figura 3.1), fue suministrada por la compañía Trécé Inc., USA. El otro tipo de trampa, fue una adaptación de la trampa comercial, y consistió de un embudo plástico blanco, de 26 cm de alto, por 22 cm de diámetro, al cual se le incorporó una malla rígida con un embudo de menor tamaño en la parte inferior interna del embudo (Figura 3.2), lugar de entrada de los insectos. El segmento superior y más delgado del embudo, se destinó para alojar la septa impregnada con los compuestos químicos a ensayar, a esta sección se le realizaron perforaciones para permitir la difusión de los compuestos.



Figura 3.1. Trampa PHEROCON BW, suministrada por la compañía Trécé Inc.USA.

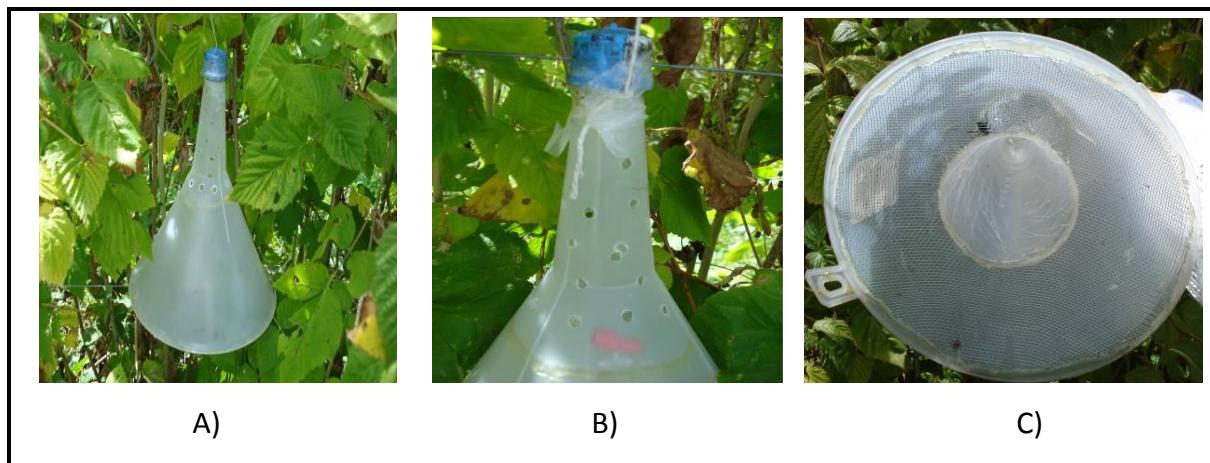


Figura 3.2. A) Trampa adaptada. **B)** Parte superior, lugar que aloja el dispositivo de liberación (septa roja). **C)** Parte inferior interna, lugar de entrada y permanencia de insectos.

c) Procedimiento experimental y tratamientos a ensayar. En un primer ensayo se dispusieron al azar 5 trampas de cada tipo (10 en total), separadas 5 metros una de otra, entre hileras (Figura 3.3). Cada trampa contenía uno de los siguientes tratamientos aplicados en los dispositivos de liberación, los cuales fueron renovados semanalmente.

d) Tratamientos.

- a) 1,8-Cineol 200 mg (identificado como kairomona, según Parra et al., 2009)
- b) 2-Nonanona 200 mg (identificado como kairomona, según Parra et al., 2009)
- c) *R*-limoneno 200 mg (presente en volátiles de hembras, activo en bioensayos electroantenográfico y conductual).
- d) Mezcla de los compuestos anteriores en relación 10:10:1 (según relación de kairomonas en Parra et al., 2009).
- e) Blanco (hexano).

Las trampas fueron inspeccionadas a intervalos de 2-4 días, según lo permitían las condiciones climáticas; y los insectos caídos dentro de las trampas fueron retirados, para ser luego contabilizados y sexados en el laboratorio. Con el objetivo de determinar el desempeño de los tratamientos, estos fueron comparados con el blanco, para ello, los resultados de captura de insectos, representados como N° de insectos/trampa x día, entre un tratamiento y el blanco fueron analizado según el test de Wilcoxon ($P \leq 0,05$).



Figura 3.3. Disposición entre hileras de trampas comerciales y adaptadas en el huerto.

En un segundo ensayo, sólo se utilizaron trampas adaptadas, las cuales fueron dispuestas en forma aleatoria, sobre las hileras, a una altura de 1,5 metros desde el nivel del suelo mediante fijación a los soportes de las plantas (Figura 3.4). Los parámetros de distancia de separación entre trampas, así como los tratamientos, período de recambio de los dispositivos de liberación y periodicidad de inspección, se mantuvieron iguales al primer ensayo.



Figura 3. 4. Disposición sobre hileras de trampas adaptadas en el huerto.

3.3 Resultados

3.3.1 Conducta de *A. superciliosus* frente a volátiles

Los resultados olfatométricos indicaron que los volátiles emitidos por hembras de *A. superciliosus* fueron fuertemente atrayentes para machos conespecíficos, observándose diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de permanencia promedio del insecto en los brazos con volátiles de hembras versus brazos con control (Figura 3.5). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas cuando hembras fueron estimuladas por volátiles de otras hembras, y cuando fueron estimuladas por volátiles de machos conespecíficos, versus el control (Figuras 3.6 y 3.7). Por su parte, cuando un macho fue estimulado por volátiles provenientes de otros machos se observa una repulsión del insecto hacia estos volátiles (Figura 3.8).

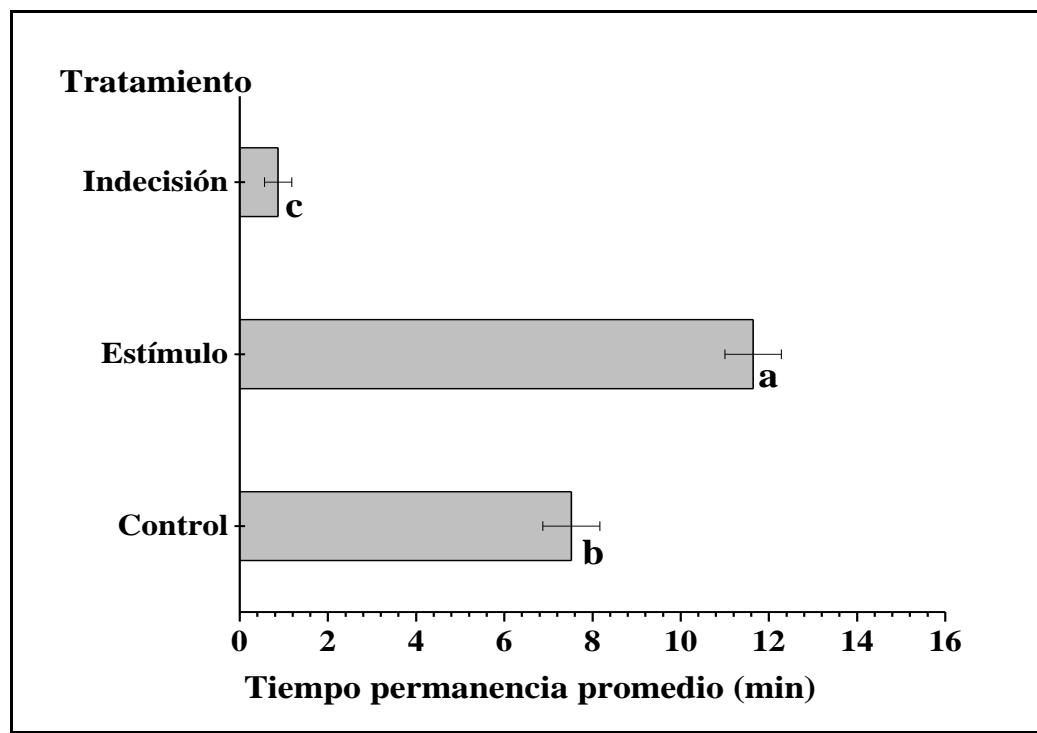


Figura 3.5. Respuesta olfatométrica de machos de *A. superciliosus* a extractos de volátiles emitidos por hembras conespecíficas. Letras diferentes indican diferencias significativas según la Prueba de Friedman ($P \leq 0,05$; $N=15$).

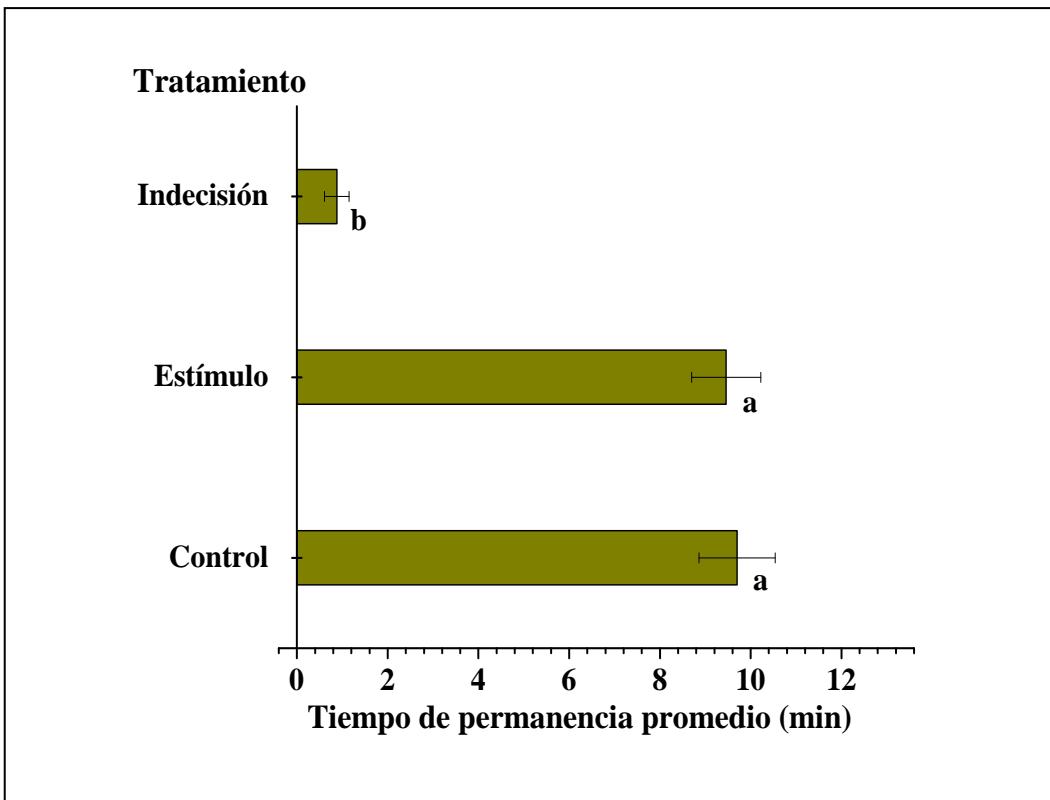


Figura 3.6. Respuesta olfatométrica de hembras de *A. superciliatus* a extractos de volátiles emitidos por hembras conespecíficas. Letras diferentes indican diferencias significativas según la Prueba de Friedman ($P \leq 0,05$; $N=10$).

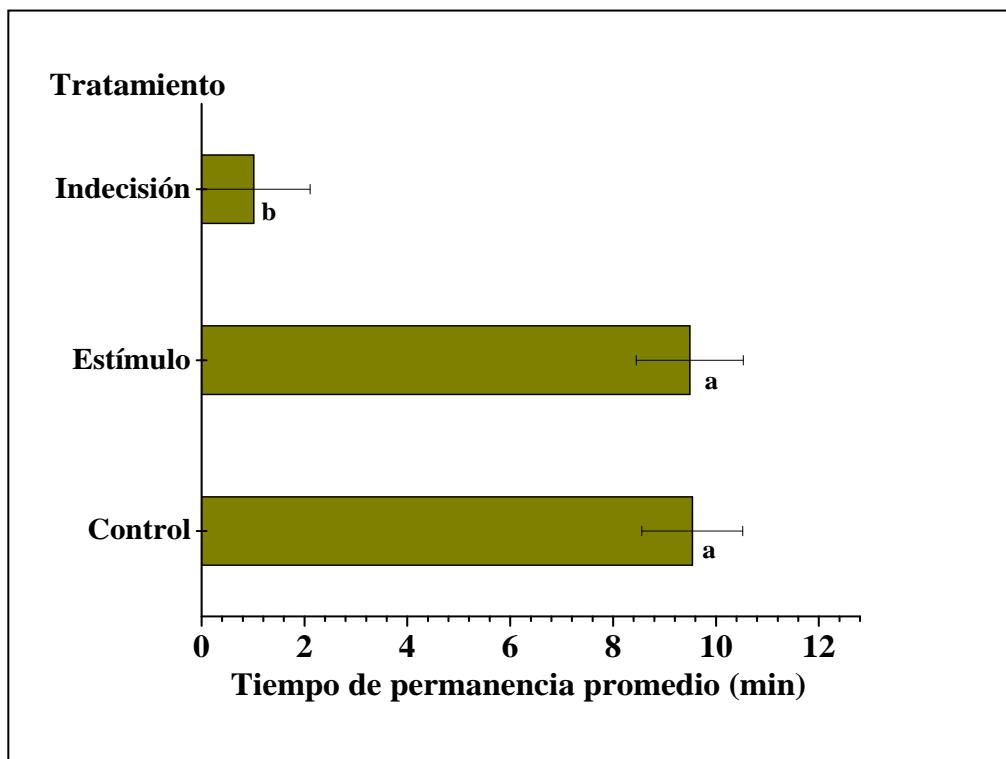


Figura 3.7. Respuesta olfatométrica de hembras de *A. superciliosus* a extractos de volátiles emitidos por machos conespecíficos. Letras diferentes indican diferencias significativas según la Prueba de Friedman ($P \leq 0,05$; $N=10$).

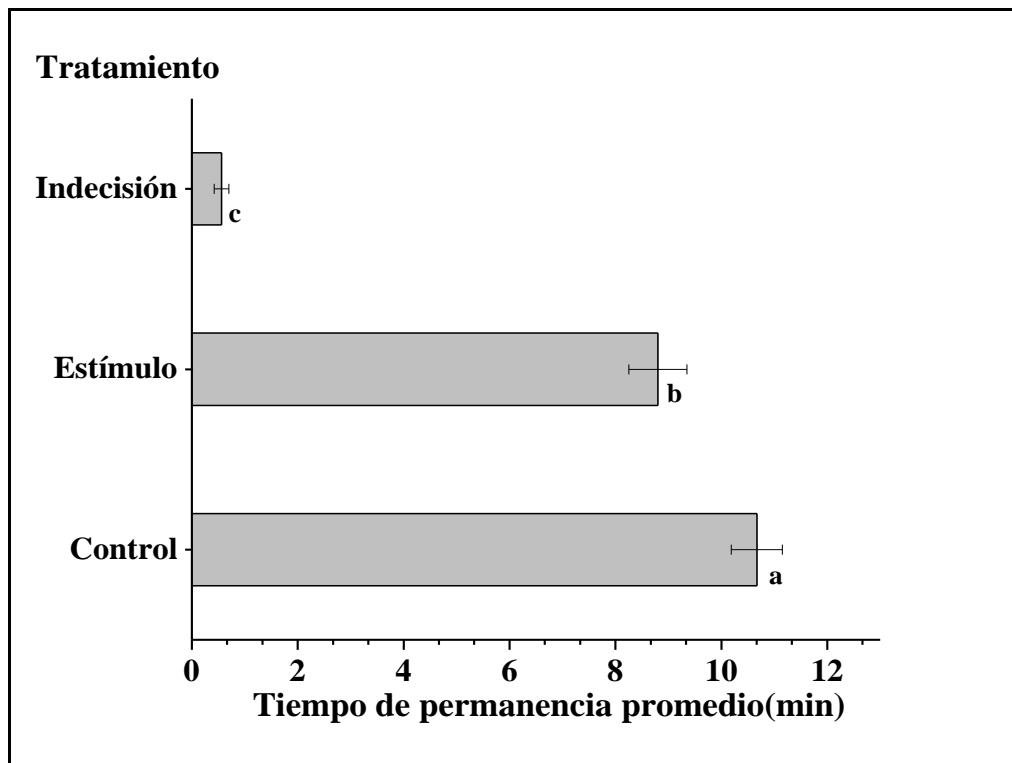


Figura 3.8. Respuesta olfatométrica de machos de *A. superciliosus* a extractos de volátiles emitidos por machos conespecíficos (Prueba de Friedman $P \leq 0,05$; $N=10$).

