



Unidad de Posgrados y Educación Permanente



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# **DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE MANEJO DEL TALADRO DE LOS CÍTRICOS, *Diploschema rotundicolle***

María Eugenia Amorós

Doctorado en Ciencias Agrarias

Octubre 2022

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE MANEJO DEL TALADRO DE LOS CÍTRICOS,  
*Diploschema rotundicolle*

por

María Eugenia AMORÓS MARTÍNEZ

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Agrarias, opción  
Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
Octubre 2022

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Q.F. Dr. Eduardo Dellacassa, Lic. PhD. Demian Gómez y el Lic. Biol. Dr. Juan Pedro Bouvet, el 5 de diciembre de 2022. Autora: Qca. Msc. María Eugenia Amorós. Director: B.Q. PhD. Andrés González. Codirectores: Q.F. PhD. Carmen Rossini e Ing. Agr. PhD. Fernando Rivas.

## AGRADECIMIENTOS

¡¡Gracias!! A Andrés, Carmen, José y Tato, que continúan confiando en mí y en mi trabajo.

Un abrazo muy apretado para los brazos y piernas de esta tesis, mi querido equipo taladro: Lautu y Vale. Otro para José Álvarez, siempre firme asumiendo esos riesgos de deshidratación y descargas eléctricas con nosotros. Mil gracias a Diani, Anna, Fede y todos los que se asolearon colgando y descolgando trampas todos estos veranos. A Guille por los piques estadísticos.

Un agradecimiento muy especial a la colaboración de técnicos, productores y funcionarios de las quintas que hicieron posible este trabajo: Yamandú Pochintesta, Martín Lanfranco, Gabriela Asplanato, Federico Montes, Maximiliano Grasso, Andrea Pastore, Ramiro Vacca, Gabriel Bueno, Gastón Di Lorenzi, Roy Mazondo, Julio Yaquinta, Johana Dalla Valle, Gustavo Rodríguez, José Berreta, Ana Rosa Pérez, Marcelo Saavedra, Alejandro Borges, Franco Correa, Mayra De Lima y Gustavo Coccolo.

A las empresas citrícolas San Miguel Global, agrupación Agrisur-Urudor, establecimiento Mora-Mora y María Auxiliadora, por el apoyo financiero y la disposición de predios y personal para los experimentos. A las agencias financiadoras CISC (Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República), ANII (Agencia Nacional de Innovación e Investigación) e INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria).

A Vivi, Hugo y Jocelyn Millar por las feromonas.

A Larry Hanks por ser una gran inspiración y por sus valiosos aportes.

A los LEQuers, de hoy y de siempre.

A mi familia.



## TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
RESUMEN .....	VII
SUMMARY .....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>MARCO TEÓRICO</u> .....	4
2.1. EL TALADRO DE LOS CÍTRICOS, <i>Diploschema rotundicolle</i> .....	4
2.1.1. <u>Descripción</u> .....	4
2.1.2. <u>Aspectos bioecológicos</u> .....	4
2.1.3. <u>Daños</u> .....	6
2.1.4. <u>Manejo</u> .....	7
2.2. HERRAMIENTAS EN EL CONTEXTO DE UN MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS .....	8
2.2.1. <u>Trampeo de cerambícidos</u> .....	8
2.2.1. <u>Atrayentes químicos: semioquímicos</u> .....	9
2.2.3. <u>Atrayentes lumínicos</u> .....	11
3. <u>OBJETIVOS</u> .....	14
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
4. <u>QUÍMICA DE FEROMONAS EN CERAMBÍCIDOS</u> .....	15
4.1. ESTUDIO DE LA QUÍMICA DE FEROMONAS DE <i>D. rotundicolle</i> .....	16

4.1.1. <u>Resumen</u> .....	16
4.1.2. <u>Introducción</u> .....	18
4.1.3. <u>Materiales y métodos</u> .....	20
4.1.4. <u>Resultados</u> .....	25
4.1.5. <u>Discusión</u> .....	35
4.1.6. <u>Bibliografía</u> .....	40
4.2. TRAMPEO DE <i>Retrachydes thoracicus thoracicus</i> (Olivier) Y OTROS CERAMBÍCIDOS NEOTROPICALES EN TRAMPAS CEBADAS CON FEROMONAS Y KAIROMONAS.....	44
4.2.1. <u>Resumen</u> .....	44
4.2.2. <u>Introducción</u> .....	46
4.2.3. <u>Materiales y métodos</u> .....	47
4.2.4. <u>Resultados</u> .....	49
4.2.5. <u>Discusión</u> .....	59
4.2.6. <u>Bibliografía</u> .....	62
5. <u>MONITOREO DEL VUELO DE ADULTOS DE <i>Diploschema rotundicolle</i> EN CULTIVO DE LIMÓN EN EL SUR DE URUGUAY</u> .....	69
5.1. RESUMEN.....	69
5.2. INTRODUCCIÓN.....	71
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
5.4. RESULTADOS.....	74
5.5. DISCUSIÓN.....	77
5.6. CONCLUSIONES .....	80
5.7. BIBLIOGRAFÍA .....	80

6. <u>EVALUACIÓN DE ATRAYENTES DE LUZ Y FEROMONAS PARA EL TRAMPEO A CAMPO DEL TALADRO DE LOS CÍTRICOS, <i>Diploschema rotundicolle</i> (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE)</u> .....	82
6.1. RESUMEN.....	82
6.2. INTRODUCCIÓN.....	84
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
6.4. RESULTADOS.....	93
6.5. DISCUSIÓN.....	98
6.6. BIBLIOGRAFÍA.....	102
7. <u>CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS</u> .....	106
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	110
9. <u>ANEXOS</u> .....	120

## RESUMEN

El taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville), es un cerambícido nativo de distribución regional, considerado en Uruguay como una plaga principal de los cítricos. En altas poblaciones, el deterioro causado en la estructura de los árboles es una de las limitantes en la vida útil de los montes y tiene impacto en su productividad y valor patrimonial. Su control recae principalmente en estrategias de control cultural, altamente demandantes de mano de obra, económicamente costosas e ineficientes. Esta tesis tuvo como objetivo el desarrollo herramientas de manejo de adultos de *D. rotundicolle*. Se estudió su comunicación química y se determinó que los machos emiten una feromona compuesta principalmente por (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona, a la que responden machos y hembras en laboratorio. La atractividad de este compuesto a campo es baja para *D. rotundicolle*; sin embargo, se observó atracción de numerosas especies nativas de cerambícidos, cuyas feromonas son desconocidas. En particular, *Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier) mostró altos niveles de capturas. Para el trampeo de *D. rotundicolle* a campo, las trampas negras de panel cruzado acopladas a luz negra, colgadas a 3 m de altura, resultaron las más eficientes. Estas son efectivas para el monitoreo del vuelo de adultos, herramienta que hace posible focalizar en tiempo y espacio el manejo cultural. Nuestros resultados permitieron determinar aspectos bioecológicos de *D. rotundicolle* en condiciones cítricas del sur de Uruguay, como el momento y duración del vuelo de adultos. A su vez, se observó que estos se refugian bajo las cortezas de *Eucalyptus globulus* que rodean, en muchos casos, los cuadros de cítricos. La extracción manual de estos adultos se presenta como otra medida potencial de control cultural. Finalmente, se llevó a cabo una primera aproximación de trampeo masivo de adultos utilizando la trampa de luz desarrollada, con resultados prometedores. Las contribuciones de esta tesis son un aporte a la sustentabilidad sanitaria y económica del sector cítrico.

**Palabras clave:** manejo integrado de plagas, Uruguay, feromonas, trampas de luz



DEVELOPMENT OF MANAGEMENT PRACTICES FOR THE CITRUS BORER,  
*Diploschema rotundicolle*

SUMMARY

The citrus borer, *Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville), is a cerambycid beetle native to the neotropical region. It is regarded as primary citrus pest in Uruguay; when populations are high, it causes serious deterioration in the structure of trees, resulting even in the death of trees, affecting grove productivity and patrimonial value. Control strategies for this pest are primarily cultural and highly demanding of man-labor, resulting both expensive and inefficient. The aim of this thesis was to develop management strategies for *D. rotundicolle* adults. We studied the insect's chemical communication system, finding that the males emit a pheromone primarily constituted by (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, to which both males and females respond in laboratory conditions. This compound was not highly attractive to *D. rotundicolle* in the field; however, numerous other native cerambycid species, with unknown pheromone chemistry, were attracted to this compound. In particular, *Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier) showed high catches. For field trapping of *D. rotundicolle*, we found that black cross vane traps coupled with black light, hanged at 3 m high, proved the most effective. These traps are effective for adult flight monitoring, tool that will enables to focalize in time and space the cultural practices. Our results also allowed to determine adults' flight period and duration in southern Uruguay citriculture conditions. Further, it was observed that the beetles seek shelter under loosen barks of *Eucalyptus globulus*, which often surround citrus plantations as windbreakers. Manual extraction of these adults represents another potential cultural control strategy. Finally, our first approximation for mass trapping in light traps was evaluated with promising results. The knowledge generated in this thesis contributes to the sanitary and economic sustainability of the citriculture sector.

**Keywords:** integrated pest management, Uruguay, pheromones, light traps

## 1. INTRODUCCIÓN

El taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville), se considera actualmente una plaga principal del sector cítrico en Uruguay (Bentancourt, Scatoni, 2010). Su manejo ineficiente a través del tiempo ha llevado a una explosión focalizada de sus poblaciones —en particular, en quintas de limones en el sur del país— y ha ocasionado severos perjuicios en quintas en producción. *Diploschema rotundicolle* es un coleóptero nativo de la familia Cerambycidae, que ha sido reportada en Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay (Wang, 2017). Existe muy poca información respecto a la bioecología de este insecto y no existen reportes de sus parámetros biológicos en Uruguay.

Los cerambícidos son conocidos como taladros por sus hábitos alimenticios xilófagos, por lo que el principal daño causado por este insecto es el debilitamiento sucesivo de los árboles, causado por la alimentación de las larvas en el interior del tronco (Machado, 1998). Esto lleva a un deterioro estructural irreversible, lo que causa severas pérdidas de rendimiento y otros problemas asociados (Machado y Berti Filho, 1999). La situación nacional es preocupante; los daños generados por las altas poblaciones resultan, actualmente, una de las limitantes de la vida útil de un monte y repercuten directamente en su productividad y valor patrimonial (comunicación personal: F. Montes, G. Di Lorenzi; Ings. Agr. del sector, octubre 2019; Proyecto CSIC-Sector Productivo 2016 “Desarrollo de atrayentes y trampas para el manejo del taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera: Cerambycidae”).

El manejo de cerambícidos en cultivos es, en general, dificultoso dadas las características de estos insectos, con largos períodos de desarrollo donde las larvas están protegidas en el interior de la madera (Wang, 2017). Los métodos más comunes de control son de tipo cultural (Wang, 2017). En el caso de *D. rotundicolle*, en Uruguay y en la región, se realiza la poda de brotes con daños visibles de oviposición antes de que las larvas migren hacia ramas centrales (Machado, Berti Filho, 2006). Esta estrategia puede alcanzar un costo

aproximado de USD 500 por hectárea (comunicación personal: F. Montes, R. Vacca, M. Lanfranco, Y. Pochintesta y G. Di Lorenzi; Ings. Agr. del sector, setiembre 2021). La mano de obra disponible para este tipo de prácticas culturales es cada vez más escasa y la ventana de tiempo en la que se puede implementar esta medida es limitada (30-40 días) porque la larva rápidamente migra desde los brotes hacia las ramas (Machado et al., 1991). Esto hace que el control cultural sea una estrategia costosa económicamente y difícil en su implementación, además de ser ineficaz. Intervenciones puntuales de control químico son realizadas en algunas quintas; sin embargo, es desconocido su efecto real sobre las larvas (comunicación personal: F. Montes, R. Vacca, M. Lanfranco, Y. Pochintesta y G. Di Lorenzi; Ings. Agr. del sector, noviembre 2018). Esto, sumado a las características de la citricultura de exportación de nuestro país, hace que el manejo de esta plaga deba contextualizarse en un manejo integrado de plagas (MIP), es decir un conjunto de estrategias multimodales para mantener las poblaciones de plagas en niveles que no causen perjuicios económicos (Pedigo, 1989).

