



5º CONGRESO FORESTAL
ESPAÑOL

5º Congreso Forestal Español

Montes y sociedad: Saber qué hacer.

REF.: 5CFE01-513

Editores: S.E.C.F. - Junta de Castilla y León
Ávila, 21 a 25 de septiembre de 2009
ISBN: 978-84-936854-6-1
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Respuestas electroantenográficas de *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) a compuestos semioquímicos del árbol hospedante y de escolítidos de los pinos.

ÁLVAREZ BAZ, G., PAJARES ALONSO, JUAN A.

Dpto de Producción Vegetal y Recursos Forestales. E. T. S. de Ingenierías Agrarias, U. de Valladolid, Avd. Madrid 44, 34071 Palencia. gonzalbaz@hotmail.com

Resumen

El cerambícido *Monochamus galloprovincialis* es el vector en Europa del nematodo de la madera del pino, *Bursaphelenchus xylophilus*, cuya presencia en Portugal desde hace diez años supone un seria amenaza para nuestras masas. El manejo del insecto vector mediante atrayentes y repelentes supone una de las posibilidades de lucha más interesantes contra la enfermedad. Con el fin de facilitar el estudio de sustancias bioactivas, se ha establecido una metodología para la realización de bioensayos electroantenográficos para esta especie adaptando parámetros establecidos para otros cerambícidos. Mediante un controlador USB-IDAC, un generador de estímulos y el software AutoSpike-32 (Syntech) se han registrado y procesado los datos de las electroantenografías. Para la aplicación del estímulo se utilizó una boquilla plana (WindJet), más adecuada a la forma de la antena de este perforador que las empleadas en otros insectos. Tras establecer la duración de las inyecciones y los flujos principal y de inyección más adecuados para este insecto, se han testado las respuestas inducidas en 19 ejemplares maduros ante diversos compuestos, individualmente y en mezcla, producidos de forma natural por los árboles hospedantes y por especies de escolítidos de los pinos. Todos los compuestos testados se diluyeron a 50 mg/ml en aceite de parafina y se ensayaron en inyecciones de 20 µl impregnando pequeñas tiras de papel Whatman N°1 dentro de pipetas Pasteur desechables. Para estandarizar las respuestas a dichas sustancias se empleó α-pineno como referencia, aplicado al inicio y al final de cada serie de tests para corregir la pérdida de sensibilidad de la antena a lo largo del ensayo. Con la metodología seguida en la realización de las preparaciones y la configuración del dispositivo, se ha conseguido una línea base estable de unos 50 ó 60 µV, muy por debajo de las respuestas más bajas producidas por la antena ante los estímulos probados, lo que garantiza una medición cómoda y limpia de la respuesta electrofisiológica de la antena.

Palabras clave

antena, insecto vector, *Bursaphelenchus xylophilus*, enfermedad del marchitamiento de los pinos

1. Introducción

El nematodo de la madera del pino *Bursaphelenchus xylophilus*, causante de la enfermedad del marchitamiento de los pinos, es originario de Estados Unidos. Este nematodo necesita de un insecto vector que lo transporte, cumpliendo con este papel en sus zonas de distribución original *Monochamus carolinensis*, *M. scutellatus* y *M. titillator*. Los pinos europeos se han mostrado muy sensibles a este patógeno exótico. *Pinus sylvestris*, la especie que ocupa mayor extensión en nuestro continente se muestra especialmente vulnerable al marchitamiento causado por dicho nematodo. En esta ocasión, la amplia distribución por Europa central y meridional de otra especie de *Monochamus*, *M. galloprovincialis*, permite la propagación de la enfermedad. En 1998 se confirmó por primera vez la introducción del

