



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-485

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Feromonas de contacto implicadas en el reconocimiento sexual en *Monochamus galloprovincialis* y *Monochamus sutor* (Coleoptera: Cerambycidae)

SACRISTÁN, A.¹, SÁNCHEZ-HUSILLOS, E.¹, HALL, D.R.² Y PAJARES, J.A.¹

¹ Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible - CIFOR-INIA-Uva. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, E.T.S.II.AA., Universidad de Valladolid, Avd. Madrid 44, 34071 Palencia

² Natural Resources Institute. University of Greenwich, London, England, United Kingdom

Resumen

Estudios anteriores han mostrado que los machos de *Monochamus galloprovincialis* (Olivier, 1975) usan feromonas de contacto en la cutícula de las hembras para la identificación de la pareja. Se encontró que la composición cuticular de machos y hembras es similar cualitativamente, excepto por la presencia de dos compuestos específicos en los machos. Este mismo planteamiento es similar en *Monochamus sutor* (Linné, 1758). Además, los compuestos exclusivos de los machos resultaron idénticos en ambas especies.

Se realizaron bioensayos de apareamiento intraespecíficos e interespecíficos utilizando extractos completos de los hidrocarburos cuticulares de machos y de hembras, fracciones de los extractos de los machos sin los compuestos exclusivos de los machos y fracciones con estos compuestos solamente, aplicados sobre señuelos de vidrio. Previamente se seleccionaron los machos que ofrecían una respuesta positiva frente a distintos señuelos para determinar su capacidad de reconocimiento sexual.

Los resultados refuerzan la hipótesis de que los machos de ambas especies de *Monochamus* (Dejean, 1821) determinan la especie de su pareja mediante el reconocimiento del conjunto de hidrocarburos cuticulares específicos en las hembras, mientras que la identificación sexual se realiza por ausencia de los compuestos característicos de los machos.

Palabras clave

Hidrocarburos cuticulares, bioensayo de apareamiento, compuestos específicos de los machos, nematodo del pino.

1. Introducción

Bursaphelenchus xylophilus (Steiner & Buhrer, 1934) es un organismo de cuarentena incluido en la lista A2 de EPPO (2003) y en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE, 2013), que causa la Enfermedad del Marchitamiento del Pino (Pine Wilt Disease). Este organismo procedente de Norteamérica, fue introducido en Japón en 1900, se expandió a China, Taiwan y Corea, donde ha causado graves problemas en sus masas (DA SILVA et al., 2015). En 1999 fue detectado en Portugal (MOTA et al., 1999), desde donde se ha extendido hasta zonas fronterizas con España: Villanueva de la Sierra (Cáceres) (CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2008), As Neves (Pontevedra) (CONSELLERÍA DEL MEDIO RURAL, 2010), Valverde del Fresno (Cáceres) (CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2012), Sancti-Spíritus (Salamanca) (CONSEJERÍA DE FOMENTO Y MEDIO AMBIENTE, 2013), y Salvaterra do Miño (CONSELLERÍA DEL MEDIO RURAL, 2016) (Pontevedra), este último a menos de dos kilómetros del foco de As Neves. Únicamente el foco de Villanueva de la Sierra se encuentra actualmente erradicado (CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2013).

El principal hospedante del nematodo de la madera del pino (NMP) es *Pinus pinaster* (Aiton, 1789), aunque también se ha determinado la susceptibilidad de *Pinus sylvestris* (L., 1753), mientras otras especies como *Pinus pinea* (L., 1753) y *Pinus halepensis* (Mill., 1768) se consideran con mayor resistencia (DA SILVA et al., 2015). En España ha sido detectado en *P. pinaster* y en *Pinus radiata* (D. Don, 1836) (ZAMORA et al., 2015), una especie considerada resistente. En Portugal también ha sido encontrado en *Pinus nigra* (J.F. Arnold, 1785) (INÁCIO et al., 2015). El NMP requiere de un insecto vector del género *Monochamus* (Dejean, 1821) para su transmisión a nuevos hospedantes. *Monochamus galloprovincialis* (Olivier, 1975) es hasta ahora el único vector demostrado de *B. xylophilus* en Portugal (SOUSA et al., 2001) y España. Otra especie potencial vector del NMP, ampliamente distribuida por el centro y norte de Europa y presente en el Pirineo, es *Monochamus sutor* (Linné, 1758) (PAJARES et al., 2013). Es de interés el estudio de las especies del género *Monochamus* por su importancia como vectores.

Investigaciones recientes han evidenciado la compleja ecología química reproductiva de estas especies. Ambos *Monochamus* son caíromonalmente atraídos por volátiles del hospedante y por compuestos feromonales de escolítidos de coníferas (PAJARES et al., 2004, 2013, IBEAS et al., 2007). Al igual que otras especies del género, los machos de *M. galloprovincialis* y *M. sutor* emiten una feromona a la que son atraídos machos y hembras de la especie (PAJARES et al., 2010, 2013). Estos descubrimientos han conducido al desarrollo de cebos operativos idénticos altamente eficientes para ambos insectos (ÁLVAREZ et al., 2016; PAJARES et al., 2016).