A diferencia del extenso período larval la presencia de adultos en campo se restringe a unos pocos meses (Machado, 1998). Las estrategias de control dirigidas a adultos son prometedoras ya que los esfuerzos se concentran en un período limitado de tiempo como ha sido reportado para otras especies de cerambícidos con estas características (Maki et al., 2011). En este contexto, la utilización de feromonas ha demostrado ser una herramienta útil y de bajo impacto para el monitoreo y control de adultos de decenas de especies de insectos plaga (Cocco et al., 2013; Cohnstaedt et al., 2012; El-Sayed et al., 2006; Kline, 2007; Witzgall et al., 2010). En particular, la investigación en identificación de feromonas producidas por cerambícidos ha progresado significativamente en los últimos años (Hanks, Millar, 2016). Se ha reportado el uso de atrayentes formulados con feromonas sintéticas (Hanks, Millar, 2016), así como compuestos volátiles característicos de la especie vegetal atacada (Brockerhoff et al., 2006; Dodds et al., 2010; Lemes Fernandes et al., 2010; Sweeney et al., 2006). El uso de trampas cebadas con atrayentes

genéricos multiespecie basados en feromonas se ha transformado en una herramienta de vigilancia sanitaria para la detección de cerambícidos potencialmente invasores, estrategia que ha ganado importancia en varios países (Brockerhoff et al., 2006; Hanks, Millar, 2016; Wickham et al., 2014). El control poblacional mediante estrategias de trampeo masivo es una posibilidad que se está estudiando para algunas especies plaga de esta familia. Los resultados son prometedores, aunque, en todos los casos, los estudios se encuentran aún en etapa de investigación y desarrollo (Maki et al., 2011; Sanchez-Husillos et al., 2015; Barbour et al., 2019). Por otro lado, adultos de muchas especies de insectos son atraídos por estímulos lumínicos, siendo otra herramienta utilizada eficientemente en estudios entomológicos y en sistemas MIP para monitoreo, detección y control de poblaciones de plagas (Li et al., 2015; Sharma et al., 2006; Solsoloy et al., 2010).

Esta propuesta de doctorado pretende generar los primeros insumos metodológicos para el desarrollo de estrategias de manejo, monitoreo y control de *D. rotundicolle*, aplicables en el corto plazo y compatibles con la citricultura en Uruguay.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. EL TALADRO DE LOS CÍTRICOS, *Diploschema rotundicolle*

#### 2.1.1. Descripción

Los cerambícidos son conocidos como taladros, barrenadores o escarabajos de antenas largas y constituyen uno de los más diversos grupos de coleópteros con, aproximadamente, 35000 especies descritas y alrededor de 4000 géneros (Hanks, 1999). Son mayormente xilófagos; las larvas, por lo general, excavan en los tejidos de las plantas leñosas, atacando un amplio espectro de fuentes de alimentación (Hanks, 1999; Machado et al., 2007). Por este tipo de hábito alimenticio, desempeñan un papel importante en el reciclado de materia vegetal muerta. Sin embargo, estos insectos también se vuelven perjudiciales cuando habitan los agroecosistemas y atacan plantas de interés agrícola (Machado et al., 2007), siendo, de hecho, plagas importantes en el mundo en ámbitos silvícolas y agrícolas y en paisajes urbanos (Ray et al., 2006).

*Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville, 1834), es un cerambícido considerado plaga principal de los cítricos en Uruguay (Bentancourt, Scatoni, 2010). Pertenece al orden Coleoptera, familia Cerambycidae, subfamilia Cerambycinae, tribu Torneutini, género *Diploschema*, especie *Diploschema rotundicolle* (Faria et al., 1987). Es una especie nativa de América del Sur, se distribuye en las regiones centro y sur de Brasil, litoral argentino, Paraguay y Uruguay (Wang, 2017) y dentro de sus hospederos reportados se encuentran especies de las familias Meliaceae, Rutaceae, Rosaceae, Euphorbiaceae, Bignoniaceae, Rhamnaceae y Erythroxylaceae (Link, Corrêa Costa, 1994).

#### 2.1.2. Aspectos bioecológicos

*Diploschema rotundicolle* se caracteriza por ser un coleóptero grande (25-40 mm x 8-10 mm), se distingue de otros barrenadores asociados a cítricos por las siguientes

características morfológicas encontradas en los adultos: coloración general castaña, élitros amarillos-castaños, con borde continuo castaño oscuro envolviendo los márgenes externos e internos de estos. La cabeza, pronoto, antenas y piernas de castaño más oscuro (Faria et al., 1987) (figura 1).



Figura 1. Diferentes estadios de *D. rotundicolle*. Adulto (izquierda), larva recientemente eclosionada (centro) y prepupa (derecha). Fotografías: María Eugenia Amorós.

Los adultos son de hábitos nocturnos y no se alimentan. La época de apareamiento reportada en San Pablo, Brasil, ocurre entre diciembre y marzo, seguido por el período de oviposición (diciembre-abril) (Machado, 1998). Los machos son más longevos que las hembras; Machado, Filho (1999) reportaron que los machos sobrevivieron hasta 50 días en condiciones controladas a 26 °C. Las hembras oviponen en las extremidades de las ramas, preferencialmente en los ápices y sobre las axilas de las hojas, sobre todo en la parte media de los árboles cítricos (Machado, Berti Filho, 2006). La oviposición se da sobre plantas de todas las edades, con tendencia a preferir árboles más desarrollados (Link, Corrêa Costa, 1994). Con base en observaciones en laboratorio, se estima que las hembras colocan un promedio de 50 huevos (Machado, Filho, 1999).

Luego de la eclosión, las larvas perforan la epidermis vegetal hasta llegar a la madera y comienzan un desarrollo extenso de 1 a 2 años. Se ha citado que la larva se desarrolla sin interrupción por un período de 8-10 meses en el estado de San Pablo, Brasil (Faria et al., 1987), mientras que en climas más templados (Santa María, RS, Brasil), se describió el período larval con una duración de 20-22 meses, con detención de la actividad durante los meses de invierno (Link, Corrêa Costa, 1994). Al final del período larvario, la prepupa prepara una cámara pupal en la cual genera la abertura de un orificio para la salida del adulto. El estadio de pupa dura, aproximadamente, 2 meses (Faria et al., 1987). Estos parámetros descritos para el ciclo del insecto no necesariamente aplican a las poblaciones de Uruguay.

### **2.1.3. Daños**

Los daños descritos en cítricos se asocian al desarrollo y alimentación de las larvas dentro de ramas y tronco, lo que afecta la estructura del árbol. En la infestación temprana, las larvas recién eclosionadas secan el ápice de las ramas donde la hembra coloca los huevos, lo que causa el marchitamiento del brote y hojas jóvenes. Posteriormente, el desarrollo larvario dentro de la madera, en sentido descendente, abre galerías longitudinales hasta llegar a las ramas principales; incluso, alcanza el tronco y el sistema radicular de la planta (Machado, 1998) (figura 2).



Figura 2. A. Aserrín en la base del tronco, producto de la alimentación de larvas. B. Orificios de galerías generadas por las larvas de *D. rotundicolle*. C. Marchitamiento causado por la oviposición reciente o picado.

Con respecto a daños indirectos, las galerías abiertas por las larvas son posteriormente colonizadas por hormigas y otros organismos, y pueden ser vías de entrada de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos o pueden acelerar la degradación del vegetal (Machado,Filho, 1999).

#### 2.1.4. Manejo

El manejo de cerambícidos en cultivos es, en general, dificultoso. Dadas las características de estos insectos, con largos períodos de desarrollo protegido en el interior de la madera, existe poco margen para el control químico. Se ha reportado, por ejemplo, el control con insecticidas sistémicos inyectados a la base del árbol para el manejo del escarabajo de los cítricos, *Anoplophora chinensis* (Gyeltshen,Hodges, 2005). Respecto a *D. rotundicolle*, Faria et al. (1987) evaluaron el control químico con pulverizaciones de insecticidas que en todos los casos probó ser ineficiente. Estando las larvas protegidas en el interior de la madera, es extremadamente dificultoso el contacto del insecticida con la plaga.



También se ha reportado el uso de hongos entomopatógenos para el control de otros cerambícidos, aunque este método está aún en etapas de investigación (Dubois et al., 2004; Shanley et al., 2009). Machado (1998) evaluó la aplicación del hongo *Metarhizium anisopilae* en las galerías utilizando larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como vector, lo que resultó en una alta mortandad de larvas (90 %). Posteriormente, (Machado, Berti Filho, 2006) probaron también la aplicación del mismo hongo en polvo directamente en las galerías a través de los orificios de salida de aserrín de las larvas, lo que también probó ser eficiente controlando larvas. Ambas metodologías, si bien efectivas, no parecen ser viables de ser llevadas a condiciones productivas al requerir la cría del insecto vector y el hongo y la aplicación manual de las larvas del vector en las galerías de *D. rotundicolle*.

Otro método reportado, y el único hasta el momento viable de ser aplicado en condiciones productivas, es el control cultural; esto es, llevar a cabo la poda de brotes con daños visibles de oviposición antes de que las larvas migren hacia ramas centrales (Machado et al., 1997). Este es el método de control sugerido en Brasil (Machado et al., 1997) y la única medida de manejo de este insecto llevada a cabo en Uruguay. Sin embargo, resulta insuficiente cuando las poblaciones son altas, además de ser extremadamente costoso por la alta demanda de personal. Además, la ventana de tiempo para adoptar esta medida es muy limitada, 30-40 días tal como fue reportado por Machado et al. (1991) o incluso menos, con base en observaciones de nuestro grupo de trabajo, y pasada esta, ya no es posible a través de ella la eliminación de las larvas.

## **2.2. HERRAMIENTAS PARA MANEJO DE CERAMBÍCIDOS EN UN CONTEXTO DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS**

### **2.2.1. Trampeo de cerambícidos**

El monitoreo es una herramienta fundamental en los planes de manejo integrado. Las medidas de control requieren información precisa de la presencia, dispersión,

comienzo de oviposición y densidad de poblaciones (Horton, 1999). Esta herramienta permite realizar intervenciones a tiempo sólo cuando son realmente necesarias (Boina, Bloomquist, 2015). En el caso de *D. rotundicolle*, no existen, hasta el momento, herramientas de monitoreo, por lo que las medidas de control cultural se realizan en función de la observación visual del daño. Esto hace que, muchas veces, las medidas no se tomen a tiempo, lo que reduce su efectividad (datos no publicados).

Respecto a medidas de control, distintos autores proponen que la corta vida de los cerambícidos adultos, y el hecho de que estos no se alimenten, los hace buenos candidatos para estrategias de tipo trampeo masivo. Este se basa en la colocación de una densidad alta de trampas de modo de atraer los insectos y atraparlos mediante un agente físico, lo que deja los niveles poblacionales por debajo de los umbrales de daño económico. Los insectos de vida adulta corta sin hábitos alimenticios están bajo una fuerte presión selectiva para encontrar pareja y copular antes que sus limitadas reservas de energía se agoten. *Diploschema rotundicolle* comparte dichas características, por lo que este tipo de estrategia podría ser muy prometedora. Además, al ser corto el período de actividad del adulto, los esfuerzos para el servicio y revisión de trampas serían limitados en el tiempo, ya que las trampas apuntan únicamente al estadio adulto. Todo esto favorece la factibilidad económica y práctica de una estrategia de control por trampeo masivo de cerambícidos en general y de *D. rotundicolle* en particular.