nematodo en Europa en la península de Setúbal, Portugal (MOTA *et al.*, 1999), demostrándose posteriormente que *M. galloprovincialis* actuaba como vector (SOUSA *et al.*, 2001). Detectada esta presencia, la unión Europea declaró a *B. xylophilus* organismo de cuarentena debido a su virulencia, momento a partir del cual las implicaciones económicas del patógeno fueron considerables. Hasta fechas recientes la enfermedad estuvo circunscrita a un área demarcada dentro de dicha península, sin que pudiese erradicarse. En la primavera de 2008, la situación de la enfermedad en Portugal cambió drásticamente, con la detección de nuevos focos alejados de la zona demarcada, algunos amenazadoramente cercanos a la frontera española. Actualmente, todo Portugal ha sido declarado zona demarcada y con un riesgo grave de introducción del nematodo en nuestro país. Se convierte así en un asunto de máximo interés avanzar en el conocimiento de la ecología química de *M. galloprovincialis* para llegar a desarrollar lo antes posible una herramienta que permita el manejo de este insecto en el campo y el control de la enfermedad que transmite. Con el fin de facilitar el estudio de sustancias biológicamente activas, este trabajo ha establecido una metodología para la realización de estudios electroantenográficos para esta especie, adaptando parámetros establecidos para otros cerambícidos.

2. Objetivos

Establecer una metodología para la realización de ensayos electroantenográficos sobre el cerambícido *Monochamus galloprovincialis*, considerando aspectos relativos a la preparación de los insectos y a la aplicación de los estímulos.

Comprobar la utilidad de esta metodología con la respuesta electroantenográfica a compuestos volátiles cuya respuesta en campo para esta especie es conocida.

3. Metodología

La prueba electroantenográfica consiste en registrar la señal eléctrica generada por la antena de un insecto cuando se ve estimulada por una sustancia volátil a la que resulta sensible. Esta señal eléctrica es del orden de sólo unos milivoltios, mientras que la resistencia de la antena es de varios megaohmios (SYNTECH, 1998). El equipo electroantenográfico consiste por lo tanto en un potente amplificador que recoge y amplifica esta señal, para enviarla a un ordenador donde un programa interpreta dichos datos de la misma manera que lo haría un osciloscopio, y los registra para su posterior análisis. Por último, es necesaria una unidad generadora de estímulos que produzca una suave corriente de aire (denominado flujo principal o continuo) en la que se inyecten los estímulos que se pretende testar (flujo de inyección o pulso).

El equipo utilizado (Syntech, Holanda), consta de una unidad USB-IDAC (Intelligent Data Acquisition Interface) que recoge y amplifica la señal generada por la antena del insecto y la envía a un ordenador donde el paquete de software AutoSpike32 se encarga de interpretarla y grabarla. Tanto el flujo de aire principal como el de inyección son generados mediante una unidad CS-55 Stimulus Controller. Este generador de estímulos presenta la ventaja frente a otros métodos (como las inyecciones manuales o las electroválvulas independientes) de ser programable, lo que permite establecer el número de estímulos por test, su caudal y su duración de forma constante y precisa. Para adaptar el flujo de aire a la forma de la antena del insecto se ha optado por una boquilla WindJet ancha y plana de 4,8 cm de ancho y 16 orificios de 1,5 mm de diámetro (SÁNCHEZ OSORIO *et al.*, 2006). Por último, y para reducir la presencia de “ruido” en la línea base, el equipo, el insecto y el

amplificador, se han colocado dentro de una jaula de Faraday (SYNTECH, 1998). Esta caja elimina interferencias electromagnéticas generadas por otros aparatos eléctricos cercanos y las conduce a través de la conexión a tierra del edificio.

