

PERFIL DE EMISIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV) FOLIARES EN ALCORNOQUES INFESTADOS POR *CERAMBYX WELENSII* KÜSTER (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE)

Israel Sánchez-Osorio¹, Luis Domínguez Nevado¹, Gloria López Pantoja¹, Raúl Tapias Martín¹ y Daniel Sánchez-Rodas Navarro²

¹ Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Politécnica Superior. La Rábida. Universidad de Huelva. Carretera Palos de la Frontera s/n. 21819-PALOS DE LA FRONTERA (Huelva. España). Correo electrónico: isanchez@uhu.es luis.dominguez@dcaf.uhu.es pantoja@uhu.es tapias@uhu.es

² Departamento de Química y Ciencias de los Materiales. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Campus El Carmen. 21071-HUELVA (España). Correo electrónico: rodas@uhu.es

Resumen

Es conocida la utilización de compuestos volátiles de los hospedantes en la selección de éstos por parte de muchos insectos xilófagos, particularmente en los cerambícidos. Los alcornoques emiten compuestos orgánicos volátiles (COV) foliares a tasas elevadas, presentando variabilidad intraespecífica en el perfil de emisión. Se estudió la relación entre la emisión de COV por alcornoques y su grado de infestación por el perforador *Cerambyx welensii*. De un grupo de 215 alcornoques (Almonte, Huelva) se seleccionaron 16 árboles, 12 que presentaban alta presencia de estos insectos y 4 donde estaban ausentes. Una vez extraídos los COV foliares en estos árboles mediante aireación in situ, el análisis de los extractos por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas mostró que los COV foliares principales en esta especie fueron los monoterpenos α -pineno, β -pineno, sabineno, limoneno y mircenol, representando su emisión conjunta entre el 81,8 y el 98,2% del total. El perfil de emisión dominante fue el tipo limoneno (9/16 árboles). Los porcentajes de emisión de los compuestos principales no resultaron relevantes a la hora de señalar la presencia de insectos; en cambio los árboles sin infestar emitieron limoneno a tasas significativamente menores (en un 84,2%) que los árboles infestados.

Palabras clave: *Cerambyx welensii*, Compuestos orgánicos volátiles, Perfil de emisión en alcornoque

INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son producidos en muchos tejidos vegetales diferentes y mediante diversos procesos fisiológicos. Se han asociado variados efectos a la emisión de COV, en particular los terpenos: defensiva contra patógenos y herbívoros; información entre plan-

tas distintas y entre plantas y animales; estabilización y protección térmica de las membranas celulares, entre otras (LANGENHEIM, 1994; KESSELMEIER & STAUDT, 1999).

A pesar de lo recogido por Pio et al. (1993), en revisiones recientes se ha considerado que *Quercus suber* L. no emite ningún tipo de isoprenoide (ni terpenos ni isopreno) (KESSELMEIER &

STAUDT, 1999; LORETO, 2002). Sin embargo, actualmente se considera al alcornoque como un fuerte emisor de monoterpenos, suponiendo la emisión conjunta de sus cinco compuestos principales (α -pineno, β -pineno, mirceno, sabineno y limoneno) valores cercanos o superiores al 90% de la emisión total (LAVOIR, 2004; PIO et al., 2005).

Los compuestos semioquímicos, y en particular las cairomonas, son una fuente de información clave utilizada por la mayor parte de insectos en su interacción reproductiva y con depredadores, así como para la localización de hospedantes (ALLISON et al., 2004). Para los cerambícidos, la localización de árboles hospedantes adecuados para la puesta es una cuestión crítica. Linsley consideraba ya en 1959 que en estos insectos el olfato desempeña uno de los papeles más importantes para tal cometido. Esta interacción ha sido comprobada en la familia *Cerambycidae* en más de 30 especies hasta el momento, y se ha estudiado con profusión en los últimos años (ALLISON et al., 2004; LIENDO et al., 2005; IBEAS et al., 2007).

Cerambyx welensii Küster puede ser considerado el insecto xilófago de *Q. suber* más importante en Andalucía Occidental, desconociéndose sus mecanismos de selección olfativa de hospedantes. Los recientes resultados electroantagráficos frente a estímulos olfativos de *C. welensii* (SÁNCHEZ-OSORIO et al., 2006, 2007), abren interesantes posibilidades de investigación sobre la influencia de los compuestos semioquímicos en su comportamiento.