Para un trampeo eficiente, tanto para monitoreo como para medidas de control, es necesario contar con dispositivos trampa-atrayente poderosos para la especie objetivo. El formato de trampas de intersección de vuelo o *cross vane* es ampliamente utilizado en ensayos de campo para la captura de cerambícidos (Mitchell et al., 2013; Morewood et al., 2002; Sweeney et al., 2006; Wong et al., 2012). El uso de estas trampas cebadas con distintos tipos de atrayentes se ha transformado en una medida de vigilancia sanitaria para la detección de cerambícidos invasores, estrategia que ha ganado importancia en varios países (Brockhoff et al., 2006; Wickham et al., 2014). El control poblacional de cerambícidos mediante estrategias de trampeo masivo es

una posibilidad que se está estudiando para algunas especies plaga de esta familia. Los resultados son prometedores, aunque, en todos los casos, los estudios se encuentran aún en etapa de investigación y desarrollo (Maki et al., 2011; Sanchez-Husillos et al., 2015).

#### 2.2.2. Atrayentes químicos: semioquímicos

Los semioquímicos son sustancias modificadoras del comportamiento de insectos; dentro de ellos se encuentran las feromonas (Čokl, Millar, 2009). Las feromonas son señales químicas producidas por un organismo que, en pequeñas cantidades y de manera específica para cada especie, provocan una respuesta comportamental y/o fisiológica en otro organismo de la misma especie (Symonds, Elgar, 2008). Dadas estas características, el uso de feromonas en manejo de plagas presenta ventajas importantes, ya que a su selectividad se suma su inocuidad ambiental y toxicológica, además de no generar resistencia (Witzgall et al., 2010).

En los últimos años se ha progresado significativamente en la identificación de feromonas sexuales o de agregación producidas por especies de cerambícidos. Aproximadamente 10 especies de la familia se conocían respecto a la química de sus feromonas hace un par de décadas, pasando, en el presente, a más de 100 especies cuyas feromonas se han identificado químicamente [(Allison et al., 2004; Hanks, Millar, 2016) y citas allí incluidas]. Se han reportado feromonas de agregación producidas por machos, que atraen tanto machos como hembras, y feromonas sexuales emitidas por hembras, que atraen únicamente machos. Estos tipos de feromonas poseen un correlato taxonómico; la subfamilia Cerambycinae, a la cual pertenece *D. rotundicolle*, está incluida en el primer grupo (Hanks, Millar 2016).

Químicamente, las feromonas de cerambícidos suelen ser mezclas de compuestos alifáticos oxigenados de cadena corta, cetonas, alcoholes, dioles, éteres o ésteres de 6 a 18 átomos de carbono, con algunas especies que presentan feromonas sexuales monoterpénicas (Hanks, Millar, 2016). Un aspecto interesante de la química de las

feromonas en esta familia es que está muy conservada en especies relacionadas (Mitchell et al., 2013). Por ejemplo, se ha reportado que los machos de diversas especies de la subfamilia Cerambycinae producen y emiten feromonas de agregación compuestas por isómeros de 3-hidroxi-2-hexanona, 2,3-hexanodiol o ambos compuestos juntos (Wong et al., 2012). La (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona parece ser el componente primario y, ocasionalmente, el único componente de la feromona de agregación en muchas especies simpátricas de dicha subfamilia (Mitchell et al., 2013). Los cerambícidos son conocidos por usar volátiles de plantas como kairomonas, esto es, como señales para encontrar recursos como alimento o refugio. Además, dado que muchas especies de cerambícidos se aparean en las mismas plantas huésped de las que se alimentan adultos y larvas, estas señales químicas de las plantas también pueden servir para el acercamiento de los sexos (Hanks, Millar, 2016; Wang, 2017). También se ha demostrado que kairomonas de volátiles de las plantas tienen sinergia con las feromonas en la atracción de cerambícidos, lo que posiblemente agrega especificidad a los sistemas de comunicación de feromonas inespecíficos (Hanks, Millar, 2016; Wang, 2017).

Las especies de cerambícidos evitan, entonces, la atracción interespecífica mediante diferentes mecanismos, los que incluyen las mencionadas respuestas sinérgicas a volátiles de plantas hospederas en conjunto con las feromonas y otras como la diferencia en los ciclos circadianos de actividad, o la especificidad dada por compuestos minoritarios (Wong et al., 2012).

### 2.2.3. Atrayentes lumínicos

Además de los atrayentes basados en feromonas, la atracción de insectos para el monitoreo o trapeo masivo puede beneficiarse de la utilización de atrayentes multimodales, por ejemplo, la combinación de cebos químicos y luz. En los últimos años se ha generado un considerable interés en tecnologías de manejo de plagas que utilizan la respuesta de los insectos a la luz como una forma «limpia» de control de

plagas que no utiliza pesticidas de síntesis [Shimoda, Honda (2013) y citas allí incluidas].

Es ampliamente conocida la respuesta de los insectos hacia fuentes de luz. Estas respuestas están sustancialmente influenciadas por una variedad de factores, incluyendo la intensidad de la luz y la longitud de onda, combinaciones de longitudes de onda, tiempo de exposición, dirección de la fuente de luz y el contraste de la intensidad de la fuente de luz y color al de la luz ambiental. Además, el impacto de la luz sobre el comportamiento de los insectos varía tanto cualitativamente como cuantitativamente dependiendo de la fuente de luz (bombilla o diodo emisor de luz [led]) y material (diodo emisor de luz lámina) [Shimoda, Honda (2013) y citas allí incluidas]. Se ha reportado que diferentes taxones son atraídos a diferentes longitudes de onda, siendo esta una forma de optimizar su especificidad en cuanto a especies a capturar (Li et al., 2015).

Estas trampas se han utilizado en forma exitosa en control de mosquitos (Li et al., 2015). En las Filipinas, la utilización de trampas de luz UV en cultivos de arroz, mango, maíz y hortícolas mostró un aumento de rendimientos y disminución de utilización de químicos, con bajas capturas de enemigos naturales (Solsoloy et al., 2010). En invernáculo se ha reportado que en algunos momentos del año las trampas de luz negra son efectivas para el trampeo masivo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta*, lo que muestra reducción del daño en hojas (Cocco et al., 2012).

Considerando, por un lado, tal como fue descrito, que los adultos de *D. rotundicolle* tienen una vida relativamente corta en comparación al ciclo larval, y que los mismos son el estadio móvil que no está protegido dentro del árbol; y por otro las experiencias prometedoras citadas en cuanto al uso de feromonas y/o volátiles de plantas hospederas y dispositivos lumínicos como atrayentes se plantean las hipótesis de este trabajo. Es decir, que atrayentes químicos en base a feromonas y/o volátiles de plantas hospederas; así como atrayentes lumínicos serán herramientas efectivas para el

trameo de adultos de *D. rotundicollis*; y que estos podrán ser utilizados en estrategias de monitoreo y control de la plaga.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Generar información sobre la comunicación química y la bioecología de *Diploschema rotundicolle* para el desarrollo de una herramienta de monitoreo y eventual trampeo masivo de adultos de la plaga.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Caracterizar y evaluar a campo la feromona de agregación de machos de *D. rotundicolle*.
- ii. Analizar compuestos volátiles de brotes susceptibles de cítricos que puedan actuar como atrayentes para *D. rotundicolle* y evaluar su sinergia con las feromonas.
- iii. Evaluar y seleccionar atrayentes para trampas efectivos para adultos de *D. rotundicolle* a través de la evaluación a campo de diferentes estímulos y combinaciones de estos, incluyendo feromona, volátiles de cítricos y luz.
- iv. Estimar dinámica temporal del vuelo de adultos en cultivos cítricos en las condiciones climáticas del sur de Uruguay.
- v. Evaluar una primera aproximación a la estrategia de trampeo masivo del insecto mediante la utilización del dispositivo trampa-estímulo seleccionado.

#### 4. QUÍMICA DE FEROMONAS EN CERAMBÍCIDOS

Este capítulo está constituido por dos partes. El primer artículo fue generado con base en el trabajo realizado para abordar los objetivos específicos i y ii. En el transcurso del trabajo, resultados de campo inesperados, pero consistentes respecto a la atracción en trampas de feromonas de otras especies nativas de feromona desconocida, llevaron al desarrollo del segundo artículo. Si bien el estudio de las feromonas de otras especies no estaba contemplado en el plan original, y excede a los objetivos de esta tesis, consideramos que los resultados son de gran interés para el conocimiento de la química de feromonas de especies nativas de cerambícidos. Algunas de ellas tienen el potencial de generar perjuicio económico a cultivos, como es el caso de *Retrachydes thoracicus thoracicus*. De este trabajo se desprende un dispositivo trampa-atrayente basado en semioquímicos, poderoso para la captura de esta especie, por lo que el trabajo se incluye en este capítulo.



#### 4.1. QUÍMICA DE FEROMONAS DEL TALADRO DE LOS CÍTRICOS, *Diploschema rotundicolle* (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE)\*

##### 4.1.1. Resumen

El taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle*, es un escarabajo de antenas largas de la región neotropical, que se ha convertido en una plaga severa de los cítricos en el sur de Sudamérica. Estrategias de manejo de este insecto recaen en la poda de brotes con daño de oviposición, el cual es costoso económicamente e ineficiente. Estudiamos el sistema de comunicación química de *D. rotundicolle*, en búsqueda de atrayentes para monitoreo y/o control. Análisis por GC-MS y GC enantioselectivo de los extractos volátiles de adultos capturados a campo, mostraron que los machos producen (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona, acompañados irregularmente por cantidades muy menores de 2,3-hexanodiol (4 estereoisómeros) y 2,3-hexanodiona. Los machos emiten los compuestos solamente en la noche, cuando son activos. Análisis por GC-EAD de compuestos naturales y sintéticos mostró que tanto antenas de machos como de hembras responden al enantiómero natural, (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona, sugiriendo que este podría tener una función como feromona sexual/de agregación, tal como se observa en muchas otras especies de cerambícidos. Tanto el enantiómero no natural (*S*), como el compuesto minoritario 2,3-hexanodiol, no generaron respuestas en las antenas. Ensayos a campo con la 3-hidroxi-2-hexanona racémica, la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona enantioméricamente pura, y una mezcla de la 3-hidroxi-2-hexanona racémica y 2,3-hexanodiol, mostraron en todos los casos capturas bajas de *D. rotundicolle*. Sin embargo, el aumento en la altura de las trampas y del ratio de emisión de los dispensadores, aumentó las capturas a campo en trampas cebadas con la hidroxiketona racémica. Capturas incidentales de otro cerambícido nativo, *Retrachydes thoracicus*, en trampas cebadas con 3-hidroxi-2-hexanona también se reportan. Este es el primer reporte de la química de feromonas del género *Diploschema* y la tribu Torneutini, reafirmando la parsimonia en las feromonas bien

establecida en cerambícidos. Factores potenciales que explican la pobre atracción de *D. rotundicolle* a campo son discutidos.

**Palabras clave:** Taladro de los cítricos; Escarabajos de antenas largas; Atrayentes; Trampas de feromonas; Cerambícinos Neotropicales; *Retrachydes thoracicus*

---

\*Este trabajo se publicó en el *Journal of Chemical Ecology*, 46, 809–819 (2020) <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01203-4>

María Eugenia Amorós<sup>1</sup>, Lautaro Lagarde<sup>1</sup>, Hugo Do Carmo<sup>2</sup>, Viviana Heguaburu<sup>2</sup> y Andrés González<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Centro Universitario de Paysandú, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay

#### 4.1.2. Introducción

La identificación de feromonas en cerambícidos ha experimentado un progreso remarcable en los últimos 15 años [Hanks, Millar (2016) y citas allí incluidas]. Un descubrimiento destacado fue el hecho de que los escarabajos de antenas largas presentan una gran parsimonia en los compuestos constituyentes de sus feromonas, con compuestos idénticos o similares que son compartidos entre especies de distintos géneros, tribus, e incluso sub-familias (Hanks, Millar, 2016). Entre las sub-familias más estudiadas se encuentran los cerambícinos, estos se caracterizan por feromonas producidas por machos, que tienen rol sexual y de agregación, y atraen a ambos sexos (Hanks, Millar, 2016). Químicamente, feromonas de tipo hidroxicetonas de cadena corta son compuestos altamente conservados dentro de los cerambícinos, y han sido reportados para numerosas especies de diferentes regiones del mundo (Hanks, Millar, 2016), incluyendo especies nativas de la región Neotropical (Silva et al., 2018; Silva et al., 2017). La (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona parece ser el compuesto mayoritario, y en algunos casos el único, en las feromonas sexuales-de agregación en muchas especies sincrónicas y simpátricas de la sub-familia (Mitchell et al., 2013).