Para obtener ejemplares de *M. galloprovincialis* maduros en los que estudiar su respuesta electroantenográfica, se recolectó material de campo colonizado por el cerambícido en estado de larva durante el mes de febrero de 2008. Las trozas colonizadas por las larvas fueron recogidas en un incendio sucedido en 2007 en el término municipal de El Barraco (Ávila). Este material se guardó en cámara fría a unos 4°C hasta Abril, cuando se dispuso en bidones de plástico cerrados con malla mosquitera y a temperatura de laboratorio (unos 25°C y en condiciones de luz natural). La emergencia de los adultos se produjo a lo largo de mayo y junio. Estos adultos se mantuvieron individualmente en tarros de vidrio de 2 litros con tapadera de malla para favorecer la aireación, y fueron alimentados con ramillos de pino carrasco (*Pinus halepensis*) que eran renovados semanalmente (IBEAS *et al.*, 2008, 2009). Los tarros se dispusieron en cámaras de cría, cada sexo en una cámara diferente, bajo un fotoperiodo de 15 horas de luz y 9 h de oscuridad, a una temperatura de 20°C.

Los movimientos musculares del insecto generan ruido sobre la señal registrada, por lo que el insecto debe ser preparado para lograr su completa inmovilización. Con este fin, se optó por envolver en parafilm al cerambícido dejando libre la antena que iba a ser ensayada (Figuras 1 y 2). Tras su inmovilización por este procedimiento, el insecto fue fijado sobre una superficie de poliestireno expandido para situarle a la altura de la boquilla emisora del flujo de aire. Al disponerle sobre esta superficie es conveniente inmovilizar la antena, sin dañarla, con una grapa que se fija al poliestireno en su primer segmento. De esta manera, además, queda visible la membrana intersegmental que se encuentra entre el escapo y el pedicelo, donde a continuación se insertará uno de los electrodos. Pueden cruzarse dos alfileres entomológicos a ambos lados del escapo si se desea lograr una mayor inmovilización de la antena.



Fig 1. Detalle de la inmovilización del insecto. Fig 2. Insecto inmovilizado con parafilm.

Para registrar la señal eléctrica buscada, los extremos de la antena deben estar en contacto con dos electrodos, el de referencia y el registrador. El primero va insertado en la membrana intersegmental anteriormente mencionada, mientras que el extremo apical de la antena se introduce en el segundo. Los electrodos fueron obtenidos a partir de tubos capilares de vidrio de 1,5 mm de diámetro (Syntech) calentados hasta romperlos por estiramiento a la llama de un mechero de alcohol. Estos electrodos deben ir rellenos de una solución salina que asegure la conductividad eléctrica, para lo que se ha utilizado una solución de cloruro potásico 0,1 N con un 4% en peso de polivinilpirrolidona que evite la evaporación de la solución y la formación de cristales en el interior del capilar (SYNTECH, 1998).

Para generar un flujo constante de aire e inyectar las sustancias adecuadamente, se programó el controlador de estímulos para que emitiese un caudal constante de 1670 ml/min y un caudal de inyección de 670 ml/min en el que las inyecciones duran 0,3 segundos (durante ese intervalo de tiempo el caudal principal es de 1000 ml/min, de manera que no existe variación de caudal durante la inyección). Se programaron 3 inyecciones para cada sustancia testada separadas 30 segundos para permitir que la antena recuperase su polarización normal.

Los compuestos testados se disolvieron a 50 mg/ml en aceite de parafina. Para cada test se impregnó una tira de 5 x 50 mm de papel de filtro Whatman N°1 con 20 μ l de esta disolución (SÁNCHEZ OSORIO *et al.*, 2006). Esta tira de papel se introdujo en una pipeta Pasteur de 150 mm de longitud cuyo extremo más estrecho fue sellado con parafina, y el extremo ancho con parafilm. Al colocar la pipeta en el flujo de aire se rompe su extremo estrecho y se retira el parafilm del extremo ancho, insertando aquí el tubo flexible del caudal de inyección. Como inyección control se empleó una tira de papel Whatman impregnada con 20 μ l de parafina. También es necesario realizar una inyección de referencia con algún compuesto al que los insectos reaccionen de forma clara. Esta referencia se emplea para corregir la pérdida de despolarización que sufre la antena del insecto desde el principio de cada batería de inyecciones y para estandarizar las respuestas del resto de las sustancias haciéndolas así comparables (SYNTECH, 1998). En esta ocasión se empleó como referencia la disolución a 50 mg/ml de α -pineno. Por lo tanto, cada batería de tests comenzó por una inyección control seguida de una de referencia y terminó con una de referencia seguida por otra inyección control. Entre ambas se incluyeron el resto de sustancias, aleatorizadas para cada insecto ensayado.