3.3.2 Análisis químico de extractos de volátiles

El análisis de volátiles emitidos por machos y hembras mediante GC-MS, y posterior determinación de índices de Kovats, comparación de espectro de masa con librería, y confirmación de identidad mediante inyección de estándares, permitió identificar los terpenos, α -pineno en los extractos de volátiles de machos y de hembras; y limoneno sólo en este último extracto (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Monoterpenos identificados en extractos de volátiles de machos y hembras de *A. superciliatus* por GC-MS.

Compuestos	Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (% del total)		Concentración (ng/μl)	
		Hembras	Machos	Hembras	Machos
α-Pineno	6,89	18,1 ± 3,95	100	0,92	1,42
Limoneno	9,25	81,9 ± 4,01	N.D	2,12	N.D

N.D = No detectado

3.3.3 Respuesta electrofisiológica

Según el análisis estadístico, los ensayos electroantenográficos indicaron que antenas de machos de *A. superciliatus* son sensibles a *R*-limoneno en las tres dosis ensayadas (*R*-limoneno 5 ng, P = 0,0313; *R*-limoneno 50 ng, P < 0,0001; *R*-limoneno 500 ng, P = 0,0078), mientras que su enantiómero *S*-limoneno no elicitó una respuesta (Figura 3.9). De igual forma, sólo el isómero *R*, logró estimular las antenas de hembras en las tres dosis ensayadas, (*R*-limoneno 5 ng, P = 0,0391; *R*-limoneno 50 ng, P = 0,0001; *R*-limoneno 500 ng, P = 0,0234) (Figura 3.10). Por su parte, sólo las antenas de machos fueron sensibles a α-pineno en dos de las tres dosis evaluadas, 5 ng y 50 ng (P = 0,0078; P = 0,001, respectivamente). La figura 3.11 muestra en forma gráfica la diferencia en la sensibilidad de antenas de machos hacia hexano (A) y *R*-limoneno (B).

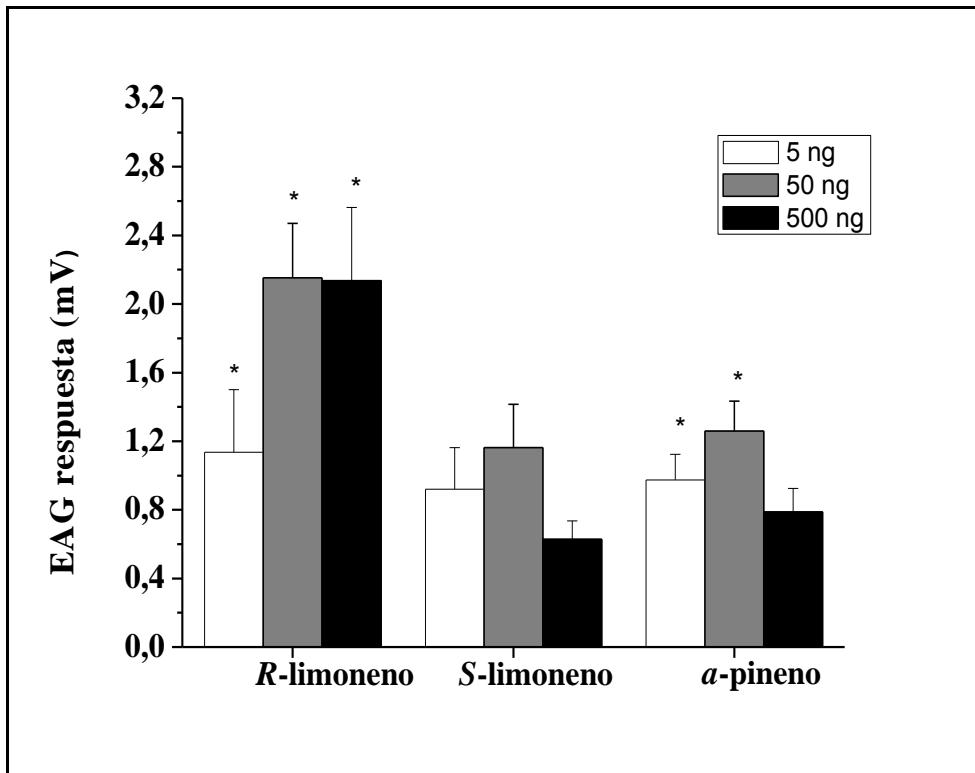


Figura 3.9. Respuesta electrofisiológica de machos de *A. superciliosus* a compuestos presentes en extracto de volátiles de hembras conespecíficas. Los asteriscos indican diferencias significativas para cada dosis de compuesto respecto del control, según la Prueba estadística Wilcoxon ($P \leq 0,05$; $N=10$).

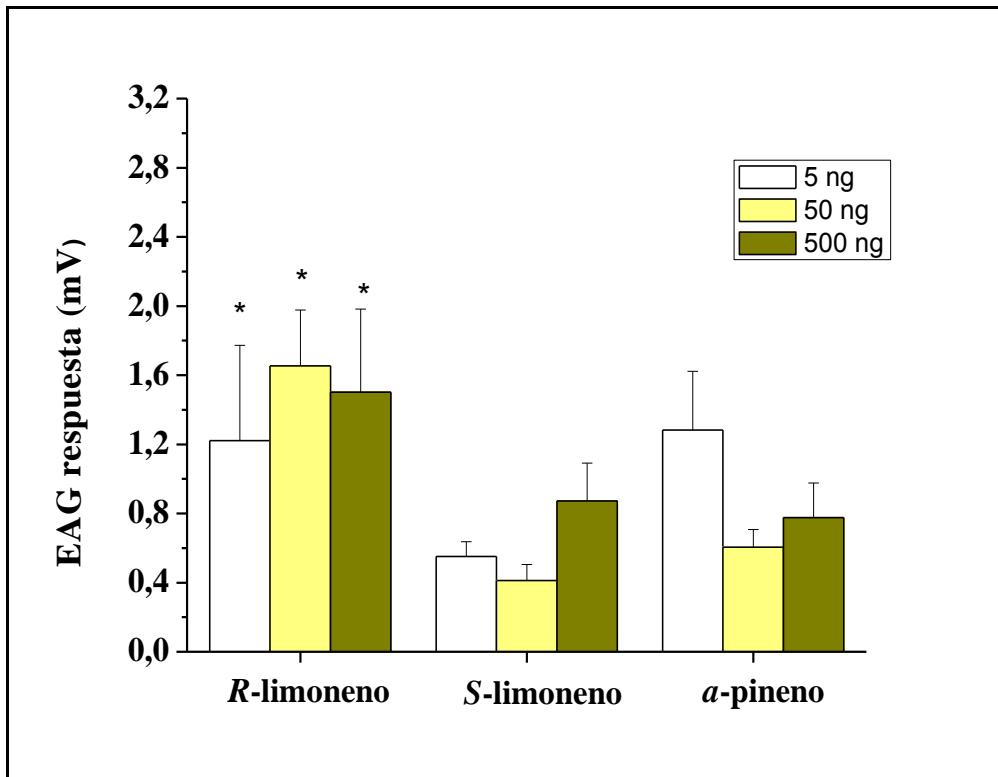


Figura 3.10. Respuesta electrofisiológica de hembras de *A. superciliosus* a compuestos presentes en extracto de volátiles de hembras conespecíficas. Los asteriscos indican diferencias significativas para cada dosis de compuesto respecto del control, según la Prueba estadística Wilcoxon ($P \leq 0,05$; $N=10$).

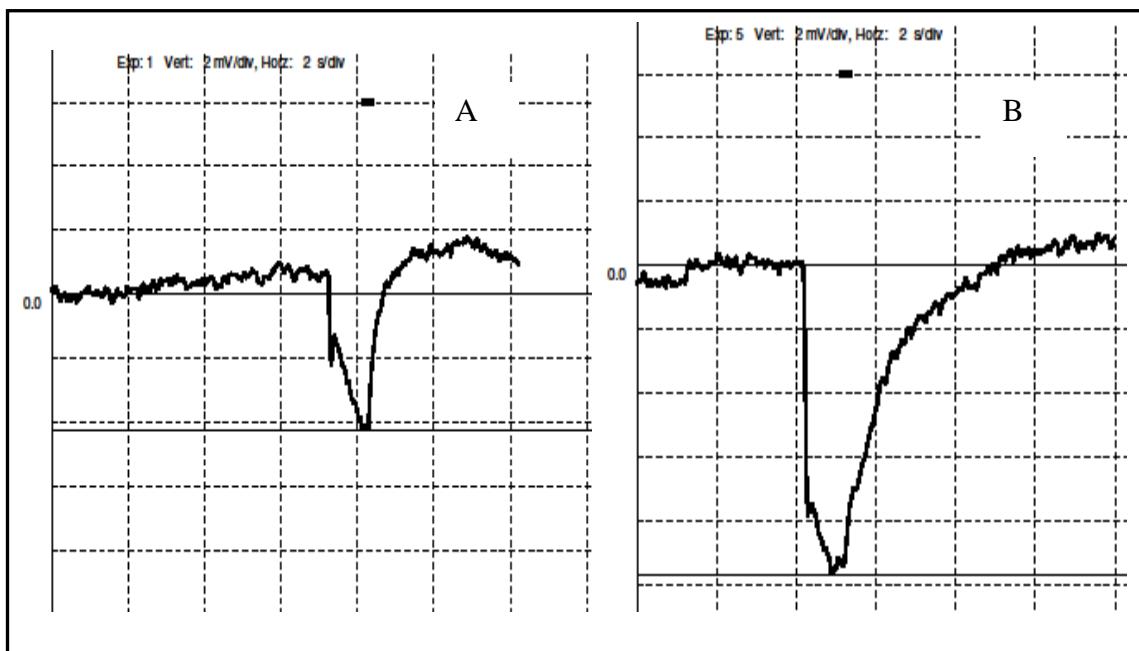


Figura 3.11. Representación gráfica de la respuesta electrofisiológica de machos de *A. superciliosus* frente a hexano (A), y *R*-limoneno (B). Eje Y indica el potencial eléctrico producido por la estimulación de la antena en mV.

3.3.4 Conducta de *A. superciliosus* frente a compuestos terpénicos identificados en extractos de volátiles.

El porcentaje de machos de *A. superciliosus* que respondieron a los diferentes estímulos en las dosis ensayadas en el bioensayo olfatométrico en Tubo-Y se presentan en la figura 3.12.

Según el análisis estadístico, los machos sólo mostraron una preferencia olfatométrica significativa por el extracto de volátiles de hembras y por *R*-limoneno en la dosis más alta evaluada (500 ng), en comparación al control (hexano).

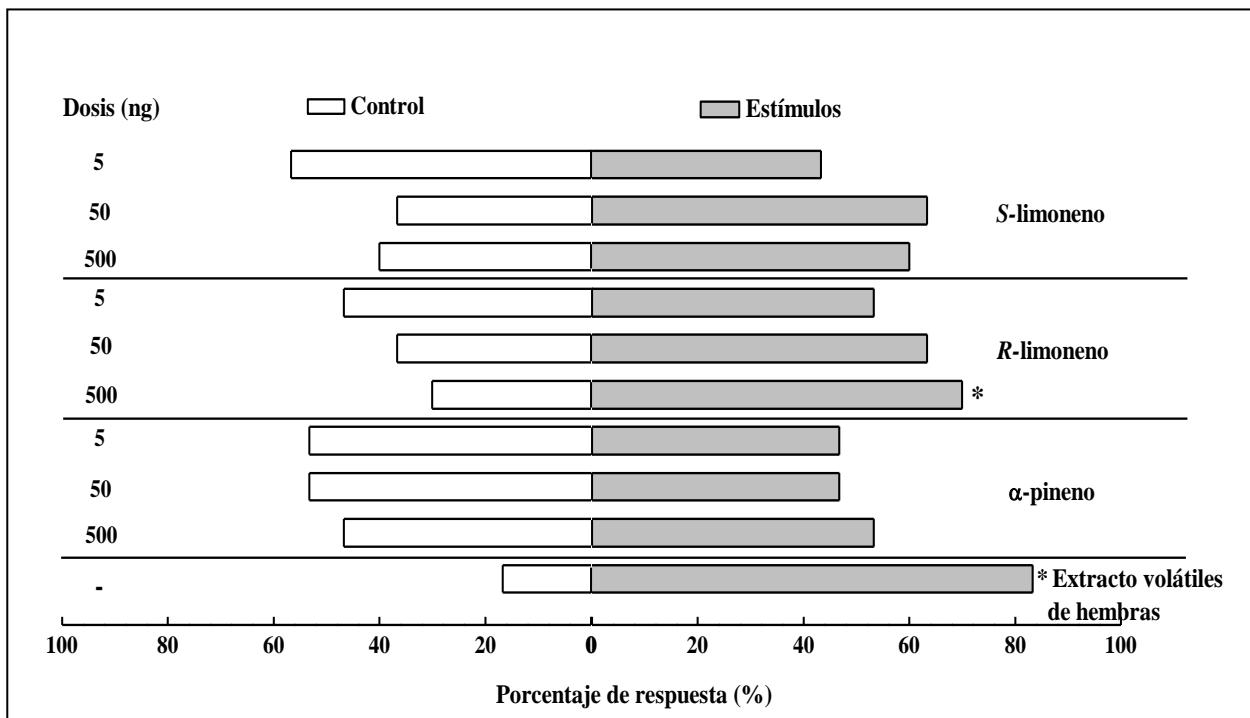


Figura 3.12. Respuesta de machos de *A. superciliosus* frente a extracto de volátiles de hembras conespecíficas, y compuestos sintéticos identificados en el extracto de volátiles de hembras. Los asteriscos indican diferencias significativas según la prueba estadística Chi-cuadrado ($P \leq 0,05$; $N=30$).

3.3.5 Ensayos de campo

Tomando en consideración los resultados de los ensayos electroantenográficos y olfatométricos, se seleccionó a *R-limoneno* para su evaluación en un huerto comercial de frambuesos, entre los meses de diciembre de 2008 y febrero de 2009. Además de este compuesto, se utilizaron 2-nananona y 1,8-cineol, los cuales habían sido reportados como kairomonas por Parra et al. (2009). En un primer ensayo, entre el 8 y 29 de diciembre las trampas comerciales y adaptadas fueron dispuestas aleatoriamente entre hileras. Los resultados mostraron que la totalidad de los insectos capturados correspondieron a hembras, pero sin que lograran establecerse diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 3.13). En un segundo ensayo, entre el 26 de diciembre y 13 de febrero, sólo trampas adaptadas fueron instaladas aleatoriamente sobre hileras, observándose un mayor número de insecto capturados en trampas con *R-limoneno*, siendo éste el único tratamiento que mostró ser estadísticamente diferente del control según la prueba de Wilcoxon ($P = 0,0156$) (Figura 3.14).