Las trampas cebadas con semioquímicos, en particular con feromonas, se están convirtiendo una valiosa herramienta para detección y monitoreo de especies invasivas de cerambícidos (Fan et al., 2018). Aun en bajas densidades, en las primeras etapas de establecimiento, las trampas de feromonas pueden ser lo suficientemente sensibles y confiables para detectar especies target (Hansen et al., 2015). El potencial de las feromonas de cerambícidos como herramientas de vigilancia ha sido explorado en mayor medida que su potencial para control de plagas. Algunos estudios han explorado esta posibilidad, utilizando feromonas de cerambícidos, sexuales y de agregación, en estrategias de control como trampeo masivo o disrupción sexual, (Maki et al., 2011; Sanchez-Husillos et al., 2015, Barbour, 2019). El uso de feromonas de cerambícidos para control de plagas podría ser más realista en el contexto de plagas de cultivos que plagas forestales, particularmente en la producción de fruta fresca, donde el uso de insecticidas está severamente restringido.

*Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville, 1834) (Coleoptera: Cerambycidae) es una plaga sudamericana de citrus, distribuida en las regiones centro-sur de Brasil, Argentina y Uruguay (Machado,Filho, 1999). Los adultos son alargados, (25-40 mm x 8-10 mm) y se caracterizan por tener élitros marrón claro y una borde continuo oscuro en el borde; cabeza, pronoto, antena y patas color marrón oscuro (Faria et al., 1987). Los adultos son nocturnos, las hembras oviponen en el ápice de las ramas, sobre las axilas de las hojas (Machado,Berti Filho, 2006). Luego de la eclosión, la larva perfora la epidermis y una vez dentro de la madera, cavan galerías longitudinales en dirección a las ramas más gruesas, comúnmente llegando al tronco principal (Machado et al., 1991). Al final del estadio larval, las larvas preparan una cámara pupal con un orificio de salida para el adulto (Faria et al., 1987). El ciclo de vida varía entre 8-10 meses en áreas sub-tropicales (Sao Paulo, Brasil) (Faria et al., 1987) y 20-22 meses en regiones templadas (Link,Corrêa Costa, 1994).

Por mucho tiempo *D. rotundicolle* fue considerada una plaga secundaria de los cítricos en la región (Bentancourt,Scatoni, 1999), pero en los últimos años se han observado focos donde las poblaciones incrementaron dramáticamente, particularmente en cultivo de limón (datos no publicados). Infestaciones severas llevan a pobres rendimientos, debilitamiento de los árboles y daños indirectos debido a invasores de las galerías vacías (Machado,Filho, 1999). El control de taladros es extremadamente complejo, ya que las larvas se protegen dentro de la madera (Shanley et al., 2009). A su vez, el uso de insecticidas en cultivo de cítricos para el consumo de fruta fresca es altamente restringido. Es así que el manejo actual del insecto recae exclusivamente en control cultural, que consiste en la poda de ramas con evidencia de oviposición, estrategia que es costosa e ineficiente.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el sistema de comunicación química en *D. rotundicolle*, buscando el desarrollo de estrategias de manejo basadas en feromonas. Utilizamos metodologías de colecta de volátiles, GC-MS. GC quiral y GC-EAD para analizar los volátiles producidos por adultos colectados a campo. También realizamos ensayos de campo para estudiar el efecto de la quiralidad, compuestos minoritarios,

ubicación de trampas y ratios de emisión, en el trampeo de adultos de *D. rotundicolle*. Este estudio también contribuye al creciente pero limitado conocimiento en la química de feromonas de cerambícidos Neotropicales.

#### **4.1.3. Materiales y métodos**

Los individuos de *D. rotundicolle* fueron colectados a campo durante los veranos australes de 2017-2018 (temporada I), 2018-2019 (temporada II) y 2019-2020 (temporada III), en una quinta de cítricos ubicada en San José, Uruguay (34°42'1"S 56°43'37"O). Para capturar adultos vivos enseguida de emergidos, se instalaron mallas alrededor de árboles con alta infestación seleccionados por observación visual de aserrín en su base. Los árboles enmallados se chequearon diariamente desde comienzos de verano (mediados de diciembre) durante todo el período de emergencia de adultos entre enero y abril. El chequeo diario previno la desecación de los adultos emergidos, logrando obtener insectos jóvenes para colectas de volátiles. Adultos vivos (mayormente machos) también se colectaron de debajo de las cortezas de las cortinas de *Eucalyptus globulus*, circundantes en los cuadros de cítricos. Presuntamente, las cortezas sueltas proveen refugio a los adultos durante el día. Todos los escarabajos capturados se mantuvieron de forma individual en recipientes plásticos transparentes (12 cm diámetro, 14 cm altura) en condiciones de laboratorio (22 ± 1 °C, 66 ± 9% HR, 14:10 L:O).

*Colecta y análisis de volátiles.* Los volátiles de insectos se colectaron en sistemas de aireación compuestos por cámaras de vidrio cilíndricas (23 cm de largo, 5 cm diámetro), tubos de PTFE (6 mm d.i.) y un flujo de aire filtrado y humidificado (0.5 L/min) provenientes de una bomba de diafragma de PTFE (KNF, Alemania). Los compuestos volátiles se adsorbieron en pipetas Pasteur de vidrio conteniendo 50 mg of HaySep-Q 80/100 mesh (HayeSep® Q, Sigma-Aldrich). Los volátiles se eluyeron con 1 mL de hexano y 100 µL de estándar interno (EI, geraniol 1mg/mL), luego se mantuvo

a -4 °C. Previo al análisis por GC-MS las muestras se concentraron a 100 µL bajo un flujo suave de N<sub>2</sub>.

Las colectas de volátiles se realizaron de acuerdo a la disponibilidad de insectos, bajo condiciones controladas (22 ± 2 °C, 55 ± 10% HR, 14:10 L:O). Para comparar los volátiles de hembras y machos, se realizaron en simultáneo por 24 h aireaciones de hembras y machos clcados individualmente en cámaras separadas. Para determinar el ciclo de emisión, se realizaron colectas en dos períodos de tiempo, diurnas (9-17 h) y nocturnas (17-9 h).

Los análisis por GC-MS se realizaron en un equipo QP-2010 Shimadzu GC-MS, con una columna apolar (AT-5MS, 30m x 0.25mm, 0.25 µm, Alltech, EEUU) funcionando con un flujo de gas carrier constante de 1 mL/min (He). El inyector fue seteado a 100 °C para evitar descomposición térmica de los compuestos volátiles, problema que ha sido reportado en feromonas de cerambícidos basadas en hidroxicetonas (Schröder et al., 1994). La temperatura del horno se programó en una temperatura inicial de 40 °C (1 min), luego aumentó a 90 °C a 5 °C/min y a 250 °C a 10 °C/min. La interfase se calentó a 250 °C y la inyección (1 µL) se realizó tanto en modo split como splitless, dependiendo del objetivo del análisis. Los espectros de masas fueron obtenidos desde  $m/z$  28 a  $m/z$  350 en modo scan (70 eV). Los análisis por GC quiral se realizaron en un equipo Shimadzu 2010 equipado con una columna quiral (MEGA-DEX DAC-Beta, 25m x 0.25mm, 0.25 µm, MEGA, Italia) y un detector FID, funcionando con un flujo constante de gas carrier de 1 mL/min (H<sub>2</sub>). La temperatura del horno se programó desde 60 °C (5 min) hasta 120 °C a 1 °C/min (5 min), luego hasta 180 °C a 5 °C/min (5 min). Las temperaturas del inyector y detector fueron de 200 y 230 °C, respectivamente, y la inyección (1 µL) fue en modo splitless.

*Estudios de electroantenograma.* Los análisis de GC-EAD se realizaron en un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II equipado con un columna EC-WAX (30 m, 0.25 mm d. i., 0.25 µm; Alltech Econo-Cap™, EEUU), operada con un flujo de gas carrier constante (H<sub>2</sub>) de 2 ml/min. Los efluentes de la columna se dividieron (1:1) en un

separador vítreo de sílica (SGE, Austin, TX, EEUU), agregando N<sub>2</sub> como gas “make-up” (30 ml/min) previo al separador. Los efluentes del separador se dirigieron a través de columnas capilares inertes (50 cm, 0.25 mm d. i.) hacia los detectores FID y EAD. La columna dirigida hacia la antena pasó por un tubo interfase (Synthech, Alemania) calentado a 240 °C, luego descargado en un tubo de vidrio (1 cm diámetro) con una corriente de aire humidificado y filtrado (150 ml por min), que liberó los volátiles en la preparación de la antena localizada a 4 cm contracorriente. La antena se removió del insecto y unió a electrodos de vidrio rellenos de una solución salina (NaCl 7.5g/L, KCl 0.4 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.2g/L); la punta de la antena se removió para mejorar el contacto. Los electrodos de vidrio se conectaron a un tubo de EAG pre-amplificado y luego a un amplificador de alta impedancia (IDAC 2) (Synthech, Alemania) para recibir señales simultáneas de los detectores FID y EAD. Los datos se analizaron usando el software GC-EAD 2014 (v.1.2.5).

Para evaluar la respuesta de las antenas de machos y hembras a los volátiles naturales de macho, las condiciones del GC fueron las mismas previamente descritas para los análisis de GC-MS. Para evaluar la respuesta de la antena de los isómeros de la 3-hidroxi-2-hexanona, se utilizó un método isoterma (90 °C) y 1 µL de cada estímulo se inyectó secuencialmente en modo Split a intervalos de 1 minuto, con adquisición continua del FID y respuesta de la antena. Los compuestos se inyectaron de la siguiente manera: (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona sintética, (*S*)-3-hidroxi-2-hexanona sintética, volátiles naturales de macho, 3-hidroxi-2-hexanona racémica sintética. Finalmente, para evaluar la respuesta de la antena al 2,3-hexanodiol, el horno se programó con una temperatura inicial de 70 °C (3 min), luego llevada a 90 °C (5 °C/min) y a 250 °C (10°C/min). El inyector se mantuvo a 100 °C, y la inyección fue de 1 µL en modo split. La solución a evaluar contuvo 3-hidroxi-2-hexanona sintética racémica y 2,3-hexanodiol general sintético (4 estereoisómeros).

*Ensayos a campo.* La atracción de adultos de *D. rotundicollis* a campo a compuestos sintéticos de la feromona y a mezclas, se evaluó en una quinta de limones (*Citrus aurantifolia*) con importante infestación en Kiyú, San José, Uruguay, durante tres

temporadas consecutivas (I, II y III). Los dispositivos de trapeo consistieron en trampas de feromonas fabricadas artesanalmente (74 cm altura, cartonplast negro corrugado). Los recipientes colectores se llenaron parcialmente con agua y jabón. Los paneles y embudo de la trampa se pintaron con Fluon® (Insect-A-Slip, PTFE DISP30, BioQuip Products, Inc) para mejorar la efectividad de las trampas (Graham et al., 2010). En las temporadas I y II las trampas se suspendieron de las ramas de los árboles de manera que los baldes quedaron suspendidos a una altura de 60 cm sobre el suelo. En la temporada III se evaluaron dos alturas de trampas. Las trampas bajas se colgaron como se mencionó previamente para las temporadas I y II; las trampas altas se colgaron de caños de PVC en forma de L, de manera que los baldes quedaron suspendidos a 1.8 m sobre el suelo.