La señal generada por la antena del insecto y amplificada por la unidad USB-IDAC fue filtrada por el ordenador para mejorar su interpretación, mediante el software AutoSpikes2, que aplica un filtro de baja frecuencia y otro de alta. Para el tipo de ensayos realizados se ha establecido un valor de 0,1 Hz para el filtro de baja frecuencia y de 20 Hz para el filtro de alta (SYNTECH, 1998). La señal resultante se ha grabado con una resolución de 400 muestras por segundo.

Con el dispositivo preparado se han llevado a cabo pruebas electroantenográficas en 19 ejemplares de *M. galloprovincialis*, nueve machos y diez hembras. Para cada uno de estos insectos se han testado 11 sustancias y para la mitad de ellos, cinco machos y cinco hembras, se han testado además distintas combinaciones entre los compuestos anteriores. La tabla 1 muestra los compuestos ensayados y sus combinaciones. Las tablas 2 y 3 recogen los materiales empleados y los valores de los principales parámetros establecidos en esta técnica.

Tabla 1. Compuestos y mezclas de compuestos ensayados.

Compuestos ensayados	Mezclas ensayadas
- (-) IPSDIENOL	- α -PINENO + CISVERBENOL
- (+) IPSDIENOL	- α -PINENO + ETANOL
- α -PINENO	- α -PINENO + IPSDIENOL
- CIS VERBENOL	- α -PINENO + IPSENOL
- CONTROL	- α -PINENO + IPSENOL + METILBUTENOL
- ETANOL	- α -PINENO + METILBUTENOL
- IPSDIENOL	- ETANOL + IPSENOL
- IPSENOL	- IPSENOL + METILBUTENOL
- METIL BUTENOL	- VERBENONA + IPSENOL
- REFERENCIA	
- VERBENONA	

Tabla 2. Materiales y equipamiento empleados en la puesta a punto el dispositivo electroantenográfico.

Generación y aplicación del flujo de aire y los estímulos

- Generador de estímulos CS-55 Stimulus Controller (Syntech ©; Hilversum, Holanda)
- Filtro de carbón activado (incorporado en el generador de estímulos)
- Tubo de vidrio en forma de Y (4 mm diámetro interno y 6 mm de diámetro externo, Kimax ®)
- Caudalímetro Fischer&Porter con flotador de zafiro
- Tubo flexible de PVC (diámetro interno de 6mm, 3,5 m de longitud)
- Micromanipulador IRN-5 con conducto metálico perforado para la aplicación de estímulos (Syntech ©; Hilversum, Holanda)
- Boquilla WindJet AAB727-1/4-15 (4,8 cm de ancho y 16 orificios de 1,5 mm de diámetro; Spraying Systems ©; Madrid, España)

Elaboración y presentación de los estímulos

- Pipeta automática Eppendorf Research 10-100 µl y 100-1000µl
- Papel filtro Whatman N°1
- Aceite de Parafina (Sigma Aldrich)
- Pipetas Pasteur desechables

Captación y análisis de la respuesta

- Capilares de vidrio de 100 mm de longitud y 1,5 mm de diámetro (Syntech ©; Hilversum, Holanda)
- Filamento de plata de 0,4 mm de diámetro (Syntech ©; Hilversum, Holanda)
- Cloruro potásico 0,1N
- Polivinilpirrolidona (Sigma-Aldrich)
- Sistema de adquisición de datos multicanal USB-IDAC (Syntech ©; Hilversum, Holanda)
- Paquete de Software AutoSpike-32 (Syntech ©; Hilversum, Holanda)
- Jaula de Faraday de hierro y malla electrosoldada de 80x 70 x 65 cm