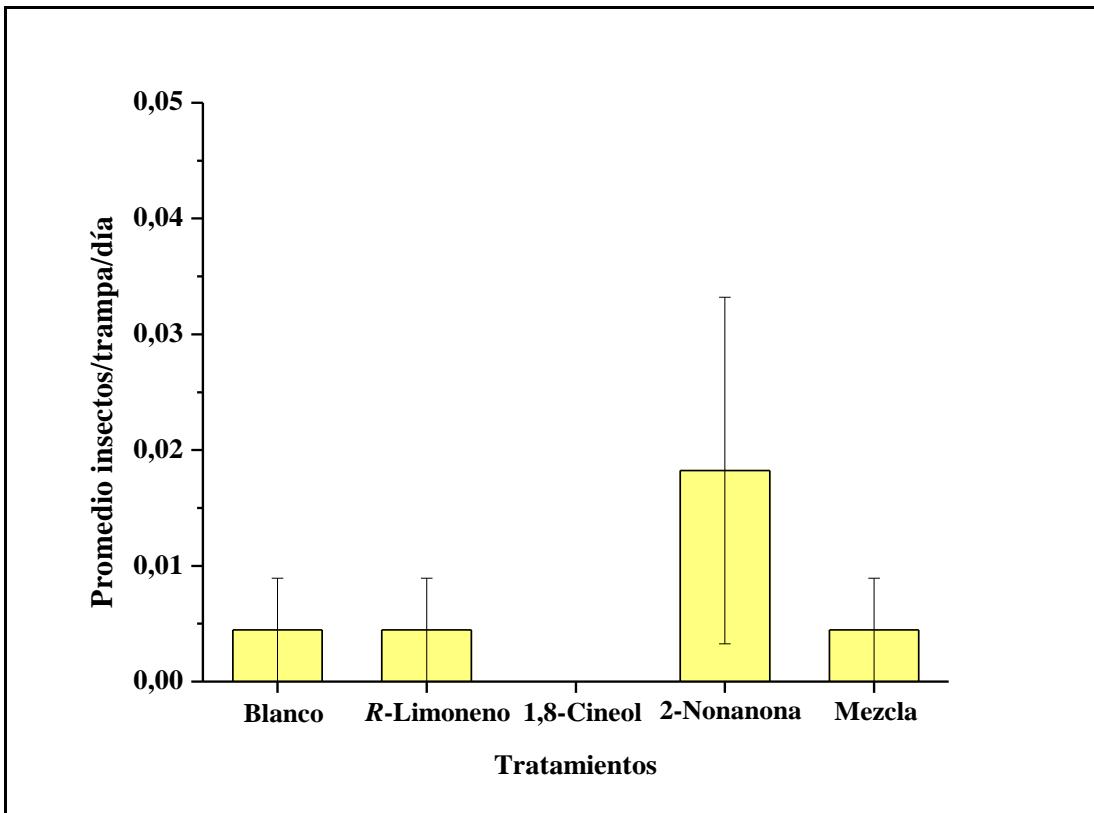


Figura 3.13. Promedio captura de adultos de *A. superciliosus* en trampas sometidas a distintos tratamientos y ubicadas entre las hileras de frambueso en el primer ensayo de campo ($N=4$). Diferencias no significativas para los contrastes entre tratamientos individuales y blanco, de acuerdo con el test de Wilcoxon ($P \leq 0,05$; $N = 4$).

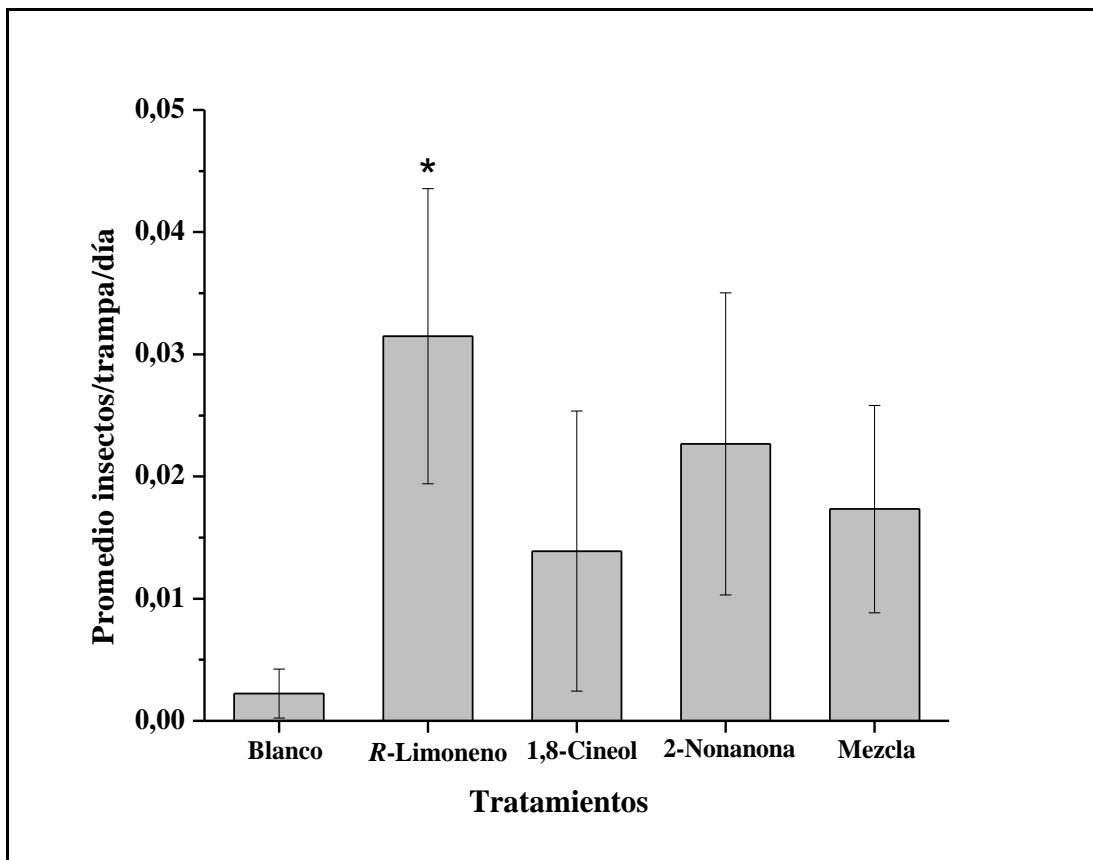


Figura 3.14. Promedio de captura de adultos de *A. superciliosus* en trampas sometidas a distintos tratamientos y ubicadas sobre las hileras de frambueso en el segundo ensayo de campo. Asterisco indica diferencia significativa respecto del blanco, según la prueba de Wilcoxon ($P \leq 0,05$; $N=15$).

3.4 Discusión

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que limoneno identificado en los extractos de volátiles de hembras de *A. superciliatus* producen una respuesta de atracción por parte de machos conespecíficos. Estudios similares reportados por Rudinsky et al. (1977), señalan que tanto machos como hembras del escolítido *Dendroctonus pseudotsugae* liberan limoneno como atrayente. Dickens et al. (1983), reportaron que hembras de *D. pseudotsugae*, que son las pioneras en la infestación del hospedero, mostraron una respuesta altamente específica a limoneno, éstas mostraron ser diez veces más sensibles que los machos a este compuesto. Así la orientación y selección del hospedero por el sexo pionero podría ser facilitada por su mayor sensibilidad a un volátil de hospedero en particular. Por su parte, Leskey et al. (2001), señalan que limoneno aumenta la eficiencia de trampas de captura para el monitoreo del curculiónido *Conotrachelus nenuphar*, mientras que ensayos con mezclas de monoterpenos, provenientes de hospedero, en las que participa limoneno, resultaron ser atrayentes para los curculiónidos *Hylobius pales* (Siegfried, 1987), y *Smicronyx fulvus* (Roseland et al., 1992).

Limoneno ha sido reportado por Robertson et al. (1993) como compuesto volátil emitido por cuatro cultivares de frambueso (*Rubus idaeus*); a su vez Parra et al. (2009) señalan que limoneno emitido por arándano (*Vaccinium corymbosum*), generó una respuesta de atracción por parte de individuos adultos de *A. superciliatus*, en bioensayos olfatométricos. El origen de limoneno encontrado en extracto de volátiles de hembras, podría indicar que hembras de *A. superciliatus*, secuestra compuestos del hospedero para su posterior uso como feromona con la finalidad de atraer machos conespecíficos de una manera similar al

comportamiento descrito por Rudinsky et al. (1977) para *D. pseudotsugae* (Tillman et al., 1999).

Al evaluar la actividad de los isómeros *R* y *S* de limoneno mediante bioensayos electroantenográfico y conductual, se observó que machos y hembras tienen la capacidad de percibir *R*- limoneno, pero sólo los machos fueron atraídos por dicho isómero. La respuesta diferencial frente a los isómeros de limoneno ha sido reportada para otras especies de curculiónidos, como es el caso de *R*-limoneno que solo elicitó respuesta electroantenográfica en hembras de *Anthonomus grandis*, mientras ambos isómeros *R* y *S*, logran estimular las antenas de machos conespecíficos (Dickens, 1984). De igual forma, receptores olfativos neuronales de *Hylobius abietis*, responden con mayor intensidad al isómero *S* (Wibe et al., 1998). Por su parte, Miller (2007) señala que trampas bañadas con *R*-limoneno o *S*-limoneno logran atraer machos y hembras del escolítido *Conophthorus coniperda*, sin embargo *R*-limoneno interrumpe la atracción del depredador *Enoclerus nigripes* a trampas bañadas con pityol (feromona producida por hembras de *C. coniperda*).

La respuesta electrofisiológica de *A. superciliosus* frente a *R*-limoneno, y la falta de actividad del isómero *S*-limoneno, indicaría que tanto el proceso de biosíntesis de semioquímicos como el sistema olfativo receptor son altamente específicos. Similares relaciones entre estructura y bioactividad de feromonas ha sido reportado por Mori (1998).

Estudios realizados en otros curculiónidos, señalan la presencia de células receptoras especializadas que responden a limoneno y α -pineno (Zagatti et al., 1997; Bichão et al., 2005a; Bichão et al., 2005b). Si bien en este estudio los resultados electroantenográficos indicaron que antenas de machos de *A. superciliosus* posee receptores para α -pineno, no fue posible establecer su actividad en el bioensayo olfactométrico a las tres dosis ensayadas.

α -Pineno ha sido reportado como atrayente (Byers, 1995), precursor y sinergista de feromonas para escolítidos (Miller et al., 2000; de Groot y DeBarr, 1998). Miller et al. (2003) y de Groot et al. (2002), reportan que (-)- α -pineno sinergiza la atracción de machos y hembras de *Conophthorus coniperda* y *C. ponderosae* a trampas bañadas con pityol. Hobson et al. (1993) encontraron que (-)- α -pineno interrumpe la atracción de *Dendroctonus valens* a (+)- α -pineno. Por su parte Wibe et al. (1998) señala que receptores olfativos neuronales del curculiónido *H. abietis*, responden con mayor intensidad al isómero (-)- α -pineno.

Si bien los ensayos de campo pueden ser considerados preliminares, es posible destacar algunos resultados. En primer lugar, llama la atención que para el primer ensayo con trampas instaladas entre hileras, la totalidad de los individuos de *A. superciliosus* colectados correspondieran a hembras. En este caso, podría sugerirse que son ellas las que exploran y migran en búsqueda de nuevas fuentes de alimentación para su progenie, comportamiento similar al descrito por Kaakeh et al. (2001), para hembras de *Rhynchophorus ferrugineus*. Más aún, considerando el hecho de que si bien los insectos emergen en el mes de octubre, no comienzan a copular sino hasta el mes de diciembre o enero de la misma temporada (Parra et al., 2009), lo que indicaría que las hembras requieren alimentarse para lograr la madurez sexual y/o para secuestrar metabolitos de su planta hospedera, los que posteriormente liberarían con el fin de atraer machos conespecíficos (Wood, 1982; Vanderwel, 1994).

Por otra parte, en el segundo ensayo, efectuado instalando las trampas sobre las hileras, solamente *R*-limoneno consiguió un desempeño significativo al ser comparado con el tratamiento control (Blanco). Esto, confirma los resultados de laboratorio y refuerza la

postura de que este compuesto cumple un importante rol en la ecología química de esta especie.

En último término, no debe ser pasado por alto, que el bajo número de insectos capturados indica que es fundamental evaluar parámetros como el tipo y color de trampa, lugar y altura de instalación, tiempo de recambio de dispositivo de liberación y condiciones ambientales (temperatura, velocidad del viento, lluvias) que afectan la eficiencia de la trampa (Montiel et al., 2008). Estudios realizados por Lamothe et al. (2008) en los cuales evaluaron el efecto de factores abióticos como lluvia, temperatura y viento, sobre la eficiencia de trampas piramidales de captura de *C. nenuphar*, indicaron que el número de insectos capturado fue superior en días cálidos (20 – 25°C), con baja velocidad del viento, y durante o poco después de llover. Por su parte, Francese et al. (2008), evaluaron parámetros como color y la altura de las trampas, sobre la eficiencia de trampas pegajosas para capturar *Agrius planipennis*, observándose un mayor número de individuos capturados en trampas de color púrpura en relación a trampas blancas y rojas, y en trampas instaladas a 13 metros del nivel del suelo, en relación a aquellas instaladas a ras de suelo. Similares estudios de evaluación de diferentes tipos de trampas para coleópteros, así como efectos de color y otros parámetros son reportados, entre otros, por de Groot y Nott (2001); McIntosh et al. (2001); Alm y Dawson (2003), y Campbell y Borden (2006).

3.5 Referencias

Agelopoulos, N., M. Birkett, A. Hick, A. Hooper, J. Pickett. E. Pow, L. Smart, D. Smiley, L. Wadhams, y C. Woodcock. 1999. Exploiting semiochemicals in insect control. Pesticide Science 55:225-235.

Alm, S., y Ch. Dawson. 2003. Evaluation of Two Prototype Traps and Existing Trap Designs for Captures of Japanese Beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Economic Entomology. 96: 453-455.

Bichão, H., A. Karlson, A. Wibe, J. Araújo, y H. Mustaparta. 2005a. Molecular receptive ranges of olfactory receptor neurones responding selectively to terpenoids, apliphatic green leaf volátiles and aromatic compounds, in the Strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi*. Chemoecology. 15:211-226.

Bichão, H., A. Karlson, J. Araújo, y H. Mustaparta. 2005b. Five types of olfactory receptor neurons in the Strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi*: Selective responses to inducible Host-plant volatiles. Cemical Senses. 30: 153-170.

Byers, J. 1995. Host tree chemistry affecting colonization in bark beetles. In: R. T. Cardé & W. J. Bell (eds), Chemical Ecology of Insects 2. Chapman and Hall, New York, pp. 120–150.

Campbell, S., y J. Borden. 2006. Close-range, in flight integration of olfactory and visual information by a host-seeking bark beetle. Entomologia Experimentalis et Applicata. 120:91-98.

de Groot, P., y G. DeBarr. 1998. Factors affecting capture of the white pine cone beetle, *Conophthorus coniperda* (Schwarz) (Col., Scolytidae) in pheromone traps. Journal of Applied Entomology 122: 281–286.

de Groot, P., y R. Nott. 2001. Evaluation of traps of six different designs to capture pine sawyer beetles (Coleoptera: Cerambycidae). Agricultural and Forest Entomology. 3: 107 - 111.

de Groot, P., R. Nott, y L. MacDonald. 2002. Influence of enantiomers of α -pinene on the response of the red pine cone beetle, *Conophthorus resinosae* to its pheromone pityol. Entomologia Experimentalis et Applicata 105: 169–174.

Dickens, J., A. Gutmann, T. Payne, L.Ryker, y J. Rudinsky. 1983. Antennal olfactory responsiveness of douglas-fir beetle, *Dendroctonus pseudotsugae* Hopkins (Coleoptera : Scolytidae) to pheromones and host odors. Journal of Chemical Ecology. 9: 1383-1395.

Dickens, J. 1984. Olfaction in the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera:Curculionidae): Electroantennogram studies. Journal of Chemical Ecology. 10:1759-1785.