El hecho de que los adultos de ambas especies, que presentan zonas de simpatría en Europa, respondan a la misma feromona agregativa, sugiere la existencia de mecanismos para el reconocimiento químico de la pareja que eviten apareamientos inviables. GINZEL & HANKS (2003) y KIM et al. (2006) han mostrado que las feromonas sexuales de contacto son fundamentales en el reconocimiento de la pareja durante la reproducción de varias especies de longicornios (Coleoptera: Cerambycidae). IBEAS et al. (2009) demostró que los machos de *M. galloprovincialis* son capaces de identificar a su pareja mediante en el reconocimiento a través de sus palpos maxilares de feromonas presentes en la cutícula de las hembras. Los extractos procedentes de machos y hembras presentaron un perfil de hidrocarburos cuticulares similar cualitativamente, aunque con diferencias cuantitativas en los picos principales, encontrándose además la presencia de dos picos específicos de los machos, ausentes en las hembras.

2. Objetivos

En este trabajo se realizaron un conjunto de bioensayos encaminados a determinar cómo se realiza la discriminación de la pareja *M. galloprovincialis* y *M. sutor*, estudiando el papel de los compuestos cuticulares que intervienen en el reconocimiento químico por contacto que se produce durante la reproducción. Se pretendió testar la hipótesis de que son los hidrocarburos cuticulares comunes a machos y hembras los que permiten identificar la especie, mientras que la identificación del sexo se realiza a través de la ausencia de los compuestos específicos de los machos. Se trató de estudiar también las diferencias en las feromonas de contacto entre *M. galloprovincialis* y *M. sutor*.

3. Metodología

3.1. Insectos utilizados

Los individuos de *M. galloprovincialis* empleados en los bioensayos de apareamiento fueron obtenidos a partir de una serie de trozas cebadas con Galloprotect 2D® (SEDQ S.L.) en Tabuyo del Monte (León) durante la primavera y verano del año anterior a los ensayos. En otoño las trozas se llevaron a una jaula de cría donde se recogieron diariamente los adultos emergidos durante el verano de 2016. Los insectos se mantuvieron individualmente en frascos de cristal de 1 l. alimentados con

ramillas de *Pinus sylvestris* frescas. Una vez que los adultos estaban sexualmente maduros, tras 12/13 días de alimentación (SANCHEZ-HUSILLOS et al., 2016) se utilizaron en los bioensayos.

Los individuos de *M. sutor* fueron capturados en trampas multiembudos (Econex S.L.) cebadas con Galloprotect 2D® (SEDQ S.L.) durante mayo a septiembre del año del bioensayo, en un dispositivo de muestreo ubicado en el Pirineo Aragonés. Los insectos fueron enviados semanalmente al laboratorio donde fueron mantenidos similarmente a los adultos de la otra especie. Los individuos capturados son maduros sexualmente cuando responden al cebo fero-cairomonal empleado (SANCHEZ-HUSILLOS et al., 2016).

3.2. Preparación de extractos

La obtención de los compuestos cuticulares se realizó mediante su extracción en hexano. (IBEAS et al., 2009). Se extrajeron los compuestos cuticulares de veinte individuos sexualmente maduros de cada sexo por cada especie, *M. galloprovincialis* y *M. sutor*. La mitad de los extractos de los machos se enviaron al Natural Resources Institute (University of Greenwich, Reino Unido) para su fraccionamiento y posterior combinación en dos extractos. Para cada una de las dos especies se obtuvieron dos extractos de los machos. Extracto 1 conteniendo los hidrocarburos comunes a ambos sexos y Extracto 3 consistente en la combinación de los dos compuestos exclusivos de los machos. Los extractos de las hembras se utilizaron sin fraccionar. Los compuestos fraccionados, y los completos de las hembras, se encontraban en una concentración equivalente de 1 insecto en cada 0,5 ml.

3.3. Bioensayos de apareamiento

Los bioensayos se realizaron en condiciones de laboratorio, a una temperatura en torno a los 24°C y bajo una iluminación suave. Los insectos se mantuvieron individualmente dentro de botes de plástico (120 ml) durante el día anterior a ser ensayados para conseguir su aclimatación. En el momento del ensayo, los adultos fueron depositados sobre un cristal y cubiertos con una Placa Petri de vidrio (15 cm de diámetro y 4 cm de altura) que configuraba la arena experimental. Se llevaron a cabo diversos ensayos durante los meses de verano de 2012 a 2016, momento en que suficientes insectos se encuentran en un estado idóneo, sexualmente maduros, pero no demasiado viejos.

Inicialmente los machos se sometieron a una prueba para seleccionar aquellos que presentaban un comportamiento reproductivo adecuado sometidos a las condiciones experimentales. Se les presentaron sucesivamente una hembra viva, dicha hembra muerta, la hembra con los compuestos cuticulares extraídos y la misma hembra con el extracto reaplicado. Para ello se llevó a cabo el procedimiento definido en IBEAS et al., (2007): la hembra se mató por congelación (-40°C) durante 30 minutos, luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora (♀ muerta) y se presentó al macho en la arena experimental durante 20 minutos. La misma hembra se sumergió entonces en 3 ml de hexano durante 2 minutos para eliminar los compuestos cuticulares. Este procedimiento se repitió dos veces y la mezcla se concentró hasta 2 ml por evaporación. Esta hembra (♀ extraída) se presentó a los mismos machos. El extracto se añadió a la misma hembra (♀ reaplicada) y se presentó a los mismos machos nuevamente. En esta secuencia, los machos aptos debían tratar de aparearse con las hembras en todos los casos, excepto con las hembras que carecían de los compuestos cuticulares.