El objetivo del presente trabajo es analizar algunos aspectos del comportamiento de *Q. suber* como emisor de COV y su relación con la infestación por *C. welensii*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de árboles y material vegetal para el estudio de las emisiones de COV

Se escogieron 16 alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) situados en una parcela permanente (Dehesa Boyal de Almonte, Huelva) de 2,3 ha, que incluye 215 árboles. Desde el año 2002 se estudia en ella la influencia de *C. welensii* en la vitalidad de los alcornoques. El conoci-

miento de la presencia de adultos en todos los árboles durante su período de vuelo a partir de 2002 (LÓPEZ et al., 2004; datos sin publicar) permitió seleccionar 4 árboles considerados “no infestados” (sin presencia detectada de adultos desde 2002 o con presencia irrelevante -1 ejemplar en los últimos 3 años en uno de los pies-) y 12 árboles “infestados” (los más visitados por adultos distintos, global desde 2002 de $36,8 \pm 18,6$ insectos/árbol; media \pm DT, N = 12). En cada pie se muestrearon al azar dos ramas con exposición sur. Los COV se obtuvieron *in situ*, sobre los 30 cm terminales de la rama. Las porciones analizadas tuvieron 53-117 hojas con un peso seco de $3,8 \pm 7$ gr (media \pm DT, N = 32).

Muestreo de COV

La emisión de COV se determinó mediante encerramiento dinámico empleando la técnica “aeration system” descrita por ZHANG et al. (1999). La cámara de encerramiento consistió en una bolsa de poliéster transparente de 38x25 cm (Albal -antes *Meny Toppits*-. Cofresco, Madrid), filtrando el aire entrante mediante carbón activo (*Split Vent Trap*, 1.200 mg de carbón. Cromlab, Barcelona). Al igual que citan ZHANG et al. (1999), el análisis de emisiones procedentes de este tipo de cámara no reveló liberación de COV alguno.

El muestreo de los COV se realizó extrayendo el aire de la cámara mediante una bomba de vacío (SP200 EC-LC. Schwarzer Präzision, Essen, Alemania), a un caudal de $120 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 5 minutos. Las bombas se calibraron antes del muestreo (Pocket Bubble Flow Meter, BFM-40. Spectrex, California, USA). El aire extraído atravesó un tubo de vidrio con 150 mg de Tenax TA (Tubo Orbo, 60/80 mesh. Supelco, Madrid); simultáneamente, y en las mismas condiciones experimentales, se muestreó el aire en el exterior de la bolsa. Tras el muestreo, cada tubo Orbo fue sellado y conservado en nevera a 4°C para su traslado al laboratorio, donde se conservaron a -30°C hasta su análisis en las 24-48 horas siguientes.

El muestreo se realizó el 12 de junio de 2006, fecha en que se esperaba una alta emergencia de *C. welensii* (LÓPEZ et al., 2004), entre las 12,30 y las 16,30 h. Durante el muestreo se midieron la temperatura en el interior y exterior

de la cámara, y la radiación fotosintéticamente activa incidente sobre la rama (sonda SunScan SS1. Delta-T, Cambridge, Reino Unido). Tras el muestreo, las ramas fueron recolectadas para la determinación del peso seco foliar (65°C hasta estabilizar el peso).

Análisis químico

Los compuestos retenidos en los tubos Orbo fueron extraídos con 1,5 ml de ciclohexano (eficiencia superior al 95% para los estándares α -pineno, β -pineno, limoneno y mirceno). El análisis de los COV se realizó mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (Agilent 6890 GC equipado con Agilent 5973N MS. Agilent Technologies, Santa Clara, USA), empleando una columna HP-5MS (0,25mm:30m:0,25 μ m) y helio como gas portador (1 ml·min⁻¹). La temperatura inicial del horno (46°C) se incrementó (30°C·min⁻¹) hasta alcanzar 70°C, temperatura mantenida durante 4 minutos para incrementarse de nuevo hasta 150°C (10°C·min⁻¹), alcanzándose finalmente los 300°C a razón de 50°C·min⁻¹.