Downham, M., N. Smit, P. Laboke, D. Hall, D. Farman, A. Braun, y B. Odongo. 1999. Specificity of response to sex pheromones among sweetpotato weevils, *Cylas puncticollis* and *C. brunneus*. Journal of Chemical Ecology. 25: 591-609.

Francese, J., J. Oliver, I. Fraser, D. Lance, N. Youssef, A. Sawyer, y V. Mastro. 2008. Influence of Trap Placement and Design on Capture of the Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae). Journal of Economic Entomology. 101: 1831-1837.

Guerrero, A. 1998. Feromonas sexuales de insectos, 271-296, en X. Bellés(ed.). *Insecticidas biorracionales*. RAYCAR, S.A. Impresores, Madrid.

Gunawardena, N., F. Kern, E. Janssen, Ch. Meegoda, D. Schäfer, O. Vostrowsky, y H. Jürgen Bestmann. 1998. Host attractants for red weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*: Identification, electrophysiological activity, and laboratory bioassay. Journal of Chemical Ecology. 24: 425-437.

Hobson, K., D. Wood, L. Cool, P. White, T. Ohtsuka, I. Kubo, y E. Zavarin, 1993. Chiral specificity in responses by the bark beetle *Dendroctonus valens* to host kairomones. Journal of Chemical Ecology 19: 1837–1846.

Jurenka, R. 2004. Insect Pheromone Biosynthesis. Topics in Current Chemistry 239: 97–132.

Kaakeh, W., F. El-Ezaby, M. Aboul-Nour, y A. Khamis. 2001. Management of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv., by a pheromone/food-based trapping system. Proceedings of The Second International Conference on Date Palms Al-Ain, United Arab Emirates University. March 25-27. 325-343.

Kalinová, B., K. Stránský, J. Harmatha, R. Ctvrtěčka, y Zd'arek, J. 2000. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? Entomologia Experimentalis et Applicata 95: 47–52.

Lamothe, S., G. Chouinard, y CH. Vincent. 2008. Abiotic Factors and Trap Design Modulate the Performance of Traps Used to Monitor the Plum Curculio. Journal of Economic Entomology. 101: 1838-1846.

Leal, W.S. 2005. Pheromone reception. Topics in Current Chemistry. 240: 1-36.

Leskey, T., R. Prokopy, S. Wright, P. Phelan, y L. Haynes. 2001. Evaluation of individual components of plum odor as potential attractants for adult plum curculios. Journal of Chemical Ecology. 27: 1-17.

Malo, E., L. Cruz-López, J. Toledo, A. Del Mazo, A. Virgen, y J. Rojas. 2005. Behavioral and electrophysiological responses of the Mexican fruit fly (Diptera:Tephritidae) to guava volatiles. Florida Entomologist. 88: 364-371.

Maarse, H. 1991. Volatile compounds in food and beverages, Marcel Dekker, Inc., New York.

McIntosh, R., P. Katinic, J. Allison, J. Borden, y D. Downey. 2001. Comparative efficacy of five types of trap for woodborers in the Cerambycidae, Buprestidae and Siricidae. Agricultural and Forest Entomology. 3: 113-120.

Miller, D. 2007. Limonene: Attractant kairomone for White pine cone beteles (Coleoptera: Scolytidae) in an eastern white pine seed orchard in western north Carolina Forest Entomology. Journal of Economic Entomology. 100: 815-822.

Miller, D., H. Pierce, Jr, P. deGroot, N. Jeans-Williams, R. Bennett, y J.H. Borden. 2000. Sex pheromone of *Conophthorus ponderosae* (Coleoptera:Scolytidae) in a coastal stand of western white pine (Pinaceae). Canadian Entomologist. 132:243-245.

Miller, D., C. Crowe, C. Asaro, y G. DeBarr. 2003. Dose and enantiospecific responses of White pine cone beteles, *Conophthorus coniperda*, to α -pinene in an eastern white pine seed orchard. Journal of Chemical Ecology. 29:437-451.

Montiel, C., G. García-Coapio, J. Rojas, E. Malo, L. Cruz-López, I. del Real, y H. González-Hernández. 2008. Aggregation pheromone of the agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 127: 207-217.

Mori, K. 1998. Chirality and insect pheromones. Chirality. 10:578-586.

Parra, L., A. Mutis, R. Ceballos, F. Pardo, F. Perich, y A. Quiroz. 2009. Behavioral response of *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae) to volatiles released from *Vaccinium corymbosum* L. Environmental Entomology. 38 : 781-789.

Plettner, E. 2002. Insect Pheromone Olfaction: New Targets for the Design of Species-Selective Pest Control Agents. Current Medicinal Chemistry. 9: 1075-1085.

Quiroz, A., E. Fuentes, C. Ramírez, G. Russell, y H. Niemeyer .1999. Host-plant chemicals and distribution of *Neuquenaphis* on *Nothofagus*. Journal of Chemical Ecology 25: 1043-1054.

Reddy, G., y A. Guerrero. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. Trends in plant science. 9: 253-261.

Robertson, G., D. Griffiths, J. Woodford, A. Birch, J. Picket, y L. Wadhams.1993. A comparison of the flower volatiles from hawthorn and four raspberry cultivars. Phytochemistry. 33: 1047-1053.

Roseland, C., M. Bates, R. Carlson, y C. Oseto. 1992. Discrimination of sunflower volatiles by the red sunflower seed weevil. Entomologia Experimentalis et Applicata. 62: 99-106.

Rudinsky, J., M. Morgan, L. Libbey, y T. Putman. 1977. Limonene released by the scolytid beetle *Dendroctonus pseudotsugae*. Zeitschrift für Angewandte Entomologie. 82:376-380.

Ruther, J., A. Reinecke, y M. Hilker. 2002. Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time-dependent bouquets and novel function of (Z)-3-hexen-1-ol as a sexual kairomone. Ecological Entomology. 27: 76-83.

Sappington, T., y D. Spurgeon. 2000. Variation in boll weevil (Coleoptera:Curculionidae) captures in pheromone traps arising from wind speed moderation by brush lines. 29: 807-814.

Siegfried, B. 1987. In-flight responses of the pales weevil, *Hylobius pales* (Coleoptera:Curculionidae) to monoterpenes constituents of southern pine gum turpentine. Florida Entomologist. 70: 97-102.

Tillman, J., S. Seybold, R. Jurenka, y G. Blomquist. 1999. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29: 481–51.

Tooker, J., A. Crumrin, y L. Hanks. 2005. Plant volatiles are behavioral cues for adult females of the gall wasp *Antistrophus rufus*. Chemoecology 15:85–88.

Vanderwel, D. 1994. Factors affecting pheromone production in beetles. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 25: 347-362.

Vet, L., J. Van Lenteren, M. Heymans, y E. Meelis. 1983. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of Hymenopteran parasitoids and other small insects. Physiological Entomology 8: 97-106.

Vogt, R. 2003. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. 391–445 pp, in G. J. Blomquist and R. G. Vogt. Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier. Oxford.

Wibe, A., A. Borg-karlsson, M. Persson, T. Norin, y H. Mustaparta. 1998. Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in some conifers and receptor neuron discrimination of α -pinene and limonene enantiomers in the pine weevil, *Hylobius abietis*. Journal of Chemical Ecology. 24: 273-287.

Wood, D. 1982. The role of pheromones, kairomones and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. Annual Review of Entomology. 27:411-446.

Zagatti, R., G. Lemperiere, y C. Malosse. 1997. Monoterpene emitted by the large pine weevil, *Hylobius abietis* (L) feeding on Scots pine, *Pinus sylvestris* L. Physiological Entomology. 22: 394-400.

Capítulo 4

Conclusiones generales

4. Conclusiones generales

El estudio de las feromonas de contacto asociadas a la conducta de apareamiento de *A. superciliosus* permitió establecer un protocolo de conducta y determinar que existen compuestos hidrocarbonados en la cutícula de las hembras que actúan como feromona de corto alcance, permitiéndole al macho reconocer a su potencial pareja y aparearse.

La captura de compuestos volátiles provenientes de machos y hembras en una matriz de Porapak Q y su posterior identificación química mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS), reveló la presencia de los monoterpenos limoneno y α -pineno en los extractos de volátiles de hembras, mientras que sólo se identificó α -pineno en los extractos de volátiles de machos.

Bioensayos olfatométricos con extractos de volátiles de machos y hembras indicaron que los volátiles de hembras fueron atractantes sólo para machos, mientras que los volátiles de machos fueron repelentes para machos conespecíficos.

Los ensayos electroantenográficos con los isómeros de limoneno *R* y *S*, y con α -pineno permitieron establecer que las antenas de machos de *A. superciliosus* poseen receptores olfativos para *R*-limoneno y α -pineno, mientras que las hembras sólo las tendrían para *R*-limoneno.

Bioensayos olfatométricos con los compuestos puros (α -pineno y *R* y *S* limoneno) determinaron que *R*-limoneno tiene actividad atrayentes sobre machos de *A. superciliosus*, mientras que a las dosis ensayadas no fue posible determinar la actividad biológica de α -pineno en machos.

La evaluación en campo de la actividad de *R*-limoneno, junto con otros compuestos señalados como kairomonas por Parra et al. (2009), mostró que *R*-limoneno logró el mayor número de insecto capturados, siendo éste el único tratamiento que se distinguió estadísticamente por sobre el control. Estos resultados, si bien preliminares, permiten confirmar y avalar los obtenidos en los ensayos de conducta y electroantenográficos.

Los resultados obtenidos en este estudio, permiten concluir que la conducta de apareamiento de la especie *A. superciliosus* está mediada por dos clases de feromonas; Una feromona de largo alcance, en la cual participa *R*-limoneno liberado por hembras, con el objetivo de atraer machos y aumentar al probabilidad de encontrarse, y una feromona de contacto responsable del reconocimiento de la potencial pareja.

Capítulo 5

Proyecciones

5. Proyecciones

La conducta de apareamiento entre machos y hembras de *Aegorhinus superciliosus* involucra una serie de eventos que al menos, implica la liberación de semioquímicos de largo alcance por hembras con el objetivo de aumentar la probabilidad de que los machos encuentren su potencial pareja, y la participación de feromonas de corto alcance presentes en la cutícula de la hembra responsables del apareamiento entre los sexos. Sin duda, es necesario seguir estudiando y dilucidando todas las etapas y los aspectos químicos y biológicos involucrados en la conducta sexual de esta especie, con miras a desarrollar estrategias eficientes de control.

La incorporación de herramientas de biología molecular, implicadas dentro de la química ecológica reversa permitiría mediante la identificación, clonación y expresión contar con posibles proteínas que tienen la capacidad de unir específicamente a un ligando odorífero. Mediante posteriores ensayos de unión entre estas proteínas y los putativos semioquímicos seleccionados mediante ensayos electrofisiológicos, se podrá contar con compuestos para ser ensayados en campo.

Es necesario continuar con los ensayos de campo y establecer las condiciones de operación para el sistema de trámico con miras a desarrollar un método alternativo de control basado en el uso de semioquímicos para *A. superciliosus*, lo que beneficiará tanto a productores orgánicos como a productores tradicionales.

Capítulo 6

Anexos

Anexo 1. Cinéticas de liberación para *R*-limoneno y 1,8-cineol desde septas.

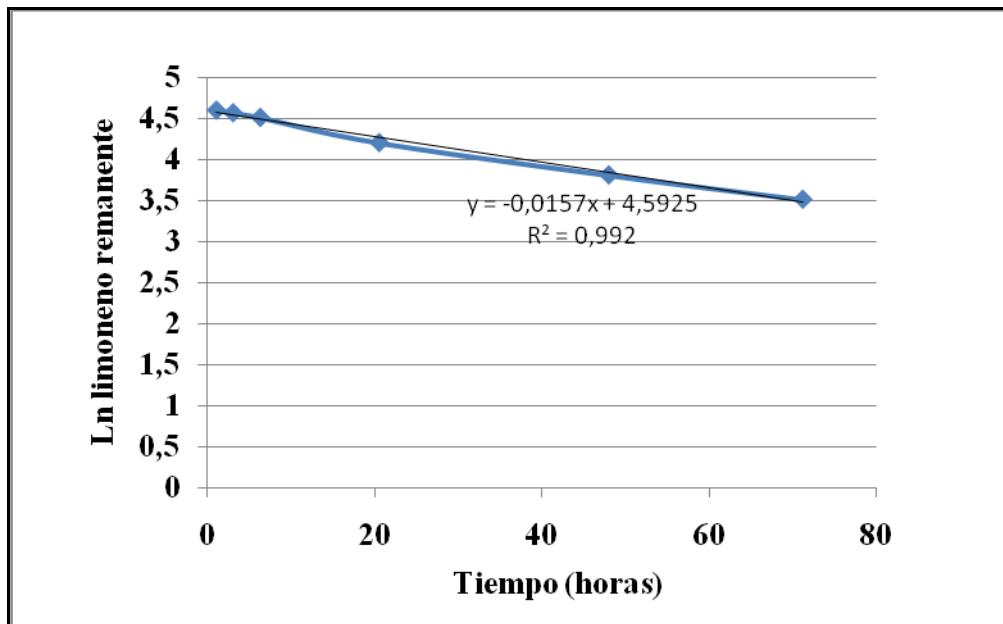


Figura A.1. Cinética de liberación de *R*-limoneno desde septas usadas como dispositivo de liberación en ensayos de campo.

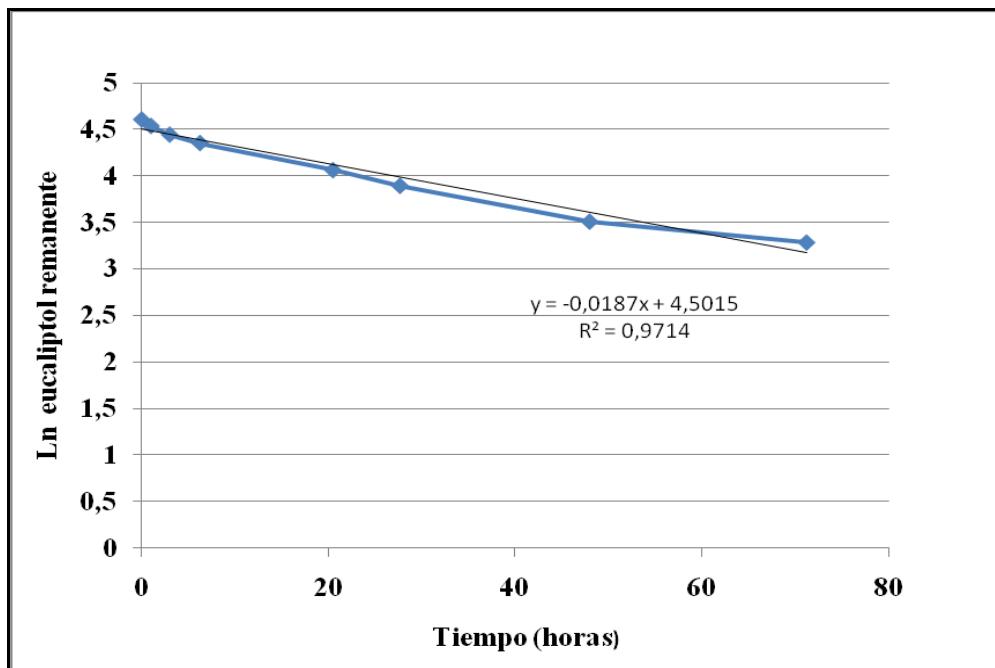


Figura A.2. Cinética de liberación de 1,8-cineol desde septas usadas como dispositivo de liberación en ensayos de campo.

Anexo 2. Publicaciones.