Los machos seleccionados como válidos se testaron frente a señuelos de vidrio (2,0 cm de largo x 0,5 cm de diámetro), o frente hembras extraídas, sobre los que se aplicaron los extractos completos o fraccionados. Se consideró que un macho aceptaba el estímulo (hembra o señuelo) si intentaba aparearse con él o ella en un tiempo de 20 minutos. En caso contrario se consideró que rechazaba el estímulo.

4. Resultados

4.1. Compuestos cuticulares

En la Figura 1 se muestran los resultados del análisis por cromatografía de gases de los compuestos cuticulares extraídos en los machos y hembras de *M. sutor* y *M. galloprovincialis*. Puede observarse que ambas especies presentaron diferencias interespecíficas en el patrón de compuestos cuticulares. Por otro lado, se aprecia que dentro de cada especie las diferencias entre machos y hembras son únicamente cuantitativas, presentando ambos sexos los mismos compuestos, si bien en cantidades diferentes. Esto es así en los hidrocarburos, con índices de retención por debajo de 3.000. Al final de ambos cromatogramas, con elevados tiempos de retención, se observan dos picos notables presentes exclusivamente en los extractos de los machos de ambas especies. Los análisis han revelado que estos picos no son hidrocarburos sino éteres y que son los mismos compuestos en las dos especies de *Monoctonus*.

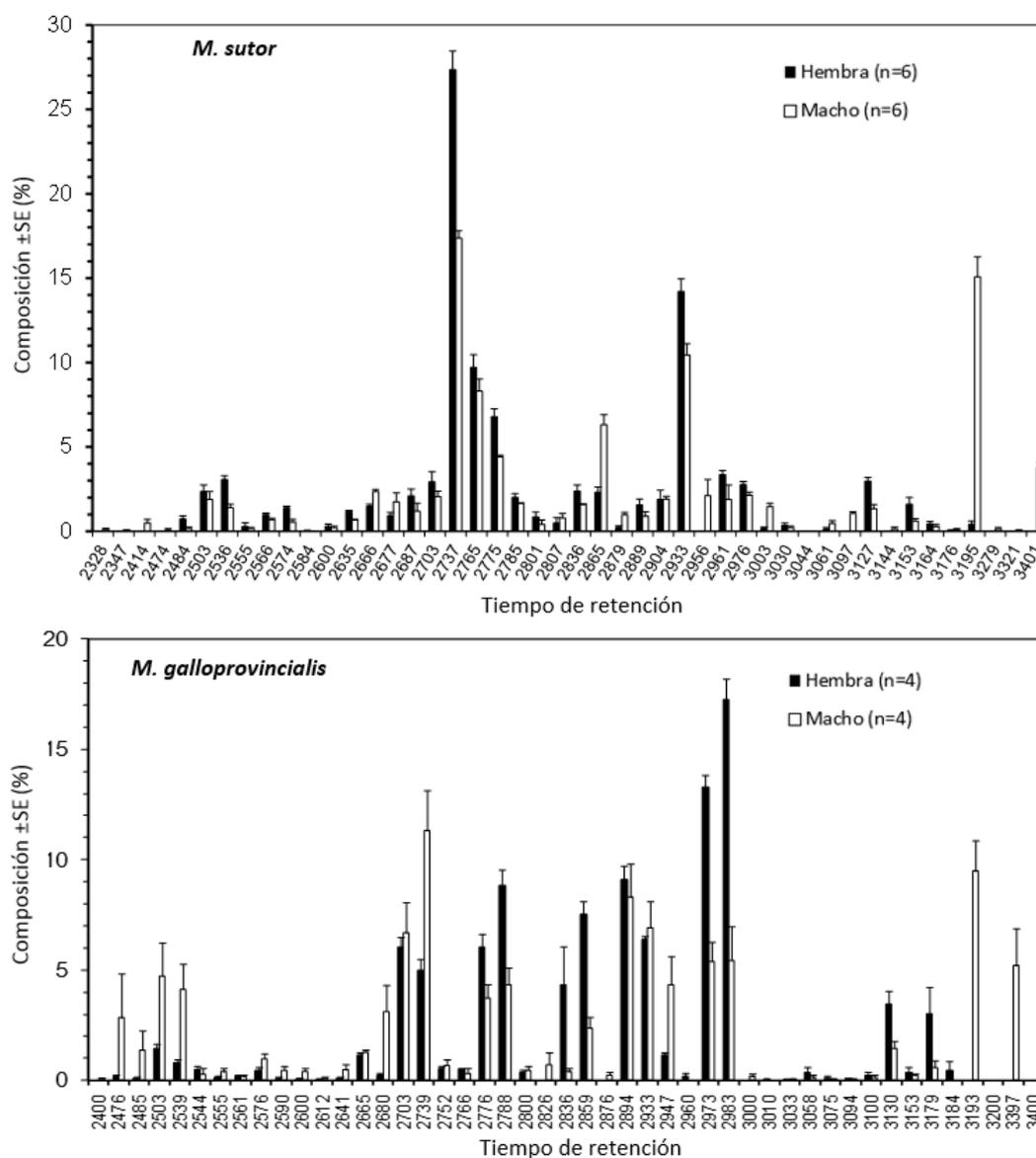


Figura 1. Análisis de los compuestos cuticulares de hembras (negro) y machos (blanco) de *M. sutor* (arriba.) y *M. galloprovincialis* (abajo).