Los compuestos se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de estándares con pureza del 95-99% (Sigma-Aldrich; Fluka), y con la ayuda de la librería NIST 2002 y la aplicación MSD Chemstation Build 75. La cuantificación se efectuó a partir de la calibración con los estándares (0,05 ppm a 1 ppm; en ciclohexano), con 1-bromo-2-clorobenceno (Fluka) como patrón interno (en todas las calibraciones, R²>0,98). Se obtuvieron relaciones señal/ruido mayores de 8 para concentraciones de 0,25 ppb.

Análisis de los datos

La variabilidad de las tasas de emisión y el pequeño tamaño muestral motivó el empleo de métodos robustos en el tratamiento estadístico inferencial; como estimadores de localización y escala se consideraron la *mediana muestral* y la *desviación absoluta mediana estandarizada* (NMAD) respectivamente (GARCÍA, 2002). Para el contraste de hipótesis se empleó la generalización robusta del test de Wilcoxon-Mann-Whitney propuesta por Mee (consultada en GARCÍA, 2002). Se utilizó el programa R-GUI (GNU Operating System Free Software

Foundation, www.gnu.org/), considerando un nivel de significación $\alpha=0,05$.

Las emisiones representativas de cada árbol fueron las medias obtenidas en sus dos ramas, tras restar las emisiones procedentes del aire exterior. Para comparar las emisiones entre árboles diferentes se calculó la tasa de emisión (Es) supuestas unas condiciones estándar de temperatura foliar (30°C) y radiación fotosintéticamente activa (RFA, 1.000 μ mol·m⁻²·s⁻¹). Para ello se empleó el algoritmo propuesto por SILVA et al. (1999):

$$E_o = E_s \cdot (C_L \cdot C_T + \exp(\beta \cdot (T - T_s)))$$

Donde E_o es la emisión observada; E_s la emisión en condiciones estándar; C_L y C_T son factores de corrección para las influencias de la luz y la temperatura respectivamente (PIO et al., 2005), T es la temperatura foliar (°K) y T_s la temperatura estándar. Para β se fijó el valor 0,07 (SILVA et al., 1999).

RESULTADOS

Los COV foliares principales encontrados en los árboles analizados fueron los monoterpenos α -pineno, β -pineno, sabineno, limoneno y mirceno, representando su emisión conjunta entre el 81,8 y el 98,2% del total (Figura 1). Los perfiles de emisión fueron constantes en las dos ramas de cada árbol, resultando dominante el perfil *tipo limoneno* (9/16 árboles, siguiendo la tipología de STAUDT et al., 2001).

También se encontraron otros monoterpenos, considerados secundarios, entre los que cabe destacar al canfeno, α -terpineno, γ -terpineno, cineol y ocimeno. Las tasas de emisión global observadas se encontraron en el rango 0,4 a 7 μ g.gps⁻¹.h⁻¹; las emisiones estándar resultaron en el rango 0,1 a 2,5 μ g.gps⁻¹.h⁻¹.

El perfil de emisión de los árboles no mostró diferencias significativas entre árboles infestados y no infestados atendiendo a los monoterpenos principales; sin embargo, los árboles sin infestar emitieron limoneno a tasas significativamente menores (en un 84,2%) a los árboles infestados (intervalo de confianza de Mee: [0,6700 0,9835]) (Figura 2). El análisis de conglomerados para la tasa de emisión de limoneno (método de Ward empleando el cuadrado de la

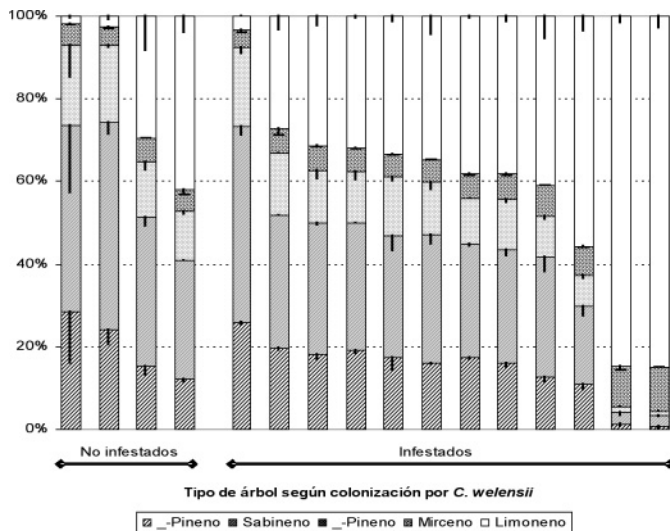


Figura 1. Composición de la emisión de COV por *Q. suber* según la infestación por *C. welensii* (porcentajes referidos a la emisión conjunta de los cinco monoterpenos principales)