Evidence of Contact Pheromone Use in Mating Behavior of the Raspberry Weevil (Coleoptera: Curculionidae)

ANA MUTIS,^{1,2} LEONARDO PARRA,^{1,2} RUBÉN PALMA,^{1,2} FERNANDO PARDO,³
FERNANDO PERICH,³ AND ANDRÉS QUIROZ^{2,3,4}

Environ. Entomol. 38(1): 192–197 (2009)

ABSTRACT Numerous studies of insect species have shown that a subset of female cuticular hydrocarbons is used as short-range or contact pheromones. Here, we studied the possible use of contact pheromones in the mating behavior of the weevil *Aegorhinus superciliosus*, a native species of Chile. Males mounted females only after antennal contact with the female's cuticle, and only 33% of the males attempted to mate with dead females washed with solvent. When a glass rod (dummy) was coated with female cuticular extracts, males exhibited behaviors similar to those observed with females. A preliminary gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis of cuticular extracts indicated that males and females share a series of aliphatic hydrocarbons but that the relative abundance of some of these compounds differ between the sexes. These results suggest that cuticular lipids mediate mating behavior of the raspberry weevil and provide the first evidence of contact pheromones in curculionids.

KEY WORDS *Aegorhinus superciliosus*, raspberry weevil, mating behavior, contact pheromone

The raspberry weevil, *Aegorhinus superciliosus* (Guerin) (Coleoptera: Curculionidae), is native to southern Chile and is also found in the Neuquén district of Argentina (Kuschel 1951). In Chile, the species is a pest of blueberries, raspberries, and similar berry crops (Aguilera and Rebolledo 2001). Although adults cause some damage by chewing leaves and shoots, serious damage is caused by the root-feeding larvae, which can kill plants (Guerrero and Aguilera 1989, Cisternas et al. 2000, France et al. 2000). Chemical and biological treatments have been used to control this pest. Application of azinphosmethyl or diazinon insecticides to the foliage before and after flowering reduces adult weevil populations. However, sprays are not effective at controlling the root-boring larvae, and long-lasting residual pesticides are not used because of concerns of toxicity to pollinators (Guerrero and Aguilera 1989, Aguilera 1995, France et al. 2000). In addition, both fungi and entomopathogenic nematodes have been tested as biological control agents of weevil populations (Gerdung 1999, France et al. 2000), but results have been unreliable because of the variability of abiotic conditions and soil types (Molina 1997).

Manipulation of populations with semiochemicals is another possible method for pest management. In particular, interruption of sexual communication with synthetic pheromones is well known as an environmentally benign method of pest control that allows for species-specific control and concomitant reduction in the use of pesticides (Rodríguez and Niemeyer 2005). Volatile sex attractant pheromones are detected by olfactory receptors, whereas contact pheromones are perceived as contact or gustatory stimuli (Nojima et al. 2007). Both attractant and contact pheromones may be important for mating success and, in some species, the two types of pheromones are used sequentially (Nojima et al. 2005). To date, there have been no studies concerning the mating behavior of *A. superciliosus* or the possible semiochemicals that are involved, although long-range pheromones are known to be important to the mating of other curculionids (Stevens 1998, Mithran and Subbaraman 1999). In addition, studies with other beetle species have provided evidence that short-range pheromones play an important role in reproduction (Ginzel and Hanks 2003, Ginzel et al. 2003, Allison et al. 2004). Here, we report evidence of a female contact pheromone and associated male behavior for *A. superciliosus*.

¹ Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

² Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

³ Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁴ Corresponding author: Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Av. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile (e-mail: aquiroz@ufro.cl).

Materials and Methods

Insects. Adults of both sexes of *A. superciliosus* were collected from a raspberry planting in Vilcún, Araucanía, Chile, and placed in individual petri dishes during the summer of 2007. Weevils used in mating trials and bioassays remained isolated for at least 24 h. An

insect was used in an experiment only if it was able to walk and all appendages were intact.

Preparation and Analysis of Whole Body Cuticular Extracts. Cuticular components were extracted according to the methodology described by Ginzel et al. (2006). Cuticular chemicals were extracted from five freeze-killed female and male *A. superciliosus* by individually immersing each weevil in seven 1-ml aliquots of pentane for 2 min each. The resultant seven aliquots were combined and concentrated to 1 ml under a stream of N₂ into a single extract. Extracts were analyzed by coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with electron impact ionization (70 eV) using a ThermoFinnigan chromatograph (Milan, Italy) equipped with a BP-1 capillary column (30 m by 0.22 mm by 0.25 µm; SGE, Victoria, Australia) with helium carrier gas. The GC oven was programmed to ramp from 40 to 290°C at 5°C/min and hold for 15 min. The injector and transfer line temperatures were 250°C. The detection limit (10 ppb) was determined using eicosane.

The components of the cuticular extracts were identified for comparison of their Kovats indices and mass spectra with those of commercial standards and library database spectra using the NIST mass spectral search program (ver. 2.0), Pherobase (<http://www.pherobase.com>) and NIST webbook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>) cited by Babushok et al. (2007). A C₂₁-C₄₀ hydrocarbons blend and individual hydrocarbons, tricosane, pentacosane, heptacosane, and nonacosane were purchased from Sigma-Aldrich (chemical purity > 99%). A 2-methylhexacosane standard was obtained from J. G. Millar, Department of Entomology, University of California, Riverside, CA. The relative abundance of cuticular hydrocarbons of female and male *A. superciliosus* were calculated using the data obtained from the GC-MS (Ginzel et al. 2006, De Pasquale et al. 2007, Yew et al. 2008). The differences in the mean relative abundances of specific hydrocarbons between the sexes were analyzed with Student *t*-tests ($\alpha = 0.05$; $N = 5$ for each male and female).

Mating Sequence. To create an ethogram that describes the mating behavior of *A. superciliosus*, we introduced a live female and a male in a 5-cm diameter petri dish ($N = 30$). The behavior was recorded for 5 min with a video camera (SONY DCR-HC46) to confirm visual observations. The ethogram was constructed using the χ^2 method (Martin and Bateson 1994). The independence of qualitative variables was determined according to Bishop et al. (1975), and individual transitions were determined by the method described by Sokal and Rohf (1981).

Bioassays with Female Weevils. We modified the bioassay methods described by Ginzel et al. (2003) that were effective in identifying the contact pheromones of longhorned beetle species. All female treatments were replicated four times ($N = 4$) and evaluated with 10 males. Female treatments were as follows: (1) live females; (2) freeze-killed females; (3) solvent-washed freeze-killed females with cuticular components removed; and (4) solvent-washed freeze-killed females coated with a female cuticular hydro-

carbon extract. For treatment 1, a live female was placed in a petri dish (5 cm diameter) with a male, and the behavior of each male was recorded by video for 5 min. For treatment 2, a freeze-killed female (-12°C for 20 min) was warmed to room temperature for 25 min and presented to a male, as described above. For treatment 3, the cuticular components were removed from a solvent-washed freeze-killed female (carrage) by extraction in pentane, as described above. The carcass was air-dried for 30 min to allow the solvent to evaporate and presented to a male. For treatment 4, a 1 ml of female cuticular pentanic extract corresponding to one female equivalent (FE) was pipetted onto a carcass and the pentane solvent was allowed to evaporate. The treated carcass was presented to a male to assess the bioactivity of the extract.

A trial was scored as an "attempted mating" if the male touched a female with his antennae, mounted a female, and extruded and inserted his aedeagus (steps 1-4). When, after touching a female with his antennae, the male continued walking or mounted a female but did not extrude his aedeagus, the trial was recorded as "mating not attempted" (steps 1 and 2). Frequency data of males that did or did not attempt to mate were analyzed using Fisher test (Conover 1999) to compare the treatment with the control (live female).

Bioassays with Glass Dummy Treatments. The pheromonal activity of cuticular extracts and individual or blends of hydrocarbon standards were evaluated using method that was modified from Fukaya et al. (1999). A glass rod (glass dummy, 50 mm diameter by 150 mm length) was coated with 500 µl of different solutions: (1) female cuticular extract (0.5 FE); (2) male cuticular extract (0.5 ME); (3) one of the following single hydrocarbons including tricosane, pentacosane, 2-methylhexacosane, heptacosane, or nonacosane formulated in pentane at 10 ng/µl; and (4) synthetic female cuticular blend (1.0 FE). The synthetic solution was formulated in pentane and comprised of the more abundant hydrocarbons present in the cuticular extract of females at ratios found in nature: a 1.5:5.0:3.0:2.0:1.0 blend of tricosane, pentacosane, 2-methylhexacosane, heptacosane and nonacosane, respectively (Table 2). The glass dummy was placed in a petri dish, and one male was introduced in the dish. Behaviors were recorded for 10 min. Because the glass dummy is a solid device, a male cannot insert his aedeagus. Hence, a trial was scored as a "positive response" if the male touched the glass dummy with his antennae, mounted the glass dummy, and extruded his aedeagus (steps 1-3).

Results

Mating Behavior. After the approach, the male touched the female with his antennae from a frontal, lateral, or posterior position (Fig. 1, step 1). When the contact was from the front, the male walked on and explored the body of the female with his antennae, from the head to the elytral rear tip, while holding her with his legs and simultaneously rubbing the costal

Table 1. Response of male *A. superciliosus* to different treatments

Treatment	Number of males tested	Number of males attempted to mate	Response (%)
Live female (control)	40	38	95
Freeze-killed female	40	32 ^a	80
Solvent-washed freeze-killed female	40	13 ^b	33
Solvent-washed freeze-killed female + female cuticular extract	40	23 ^b	58

^a Not significantly different from live females.^b Significantly different from live female at $P \leq 0.05$ (Fisher's test).

side of the female abdomen with his legs. When the male found the elytrae rear tip of the female body, he quickly turned and aligned his body to mount the female. When lateral contact was made, the male turned and aligned his body to mount the female. When the contact was posterior, the male mounted the female (Fig. 1, step 2). Then, the male bent his abdomen to connect his aedeagus with the female's genitalia, and a receptive female opened her ovipositor valve (Fig. 1, step 3). Finally, the male inserted his aedeagus into the ovipositor to copulate (Fig. 1, step 4). Twenty-eight of 30 males (95%) reached step 4. The average copulation time in the laboratory was 91.16 ± 6.06 min ($n = 3$). Females generally remained immobile or walked slowly during copulation, but 15.00 ± 0.56 min before the end of copulation, walking accelerated and was followed by their separation.

Function of Cuticular Components. When recently freeze-killed females were presented to males, 80% of the males attempted to mate with the females ($P = 0.0872$), similar to behavior exhibited by males tested with live females ($P = 0.4937$); but only 33% of the males attempted to mate with the same dead females washed with pentane ($P < 0.0001$), suggesting that the

signals for mate recognition were largely removed by the solvent. Importantly, 58% of males were attracted by carcasses coated with a female cuticular extract ($P = 0.0001$) (Table 1).

Chemical Analysis of Cuticular Extracts. Analyses of male and female cuticular extracts by GC-MS indicated that *A. superciliosus* males and females share several long-chain aliphatic hydrocarbons, which are the major extractable cuticular components. Although most components were present in both sexes, the relative abundances were different between males and females (Table 2). The most abundant hydrocarbons in male extracts were 2-methylhexacosane and n-pentacosane, whereas the major alkane in females was n-pentacosane. Some sex-specific compounds were identified in the extracts, such as 2-methyldocosane, an unidentified compound (IK 2586), and octacosane, which were specific to males, and another unidentified component (IK 2730), which was specific to females.

Pheromonal Activity. In our assay, 70% of males extruded his aedeagus in response to a glass rod (dummy) coated with female cuticular extracts (Table 3; Fig. 2), whereas no response was observed when

Table 2. Relative abundance of cuticular hydrocarbons of female and male *A. superciliosus*

Compounds	Relative abundance (% of total) ^a		KI Exp. ^b	KI Lib. ^c	Reliability of identification ^d	P ^e
	Female	Male				
2-Methyldocosane	ND	1.20 ± 0.11	2,265	2,264	2	
Tricosane	9.90 ± 1.19	11.10 ± 0.50	2,300	2,300	1	NS
11-Methyltricosane	0.70 ± 0.02	0.80 ± 0.20	2,338	2,336	2	NS
Tetracosane	1.20 ± 0.19	0.80 ± 0.09	2,400	2,400	1	NS
Unidentified	1.90 ± 0.38	2.30 ± 0.39	2,469		NS	
Pentacosane	31.9 ± 1.70	22.0 ± 1.37	2,500	2,500	1	0.004
11-Methylpentacosane	3.10 ± 0.55	3.20 ± 0.36	2,533	2,533	2	NS
Unidentified	ND	1.90 ± 0.12	2,586			
Hexacosane	2.70 ± 0.35	2.40 ± 0.19	2,600	2,600	1	NS
2-Methylhexacosane	16.70 ± 1.44	22.90 ± 2.58	2,663	2,664	1	NS
Heptacosane	14.40 ± 1.25	19.0 ± 0.96	2,700	2,700	1	0.028
Unidentified	4.30 ± 0.09	ND	2,730			
Octacosane	ND	3.00 ± 0.47	2,800	2,800	1	
Unidentified	3.70 ± 0.40	1.80 ± 0.15	2,862		0.005	
Nonacosane	6.20 ± 0.22	5.90 ± 0.36	2,900	2,900	1	NS
Heptacosane	14.40 ± 1.25	19.0 ± 0.96	2,700	2,700	1	0.028

^a Mean \pm SEM; $n = 5$.^b Kovats indices experimental.^c Kovats indices library.

^d The reliability of the identification is indicated by the following letters: (1) mass spectrum (MS), Kovats indices and matching with standard; (2) mass spectrum and Kovats indices agree with corresponding data in the literature, but the data were not confirmed by comparison with the retention time or MS data for an appropriate identical standard compound.

^e Statistical significance of differences between the sexes in mean relative abundance was tested with Student *t*-test ($P \leq 0.05$).

ND, not determined; NS, not significant.

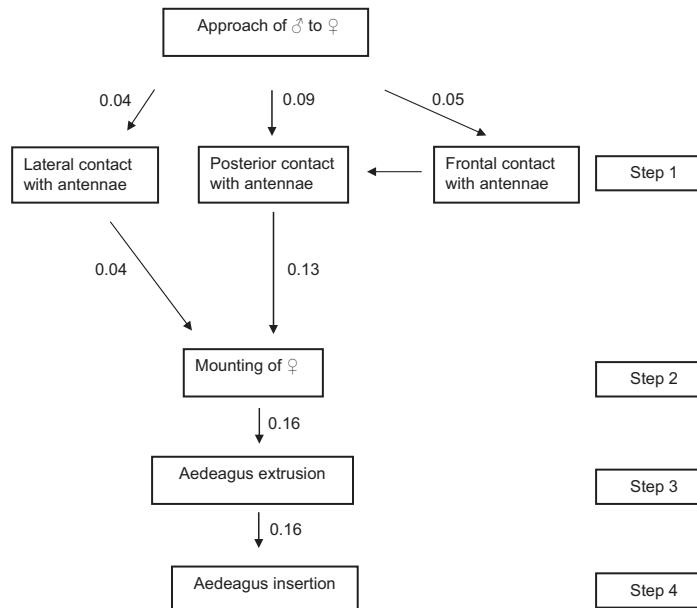


Fig. 1. Mating sequence in *A. superciliosus* ($N = 30$ couples, $P = 0.05$). The values indicate probabilities of transitions from one step to the next.

a glass rod was coated with male cuticular extracts (Table 3). A synthetic cuticular extract was prepared from a mixture of the five principal hydrocarbons present in the cuticle of females at their natural ratios. Glass rods coated with this mixture elicited antennal contact and mounting (steps 1–2) from 55% of the males but did not lead aedeagus extrusion.