4.2. Bioensayos de apareamiento

En los dos primeros bioensayos de apareamiento (bioensayos 1 y 2) se trató de mostrar la influencia de los compuestos cuticulares en el reconocimiento de la pareja por los machos de *M. sutor* y *M. galloprovincialis* (Figura 2). Ambas especies se comportaron similarmente: todos los machos intentaron aparearse con las hembras muertas de su especie, rechazaron a las hembras que no presentaban los compuestos cuticulares (extraídas) e intentaron copular con ellas cuando les fueron reaplicados los compuestos extraídos. Igualmente, todos los machos aceptaron los señuelos de vidrio a los que se habían aplicado los extractos cuticulares completos de las hembras.

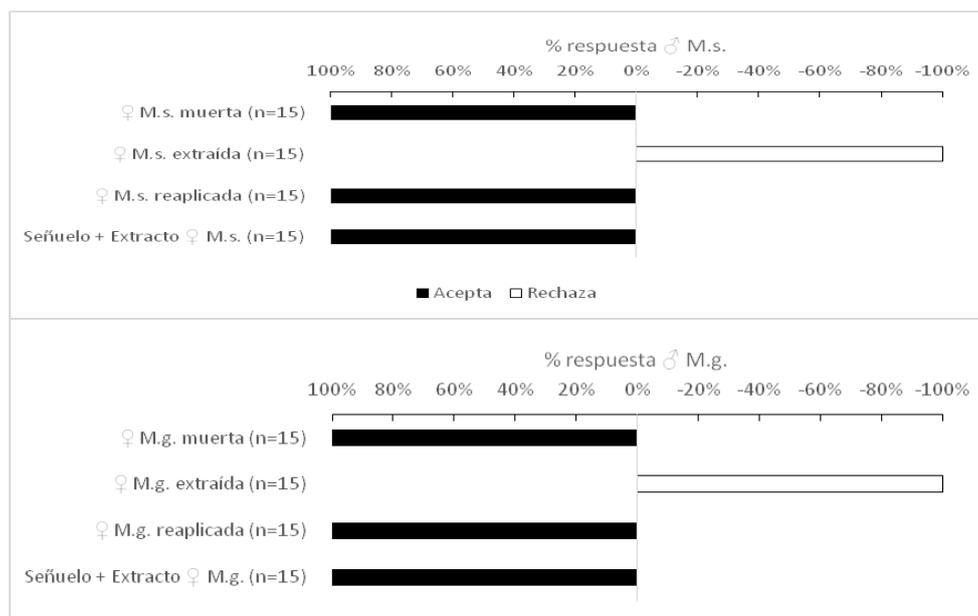


Figura 2. Respuestas de machos de *M. sutor* (arriba) y de *M. galloprovincialis* (abajo) a diferentes estímulos (bioensayos 1 y 2; 2012). Acepta: el macho intenta aparearse (en negro); Rechaza: no intenta aparearse (en blanco).

En un nuevo bioensayo (bioensayo 3; 2013) se ofrecieron a los machos de *M. sutor* estímulos consistentes en machos de su especie muertos, los cuales fueron rechazados en todos los casos. Sin embargo, cuando a los mismos machos se les ofrecieron señuelos de vidrio a los que se había aplicado el extracto 1 de *M. sutor* (hidrocarburos cuticulares comunes a machos y hembras) todos fueron aceptados para el apareamiento. Por el contrario, si a esos señuelos con el extracto 1 se les añadía además el extracto 3 de *M. sutor* (éteres exclusivos de los machos), entonces un 75% de los machos rechazaron el señuelo. Estos resultados apuntan a que los compuestos cuticulares que permiten a los machos reconocer a su pareja son los hidrocarburos comunes a ambos sexos ya que los machos reconocieron como hembras señuelos impregnado con esta fracción de compuestos cuticulares de los extractos de los machos. Al aplicar también los éteres específicos de los machos se produjo el rechazo del señuelo, lo que refuerza la hipótesis de que estos compuestos intervienen también en la aceptación de la pareja.

El bioensayo anterior fue realizado con un pequeño número de machos (4). En 2014 se realizaron nuevos bioensayos (bioensayos 4 y 5; figura 3) para tratar de confirmar los resultados anteriores. Nuevamente se encontró que los machos aceptaron señuelos tratados con extractos completos de hembras y rechazaron los señuelos tratados con extractos completos de machos. Sin embargo, cuando los señuelos fueron tratados con los extractos de los machos que contenían sólo la fracción común con las hembras (extracto 1), éstos fueron mayoritariamente aceptados (90%) como parejas por los machos. Ambas especies se comportaron similarmente, si bien los valores no fueron tan altos en *M. sutor*. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los hidrocarburos cuticulares

comunes a machos y hembras (aunque en distintas cantidades) son utilizados por los machos para reconocer a las parejas de su especie.