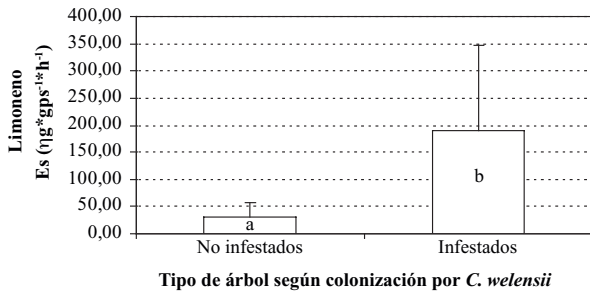


Figura 2. Emisión estándar de limoneno según la infestación por *C. welensii* (medianas/NMAD). Letras distintas indican diferencia significativa

distancia euclídea) mostró, así mismo, una tendencia a la agrupación de los árboles según su infestación, tendencia que se hace más patente si se observa el agrupamiento de árboles considerando sólo los datos de infestación correspondientes al año 2006 (Figura 3).

DISCUSIÓN

Los principales COV encontrados, los monoterpenos α -pineno, β -pineno, mirceno, sabineno y limoneno, presentaron un porcentaje de emisión conjunta similar al hallado en ante-

riosos estudios (STAUDT et al., 2004; LAVOIR, 2004; PIO et al., 2005). El porcentaje de árboles con perfil *tipo limoneno* (56,25%) supera ligeramente al encontrado por STAUDT et al. (2004) en el sur de Francia (49%). Se encontraron árboles con perfil de emisión *tipo pineno*, pero no se encontró perfil *tipo mirceno*, tal y como indicaron que ocurre en *Q. suber* STAUDT et al. (2004).

La emisión observada fue menor que la encontrada en otros estudios. Así, KESSELMEIER & STAUDT (1999) y STAUDT et al. (2004) citan valores en torno a $40 \mu\text{g}\cdot\text{gps}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; sin embargo, PIO et al. (2005) encontraron emisiones de $5\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{gps}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en junio-julio al sur de Lisboa, valo-

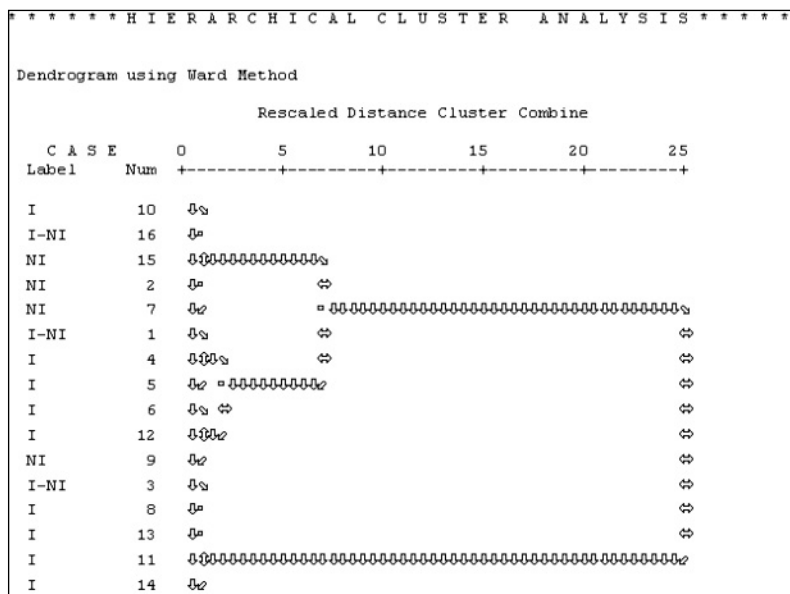


Figura 3. Dendrograma para la emisión estándar de limoneno según la infestación por *C. welensii* (método de Ward). I= Infestado; NI= No infestado; I-NI= "Infestado" si se consideran todos los años, pero con ausencia de insectos en 2006