Discussion

Males contacted both live and freeze-killed females with their antennae (step 1), suggesting that gustatory receptors are located in antennal sensory structures, similar to the clover head weevil *Hypera meles* (Smith et al. 1976), the pecan weevil *Curculio caryae* (Hatfield et al. 1976), the alfalfa weevil *Hypera postica* (Bland, 1981), and the plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Alm and Hall 1986). Similar behaviors were reported by Calyecac-Cortero et al. (2004) for the curculionid

Trischobaris championi and by Fukaya (2003), Ginzel and Hanks (2003), and Zhang et al. (2003) for cerambycid beetles. The responses of *A. superciliosus* males to freeze-killed conspecific females (Table 1) indicated that a behavioral response from females was not necessary for copulation. The lack of male responses to solvent-washed freeze-killed females indicated that the recognition signals were largely removed by the solvent, confirming that cuticular components are important for the recognition of a potential mate. The low percentage (33%) of male responses to solvent-washed freeze-killed females may be attributed to visual stimuli and/or mechanoreception (Ginzel et al. 2003). Visual orientation is likely to be involved in mate location in some cerambycids, such as *Anoplophora malasiaca* (Fukaya et al. 2005) and *A. glabripennis* (Li et al. 1999). The reduction in the response of males to solvent-washed freeze-killed females coated with female cuticular hydrocar-

Table 3. Responses of male *A. superciliosus* to synthetic compounds, female cuticular extracts, and male cuticular extracts

Treatment	Number of males tested	Number of males extruded his aedeagus	Response (%)
Dummy	20	0	0
Dummy + female cuticular extract	20	14 ^a	70
Dummy + tricosane	20	0 ^b	0
Dummy + pentacosane	20	0 ^b	0
Dummy + 2-methylhexacosane	20	0 ^b	0
Dummy + heptacosane	20	0 ^b	0
Dummy + nonacosane	20	0 ^b	0
Dummy + synthetic cuticular blend of hydrocarbons	20	0 ^b	0
Dummy + male cuticular extract	20	0 ^b	0

^a Significantly different from dummy at $P < 0.0001$ (Fisher's test).

^b Not significantly different from dummy.



Fig. 2. Response of a male *A. superciliosus* to a dummy coated with cuticular extracts of a female. Bent abdomen and extruded aedeagus are shown.

bon extract (58%) compared with freeze-killed females (80%) suggests that the processes of solvent extraction and reapplication of hydrocarbons changes the natural structure of the wax layer, similar to the description by Ginzel et al. (2003) for the longhorned beetle *Megacyllene robiniae*. Another possibility is that the reapplication of extract to a female body does not result in even distribution of compounds over the cuticle.

The different patterns and proportions of compounds observed in the cuticular extracts of male and female *A. superciliosus* indicate that the ratio between compounds and/or some sex-specific compounds are important factors for the proper activity of contact pheromone in this insect, as has been found in other species of beetles (Zhang et al. 2003, Ginzel et al. 2006). It is also possible that the cuticular hydrocarbons present on males and absent or present in low concentrations in females play a role in preventing mating attempts between males (Schlein et al. 1981). Most of the components identified from both males and females were n-alkanes or monomethyl-branched alkanes. This pattern is similar to that reported for the elytra hydrocarbons of the curculionids *Diaprepes abbreviatus* (Lapointe et al. 2004) and *Cylindrocopturus adspersus* (Pomonis and Hakk 1984).

The mating behavior (step 1–3) developed by males exposed to glass dummies coated with female cuticular extracts confirms that recognition cues were present in the extract and that the mating response was primarily mediated by chemicals rather than by tactile or behavioral signals from the female. Although no aedeagus extrusion was observed when the glass rods were coated with the partially reconstituted blend or individual hydrocarbons present in female extracts,

the males showed some signs of recognition, such as approach, antennal contact and mounting of the dummy particularly with the synthetic female cuticular extract blend (steps 1 and 2, but not steps 3 or 4). These results suggest that one or more minor components present in the female extract (Table 2, IK 2730) may be necessary to induce the full sequence of behaviors that culminate in copulation. Further research will be focused on identifying the minor sex-specific compounds in the cuticular extract of females.

Here, we report that mate recognition in *A. superciliosus* is mediated by contact pheromones and provide the first evidence of this type of pheromone in curculionids. The information generated in this study provides key baseline information for a detailed study of the semiochemistry of this pest insect.

Acknowledgments

We thank J. Millar, Department of Entomology, University of California, Riverside, for comments on this manuscript and for the gift of the 2-MeC₂₆ standard. Financial support for this research was supplied by CONICYT (Project AT 23070010) and MECESUP (FRO 0309).

References Cited

- Aguilera, A. 1995. Control selectivo de plagas en frutales de la zona sur, pp. 140–180. In Centro de Investigación INIA-Carillanca (ed.), Seminario de protección vegetal. Centro de Investigación INIA-Carillanca, Temuco, Chile.
- Aguilera, A., and R. Rebollo. 2001. Estudios larvarios de *Aegorhinus superciliosus* (GUERIN, 1830) (Coleoptera: Curculionidae). Rev. Chilena Entomol. 28: 5–8.
- Allison, J. D., J. H. Bordenand, and S. J. Seybold. 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). Chemoecology 14: 123–150.
- Alm, S. R., and F. R. Hall. 1986. Antennal sensory structures of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 79: 324–333.
- Babushok, V. I., P. J. Linstrom, J. J. Reed, I. G. Zenkevich, R. L. Brown, W. G. Mallard, and S. E. Stein. 2007. Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. J. Chromatogr. 1157: 414–421.
- Bland, R. G. 1981. Antennal sensilla of the adult alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 10: 265–274.
- Bishop, Y. M., S. E. Fienberg, P. W. Holland, and R. J. Light. 1975. Discrete multivariate analysis: theory and practice. MIT Press, Cambridge, MA.
- Calyecac-Cortero, H., J. Cibrián-Tovar, N. Bautista-Martínez, and J. López-Collado. 2004. Feeding, courtship and oviposition behavior of *Trichobaris championi* Barber (Coleoptera: Curculionidae). Agrociencia 38: 365–373.
- Cisternas, E., A. France, L. Devotto, and M. Gerdung. 2000. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas a la frambuesa. Instituto de Investigación Agropecuaria INIA-Quilamapu, Chillán, Chile.
- Conover, W. J. 1999. Practical nonparametric statistics. Wiley, New York.
- De Pasquale, C., S. Guarino, E. Peri, G. Alonzo, and S. Colazza. 2007. Investigation of cuticular hydrocarbons from *Bagrada hilaris* genders by SPME/GC-MS. Anal. Bioanal. Chem. 389: 1259–1265.

- France, A., M. Gerding, and A. Sandoval. 2000. Patogenicidad de una Colección de Cepas Nativas de *Metarrhizium* spp y *Beauveria* spp. en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorrhynchus sulcatus*. Agric. Técnica 60: 205–215.
- Fukaya, M. 2003. Review. Recent advances in sex pheromone studies on the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca*. Jap. Agr. Res. Quart. 37: 83–88.
- Fukaya, M., T. Akino, T. Yasuda, S. Tatsuki, and S. Wakamura. 1999. Mating sequence and evidence for synergistic component in female contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). Entomol. Sci. 2: 183–187.
- Fukaya, M., H. Yasui, T. Yasuda, T. Akino, and S. Wakamura. 2005. Female orientation to the male in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) by visual and olfactory cues. Appl. Entomol. Zool. 40: 63–68.
- Gerding, M. 1999. Agentes de Control Biológico de Plagas. Instituto de Investigación Agropecuaria INIA-Quilamapu, Chillán, Chile.
- Ginzel, M., and L. M. Hanks. 2003. Contact pheromones as mate recognition cues of four species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). J. Insect Behav. 16: 181–187.
- Ginzel, M. D., G. J. Blomquist, J. G. Millar, and L. M. Hanks. 2003. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. J. Chem. Ecol. 29: 533–545.
- Ginzel, M. D., J. A. Moreira, A. M. Ray, J. G. Millar, and L. M. Hanks. 2006. (Z)-9-Nonacosene- Major component of the contact sex pheromones of the beetle *Megacyllene caryae*. J. Chem. Ecol. 32: 435–451.
- Guerrero, J., and A. Aguilera. 1989. Plagas y enfermedades en el arándano chileno. Próxima Década 76: 24–29.
- Hatfield, L. D., J. L. Frazier, and L. B. Coons. 1976. Antennal sensilla of the pecan weevil, *Curculio caryae* (Horn) (Coleoptera: Curculionidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 5: 279–287.
- Kuschel, G. 1951. La subfamilia Aterpinae en América. Rev. Chilena Entomol. 1: 205–244.
- Lapointe, S., W. Hunter, and R. Alessandro. 2004. Cuticular hydrocarbons on elytra of the *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Agric. Forest Entomol. 6: 251–257.
- Li, D., M. Tokoro, and T. Nacashima. 1999. Mechanism of mating action of *Anoplophora glabripennis* (Motsch). J. Beijing For. Univ. 21: 33–36.
- Martin, P., and P. Bateson. 1994. Measuring behaviour: an introductory guide. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Mithran, S., and A. S. Subbaraman. 1999. Synthesis of (3Z)-dodecenyl-(E)-2-butenoate, the pheromone of Sweet Potato weevil. Molecules 4: 159–164.
- Molina, J. 1997. Efectos de la antibiosis vegetal sobre la actividad de nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) en el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). PhD thesis, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Colima, Mexico.
- Nojima, S., C. Schal, F. X. Webster, R. Santangelo, and W. Roelofs. 2005. Identification of sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica*. Science 307: 1104–1106.
- Nojima, S., K. Shimomura, H. Honda, I. Yamamoto, and K. Ohsawa. 2007. Contact sex pheromone components of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. J. Chem. Ecol. 33: 923–933.
- Pomonis, J., and H. Hakk. 1984. Alkanes from surface lipids of sunflower stem weevil, *Cylindrocopturus adspersus* (LeConte). J. Chem. Ecol. 10: 1335–1347.
- Rodríguez, L. C., and H. M. Niemeyer. 2005. Integrated pest management, semiochemicals and microbial pest control agents in Latin American agriculture. Crop Protect. 24: 615–623.
- Schlein, Y., R. Galun, and M. N. Ben-Eliah. 1981. Abstentions. Male-produced deterrents of mating in flies. J. Chem. Ecol. 7: 285–290.
- Smith, C. M., J. L. Frazier, L. B. Coons, and W. E. Knight. 1976. Antennal sensilla of the clover head weevil *Hypera meles* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 5: 349–355.
- Sokal, R., and F. Rohlf. 1981. Biometry, the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman, New York.
- Stevens, I.D.R. 1998. Chemical structures and diversity of pheromones, pp. 135–179. In P. Howse, I. Stevens, and O. Jones (eds.), Insect pheromones and their use in pest management. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Yew, J., R. Cody, and E. Kravitz. 2008. Cuticular hydrocarbon analysis of an awake behaving fly using direct analysis in real-time time-of-flight mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 7135–7140.
- Zhang, A., J. E. Oliver, K. Chauhan, B. Zhao, L. Xia, and Z. Xu. 2003. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). Naturwissenschaften 90: 410–413.

Received 4 April 2008; accepted 13 October 2008.

1

Mutis et al.: Electroantennographic and behavioral responses of the raspberry weevil *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae).

Andrés Quiroz

Laboratorio de Ecología Química

Departamento de Ciencias Químicas

Universidad de La Frontera

Av. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile

Phone: 056 45 325 441

Fax: 056 45 325 440

e-mail: aquiroz@ufro.cl

2

3 Environmental Entomology, Behavior

4

5

6 **Electroantennographic and behavioral responses of adults of raspberry weevil**
7 ***Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae) to odors released from conspecific**
8 **females.**

9

10 ANA MUTIS^{1,3}, LEONARDO PARRA^{1,3}, LORETO MANOSALVA^{1,3}, RUBÉN PALMA^{1,3},
11 MARCELO LIZAMA², FERNANDO PARDO², FERNANDO PERICH³ AND ANDRÉS
12 QUIROZ^{2,4}

13

14 Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La
15 Frontera, Temuco, Chile.

16

17

¹ Doctorado y magister en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

² Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

³ Laboratorio de Ecología Química,(CETAS) Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

1 **Abstract**

2

3 The raspberry weevil, *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae), is the
4 most important pest in blueberry and raspberry orchards in the south of Chile. Here, we
5 investigated the electrophysiological and behavioral responses of *A. superciliosus* to the
6 semiochemicals released from conspecific individual adults, with particular attention in males
7 attraction to females. Odors released from females significantly attracted conspecific males in
8 a Y-tube olfactometer. Gas chromatographic and mass spectral (GC-MS) analysis of females
9 volatile extracts revealed the presence of limonene, and α -pinene. Electroantennogram
10 recording from both sexes, indicated that males of *A. superciliosus* possess olfactory
11 sensitivity for the isomer *R*-limonene and α -pinene, whereas females only perceived *R*-
12 limonene. Behavioral evaluation of the synthetic compounds showed that only *R*-limonene
13 elicited attraction response from male weevils.

14 This is the first report about long range chemical communication in this weevil. Here, is
15 discussed the origin of these compounds, their accumulation and possible involvement in the
16 sexual behavior of this specie and their potential use in a pest control strategy.

17

18 **Key Words:** *Aegorhinus superciliosus*, electroantennogram, behavioral bioassay, *R*-
19 limonene.

20

21

22

23

24

25

1 **Introduction**

2
3 A pheromone is a message-bearing signal (semiochemical) that is secreted by an organism
4 that causes a specific reaction in a receiving individual of the same species (Price 1997). Sex
5 pheromones of insects are chemical signals produced and released for mate attraction.
6 Interactions between insect pheromones and semiochemicals from the host plant have been
7 recognized as a key communication system within species. Such interactions are manifested
8 as effects of the host plant on insect physiology and behavior, reflecting different types of
9 insect strategies to optimize feeding, mating and reproduction. Some insects acquire host
10 plant chemicals to use them as sex pheromones or sex pheromone precursors. Other host plant
11 volatiles can induce the production or releasing of pheromones in certain insects and often
12 synergizing or enhancing insect responses to sex pheromones (Reddy and Guerrero 2004).
13 The isolation, identification and subsequent synthesis of sex pheromones have potential as
14 behavior-modifying tools for insect pest management. Mating disruption technology use
15 synthetic pheromone treatment to interfere with the ability of males to locate calling females,
16 this technology has been successfully deployed against insect pest of agronomic crops that are
17 resistant to conventional insecticides (Sarfraz et al. 2006).

18 In southern Chile, the raspberry weevil, *Aegorhinus superciliosus* (Guerin) (Coleoptera:
19 Curculionidae), is a serious pest in some fruit crops such as blueberry and other berries,
20 (raspberry, strawberry, blackberry) (Aguilera and Rebolledo 2001). Although adults cause
21 some damage by chewing leaves and shoots, the principal damage is caused by the root-
22 feeding larvae, which can kill plants (Guerrero and Aguilera 1989; Cisternas et al. 2000;
23 France et al. 2000). Chemical and biological treatments have been used to control this weevil;
24 however, they are not successful in controlling this pest, and maintaining low damage crop.
25 Due to problems associated with the continuous applications of synthetic insecticides,

Mutis et al.

1 including environmental and health risks, and residues on harvested fruit, the study of
2 alternative strategies of pest management for this weevil are needed. Semiochemicals are
3 compatible with other control strategies and ideal components for integrated pest-
4 management programs. In addition, semiochemicals-based mass trapping strategies have been
5 developed for several weevil species in different crops (Ruiz-Montiel et al. 2008). Knowledge
6 of the mechanism involved in long-range attraction of the insect to its host and conspecifics
7 may be crucial in terms of pest control (Zagatti et al. 1997). In the case of *A. superciliosus*,
8 previous studies showed that volatiles released from blueberry plant (*Vaccinium corymbosum*
9 L.) were attractive to this weevil (Parra et al. 2009) and that cuticular lipids of females *A.*
10 *superciliosus* mediated the mating behavior for this specie (Mutis et al. 2009). The objectives
11 of this study were to identify volatile chemicals, released from adult conspecifics, and to
12 evaluate the electrophysiological and behavioral activity elicited by volatiles released from
13 male and female of *A. superciliosus*.