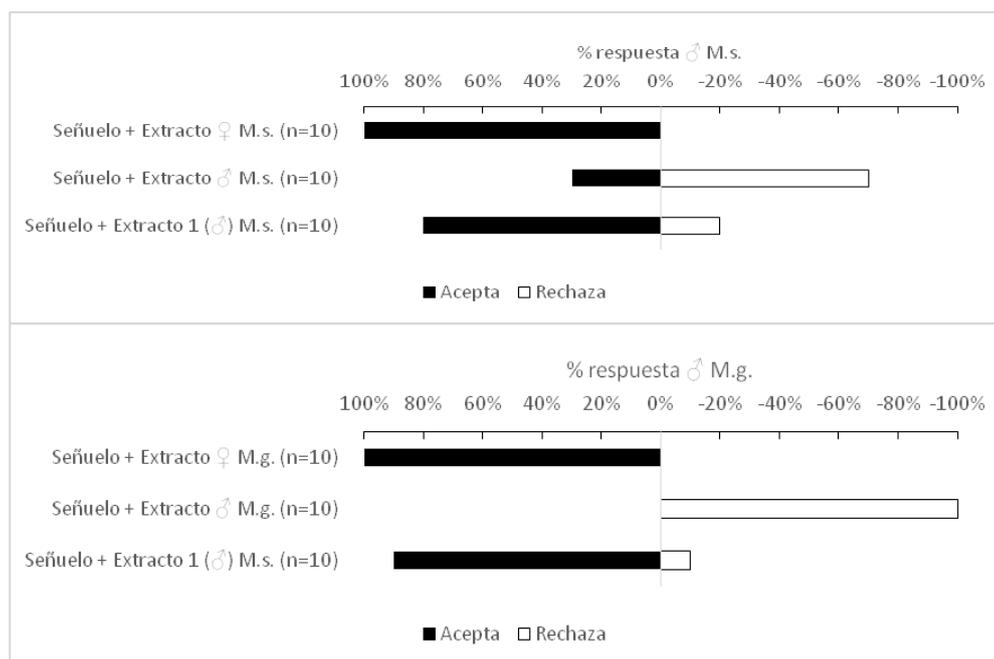


Figura 3. Respuestas de machos de *M. sutor* (arriba) y *M. galloprovincialis* (abajo) frente a distintos estímulos. (bioensayos 4 y 5; 2014). Acepta: el macho intenta aparearse (en negro); Rechaza: no intenta aparearse (en blanco)..

Durante 2014 (bioensayo 6) y 2016 (bioensayo 7) se continuaron los experimentos de reconocimiento de la pareja para confirmar los resultados obtenidos anteriormente (Figura 4). En el bioensayo 6 se encontró nuevamente que los machos de *M. sutor* aceptaron aparearse con señuelos tratados con extractos completos de sus hembras o con señuelos en los que se había aplicado la fracción cuticular de los machos común con las hembras (extracto 1). Los machos rechazaron mayoritariamente (80 %) los señuelos que, habiendo recibido los extractos completos de las hembras, habían recibido además la fracción exclusiva de machos (extracto 3). El mismo comportamiento se repitió cuando se utilizaron hembras muertas en vez de señuelos: los machos aceptaron todas las hembras muertas de su especie, pero las rechazaron mayoritariamente cuando se les añadieron los extractos que contenían los compuestos exclusivos de los machos.

Los resultados obtenidos con *M. galloprovincialis* (bioensayos 7) fueron similares: los machos aceptaron como parejas señuelos con extractos de hembras y con extractos conteniendo la fracción común de los machos (extracto 1), pero los rechazaron si a estos últimos se les añadió además la fracción exclusiva de los machos (extracto 3). No obstante, estos resultados deben confirmarse en posteriores experimentos, puesto que, sorpresivamente, los machos no rechazaron mayoritariamente los señuelos que habían recibido el extracto completo de los machos (2º línea en las Figuras 4 superior e inferior).