En las temporadas I y II, el dispositivo de emisión consistió en bolsas de cierre hermético de polietileno dobles (una dentro de otra) de 5 × 7 cm; dentro se colocó una mecha de algodón de 4 cm con una solución de isopropanol con el estímulo a evaluar (1 mL). En la temporada I el compuesto de feromona mayoritario se evaluó tanto de forma racémica como el enantiómero puro. Los septos se cargaron con 50 mg de la 3-hidroxi-2-hexanona o 25 mg de la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona. En la temporada II el objetivo fue evaluar la adición de 2,3-hexanodiol, entonces los septos se cargaron con 50 mg de la 3-hidroxi-2-hexanona racémica o 50 mg de 3-hidroxi-2-hexanona racémica más 25 mg de 2,3-hexanodiol genérico (mezcla de estereoisómeros) en bolsas separadas. En ambas temporadas los controles se cargaron con 1 ml de isopropanol. En la temporada III se utilizó solamente 3-hidroxi-2-hexanona racémica, y los septos se modificaron para evaluar distintos ratios de emisión. Se usaron dos tipos de dispensadores, de baja y alta emisión. Los de baja emisión consistieron en un tubo Eppendorf (1 mL) con la tapa perforada (1 mm) y dentro una mecha de algodón de 1 cm. El algodón se cargó con 50 mg de 3-hidroxy-2-hexanone racémica sin solvente. Los dispensadores de alta emisión fueron las mismas bolsas cierre hermético descritas previamente, cargadas con una dosis más alta (500 mg) de 3-hidroxi-2-hexanona racémica sin solvente. Se utilizó feromona sin



solvente para tener un control más preciso de los ratios de emisión de la 3-hidroxi-2-hexanona. Estos se evaluaron en condiciones de laboratorio resultando en emisiones de 4 mg/día y 40 mg/día para los dispensadores de alta y baja emisión respectivamente (Tabla 1 Material suplementario). Estos ratios de emisión fueron 10 y 100 veces mayores que la emisión más alta observada por un macho individual (ver resultados). En la temporada III entonces se colgaron los siguientes tratamientos tanto en trampas bajas como en las trampas altas: *i*) dispensadores de baja emisión, *ii*) dispensadores de alta emisión, *iii*) control (materiales del dispensador). A su vez para comparar capturas entre temporadas, se agregó en las trampas bajas un tratamiento más, idéntico al utilizado en temporadas anteriores: 50 mg de 3-hidroxi-2-hexanona racémica en 1 mL de isopropanol.

Las trampas se colocaron dentro de cuadros de cítricos de 1 ha (a excepción de ver abajo), a 6 m del borde de los cuadros y con una separación de al menos 20 m entre trampas. Se siguió un diseño de bloques completos al azar, cada réplica conteniendo todos los tratamientos. En las temporadas I y II se dispusieron 10 repeticiones, y 5 en la temporada III. En la temporada II se colocaron 5 repeticiones en los cuadros cítricos y 5 en los árboles de las cortinas de eucalipto circundantes a los cuadros. Los atrayentes se recambiaron a la vez que se revisaron las trampas cada 15 días en las temporadas I y II, y semanalmente en la temporada III. Los tratamientos se asignaron al azar al comienzo de le experimento y luego se reasignaron en cada recambio para evitar desvíos posicionales. Otras especies de cerambícidos capturados también fueron registradas.

*Químicos.* La 3-hidroxi-2-hexanona racémica para los septos se compró de ChemTica Internacional, S.A. y Bedoukian Inc. (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona, (*S*)-3-hidroxi-2-hexanona y 2,3-hexanediol se sintetizaron según (Heguaburu et al., 2017). Los 4 diastereómeros del 2,3-hexanodiol se obtuvieron por reducción de (*R*)- y (*S*)-3-hidroxi-2-hexanona, seguido por separación en columna de los diastereómeros y la asignación de la configuración absoluta del C2 se realizó a través de RMN. Los estándares de (*R*)-

y (S)-3-hidroxi-2-hexanona fueron provistos generosamente por el Prof. Jocelyn Millar (UC Davis, EEUU).

*Análisis estadístico.* La emisión diurna y nocturna de feromona se expresó como cantidad de 3-hidroxi-2-hexanona relativa al estándar interno, y fue analizada a través de un test de *Wilcoxon* para muestras pareadas. Las capturas de escarabajos (capturas totales por bloque/repeticón durante toda la temporada) se analizaron en las temporadas I y II por un modelo lineal generalizado mixto (*GLMM*) con distribución de *Poisson* y el “bloque” considerado un factor aleatorio. Se utilizó el paquete *lme4* (Bates et al., 2015). Las medias por tratamiento se compararon usando un test de *Tukey HSD* ( $\alpha = 0.05$ ) usando el paquete *multcomp* (Hothorn et al., 2008). Debido a las limitaciones de los modelos *GLM*, cualquier tratamiento con capturas cero en la totalidad del experimento no se incluyó en el análisis. En la temporada II, la ubicación de las trampas (dentro de los cuadros vs. cortinas) se consideró un factor fijo. En la temporada III, debido a las bajas capturas, las diferencias entre tratamientos para las capturas de *D. rotundicollae* y *R. thoracicus* se analizaron con un test de *Friedman* seguido por el test post-hoc de *Conover* ( $\alpha = 0.05$ ). La comparación de hembras vs. machos entre temporadas se realizó usando tests de *Chi-cuadrado* con las capturas acumuladas de escarabajos por temporada en todos los tratamientos y bloques. Los análisis se realizaron con los softwares estadísticos R e Infostat (0.99.892 version – © 2009-2016 RStudio, Inc.) (RStudioTeam, 2015) (Di Rienzo et al., 2011).

#### **4.1.4. Resultados**

*Colectas y análisis de volátiles.* Las colectas de volátiles de hembras y machos de *D. rotundicollae* se obtuvieron y analizaron durante las temporadas I y II. Las muestras de machos mostraron consistentemente un compuesto mayoritario que representó el 96.8% [92.8–98.8] (mediana [rango intercuartil], N = 10) del área de GC. Ninguna muestra de hembras mostró este ni cualquier otro volátil distintivo (Fig. 1a). El tiempo de retención y espectro de masas del compuesto macho-específico claramente igualó el del estándar de la 3-hidroxi-2-hexanona sintética (Fig. S1). El análisis de GC

enantioselectivo con estándares estereoquímicamente puros mostró que el enantiómero natural emitido por los machos es la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona (Fig. 1b). La cuantificación de la 3-hidroxi-2-hexanona por comparación de áreas con el estándar interno mostró que los machos emiten cantidades altamente variables, en un rango desde 0.5 a 391  $\mu\text{g}$  en 24 h (8.8  $\mu\text{g}$  [0.9–54.5], mediana [rango intercuartil], N = 17). Los machos también producen algunos compuestos minoritarios que no se observaron de forma consistente, incluso en muestras diferentes del mismo macho. Cuando presentes, los compuestos minoritarios representaron el 2.8% [1.2–5.3] (mediana [rango intercuartil], N = 10) del área relativa en el GC. Los compuestos minoritarios más abundantes igualaron los tiempos de retención y espectros de masas de los estándares de diasterómeros del 2,3-hexanodiol (Fig. S1). Comparaciones enantioselectivas por GC con estándares de los 4 estereoisómeros del 2,3-hexanodiol mostró que todos están presentes en la muestra natural, siendo los diasterómeros (3*R*) más abundantes que los (3*S*) (Fig. 1c). Otro compuesto minoritario con un tiempo de retención menor fue también observado en las aireaciones de machos de forma inconsistente. El espectro de masas de este compuesto sugiere que se trata de la 2,3-hexanodiona (Fig. S1).

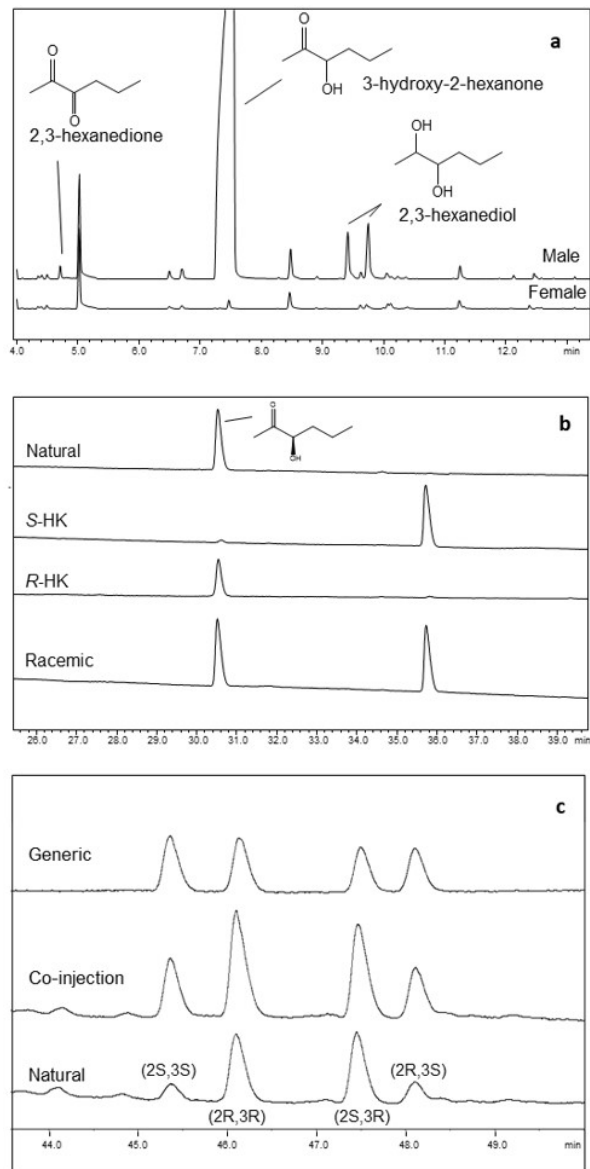


Fig. 1 Análisis químico de extractos volátiles de *D. rotundicolle*: A) Cromatogramas representativos de un macho individual (trazo superior) y hembra (trazo inferior) luego de 24 h de aireación (ver Figura S1 para espectro de masas). B) Análisis quiral de extracto de machos comparado con la (3R/3S)-hidroxi-2-hexanona pura y enantioméricamente pura. C) Análisis de GC quiral de isómeros de 2,3-hexanodiol en extractos volátiles de machos (trazo inferior), diol genérico sintético (trazo superior) y co-inyección de dioles naturales y sintéticos (trazo del medio). Los cuatro diastereómeros fueron asignados con base en estándares sintéticos de cada uno.

El estudio del patrón de emisión diario mostró que los machos emiten la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona casi exclusivamente durante las 17 y 9 h (escotofase  $\pm 3$  h) (Wilcoxon,  $P = 0.002165$ ) (Fig. 2). Las muestras colectadas durante la noche contuvieron 68.6  $\mu\text{g}/\text{macho}$  [4.8–201.3] (mediana [rango intercuartil],  $N = 6$ ), mientras que las diurnas mostraron solamente trazas del compuesto 1.5  $\mu\text{g}/\text{macho}$  [0.8–1.8] (mediana [rango intercuartil],  $N = 6$ ).

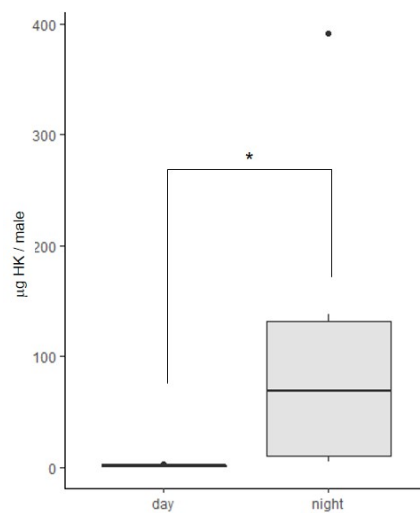


Fig. 2 Patrón de emisión de 3-hidroxi-2-hexanona (HK) en machos de *D. rotundicolle*. Noche: 17-9 h; día: 9-17 h; escotofase: 20-6 h. El asterisco indica una diferencia significativa (Wilcoxon  $P < 0.05$ ).