14

15 **Material and Methods**

16

17 *Insects.* Adults of both sexes of *A. superciliosus* were collected from a raspberry planting in
18 Vilcun, Araucanía, Chile and placed in individual Petri dishes during the summers of 2007
19 and 2008. Weevils used in both electrophysiological trials and bioassays were sexed
20 according to Reyes (1993), and remained isolated on moist filter paper in Petri dishes at room
21 temperature. Each insect was used in a single one experiment, and only if it was able to walks
22 normally and all its appendages were intact.

23

Mutis et al.

1 *Synthetic chemicals.* The test chemicals used in electroantennography (EAG) and bioassays,
2 *R*-limonene (97% purity), *S*-limonene (96%) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim,
3 Germany), and (+)- α -pinene (97%) was obtained from Merck (Munich, Germany).

4

5 *Volatile collections.* Groups of either 50 males or 50 females were confined in a glass
6 entrainment container (8.0 cm ID and 30 cm length). The volatiles were drawn out from the
7 container, using air purified by passing it through a charcoal trap, onto a glass volatile
8 collection trap device (4.0 mm ID and 100 mm long) containing 100 mg of Porapak Q
9 adsorbent (80-100 mesh, Waters associates Inc., USA). Air was pulled through the trap at a
10 rate of 1l/min by 24 h, using a positive/negative pressure air system (Agelopoulos et al. 1999).
11 The volatiles were eluted from the adsorbent with 1 ml of hexane. Extracts were concentrated
12 under nitrogen stream and stored in sealed ampoules at -20°C before analysis.

13

14 *Identification of Semiochemicals by GC-MS.* Volatiles extracts were analyzed by coupled gas
15 chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with electron impact ionization (70 eV) using a
16 ThermoFinnigan chromatograph (Milan, Italy) equipped with a BP-1 capillary column (30 m,
17 0.22 mm, 0.25 μ m; SGE, Australia) with helium as carrier gas. The GC oven was
18 programmed to remain at 40°C for 1 min and then increased at 5°C min⁻¹ up to 260°C and
19 held for 5 min. The injector and transfer line temperatures were 250°C. The components of
20 volatile extracts were identified for comparison of their Kovats indices and mass spectra with
21 those of commercial standards and library database spectra using the NIST mass spectral
22 search program (ver.2.0), Pherobase database and NIST webbook
23 (<http://webbook.nist.gov/chemistry>) cited by Babushok et al. (2007). Calibration curves
24 based on peak area ratio were constructed using standards and docosane as an internal

Mutis et al.

1 standard for quantification of each volatile compound identified from the samples of males
2 and females of *A. superciliosus* (N=5 for each male and female extracts).

3

4 *Olfactometer Bioassays.* The behavioral response of male and female *A. superciliosus* to the
5 volatile extracts and synthetic compounds was tested by using a two-way olfactometer
6 described by Rojas et al. (2002). Each arm of the Y-tube and the base tube was 16 cm long
7 and 3.0 cm inner diameter. Each Y-tube arms was connected to Pasteur pipette, containing
8 stimulus or control (50 µl of hexane applied on filter paper). An aliquot of 50 µl of standard
9 solutions (0.1 ppm, 1.0 ppm and 10 ppm) of all synthetic compounds and 10 µl of female
10 volatile extracts (equivalent to five females), were prepared in hexane and loaded onto
11 Whatman N°1 filter paper (2 cm²). The olfactometer base was connected to a vacuum pump,
12 which produced airflow through the arms and stem of the tube at a rate of 800 mL/min. The
13 bioassay consisted of one male or female introduced into the base of the Y-tube and letting
14 it's freely movement. The assay was considered successful when after 5 min the weevil
15 walked from the Y-tube base up to 3 cm past the Y-junction and remained for at least 20 s.
16 The position of odour chambers to each arm was reversed after each replication to eliminate
17 directional bias. X² tests were used to compare differences between male responses to
18 compounds versus control.

19

20 *EAG responses.* The antennal receptivity of adult males and females was determined by EAG
21 according to the methodology described by Zhang and Sun (2006). Antennae were excised
22 from the heads of *A. superciliosus*, and mounted between two glass micropipette electrodes.
23 The recording electrode was inserted into the distal edge of the club and the indifferent
24 electrode into the scape of the antenna. The signals generated by the antenna were passed
25 through a 10 X high impedance amplifier (Syntech, Hilversum, The Netherlands) and

Mutis et al.

1 displayed onto a monitor using Syntech version 2.2 a software for processing EAG signals. A
2 volume of 50 µl of standard solutions in hexane (0.1 ppm, 1.0 ppm and 10 ppm) of each
3 synthetic compound was loaded on a piece of filter paper (2 cm²), exposed to air for 20 s to
4 allow the solvent evaporation, then inserted into a glass Pasteur pipette. The odor stimuli were
5 delivered from Pasteur pipette as a 1.0 s pulse of odor into a continuous airstream (500 mL
6 min⁻¹) flowing over the antennal preparation. An interval of 40 s between puffs was used to
7 ensure antennal recovery. On the basis of the responses to the initial and the final stimulus, we
8 determined for each preparation the percentage decline in EAG response for each stimulus
9 and adjusted the EAG data according to methodology described by Brockerhoff and Grant
10 (1999). For each compound, 10 replicate were performed per sex and each replicate was made
11 with one different antenna. Differences between responses of the sexes to the control (hexane)
12 were analyzed using nonparametric statistic with a Wilcoxon tests.

13

14 **Results**

15 *Semiochemicals released from adults.* Table 1 shows the GC-MS analyses from volatiles
16 released by males and females of *A. superciliosus*. The main volatile compounds identified
17 from females were the monoterpenes, limonene and α-pinene , whereas only α-pinene is
18 present in males volatile extracts (Table 1).

19

20 *Electrophysiological responses.* EAG results indicated that the antennae of raspberry weevil
21 were sensitive to some monoterpenes identified in the female's volatile extracts. Males and
22 females showed an electrophysiological response to *R*-limonene in the three tested dose
23 (Females; *R*-limonene 5 ng, $P = 0.0391$; *R*-limonene 50 ng, $P = 0.0001$; *R*-limonene 500 ng, P
24 = 0.0234; Males; *R*-limonene 5 ng, $P = 0.0313$; *R*-limonene 50 ng, $P < 0.0001$; *R*-limonene
25 500 ng, $P = 0.0078$) (Fig. 1 and 2), whereas Wilcoxon test showed no significant differences

Mutis et al.

1 between response of males and females to *S*-limonene in the three tested dose comparated to
2 the control (Females; *S*-limonene 5 ng, $P = 0.090$; *S*-limonene 50 ng, $P = 0.0625$; *S*-limonene
3 500 ng, $P = 0.0625$ Males; *S*-limonene 5 ng, $P = 0.0625$; *S*-limonene 50 ng, $P < 0.0625$; *S*-
4 limonene 500 ng, $P = 0.0625$). Only male antennae were sensitive to α -pinene in the dose 5
5 ng and 50 ng ($P = 0.0078$; $P = 0.001$, respectively), but they were not sensitive to α -pinene in
6 the dose 500 ng ($P = 0.125$).

7

8 *Olfactometric bioassays*. The percentages of males of *A. superciliosus* responding to the
9 different treatments in the Y-olfactometer are shown in Fig. 3. X^2 tests showed no significant
10 differences in the response of males to the monoterpenes *S*-limonene and α -pinene at the
11 tested dose (*S*-limonene 5 ng, $P = 0.465$; *S*-limonene 50 ng, $P = 0.144$; *S*-limonene 500 ng, P
12 = 0.273; α -pinene 5 ng, $P = 0.715$; α -pinene 50 ng, $P = 0.715$; α -pinene 500 ng, $P = 0.715$).
13 Males only showed preference for *R*-limonene at the dose of 500 ng ($P = 0.028$) and females
14 volatile extracts ($P = 0.021$).

15

16

17 Discussion

18 Identification of volatiles released by adults of raspberry weevil indicated that females release
19 limonene and α -pinene whereas males release only α -pinene. These compounds were reported
20 by Parra et al. (2009) as volatiles emitted by blueberry (*Vaccinium corymbosum*); and
21 Robertson et al. (1993) as volatiles released by flowers from four raspberry (*Rubus idaeus*)
22 cultivars. The presence of a distinguishable monoterpene in female volatiles should indicate
23 that they use sequestered dietary components directly to attract conspecific males. Landolt
24 and Phillips (1997) reported that phytophagous insects mate on host plants because of the
25 relatively high probability of mating with the opposite sex in a place of mutual interest,

Mutis et al.

1 particularly for species whose adults feed on host plants. Males may purposefully search host
2 plants for females simply because females are likely visiting feeding and oviposition sites,
3 resulting in mixed-sex encounters and mating opportunities on host plants. Similar behavior
4 was reported by Rudinsky et al. (1977), for the Douglas-fir beetle, *Dendroctonus*
5 *pseudotsugae*. This scolytid obtains and sequesters the monoterpane limonene from host
6 Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* during feeding. Both sexes of *D. pseudotsugae* release
7 limonene with their respective aggregation pheromone components in the presence of
8 acoustic signals from the opposite sex.

9 Limonene has been reported as attractants for numerous species of weevils, including the red
10 sunflower seed weevil *Smicronyx fulvus* (Roseland et al. 1992), the plum curculio
11 *Conotrachelus nenuphar* (Leskey et al. 2001; Piñero and Prokopy 2003), and the pales weevil
12 *Hylobius pales* (Siegfried 1987). In the other hand, α -pinene has been reported as attractant
13 for the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* (Zhang and Sun 2006), the pine weevils
14 *Hylobius abietis* and *H. pinastri* (Selander et al. 1974; Nordlander 1990), *S. fulvus* (Roseland
15 et al. 1992), and some bark beetles (de Groot et al. 2002); as well as a precursor for
16 pheromone components and synergist for pheromones (Landolt and Phillips 1997; de Groot
17 and DeBarr 1998; Miller et al. 2000), and as a repellent by rice weevil, *Sitophilus oryzae*
18 (Yoon et al. 2007).

19 EAG screening of α -pinene and limonene isomers showed that males can perceive *R*-
20 limonene and α -pinene whereas females only can perceive the *R*-limonene isomer; the lack of
21 sensibility to *S*-limonene suggests that both the semiochemicals biosynthesis and the olfaction
22 are enantioselective processes in *A. superciliosus*. Up to date studies in insect olfaction
23 suggest a strong chiral specificity in pheromone biosynthesis, bioactivity and olfactory
24 receptor systems (Mori 1998; Wibe et al. 1998; Leal 2005; Leal et al. 2008). Differential
25 responses to both limonene isomers has been reported previously for other curculionids;

1 Dickens (1984) reported that only (+)-limonene evoked a significant EAG response in
2 females of *Anthonomus grandis*, whereas (+) and (-) limonene evoked response in males
3 conspecifics; Wibe et al. (1998) reported that one olfactory receptor neuron of *H. abietis*,
4 showed a marked better response to (+)- α -pinene than (-)- α -pinene, and another olfactory
5 receptor neuron responded more strongly to (-) limonene than to (+) limonene. Payne (1975)
6 indicated that the intensity of EAG (increase in response) can be taken as a measure of the
7 relative number of responding receptor cells. Our data suggest, therefore, that the antennae of
8 *A. superciliosus* possess major numbers of acceptors and a high sensitivity to *R*-limonene.
9 The results of our Y-tube bioassays showed that males of *A. superciliosus* were attracted by
10 female volatile extracts when they were compared with hexane. This result suggests that male
11 orientation is mediated by conspecific volatiles in the absence of visual stimuli. The
12 olfactometric evaluation of synthetic compounds identified in volatile extracts of insect and
13 both isomers of limonene, showed that only *R*-limonene elicited behavioral response from
14 males, whereas none compounds elicited response from females at the tested doses.
15 Despite in this study the electroantennographic results indicated that *A. superciliosus* male
16 antennae possess receptors to the monoterpane α -pinene, was not possible to determine its
17 activity in the olfactometric bioassays at the three tested doses. This opposite relationship
18 between the EAG and behavioral responses has been reported previously by Cha et al. (2008)
19 for females of grape berry moth, *Paralobesia viteana*. Furthermore, Leal (2005) showed that
20 some tested compounds may be EAG-active without showing any bioactivity; however, EAD
21 inactive compounds can be eliminated from further behavioral tests.
22 This study provides the first evidence of electrophysiological and behavioral responses of *A.*
23 *superciliosus* to volatiles emitted from conspecific. Future works might be focused on to
24 validate these results in field bioassays, for developing trapping systems for monitoring and
25 management of raspberry weevil.

Mutis et al.

1 **Acknowledgments**

2
3 We gratefully acknowledge Dr.Rufus Isaacs, Department of Entomology, Michigan State
4 University, for his comments on this manuscript. Financial support for this research was
5 supplied by CONICYT (Project AT 23070010).

6
7 **References Cited**

8
9 **Agelopoulos, N., M. Birkett, A. Hick, A. Hooper, J. Pickett, E. Pow, L. Smart, D. Smiley,**
10 **L. Wadhams, and C. Woodcock. 1999.** Exploiting semiochemicals in insect control. Pestic.
11 Sci. 55:225-235.

12
13 **Aguilera, A., and R. Rebolledo. 2001.** Estudios larvarios de *Aegorhinus superciliatus*
14 (Guérin, 1830) (Coleoptera: Curculionidae). Rev. Chilena Entomol. 28: 5-8.

15
16 **Babushok, V. I., P. J. Linstrom, J. J. Reed, I. G. Zenkevich, R. L. Brown, W. G.**
17 **Mallard, and S. E. Stein. 2007.** Development of a database of gas chromatographic retention
18 properties of organic compounds. J. Chromatogr. 1157: 414–421.

19 **Brokerhoff, E.G., and G. G. Grant. 1999.** Correction for differences in volatility among
20 olfactory stimuli and effect on EAG responses of *Dioryctria abietivorella* to plant volatiles. J.
21 Chem. Ecol. 25:1353-1367.

22

Mutis et al.

- 1 **Cisternas, E., A. France, L. Devotto, and M. Gerding. 2000.** Insectos, ácaros y
2 enfermedades asociadas a la frambuesa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán,
3 Chile.
4
- 5 **Cha, D.H., S. Nojima, S.P. Hesler, A. Zhang, Ch. E. Linn Jr., W. L. Roelofs, and G. M.**
6 **Loeb. 2008.** Identification and field evaluation of grape shoot volatiles attractive to female
7 grape berry moth (*Paralobesia viteana*). J. Chem. Ecol. 34:1180–1189.
8
- 9 **de Groot, P., and G. DeBarr. 1998.** Factors affecting capture of the white pine cone beetle,
10 *Conophthorus coniperda* (Schwarz) (Col., Scolytidae) in pheromone traps. J. Appl. Entomol.
11 122: 281–286.
12
- 13 **de Groot, P., R. Nott, and L. MacDonald. 2002.** Influence of enantiomers of α -pinene on
14 the response of the red pine cone beetle, *Conophthorus resinosae* to its pheromone pityol.
15 Entomol. Exp. Appl. 105: 169–174.
16
- 17 **Dickens, J. 1984.** Olfaction in the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera:
18 Curculionidae): Electroantennogram studies. J. Chem. Ecol. 10: 1759-1785.
19
- 20 **France, A., M. Gerding, and A. Sandoval. 2000.** Patogenicidad de una Colección de Cepas
21 Nativas de *Metarhizium* spp y *Beauveria* spp. en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus*
22 *cervinus* y *Otiorhynchus sulcatus*. Agric. Tec. 60: 205-215.
23
- 24 **Guerrero, J., and A. Aguilera. 1989.** Plagas y enfermedades en el arándano chileno.
25 Próxima Década. 76: 24-29.