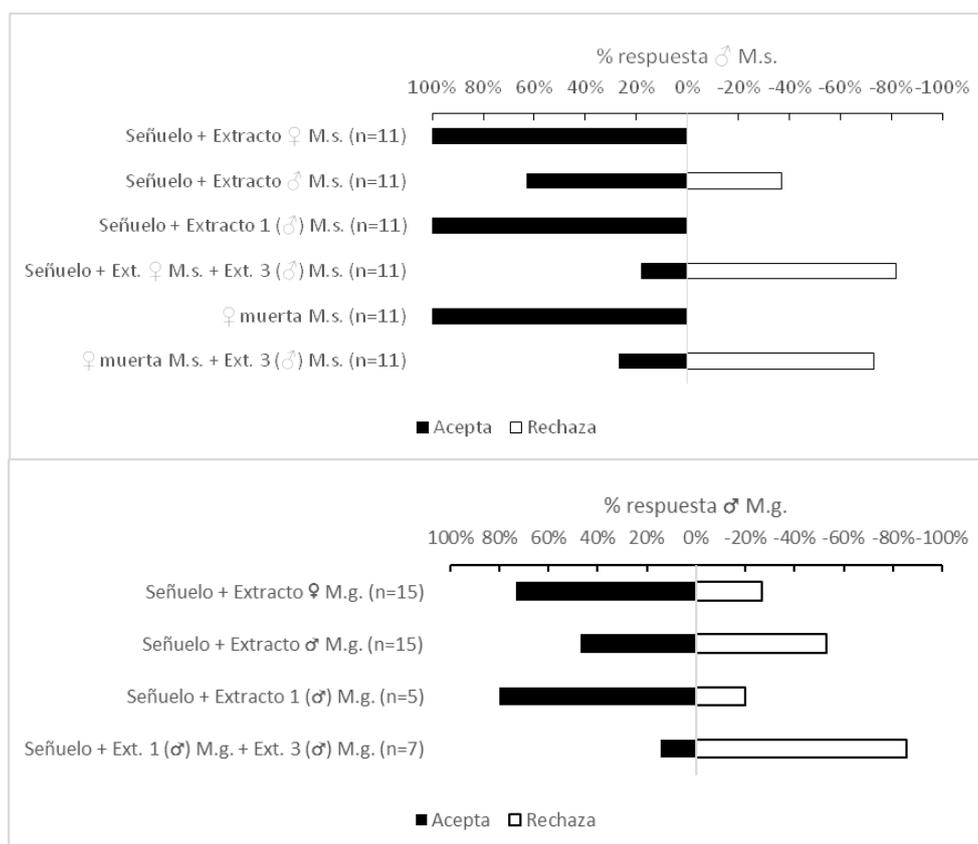


Figura 4. Respuestas de machos de *M. sutor* (arriba) y *M. galloprovincialis* (abajo) frente a distintos estímulos. (bioensayos 6 y 7; 2014 y 2016). Acepta: el macho intenta aparearse (en negro); Rechaza: no intenta aparearse (en blanco).

5. Discusión

Los resultados confirman la existencia de feromonas de contacto para el reconocimiento de la pareja en *M. galloprovincialis* (IBEAS et al., 2009) y muestran por primera vez su existencia en *M. sutor*. Este hecho era esperable toda vez que ambas especies comparten zonas de distribución en varias áreas europeas y responden a la misma feromona agregativa, lo que hace necesario la evolución de mecanismos de diferenciación sexual intraespecífica. La existencia de feromonas de contacto presentes en la cutícula de los adultos ha sido indicada en diferentes especies de coleópteros (HOWARD & BLOMQUIST, 2005), como el bupréstido *Agrilus planipennis* (Fairmaire, 1888) (SILK et al., 2009). Entre los cerambícidos (RAY et al., 2006), se han reportado feromonas de contacto en diversas especies como *Psacotheta hilaris* (GAHAN, 1857) (FUKAYA et al., 1996), *Anoplophora malasiaca* (Thomson, 1865) (FUKAYA et al., 2000), *Xylotrechus colonus* (Fabricius, 1775) (GINZEL et al., 2003a), *Megacyllene robiniae* (Forster, 1771) (GINZEL & HANKS, 2003), *Dectes texanus* (LeConte, 1862) (CROOK et al., 2004) o *Prionus californicus* Beutenmüller (1896) (BARBOUR et al., 2007). Dentro del género *Monochamus*, han sido encontradas feromonas de contacto en *Monochamus alternatus* (Hope, 1843) (KIM et al., 1992), *Monochamus saltuarius* (Gebler, 1830) (KIM et al., 2006) y en *Monochamus scutellatus* (Say, 1824) (BRODIE et al., 2012).

Las feromonas de contacto en los insectos están compuestas normalmente de mezclas de hidrocarburos cuticulares como se ha demostrado en varias especies (HOWARDS, 1993). Sin embargo, la composición de estos hidrocarburos cuticulares, implicados en el reconocimiento de la pareja sólo ha sido identificada en unas pocas especies. Se ha encontrado en varios cerambícidos que las hembras presentan algunos compuestos cuticulares exclusivos o en mucha mayor proporción

que los machos y que estos compuestos desencadenan la secuencia de apareamiento en los machos. Así, las hembras de *M. robiniae* tienen mucho más (Z)-9-pentacosano en su cutícula que los machos (GINZEL et al., 2003b), igual que sucede con *Anoplophora glabripennis* (Breuning, 1944) (ZHANG et al., 2003) y los extractos de hembras de *X. colonus* tienen cantidades mayores de n-pentacosano, 3-metilpentacosano, y 9-metilpentacosano que los de los machos (GINZEL et al., 2003a). En el bupréstido *A. planipennis* las hembras tienen en su cutícula 9-metilpentacosano, que está ausente en la de los machos, y actúa como feromona de contacto (SILK et al., 2009). Por el contrario, en *M. galloprovincialis* no se encontraron grandes diferencias cuantitativas apreciables entre hembras y machos en los tres hidrocarburos cuticulares más abundantes, n-pentacosano, n-heptacosano y n-nonacosano (IBEAS et al., 2008). Nuestros análisis han confirmado que machos y hembras de *M. galloprovincialis* presentan un perfil de hidrocarburos cuticulares similar, con diferencias cuantitativas relativas, pero además la cutícula de los machos contiene dos compuestos exclusivos que no aparecen en las hembras (IBEAS et al., 2009). Se describe aquí por primera vez un patrón similar presente en *M. sutor*. Más aún, se han identificado los dos compuestos exclusivos de los machos como éteres y han resultado ser los mismos compuestos para ambas especies. GINZEL et al. (2003a) encontraron un hidrocarburo (11, 13, 15-MeC₂₉) en los machos de *X. colonus* en mayor proporción que en hembras que podría estar implicado en el reconocimiento de la pareja. Por su parte, BRODIE et al. (2012) encontraron que las hembras sexualmente maduras de *M. scutellatus* tenían cantidades de compuestos cuticulares mucho mayores que las hembras inmaduras y que los machos, pero no encontraron compuestos exclusivos en los extractos de los machos. No obstante, su análisis de los extractos cuticulares no se extendió hasta los compuestos con índices de retención iguales o superiores a 3000, en los que aparecen los compuestos exclusivos de machos de *M. galloprovincialis* y *M. sutor*.