*Estudios de electroantenograma.* Los estudios de GC-EAD acoplados se llevaron a cabo para evaluar la respuesta de antenas de hembras y machos de *D. rotundicolle* a volátiles naturales y sintéticos. Las antenas mostraron baja relación señal/ruido, lo que permitió obtener datos de una cantidad limitada de insectos. De todas formas, respuestas bien definidas a la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona natural de volátiles de macho, se observaron para antenas de machos y hembras (Fig. 3a). Las antenas no parecieron responder al isómero no natural (*S*)-3-hidroxi-2-hexanona. Esto se comprobó mediante la aplicación subsecuente de 4 muestras a la misma antena, los

enantiómeros sintéticos R y S de la 3-hidroxi-2-hexanona, extracto de volátiles naturales de macho y la 3-hidroxi-2-hexanona racémica. Trabajando en condiciones isotermas e inyectando las muestras con 1 min de diferencia, la misma antena fue estimulada con compuestos que eluyeron cada 1 min. Las antenas de machos respondieron al enantiómero R, sintético y natural, así como a la mezcla racémica, pero no así al enantiómero S aun siendo este inyectado en medio de los demás estímulos (Fig. 3b). Los experimentos correspondientes con antenas de hembras no mostraron resultados concluyentes, aunque el patrón de respuesta aparenta ser igual que el de machos (Fig. S2). Finalmente, el 2,3-hexanodiol (mezcla de todos los estereoisómeros) no mostró ninguna respuesta de las antenas de machos (n = 5) ni de hembras (n = 6), aun cuando la misma antena claramente respondió a la 3-hidroxi-2-hexanona racémica, la que fue co-inyectada con el diol (Fig. 3c).

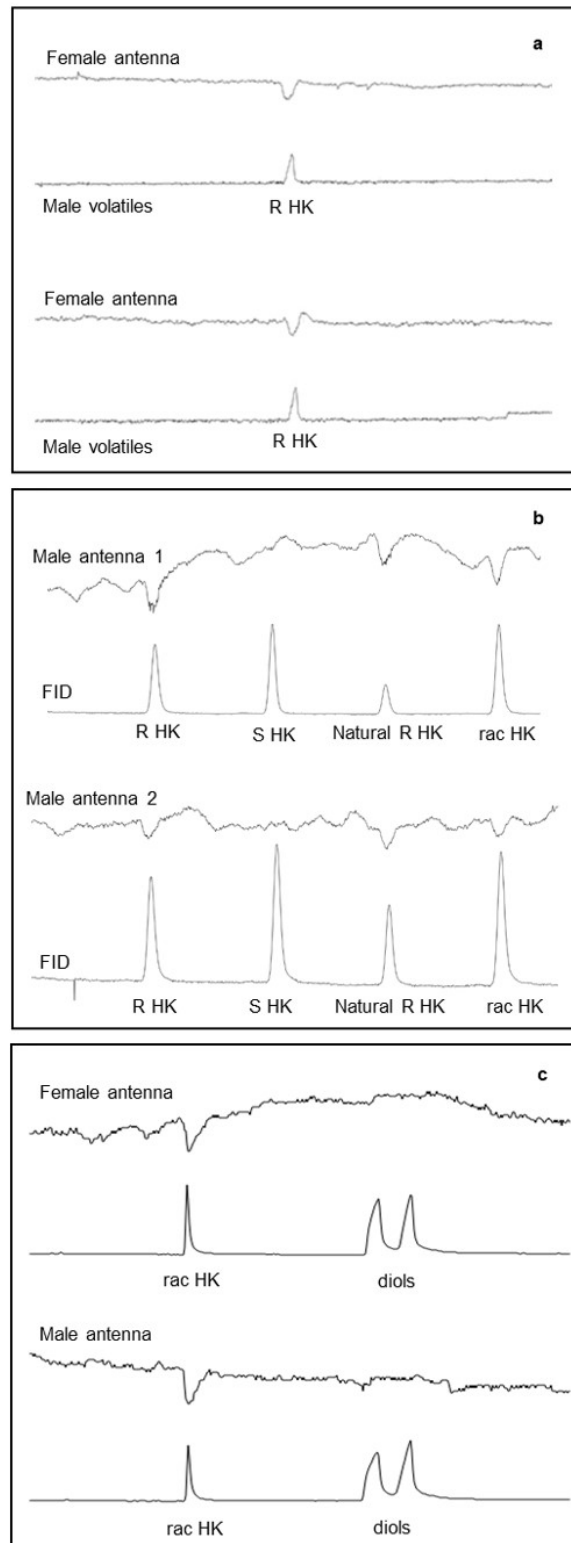


Fig. 3 Análisis de GC-EAD de volátiles de machos de *D. rotundicolle* y estándares sintéticos: A) Respuesta de antenas de hembras y machos a la (*R*)-3-hidroxi-2-

hexanona (R HK) natural. B) Respuesta de antenas a 3-hidroxi-2-hexanona sintética (R, S y rac HK) y volátiles naturales de macho (natural). Las muestras fueron subsecuentemente inyectadas cada 1-min en un método de GC isoterma. C) Respuesta de antenas de hembras y machos a una mezcla de 3-hidroxi-2-hexanona racémica (rac HK) y 2,3-hexanodiol genérico (cuatro diastereómeros) (dioles).

*Ensayos de campo.* En general, considerando los niveles altos de infestación del predio, las capturas de *D. rotundicolle* obtenidas fueron bajas. En la temporada I, un total de 29 insectos fueron encontrados en las trampas. Sin diferencias significativas entre las trampas cebadas con la 3-hidroxi-2-hexanona racémica, (R)-3-hidroxi-2-hexanona y trampas control (GLMM, Tukey HSD:  $P > 0.5$  para todos los contrastes) (Fig. 4a). Interesantemente, se observaron capturas incidentales de otros cerambícidos, con números superiores a las capturas de la especie objetivo. Particularmente se destacaron las capturas de *Retrachydes thoracicus* (Olivier, 1790), una especie conocida del neotrópico (Monné, Bezark, 2009); los insectos se identificaron con base en comparación con colecciones locales. Un total de 65 insectos se capturaron en la temporada I, y en este caso las capturas fueron claramente diferentes entre las trampas de feromonas y las trampas control, con las 56 capturas en las trampas de feromonas y cero en el control. No se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos de feromonas (racémica vs. enantiómero R) (GLMM, Tukey HSD:  $P = 0.424$ ) (Fig. 4a).

En la temporada II, se capturó un total de 35 individuos de *D. rotundicolle*, 8 en las trampas dentro de los cuadros de cítricos y 27 en las trampas en las cortinas. Los datos se juntaron y se analizaron juntos, mostrando diferencias significativas entre el control y la 3-hidroxi-2-hexanona racémica (GLMM, Tukey HSD:  $P = 0.0240$ ). Las capturas en las trampas control y las cebadas con la mezcla de 3-hidroxi-2-hexanona racémica y el 2,3-hexanodiol no fueron significativamente diferentes, pero mostraron una tendencia clara a favor de las trampas cebadas con la mezcla (GLMM, Tukey HSD:  $P =$



0.0669). Finalmente, las trampas cebadas con la hidroxiketona solamente o en combinación con el diol no mostraron diferencias significativas (GLMM, Tukey HSD:  $P = 0.8495$ ) (Fig. 4b). Similarmente a la previa temporada, se capturaron en la temporada II 56 individuos de *R. thoracicus*, 55 en las trampas de feromonas. No se observaron diferencias significativas entre las trampas cebadas con hidroxiketona solamente o en la combinación hidroxiketona:diol (GLMM, Tukey HSD:  $P = 0.58230$ ). Cuando se compararon con las trampas control, ambos tratamientos capturaron significativamente más insectos ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4b).

La temporada III mostró en líneas generales bajas capturas de ambas especies, posiblemente debido a un verano extremadamente seco. Una reducción en las poblaciones de *D. rotundicolle* fue evidente, desde la reducción en el daño de oviposición, la ausencia en la emergencia de adultos en los árboles enmallados, y ausencia de capturas en las trampas control; todos factores contrastantes con las temporadas anteriores. De todas formas, se pudieron realizar algunas observaciones relevantes a partir de los resultados. Un total de 14 adultos de *D. rotundicolle* se trampearon, todos ellos en trampas cebadas con 3-hidroxi-2-hexanona racémica. Además, todos excepto uno, fueron capturados en trampas elevadas y la mayoría (8) en las trampas con dispensadores de alta emisión (Friedman, Chi-cuadrado,  $P = 0.0053$ ) (Fig. 4c). En esta tercera temporada, las capturas de *R. thoracicus* fueron similarmente bajas, con 13 adultos capturados tal como se observó en todas las temporadas previas, en las trampas cebadas con 3-hidroxi-2-hexanona (Friedman Chi-cuadrado,  $P = 0.0037$ ). En este caso, no se observó un patrón claro entre alturas de trampas (7 capturas en trampas altas y 6 en trampas bajas) ni entre ratios de emisión (8 en ratios altos y 5 en ratios bajos) (Fig. 4c).

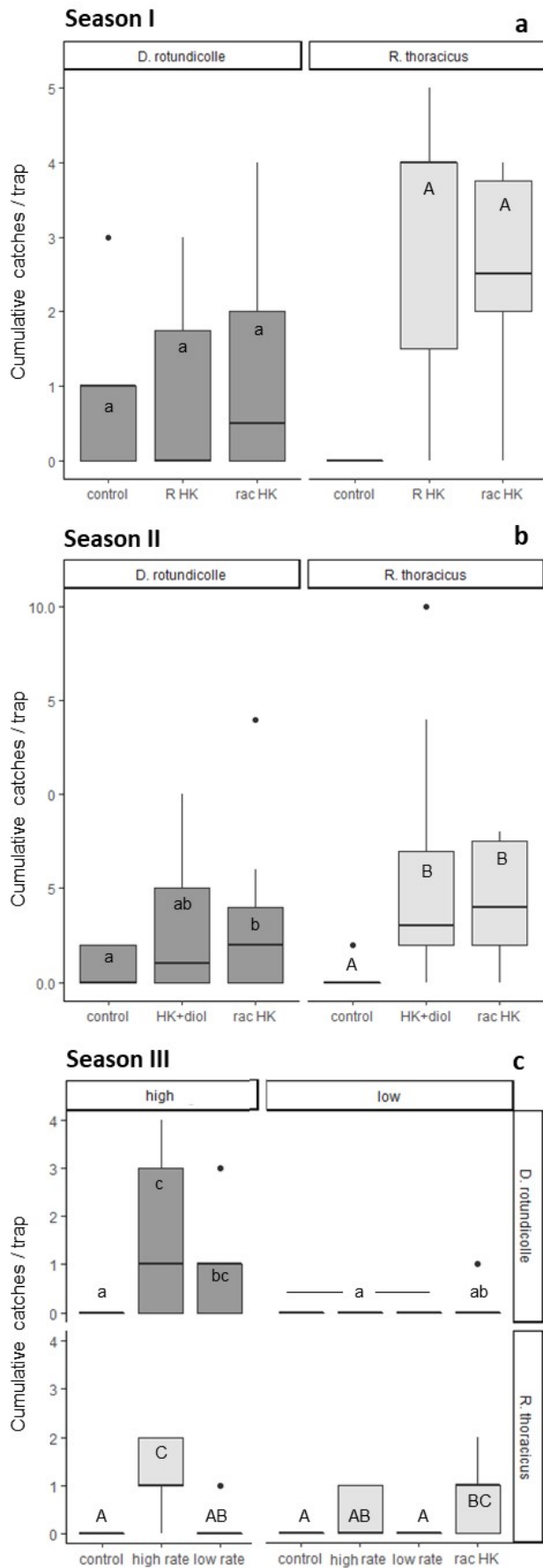


Fig. 4 Boxplots mostrando las capturas a campo de *Diploschema rotundicolle* (gris oscuro) y *Retrachydes thoracicus* (gris claro) en tres temporadas de campo consecutivas (veranos australes 2018-2020). HK representa 3-hidroxi-2-hexanona racémica, diol representa 2,3-hexanodiol genérico. Letras diferentes indican diferencias significativas (post-hoc Friedman Conover test,  $\alpha = 0.05$ ). En C: high y low representan altura de trampas y high rate / low rate representa ratio de emisión de dispensadores.