Mutis et al.

- 1 **Landolt. P., and T. Phillips. 1997.** Host plant influences on sex pheromone behavior of
2 phytophagous insect. Annu. Rev. Entomol. 42: 371– 391.
3
4 **Leal, W.S. 2005.** Pheromone Reception. Top. Curr. Chem. 240: 1–36.
5
6 **Leal, W.S., R. M.R. Barbosa, W. Xu, Y. Ishida, Z. Syed, N. Latte, A. Chen, T. Morgan,**
7 **A. Cornel, and A. Furtado. 2008.** Reverse and conventional chemical ecology approaches
8 for the development of oviposition attractants for *Culex* mosquitoes. PlosOne.3:1-11.
9
10 **Leskey, T., R. Prokopy, S. Wright, L. Phelan, and L. Haynes. 2001.** Evaluation of
11 individual components of plum odor as potential attractants for adult plum Curculius. J.
12 Chem. Ecol. 27: 1-17.
13
14 **Mutis, A., L. Parra, R. Palma, F. Pardo, F. Perich, and A. Quiroz. 2009.** Evidence of
15 contact pheromone use in mating behavior of the raspberry weevil (Coleoptera:
16 Curculionidae). Environ. Entomol. 38:192-197.
17
18 **Miller, D. R., H. D. Pierce, Jr, P. de Groot, N. Jeans-Williams, R. Bennett, and J. H.**
19 **Borden. 2000.** Sex pheromone of *Conophthorus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) in a
20 coastal stand of western white pine (Pinaceae). Can. Entomol. 132: 243- 245.
21
22 **Mori. K. 1998.** Semiochemicals – Synthesis, Stereochemistry, and Bioactivity. Eur. J. Org.
23 Chem. 8:1479-1489.
24

Mutis et al.

1 **Nordlander, G. 1990.** Limonene inhibits attraction to α -pinene in the pine weevils *Hylobius*
2 *abietis* and *H. pinastri*. J. Chem.Ecol. 16:1307- 1320.

3

4 **Parra, L., A. Mutis, R. Ceballos, M. Lizama, F. Pardo, F. Perich, and A. Quiroz. 2009.**
5 Volatiles released from *Vaccinium corymbosum* were attractive to *Aegorhinus superciliatus*
6 (Coleoptera: Curculionidae) in an olfactometric bioassay. Environ. Entomol. 38:781-789.

7

8 **Payne T. 1975.** Bark beetle olfaction. III. Antennal olfactory responsiveness of
9 *Dendroctonus frontalis* Zimmerman and *D. brevicomis* Le Conte (Coleoptera : Scolytidae) to
10 aggregation pheromones and host tree terpene hydrocarbons. J. Chem. Ecol. 1: 233-242.

11

12 **Piñero, J., and R. Prokopy. 2003.** Field evaluation of plant odor and pheromonal
13 combinations for attracting plum curculios. J. Chem. Ecol. 29: 2735-2748.

14

15 **Price, P. 1997.** Insect Ecology, Wiley, New York.

16

17 **Reddy, G., and A. Guerrero. 2004.** Interactions of insect pheromones and plant
18 semiochemicals. Trends Plant Sci. 9: 253-261.

19

20 **Reyes, G. 1993.** Aspectos morfológicos y biológicos de la especie *Aegorhinus superciliatus*
21 (Coleoptera: Curculionidae). Ingeniero Agrónomo, Universidad Austral de Chile, Valdivia,
22 Chile.

23

Mutis et al.

- 1 **Robertson, G.W., D.W. Griffiths, J.A.T. Woodford, A.N.E. Birch, J.A. Picket, and L.J.**
2 **Wadhams. 1993.** A comparison of the flower volatiles from hawthorn and four raspberry
3 cultivars. *Phytochemistry*. 33:1047-1053.
4
5 **Rojas, J., E. Ríos-Candelaria, L. Cruz-López, A. Santiesteban, J. Bond-Compean, Y.**
6 **Brindis, and E. Malo. 2002.** A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compounds of
7 *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 39: 256-265.
8
9 **Roseland, C.R., M.B. Bates, R.B. Carlson, and C.Y. Oseto. 1992.** Discrimination of
10 sunflower volatiles by the red sunflower seed weevil. *Entomol. Exp. Appl.* 62: 99-106.
11
12 **Rudinsky, J.A., M.E. Morgan, L.M. Libbey, and T.B. Putnam. 1977.** Limonene released
13 by the scolytid beetle *Dendroctonus pseudotsugae*. *Z. Angew. Entomol.* 82: 376–380.
14
15 **Ruiz-Montiel, C., G. García-Coapio, J. Rojas, E. Malo, L. Cruz-López, I. del Real, and**
16 **H. González-Hernández. 2008.** Aggregation pheromone of the agave weevil, *Scyphophorus*
17 *acupunctatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 127: 207-217.
18
19 **Sarfraz.M., L.M. Dosdall, and B.A. Keddie. 2006.** Diamondback moth–host plant
20 interactions: Implications for pest management. *Crop Protec.* 25: 625–639.
21
22 **Selander, J., P. Kalo, E. Kangas, and V. Perttunen. 1974.** Olfactory behaviour of *Hylobius*
23 *abietis* L. (Col., Curculionidae). I. Response to several terpenoid fractions isolated from Scots
24 pine phloem. *Ann. Entomol. Fenn.* 40:108-115.
25

Mutis et al.

- 1 **Siegfried, B. D. 1987.** In-flight responses of the pales weevil, *Hylobius pales* (Coleoptera:
2 Curculionidae) to monoterpene constituents of southern pine gum turpentine. Fla. Entomol.
3 70: 97-102.
- 4
- 5 **Wibe, A., A.K. Borg-Karlson, M. Persson, T. Norin, and H. Mustaparta. 1998.**
6 Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in some conifers and receptor
7 neuron discrimination of α -pinene and limonene enantiomers in the pine weevil, *Hylobius*
8 *abietis*. J. Chem. Ecol. 24: 273-287.
- 9
- 10 **Yoon. Ch., Sh. Kang, S. Jang, Y. Kim, and G. Kim. 2007.** Repellent efficacy of Caraway
11 and Grapefruit oils for *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). J. Asia-Pacific
12 Entomol. 10: 263-267.
- 13
- 14 **Zagatti, P., G. Lemperiere, and C. Malosse. 1997.** Monoterpenes emitted by the large pine
15 weevil, *Hylobius abietis* (L.) feeding on Scots pine, *Pinus sylvestris* L. Physiol. Entomol. 22:
16 394-400.
- 17
- 18 **Zhang, L., and J. Sun. 2006.** Electrophysiological and behavioral responses of
19 *Dendroctonus valens* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) to candidate pheromone
20 components identified in hindgut extracts. Chem. Ecol. 35: 1232-1237.
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

1

2

3 **Figure captions**

4

5 **Figure 1.** Electrophysiological response of males *A. superciliosus* to synthetic compounds
6 identified in females volatile extract. * Indicate significant differences based on Wilcoxon test
7 ($P \leq 0.05$, N=10), Bars represent SE.

8

9 **Figure 2.** Electrophysiological response of females *A. superciliosus* to synthetic compounds
10 identified in females volatile extract. * Indicate significant differences based on Wilcoxon test
11 ($P \leq 0.05$, N=10), Bars represent SE.

12

13 **Figure 3.** Olfactometric Response of males *A. superciliosus* to compounds identified in
14 volatiles extract emitted by conspecific females in Y-tube olfactometer trials. The null
15 hypothesis that *A. superciliosus* showed no preference for either olfactometer arm (a response
16 equal to 50:50) was analyzed with X^2 test. *Significant differences at $P < 0.05$.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1
2
34 **Table 1.** Monoterpenes identified from volatiles emitted by males and females of *A.*
5 *superciliosus* by GC-MS.
6

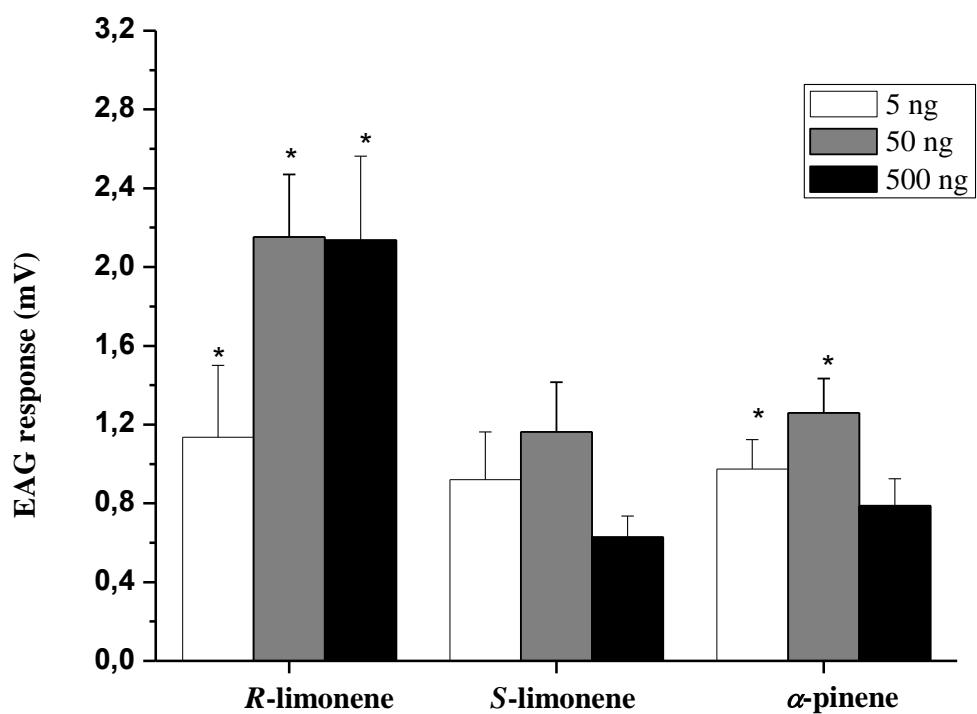
Compounds	Retention time (min)	Relative abundance		Concentration (ng/μl)	
		Females	Males	Females	Males
α-Pinene	6.89	18.1 ± 3.95	100	0.92	1.42
Limonene	9.25	81.9 ± 4.01	N.D	2.12	N.D

7 Mean ± SD; n=5

8 ND = Not detected.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

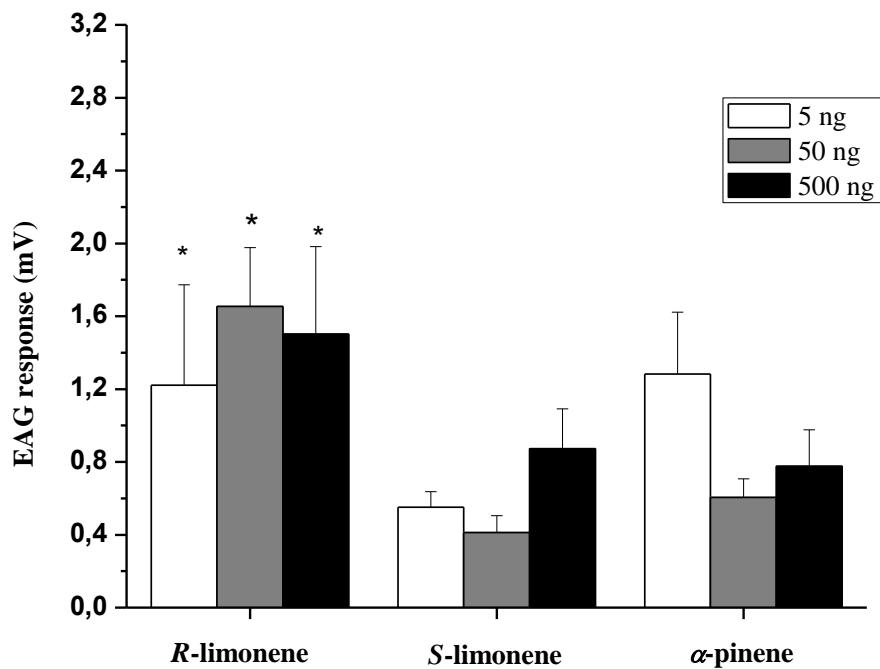
1 Figure 1



2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

1 Figure 2

2

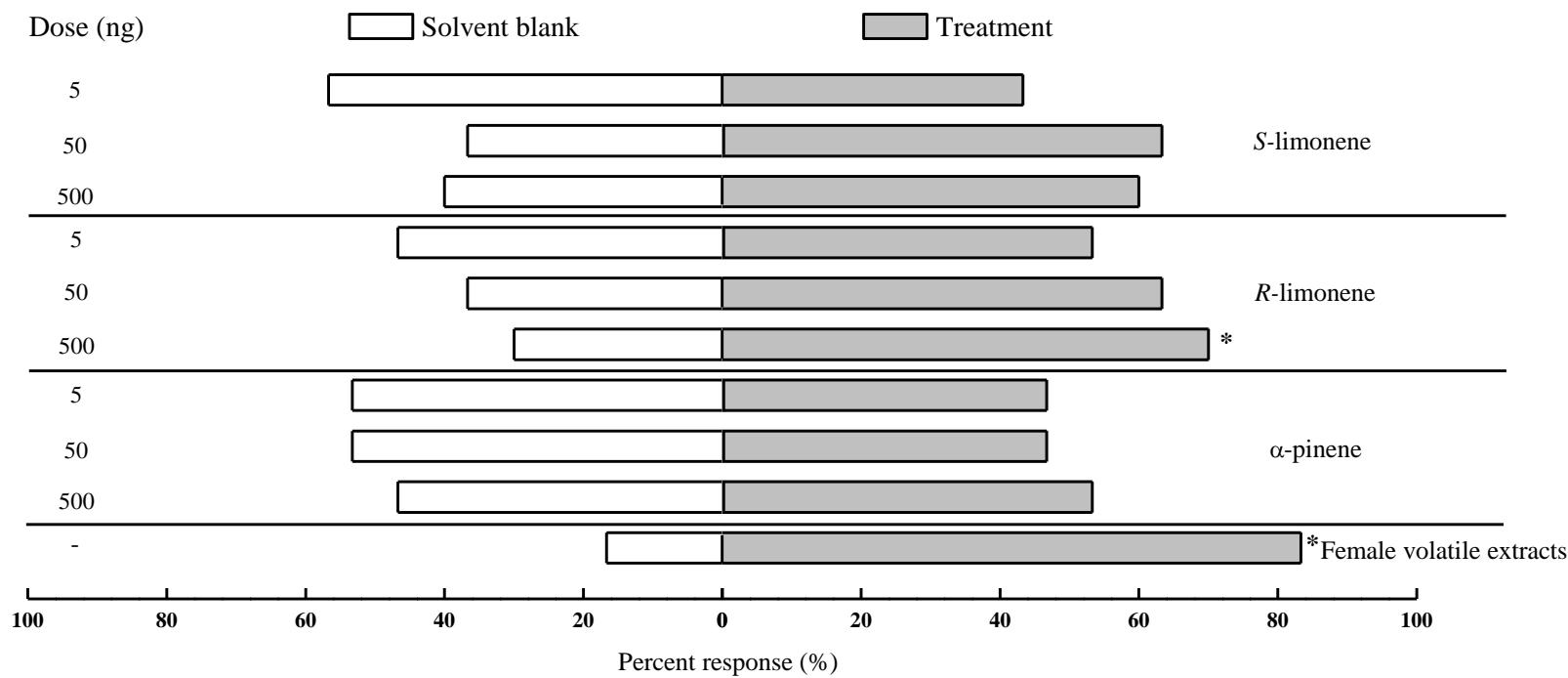


3

1

2 Figure 3

3



4

5

6