Los resultados obtenidos en los bioensayos refuerzan la hipótesis inicial de que la fracción cuticular de hidrocarburos comunes a machos y hembras es utilizada por los machos de ambas especies de *Monochamus* para reconocer a las hembras como individuos de su especie, mientras que la ausencia de los éteres exclusivamente presentes en la cutícula de los machos les permite determinar que se trata del sexo correcto. Posteriores estudios deberán confirmar estos mecanismos y avanzar en la completa identificación de los compuestos implicados.

6. Conclusiones

Se ha confirmado la presencia de feromonas de contacto implicadas en el reconocimiento de pareja en *M. galloprovincialis* y se demostrado por primera vez su existencia en *M. sutor*. Se han encontrado perfiles de hidrocarburos cuticulares diferentes en ambas especies, pero similares entre machos y hembras dentro de cada especie, excepto por la existencia de dos compuestos exclusivos de la cutícula de los machos, identificados como éteres.

Se han encontrado evidencias de que los machos de estos cerambícidos reconocen a su pareja por los hidrocarburos específicos de la especie y por la ausencia de los compuestos exclusivos de los machos.

7. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer la ayuda prestada en la obtención de los insectos a F. Centeno, N. Ibarra y a los Agentes para la Protección de la Naturaleza de la Unidad de la Salud de los Bosques, del Departamento de Desarrollo Rural y Sostenibilidad del Gobierno de Aragón y al personal del

Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos de la Junta de Castilla y León. A. Ponce colaboró en mantenimiento de los adultos de los insectos para los bioensayos.

Este trabajo ha sido financiado por la Unión Europea (Proyecto REPHRAME FP7-KBBE-2010-4) y por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad a través del proyecto RTA2014-00042-C02-02. A. Sacristán ha sido financiado por el Plan de Contratación de personal para la promoción de empleo joven e implantación de la Garantía Juvenil I+D+i, del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

8. Bibliografía

ÁLVAREZ, G., GALLEGO, D., HALL, D. R., JACTEL, H., & PAJARES, J. A. 2016. Combining pheromone and kairomones for effective trapping of the pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis*. J. Appl. Entomol. 140(1-2): 58-71.

BARBOUR, J.D., LACEY, E.S. & HANKS, L.M. 2007. Cuticular hydrocarbons mediate mate recognition in a species of longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) of the primitive subfamily prioninae. Ann. Entomol. Soc. Am. 100: 333-338.

BRODIE, B.S., WICKHAM, J.D. & TEALE S.A. 2012. The effect of sex and maturation on cuticular semiochemicals in *Monochamus scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Can. Entomol. 144(06): 801-808.

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2008. RESOLUCIÓN de 12 de noviembre de 2008, de la Dirección General de Explotaciones y Calidad Alimentaria, por la que se declara contaminada por el nematodo de la madera del pino *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. determinada área forestal del término municipal de Villanueva de la Sierra y se establece una zona demarcada de 20 kilómetros de radio, adoptándose en ella diversas medidas fitosanitarias tendientes al control y erradicación del agente patógeno. DOE 233: 32018 (de 2 de diciembre de 2008).

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2012. RESOLUCIÓN de 17 de febrero de 2012, de la Dirección General de Agricultura y Ganadería, por la que se declara contaminada por el nematodo de la madera del pino, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al., determinada planta sensible ubicada en el término municipal de Valverde del Fresno y se establece una zona demarcada de 20 kilómetros de radio, adoptándose diversas medidas fitosanitarias para la erradicación y control del organismo nocivo. DOE 46: 4668 (de 7 de marzo de 2012).

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2013. RESOLUCIÓN de 16 de enero de 2013, de la Dirección General de Agricultura y Ganadería, por la que se declara erradicado el foco del organismo nocivo *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. en el término municipal de Villanueva de la Sierra, se acuerda el levantamiento de la zona demarcada y se adoptan diversas medidas fitosanitarias de vigilancia. DOE 17: 1534 (de 25 de enero de 2013).

CONSEJERÍA DE FOMENTO Y MEDIO AMBIENTE. 2013. ORDEN FYM/1090/2013, de 20 de diciembre, por la que se declara contaminado el monte con número de elenco SA-3032 situado en el término municipal de Sancti-Spíritus (Salamanca) por el nematodo de la madera del pino, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. y se establece la zona demarcada y las medidas fitosanitarias de emergencia para su erradicación. BOCyL 249: 83977 (de 30 de diciembre de 2013).

CONSELLERIA DEL MEDIO RURAL. 2010. RESOLUCIÓN de 17 de noviembre de 2010, de la Dirección General de Producción Agropecuaria, por la que se declara en el territorio de la Comunidad Autónoma de Galicia la presencia del organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner)

Nickle et al. (nematodo del pino) y se ordena comenzar las medidas para su erradicación. DOG: 19.633 (de 26 de noviembre de 2010).

CONSELLERIA DEL MEDIO RURAL. 2016. RESOLUCIÓN de 6 de junio de 2016, de la Dirección General de Ganadería, Agricultura e Industrias Agroalimentarias, por la que se declara en el territorio de la Comunidad Autónoma de Galicia la presencia de un nuevo brote del organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. (nematodo del pino) y se ordena comenzar las medidas para su erradicación. DOG 117: 25643 (de 21 de junio de 2016).