Notoriamente, en las tres temporadas se capturaron significativamente más hembras que machos para ambas especies ( $\chi^2 P < 0.05$  en todas las comparaciones) (Fig. 5). Este patrón se observó en todos los tratamientos, incluyendo las trampas control (Fig. S3). Todas las figuras de material suplementario se encuentran en el anexo I.

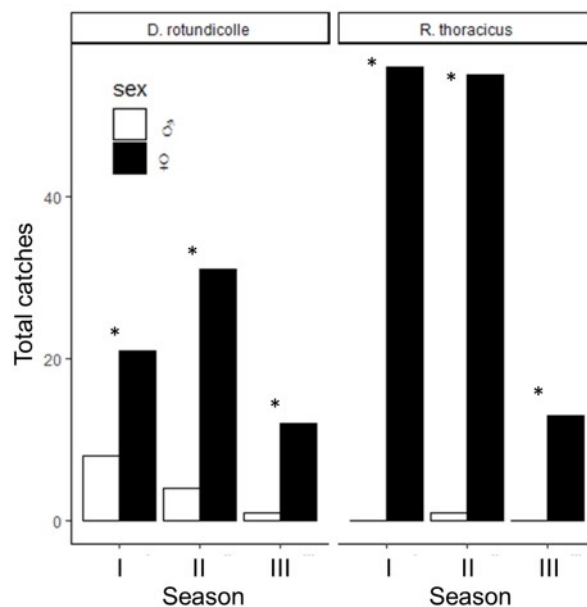


Fig. 5 Trampeo a campo de *Diploschema rotundicolle* hembras y machos (izquierda) y *Retrachydes thoracicus* (derecha) por temporada. Todos los tratamientos fueron combinados. Los asteriscos indicant diferencias significativas,  $P < 0.05$  en test de *Chi-cuadrado*.

#### 4.1.5. Discusión

Aquí reportamos la química de feromonas del taladro de los cítricos, *D. rotundicolle*. Similarmente a muchas especies de cerambícidos (Hanks, Millar, 2016), los machos de *D. rotundicolle* emiten (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona, junto con algunos compuestos minoritarios que no se emiten de forma consistente. Este es con base en nuestro conocimiento el primer reporte de una especie de la tribu Torneutini en compartir esa química de feromonas conservada, expandiendo la distribución taxonómica de este motivo dentro de los cerambícidos. Los machos emiten la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona mayormente a la noche, cuando son comportamentalmente activos. Las cantidades emitidas fueron altamente variables en laboratorio, más comúnmente entre 10–50 µg por noche, pero llegando a casi 400 µg en una sola noche.

Nuestros resultados de electroantenograma mostraron que tanto antenas de hembras como de machos responden a este compuesto macho-específico, sugiriendo que la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona funciona como feromona mediando la comunicación con ambos sexos. Como ha sido observado en muchas especies emparentadas (Hanks, Millar, 2016), el compuesto muy probablemente funciona como una feromona sexual-de agregación.

Los resultados de GC-EAD también mostraron, claramente en el caso de machos, que las antenas no responden al isómero no natural (*S*)-3-hidroxi-2-hexanona. El hecho de que los insectos no perciban el enantiómero “incorrecto”, es consistente con varios estudios que muestran que el enantiómero o natural no afecta las capturas a campo. A su vez, nuestros resultados sugieren amplitudes similares en las respuestas de antena a la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona antes y después de la estimulación con el enantiómero *S*, implicando que el enantiómero no natural no inhibe la detección de la feromona. Este hecho es relevante desde una perspectiva aplicada, ya que la 3-hidroxi-2-hexanona racémica está comercialmente disponible y es más barata de sintetizar.

La atracción a campo de adultos de *D. rotundicolle* a trampas cebadas con 3-hidroxi-2-hexanona (racémica o enantioméricamente pura), no fue tan fuerte como se esperaba. A pesar de haber trabajado en una zona con infestaciones altas, las capturas totales no superaron unas decenas de adultos en las tres temporadas de campo. En base al daño observado particularmente en las primeras dos temporadas, y el aserrín fresco bajo casi todos los árboles de la quinta, estas capturas representarían una proporción muy menor de la población. Un indicador de la alta abundancia de insectos durante las dos primeras temporadas fue las capturas inesperadas en las trampas control. De hecho, las capturas en las trampas cebadas con feromonas en la primera temporada no se diferenciaron de las capturas al azar del control y si lo fueron significativamente, pero levemente superiores en la segunda temporada. Claramente algunos otros factores faltaron, que podrían estar asociados a la química del atrayente, el ratio de emisión de los septos, la estructura de la trampa, o factores relacionados a la biología del insecto. A pesar de las bajas capturas, la primera temporada sugiere fuertemente que el enantiómero puro y la mezcla racémica no se comportarían diferente como atrayentes en el campo, lo cual es esperable con base en los resultados de CG-EAD. La falta de compuestos minoritarios puede ser una clara explicación de los bajos niveles de capturas. Ha sido demostrado que los compuestos minoritarios son importantes determinando la especificidad de las feromonas en cerambicinos que comparten el compuesto mayoritario de la feromona (Mitchell et al., 2015). En nuestros análisis de los volátiles de machos de *D. rotundicolle* identificamos la 2,3-hexanodiona y 2,3-hexanodiol ambos compuestos minoritarios de otras especies de cerambicinos. Estos compuestos se encontraron de forma inconsistente, con algunas colectas de volátiles solamente mostrando la hidroxiketona mayoritaria. La 2,3-hexanodiona ha sido comúnmente encontrada en cerambicinos, pero no se ha reportado ninguna actividad biológica hasta el momento (Hanks, Millar, 2016). Aquí por lo tanto nos focalizamos en el 2,3-hexanodiol, el cual fue más abundante y ha mostrado actividad como feromona en otros estudios. Nuestros resultados de GC-EAD y campo, sin embargo, sugieren que el diol no juega un rol ecológicamente relevante

para *D. rotundicolle*. Las antenas de machos y hembras que claramente detectaron la hidroxiketona no mostraron respuesta al diol en el GC-EAD, y la adición del diol a la hidroxiketona en los cebos de trampas no aumentó su atraktividad a campo. Interesantemente, nuestro análisis por GC enantioselectivo mostró la presencia de los 4 estereoisómeros en el diol natural, mientras que la hidroxiketona en *D. rotundicolle* es enantioméricamente pura. En su conjunto, estos resultados nos llevaron a hipotetizar que para algunas especies, el diol podría ser solo un subproducto de la formación la hidroxiketona sin una significación biológica específica, mientras que en otras especies este ha adquirido un valor en la comunicación.

La arquitectura de la trampa y su ubicación pueden también ser factores causales de las bajas capturas de *D. rotundicolle* a pesar de los altos niveles poblacionales. Si bien detalles menores de diseño podrían ser pasados por alto en las trampas confeccionadas artesanalmente, las trampas de panel cruzado cubiertos con lubricante han mostrado ser dispositivos adecuados para el trampeo de cerambicinos (Allison et al., 2014). Apoyo inesperado para nuestro diseño de trampa provino de las capturas incidentales de *Retrachydes thoracicus* en nuestros ensayos de campo. *Retrachydes thoracicus* es una especie de cerambicino nativo, reportado en Argentina, Brasil, Paraguay, Bolivia y Uruguay (Bentancourt, Scatoni, 1999). Es una especie polífaga asociada a numerosos hospederos leñosos, dentro de los cuales están los cítricos, eucaliptos y casuarinas, todos presentes en nuestro predio experimental. Números relativamente altos de esta especie, similar en tamaño a *D. rotundicolle*, se capturaron casi exclusivamente en las trampas cebadas con feromonas (1 de 125 en una trampa control) en las tres temporadas de estudio. *Retrachydes thoracicus* no es considerado una plaga de citrus y no fueron encontrados insectos de esta especie emergiendo de los árboles enmallados, por lo que su población es probablemente más baja que la de *D. rotundicolle* en nuestro predio experimental. Concluimos que los adultos de *R. thoracicus* fueron efectivamente atraídos desde los alrededores hacia las trampas de feromonas, representando un control positivo no intencional en la capacidad de captura y retención de las trampas. Nuestros resultados sugieren

fuertemente que la 3-hidroxi-2-hexanona juega un rol importante en la comunicación química de *R. thoracicus*. Siendo especies simpátricas, *R. thoracicus* y *D. rotundicolle* no se superpondrían ni generarán atracción cruzada entre especies, ya que el primero es activo durante el día (Bentancourt, Scatoni, 1999), mientras que *D. rotundicolle* es de hábitos nocturnos tanto para oviposición (Machado, Filho, 1999) como para la producción de feromona (este estudio).

La ubicación de las trampas y el ratio de emisión de los dispensadores fue investigado en el correr de la tercera temporada de este trabajo. A pesar de las capturas significativamente más bajas de esta temporada, los resultados mostraron que las trampas elevadas y con ratios más altos de emisión tuvieron en efecto positivo en la atracción de *D. rotundicolle* a la 3-hidroxi-2-hexanona. La altura de las trampas es un factor que se ha probado como relevante en la captura de cerambícidos (Graham et al., 2012; Schmeelk et al., 2016). A pesar de que los cítricos no tienen un gran gradiente vertical, las trampas elevadas funcionaron claramente mejor (13 de 14 *D. rotundicolle* fueron capturadas en trampas altas). Si este resultado es debido a que las trampas elevadas se encuentran más expuestas o se debe a una estratificación e el vuelo de los escarabajos no puede ser concluido. Curiosamente las trampas en altura no tuvieron un efecto en el caso de *R. thoracicus*, sugiriendo que la exposición a la trampa por sí sola no es una explicación obvia. Las tasas de emisión de los dispensadores también produjeron un efecto significativo sobre la captura de *D. rotundicolle*. Se conoce en cerambícidos que las feromonas sexuales de agregación producidas por los machos son a menudo producidas en grandes cantidades, que van hasta decenas a cientos de microgramos por hora. Por lo tanto, los señuelos pueden necesitar aproximadamente igualar o superar estos ratios para ser efectivas, liberando por lo menos varios miligramos de feromona por día (Millar, Hanks, 2018). Porque los señuelos utilizados en las dos primeras temporadas contenían solvente, nuestros esfuerzos para medir las tasas de liberación no lograron producir resultados confiables. El uso de dispensadores sin solvente en la tercera temporada nos permitió medir las tasas de liberación por pérdida de peso. Usamos tasas de liberación de 4 y 40 mg por día, representando 10

y 100 veces más que la cantidad más alta de feromona emitida por un macho en el laboratorio (aprox. 400 µg/día). Las trampas con dispensadores de tasa alta de emisión capturaron aproximadamente el doble de adultos de *D. rotundicolle*, pero nuevamente, las bajas capturas generales impiden una conclusión definitiva.

En resumen, mostramos que los machos del taladro de los cítricos sudamericano, *Diploschema rotundicolle*, emiten (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona, a la que responden tanto antenas de machos como de hembras. Las antenas responden a la mezcla racémica, pero no al enantiómero natural. Los machos también emiten los cuatro estereoisómeros de 2,3-hexanodiol, que no desencadena respuestas antenales ni mejoran las capturas de campo. Trampas cebadas con la 3-hidroxi-2-hexanona racémica mostraron bajos niveles de captura, aunque estos fueron mejorados por dispensadores de mayor tasa de emisión y altura elevada de la trampa. Capturas no intencionales pero abundantes de *Retrachydes thoracicus* en trampas cebadas con feromonas también se reportan. Para ambas especies, significativamente más hembras fueron capturados a través de tratamientos y temporadas, lo que sugiere que las hembras son el sexo más activo o que la especie tiene un sesgo de proporciones entre sexos.