res inferiores un 50-75 % a los obtenidos por ellos en el norte de Portugal. NÚÑEZ et al. (2002) observaron disminuciones drásticas en la emisión de *Q. ilex* en Madrid bajo condiciones cálidas y secas ($T^a > 28^{\circ}C$; $HR < 34\%$), encontrando emisiones estándar de 1,7-3 $\mu g \cdot g p s^{-1} \cdot h^{-1}$. Durante nuestro muestreo prevalecieron condiciones similares a las descritas, con humedad relativa del 20-27% (estación meteorológica situada a 8 km de la parcela de estudio) y temperatura entre 34,1 y 41,6°C. Estos resultados parecen indicar, siguiendo a PIO et al. (2005), algún tipo de adaptación de *Q. suber* a condiciones climáticas severas.

Se ha considerado que el ataque de insectos xilófagos puede verse favorecido por situaciones estresantes para el árbol, o por defoliación (CHARARAS, 1978; COMPTE Y CAMINERO, 1982); sin embargo es difícil establecer las condiciones de la planta previas al ataque (HANKS, 1999). La emisión de limoneno exhibe una marcada variabilidad intraespecífica en *Q. suber* (STAUDT et al., 2004), pero se ha sugerido que las condiciones de crecimiento de las plantas pueden modificar a largo plazo su proporción en árboles con

este perfil (STAUDT et al., 2003). Hasta el momento, la capacidad atrayente del limoneno en cerambícidos se han constatado para *Xylotrechus longitarsis* Casey (aunque mezclado con otros monoterpenos, MOREWOOD et al., 2002), si bien su actividad cairomonal se ha vinculado más a la repelencia e inhibición de la alimentación en otros perforadores, como los escolítidos (BYERS, 1995). Esta es la primera vez que se relaciona al limoneno con la infestación por un cerambícido de frondosas, aunque hay que considerar estos resultados con carácter aún preliminar. Aunque la tasa de emisión de limoneno mostró diferencias entre los dos grupos de infestación, el porcentaje de presencia (perfil) de este compuesto no resultó diferente. Es necesario, por lo tanto, analizar tal relación con más detalle a partir de un mayor número de árboles infestados y no infestados.

BIBLIOGRAFÍA

ALLISON, J.; BORDEN, J. & SEYBOLD, J.; 2004. A review of the chemical ecology of the

- Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology*. 14: 123-150.
- BYERS, J.; 1995. Host tree chemistry affecting colonization in bark beetles. In: R. Cardé & W. Bell (eds.), *Chemical Ecology of Insects*: 154-213. Chapman and Hall. New York.
- CHARARAS, C.; 1978. La presión osmótica de las especies forestales y sus relaciones con los insectos xilófagos. En: Pesson (ed.), *Ecología*: 207-227. Mundi-Prensa. Madrid.
- COMPTE, A. Y CAMINERO, M.; 1982. Las comunidades de coleópteros xilófagos de las encinas de los alrededores de Madrid. *Graellsia* 38: 201-217.
- GARCÍA, A.; 2002. *Métodos Avanzados de Estadística Aplicada: Metodos Robustos y de Remuestreo*. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid.
- HANKS, L.M.; 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 483-505.
- IBEAS, F.; GALLEGO, D.; Díez, J.J. & PAJARES, J.A.; 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbycidae). *J. Appl. Entomol.* 131: 13-20.
- KESSELMEIER, J. & STAUDT, M.; 1999. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *J. Atmos. Chem.* 33: 23-88.
- LANGENHEIM, J.H.; 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.
- LAVOIR, A.V.; 2004. *Résistance aux stress thermique et lumineuse et émissions de COV chez deux espèces de chênes méditerranéens (Quercus ilex et Quercus suber)*. Diplôme d'études approfondies (DEA). Biosciences de L'environnement, Chimie et Sante. [en línea]. www.cefe.cnrs.fr/fe/pdf/Memoire2004_Lavoir.pdf. Última consulta, junio de 2007.
- LIENDO, C.; MORILLO, F.; SÁNCHEZ, P.; MUÑOZ, W.; GUERRA, J.; CABRERA, A. & HERNÁNDEZ, J.V.; 2005. Olfactory behavior and electroantennographic responses of the cocoa beetle, *Steirastoma breve* (Coleoptera: Cerambycidae). *Florida Entomol.* 88: 117-122.
- LÓPEZ, G.; DOMÍNGUEZ, L.; SÁNCHEZ, I.; TAPIAS, R.; CREMADES, D.; PARAMIO, A. & ALESSO, S.P.; 2004. Population ecology of xylophagous beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in mediterranean *Quercus* forest (southwest of Iberian Peninsula). Incidence on oak trees health (*Quercus ilex* L. sp. ballota and *Quercus suber* L.). In: M. Arianoutsou & V. Papanastasis (eds.), *Ecology, Conservation and Management of Mediterranean Climate Ecosystems*. Proceedings 10th MEDECOS Conference. Rhodes.
- LORETO, F.; 2002. Distribution of isoprenoid emitters in the *Quercus* genus around the world: chemo-taxonomical implications and evolutionary considerations based on the ecological function of the trait. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*. 5: 185-192.
- MOREWOOD, W.D.; HEIN, K.E.; KATINIC, P.J. & BORDEN, J.H.; 2002. An improved trap for large wood-boring insects, with special reference to *Monochamus scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Can. J. For. Res.* 32: 519-525.
- NÚÑEZ, L.; PLAZA, J.; PÉREZ-PASTOR, R.; PUJADAS, M.; GIMENO, B.; BERMEJO, V. & GARCÍA-ALONSO, S.; 2002. High water vapour pressure deficit influence on *Quercus ilex* and *Pinus pinea* field monoterpene emission in the central Iberian Peninsula (Spain). *Atmos. Environm.* 36: 4441-4452.
- PIO, C.; NUNES, T. & BRITO, S.; 1993. Volatile hydrocarbon emissions from common and native species of vegetation in Portugal. In: J. Slanina, G. Angeletti & S. Beilke (eds), *Air pollution report 47*: 291-298. Guyot SA. Brussels.
- PIO, C.A.; SILVA, P.A.; CERQUEIRA, M.A. & NUNES, T.V.; 2005. Diurnal and seasonal emissions of volatile organic compounds from cork oak (*Quercus suber*) trees. *Atmos. Environm.* 39: 1817-1827.
- SÁNCHEZ-OSORIO, I.; TAPIAS, R.; LÓPEZ, G. Y DOMÍNGUEZ, L.; 2006. Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo para el estudio electroantegráfico de estímulos olfativos en cerambycidos. *Bol. San. Veg., Plagas.* 32: 109-120.
- SÁNCHEZ-OSORIO, I.; TAPIAS, R.; DOMÍNGUEZ, L. Y LÓPEZ, G.; 2007. Caracterización de la respuesta electroantegráfico de *Cerambyx*

- welensii Küster y Prinobius germari Dejean (Coleoptera: Cerambycidae). *Inv. Agrar.: Sist. Rec. For.* 16: 95-106.
- SILVA, P.; NUNES, T.; CAMPOS, C.; MARIZ, M. Y PIO, C.; 1999. Emissões de compostos orgânicos voláteis pela floresta de sobreiro em Portugal. *En: Actas 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Lisboa 2:* 627-637. Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.
- STAUDT, M.; JOFFRE, R. & RAMBAL, S.; 2003. How growth conditions affect the capacity of *Quercus ilex* leaves to emit monoterpenes. *New Phytol.* 158: 61-73.
- STAUDT, M.; MANDL, N.; JOFFRE, R. & RAMBAL, S.; 2001. Intraspecific variability of monoterpene composition emitted by *Quercus ilex* leaves. *Can. J. For. Res.* 31: 174-180.
- STAUDT, M.; MIR, C.; JOFFRE, R.; RAMBAL, S.; BONIN, A.; LANDAIS, D. & LUMARET, R.; 2004. Isoprenoid emission of *Quercus* spp. (*Q. suber* and *Q. ilex*) in mixed stands contrasting in interspecific genetic introgression. *New Phytol.* 163: 573-584.
- ZHANG, Q.H.; BIRGERSSON, G.; ZHU, J.; LÖFSTEDT, C.; LÖFQVIST, J. & SCHLYTER, F.; 1999. Leaf volatiles from nonhost deciduous trees: variation by tree species, season and temperature, and electrophysiological activity in *Ips typographus*. *J. Chem. Ecol.* 25: 1923-1943.