CROOK, D. J., HOPPER, J. A., RAMASWAMY, S. B., & HIGGINS, R. A. 2004. Courtship behavior of the soybean stem borer *Dectes texanus texanus* (Coleoptera: Cerambycidae): evidence for a female contact sex pheromone. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97(3): 600-604.

da Silva, M.N. et al., 2015. Susceptibility to the pinewood nematode (PWN) of four pine species involved in potential range expansion across Europe. *Tree physiology*, 35(9): 987–999.

EPPO. 2003. *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors: procedures for official control *Bursaphelenchus xylophilus* et ses vecteurs: procédures de lutte officielle. EPPO Bulletin, 33: 301–304.

FUKAYA M., YASUDA T., WAKAMURA S. & HONDA H. 1996. Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). III. Identification of contact sex pheromone on female body surface. *J. Chem. Ecol.* 22: 259–270.

FUKAYA, M., AKINO, T., YASUDA, T., WAKAMURA, S., SATODA, S., & SENDA, S. 2000. Hydrocarbon components in contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) and pheromonal activity of synthetic hydrocarbons. *Entomol. Sci.* 3(2): 211-218.

GINZEL, M.D. & HANKS, L.M., 2003. Contact pheromones as mate recognition cues of four species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect Behav.*, 16(2): 1–7.

GINZEL, M. D., BLOMQUIST, G. J., MILLAR, J. G., & HANKS, L. M. 2003a. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *J. Chem. Ecol.* 29(3): 533-545.

GINZEL, M. D., MILLAR, J. G., & HANKS, L. M. 2003B. (Z)-9-Pentacosene—contact sex pheromone of the locust borer, *Megacyllene robiniae*. *Chemoecology*, 13(3): 135-141.

HOWARD, R. W. 1993. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*, 179-226.

HOWARD, R. W., & BLOMQUIST, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.*, 50: 371-393.

IBEAS, F., GALLEGO, D., DIEZ, J. J., & PAJARES, J. A. 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbycidae). *J. Appl. Entomol.* 131(1): 13-20.

IBEAS, F., GEMENO, C., DÍEZ, 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.

- INÁCIO, M. L., NOBREGA, F., VIEIRA, P., BONIFACIO, L., NAVES, P., SOUSA, E., & MOTA, M. 2015. First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology*, 45(3): 235-238.
- KIM, G.H, TAKABAYASHI, J., TAKAHASHI, S., & TABATA, K. 1992. Function of pheromones in mating behavior of the Japanese pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus* Hope. *Appl. Entomol. Zool.* 27(4): 489-497.
- KIM, J. S., KIM, M. K., HAN, J. H., YOON, C., CHOI, K. S., SHIN, S. C., & KIM, G. H. 2006. Possible presence of pheromone in mating behavior of the pine sawyer *Monochamus saltuarius* Gebler (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Asia Pacific Entomol.* 9(4): 347-352.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. 2013. Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras. BOE 185: 56764-56786 de 3 de agosto de 2013. Texto consolidado: 17 de junio de 2016 (2 de agosto de 2016).
- 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*, 1(7): 727-734.
- PAJARES, J. A., ÁLVAREZ, G., HALL, D. R., DOUGLAS, P., CENTENO, F., IBARRA, N., & MILLAR, J. G. 2013. 2-(Undecyloxy)-ethanol is a major component of the male-produced aggregation pheromone of *Monochamus sutor*. *Entomol. Exp. Appl.* 149(2): 118-127.
- PAJARES, J. A., ÁLVAREZ, G., HALL, D. R., IBARRA, N., HOCH, G., HALBIG, P., & SCHROEDER, M. 2016. Attractants for management of the pine sawyer beetle *Monochamus sutor*, a potential vector of *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. Appl. Entomol.* 1-15.
- PAJARES, J. A., ÁLVAREZ, G., IBEAS, F., GALLEGU, D., HALL, D. R., & FARMAN, D. I. 2010. Identification and field activity of a male-produced aggregation pheromone in the pine sawyer beetle, *Monochamus galloprovincialis*. *J. Chem. Ecol.* 36(6): 570-583.
- 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(9-10): 633-638.
- RAY, A. M., LACEY, E. S., & HANKS, L. M. 2006. Predicted taxonomic patterns in pheromone production by longhorned beetles. *Naturwissenschaften*, 93(11): 543-550.
- SANCHEZ-HUSILLOS, E., ETXEBESTE, I., & PAJARES, J. 2016. Physiological development and dispersal ability of newly emerged *Monochamus galloprovincialis*. *Entomol. Exp. Appl.* 161(2): 141-151.
- SILK, P. J., RYALL, K., LYONS, D. B., SWEENEY, J., & WU, J. 2009. A contact sex pheromone component of the emerald ash borer *Agilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). *Naturwissenschaften*, 96(5): 601-608.
- SOUSA, E., BRAVO, M. A., PIRES, J., NAVES, P., PENAS, A. C., BONIFACIO, L., & MOTA, M. M. 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, 3(1): 89-91.

ZAMORA, P., RODRÍGUEZ, V., RENEDO, F., SANZ, A. V., DOMÍNGUEZ, J. C., PÉREZ-ESCOLAR, G., & DUEÑAS, M. (2015). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* causing pine wilt disease on *Pinus radiata* in Spain. *Plant Disease*, 99(10), 1449-1449.

ZHANG, A.J., OLIVER, J.E., CHAUHAN, K., ZHAO, B.G., XIA, L.Q. & XU, Z.C. 2003. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Naturwissenschaften*, 90: 410–413.