Tabla 3. Valores fijados para los principales parámetros del dispositivo electroantenográfico

Parámetro	Valor
Volumen de disolución aplicada en cada inyección	20 µl
Concentración de la disolución	50 mg/ml
Separación entre inyecciones del mismo compuesto	30 s
Caudal principal	1670 ml/min
Caudal de inyección	670 ml/min
Duración de la inyección	0,3 s
Filtro de baja frecuencia	0,1 Hz
Filtro de alta frecuencia	20 Hz
Resolución del muestreo	400 muestras/s

4. Resultados

Cada preparación origina un ruido de fondo denominado “línea base”, resultando la relación entre la amplitud de este ruido y la de la señal generada por la antena un factor fundamental para obtener lecturas precisas, limpias y fiables. Con la metodología seguida en la realización de las preparaciones se ha conseguido una línea base estable de unos 50 a 60 µV, muy inferior a las respuestas más bajas producidas por la antena ante los estímulos probados, lo que garantizó una medición cómoda y limpia de la respuesta electrofisiológica de la antena (figura 3).

En la figura 4 se muestran las respuestas estandarizadas (en porcentaje respecto al estímulo de referencia) de los machos y las hembras a los compuestos y mezclas probados. En dicho histograma se puede apreciar que estas respuestas relativas no difieren demasiado entre sexos. Ambos mostraron la mayor despolarización ante el metil-butenol y sus mezclas.

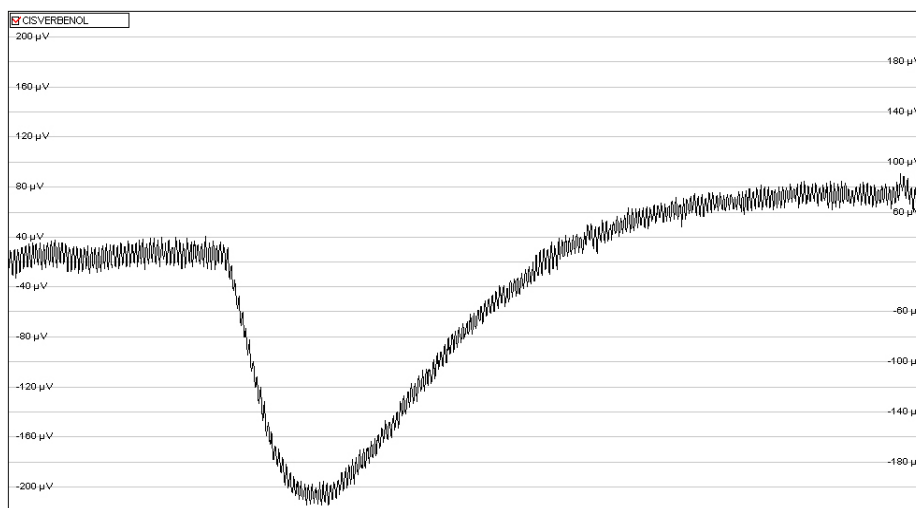


Fig 3. Respuesta electroantenográfica de la antena ante un estímulo con cisverbenol. Se observa que mientras la despolarización supera los 200 μV , la línea base apenas supera los 40 μV .

Tras el metil-butenol, el compuesto que mayor respuesta indujo fue el α -pineno, seguido por el ipsenol y el cisverbenol. El etanol fue el compuesto que menor respuesta eléctrica produjo. Entre las mezclas probadas, la respuesta más amplia ha sido inducida por el α -pineno + metil-butenol. Las hembras pierden sensibilidad a esta mezcla cuando se le añade ipsenol, mientras que los machos no muestran ninguna diferencia cuando se añade esta sustancia.

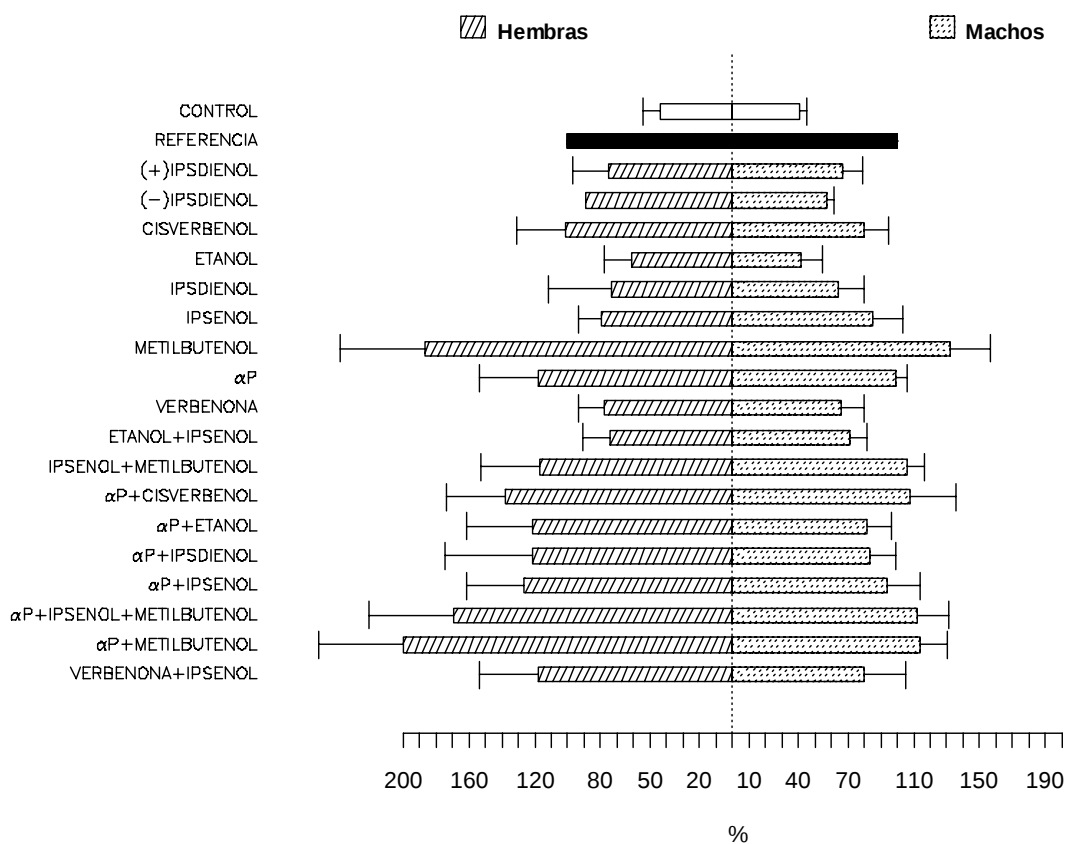


Fig 4. Respuesta estandarizada (% respecto al estímulo de referencia) de los machos y las hembras ante los compuestos y mezclas ensayados

5. Discusión

La metodología empleada en la realización de las antenografías ha proporcionado unas señales limpias y claras. El ruido de fondo o línea base se ha estabilizado en torno a los 50 o 60 μV . Algunos autores como DOLZER (2002) consideran que líneas base inferiores a 0,1 milivoltios pueden considerarse como bajas. Aunque el retardo entre la inyección y la aparición de la respuesta no se considera un verdadero problema, la configuración empleada en este dispositivo electroantenográfico la ha reducido prácticamente a cero. El tiempo registrado para la despolarización de la antena ha sido de aproximadamente 0,5 segundos, valor muy similar al registrado por SÁNCHEZ OSORIO *et al.* (2006) en otros ceraméricidos como *Cerambyx welensii* y *Prinobius germari*. Mientras que en el citado trabajo se inmoviliza al insecto con una cinta de cuero bajo dos abrazaderas metálicas atornilladas sobre una pieza de madera, la metodología de inmovilización aquí empleada parece más adecuada ya que minimiza la posibilidad de daño durante la manipulación, requiere menos tiempo en el proceso y la inmovilización es más eficaz, lo que repercute en un menor ruido de fondo.

Todos los compuestos ensayados fueron electroantenográficamente activos, revelando diferencias en la respuesta electroantenográfica. Sin embargo, estas diferencias en la intensidad de la respuesta no tienen por que estar directamente relacionadas con la intensidad de la respuesta comportamental del insecto en campo a los mismos volátiles. Así, el ipsenol ha demostrado ser el volátil más atractivo en campo frente a machos y hembras de *M. galloprovincialis* (PAJARES *et al.*, 2004; IBEAS *et al.*, 2007), mientras que indujo una respuesta electroantenográfica no superior a la de otros compuestos. La verbenona, que no provoca ninguna respuesta del insecto en campo, ni atrayente ni repelente, obtuvo una respuesta electroantenográfica similar al ipsdienol. Por otro lado, no debe olvidarse que las diferencias en la intensidad de la respuesta antenal pueden deberse parcialmente a una menor cantidad de moléculas que alcanzaron los quimiorreceptores olfativos, ya que aunque se utilizaron las mismas concentraciones inicialmente, las diferencias de volatilidad de los compuestos pudieron modificar el número de moléculas activas que interaccionaron con la antena.

6. Conclusiones

La metodología establecida en este estudio para la realización de electroantenografías se muestra eficaz a la hora de evaluar las respuestas de *Monochamus galloprovincialis*, ya que proporciona respuestas limpias. La inmovilización con parafilm se muestra como una solución adecuada ya que minimiza los daños causados al insecto, reduce el tiempo de manipulación e inmoviliza al insecto de forma eficaz mejorando la línea base.

Los compuestos ensayados mostraron actividad electroantenográfica aunque la intensidad de la respuesta obtenida no guardó relación con la intensidad de respuesta comportamental de los insectos observada en campo para estas mismas sustancias.

7. Bibliografía

DOLZER, J., 2002: Mechanism of modulation and adaptation in pheromone-sensitive of the hawkmoth *Manduca sexta* [en línea]. Disponible en <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2002/0185/pdf/z2002-0185.pdf> [Consulta, marzo de 2009].

IBEAS, F.; DIEZ, J. J.; PAJARES, J. A., 2008: Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: *Cerambycidae*). *J. Insect Behav.*, 21: 101-110.

IBEAS, F.; GEMENO, C.; DIEZ, J. J.; PAJARES, J. A., 2009: Female Recognition and Sexual Dimorphism of Cuticular Hydrocarbons in *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: *Cerambycidae*). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102 (2): 317-325.

LINDGREN, B. S., 1983: A multiple funnel trap for scolytid beetles (Coleoptera). *Can. Entomol.* 115, 299–302.

MOTA, M. M., BRAASCH, H., BRAVO, M. A., PENAS, A. C., BURGERMEISTER, W., METGE, K., SOUSA, E., 1999: First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, Vol. 1, Pages: 727-734, Part 7-8.

PAJARES, J. A., IBEAS, F., DIEZ, J. J., GALLEGU, D., 2004: Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., *Cerambycidae*) to host and bark beetle Semiochemicals. *J. Appl. Entomol.*, 128: 633-638.

SÁNCHEZ OSORIO, I., TAPIAS, R., LÓPEZ, G., DOMÍNGUEZ, L., 2006: Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo para el estudio electroantenográfico de estímulos olfativos en cerambícidos. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 109-119.

SOUSA E, BRAVO MA, PIRES J, NAVES P, PENAS AC, BONIFACIO L, MOTA MM, 2001: *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; *Aphelenchoididae*) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; *Cerambycidae*) in Portugal. *Nematology*, 3: 89-91.

SYNTECH, 1998: Electroantennography: a practical introduction. Syntech, 13 pp. Hilversum, The Netherlands.