La captura efectiva de adultos de *D. rotundicolle* sería una contribución significativa al manejo de plagas en el sector de los cítricos en Sudamérica. Mientras que otras plagas emergentes enfermedades representan amenazas importantes para los cultivos de cítricos en la región, las explosiones poblacionales locales de *D. rotundicolle* se están volviendo más comunes. Aunque la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona debe desempeñar un papel en la comunicación química de este insecto, algunos cerambícidos muestran atracción moderada o nula a sus feromonas solas, que requieren, por ejemplo, la presencia de volátiles de sus hospederos vegetales para disparar la atractividad (Hanks, Millar, 2018). Este y otros factores serán el foco de nuestro trabajo futuro para optimizar las trampas de feromonas para *D. rotundicolle*.



#### 4.1.6. Bibliografía

- Allison JD, Bhandari BD, McKenney JL, y Millar JG. 2014. Design factors that influence the performance of flight intercept traps for the capture of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae) from the subfamilies Lamiinae and Cerambycinae. PLoS ONE, 9: e93203.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, y Walker S. 2015. Fitting linear mixed effects models using lme4. J Stat Softw, 67: 1–48.
- Bentancourt CM, y Scatoni IB. 1999. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur. 582p.
- Barbour JD, Alston DG, Walsh DB, Pace M, y Hanks LM. 2019. Mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop and sweet cherry Journal of Economic Entomology.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, y Robledo CW. 2011. InfoStat. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Fan J, Denux O, Courtin C, Bernard A, Javal M, Millar JG, Hanks LM, y Roques A. 2018. Multi-component blends for trapping native and exotic longhorn beetles at potential points-of-entry and in forests. Journal of Pest Science.
- Faria AM, Fernandes SCS, dos Santos JCC, Bergmann E, Brisolla AD, Takematsu AD, Negri JD, y Sempinoato OR. 1987. Estudo sobre controle da broca-dos ramos e do tronco dos citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Coleoptera - Cerambycidae). Biologico, Sao Paulo, 53: 13-18.
- Graham EE, Poland TM, y Millar JG. 2012. A comparison of trap type and height for capturing cerambycid beetles (Coleoptera). Journal of Economic Entomology, 105: 837-846
- Graham EE, Mitchell RF, Reagel PF, Barbour JD, Millar JG, y Hanks LM. 2010. Treating panel traps with a fluoropolymer enhances their efficiency in capturing cerambycid beetles. Journal of Economic Entomology, 103: 641-647.

- Hanks LM, y Millar JG. 2018. Conservation of pheromone chemistry within the cerambycidae on a global scale, and implications for invasion biology. Annapolis, MD.
- Hanks LM, y Millar JG. 2016. Sex and aggregation-sex pheromones of cerambycid beetles: Basic science and practical applications. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 631-654.
- Hansen L, Xu T, Wickham J, Chen Y, Dejun Hao<sup>3</sup>, Hanks LM, Millar JG, y Teale SA. 2015. Identification of a male-produced pheromone component of the citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis*. *PLoS ONE*, 10: e0134358.
- Heguaburu V, do Carmo H, Parpal F, Amorós ME, y González A. 2017. Synthesis of aggregation pheromone components of cerambycid species through  $\alpha$ -hydroxylation of alkylketones. *Tetrahedron Letters*, 58: 1738-1741.
- Hothorn T, Bretz F, y Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50: 346–363.
- Link D, y Corrêa Costa E. 1994. Nível de infestação da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle* (serville, 1834) em cinamomo e plantas cítricas, em Santa Maria - RS. *Ciencia Rural* 24.
- Machado LA, y Berti Filho EB. 2006. Prática cultural associada ao controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate à broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle*. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 73: 439-445.
- Machado LA, y Filho B. 1999. Criação artificial da broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Col.: Cerambycidae). *Biológico, São Paulo*, 61: 5-11.
- Machado LA, Cruz BPB, Leite LG, Batista Filho A, y da Silva EM. 1991. Práticas para o controle da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle*, (Serville,

- 1834)(Coleoptera-Cerambycidae). En: XIII Congresso Brasileiro de Entomologia. 366.
- Maki EC, Millar JG, Rodstein J, Hanks LM, y Barbour JD. 2011. Evaluation of mass trapping and mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop production yards. *Journal of economic entomology*, 104: 933-938.
- Millar JG, y Hanks LM. 2018. New pheromones for invasive cerambycids: From the bench to the field. Annapolis, MD.
- Mitchell RF, Reagel PF, Wong JCH, Meier LR, Dias Silva W, Mongold-Diers JA, Millar JG, y Hanks LM. 2015. Cerambycid beetle species with similar pheromones are segregated by phenology and minor pheromone components. *Journal of chemical ecology*, 41: 431-440.
- Mitchell RF, Millar JG, y Hanks LM. 2013. Blends of (R)-3-hydroxyhexan-2-one and alkan-2-ones identified as potential pheromones produced by three species of cerambycid beetles. *Chemoecology* 23: 121-127.
- Monné MA, y Bezark L 2009. Checklist of the Cerambycidae, or longhorned beetles (Coleoptera) of the Western Hemisphere. Consultado Disponible en: <https://www.cerambycoidea.com/titles/monnebezark2009.pdf>.
- RStudioTeam. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
- Sanchez-Husillos E, Etxebeste I, y Pajares J. 2015. Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *Journal of Applied Entomology*, 139: 747-758.
- Schmeelk TC, Millar JG, y Hanks LM. 2016. Influence of trap height and bait type on abundance and species diversity of cerambycid beetles captured in forests of east-central Illinois. *Journal of Economic Entomology*, 109: 1750-1757.

- Schröder F, Fettköther R, Noldt U, Dettner K, König WA, y Francke W. 1994. Synthesis of (3R)-3-hydroxy-2-hexanone, (2R,3R)-2,3-hexanediol and (2S,3R)-2,3-hexanediol, the male sex pheromone of *Hylotrupes bajulus* and *Pyrrhidium sanguineum* (Cerambycidae). *European Journal of Organic Chemistry*: 1211 - 1218.
- Shanley RP, Keena M, Wheeler MM, Leland J, y Hajek AE. 2009. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biological Control* 50: 94-102.
- Silva WD, Millar JG, Hanks LM, Costa CM, Leite MOG, Tonelli M, y Bento JMS. 2018. Interspecific cross-attraction between the south american cerambycid beetles *Cotyclytus curvatus* and *Megacyllene acuta* is averted by minor pheromone components. *Journal of Chemical Ecology*, 44: 268-275.
- Silva WD, Zou Y, Bento JMS, Hanks LM, y millar JG. 2017. Aggregation-sex pheromones and likely pheromones of 11 South American Cerambycid beetles, and partitioning of pheromone channels. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5: 1-9.

## 4.2. TRAPPING OF *Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier) AND OTHER NEOTROPICAL CERAMBYCID BEETLES IN PHEROMONE AND KAIROMONE BAITED TRAPS\*

### 4.2.1. Abstract

The subfamily Cerambycinae, one of the most diverse in longhorn beetles, is well-known for its remarkable chemical parsimony in male-emitted pheromones. Conserved shared structural motifs have been reported in numerous species, sometimes working in combination with plant volatile kairomones. Among other compounds, the most ubiquitous male pheromone in cerambycine species is 3-hydroxyhexan-2-one. We conducted field trials using intercept traps baited with 3-hydroxyhexan-2-one and observed abundant captures of several Neotropical cerambycine species. These were *Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier), *Megacyllene acuta* (Germar), *Compsocerus violaceus* (White) and *Cotylytus curvatus* (Germar) in high numbers; as well as *Chydarteres striatus striatus* (Fabricius) and *Odontocroton flavicauda* (Bates) in smaller numbers. When ethanol was added to the traps, a remarkable increase in the attractiveness of 3-hydroxyhexan-2-one was observed for *R. thoracicus thoracicus* and *M. acuta*. Adding ethanol also resulted in the capture of *Chrysoprasis aurigena* (Germar). Finally, incidental catches in pheromone baited traps of *Trachelissa maculicollis* (Audinet-Serville), *Neoclytus pusillus* (Laporte & Gory), *Achryson unicolor* (Bruch, 1908) and *Achryson surinamum* (Linnaeus), *Megacyllene mellyi* (Chevrolat) and *Thelgetra adustus* (Burmeister) were also observed. Pheromone chemistry has been reported for *C. curvatus*, *M. acuta* and *N. pusillus*, all three producing 3-hydroxyhexan-2-one, and for *C. aurigena* and *A. surinamum*, which produce other compounds. Our findings suggest that the captured species probably produce 3-hydroxyhexan-2-one for their pheromone communication system. Alternatively, they might be “eavesdropping” on the pheromones of other cerambycine species. The probable synergistic effect of ethanol is likely explained from its kairomonal role as a volatile cue for plant stress or ripeness.

**Palabras clave:** Cerambycinae; kairomone-pheromone synergism; 3-hydroxy-2-hexanone; etanol

---

\*Este trabajo se publicó en *Neotropical Entomology*, 51, 386–396 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13744-022-00955-w>

María Eugenia Amorós<sup>1</sup>, Lautaro Lagarde<sup>1</sup>, Hugo Do Carmo<sup>2</sup>, Viviana Heguaburu<sup>2</sup>; Marcela Monné<sup>3</sup>, José Buenahora<sup>4</sup> y Andrés González<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

<sup>2</sup> *Centro Universitario de Paysandú, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay*

<sup>3</sup> *Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil*

<sup>4</sup> *Estación Experimental INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay*

---

#### 4.2.2. Introduction

There has been a remarkable progress in the identification of cerambycid beetle pheromones in the past fifteen years. As new pheromones were discovered, it became evident that cerambycids show a high degree of biosynthetic parsimony of male-emitted sex-aggregation pheromones. The same or similar pheromone components are shared by several species across genera, tribes, and even subfamilies [reviewed by (Hanks, Millar, 2016)].  $\alpha$ -Hydroxyketones and 2,3-alkanediols are the most conserved chemical motifs within the subfamily Cerambycinae, with (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one as the most widespread major or sole pheromone component (Hanks, Millar, 2016). Indeed, this compound has been fully identified or suggested as a pheromone component for cerambycine species belonging to at least 25 genera across 10 tribes (Millar et al., 2019), including several sympatric and synchronic species (Mitchell et al., 2013). For this reason, these compounds have been used to prepare “generic pheromone lures” in the context of cerambycid pheromone studies (Wang, 2017). Research on chemical communication of Neotropical cerambycids also indicate that this hydroxyketone is also used by many species native to the region (Aguirre Gil et al., 2021; Amorós et al., 2020; Silva et al., 2020; Silva et al., 2018; Silva et al., 2017; Silva et al., 2016).

Cerambycids are also known for using plant volatiles as kairomonal cues for resources such as food or refuge. Moreover, since many cerambycid species mate on the same host plants on which the adults and larvae feed, these plant chemical cues may also serve to bring the sexes together (Hanks, Millar, 2016; Wang, 2017). Many cerambycid species are attracted to stressed hosts, so research on host plant attractants has naturally focused on volatiles associated with plant stress. This is the case of ethanol, which is produced by stressed or diseased plants and has been reported to attract many species of wood-boring insects. Indeed, ethanol is commonly used as a general attractant for monitoring and quarantine surveillance programs in forests (Brockerhoff et al., 2006; Fan et al., 2018; Hanks, Millar, 2013; Hanks et al., 2012; Miller et al., 2017). Plant volatile kairomones have also been shown to synergize with pheromones in the

attraction of cerambycids, possibly adding specificity to unspecific pheromone communication systems (reviewed by (Hanks, Millar, 2016; Wang, 2017)).

Over the last few years our group has conducted field trapping experiments specifically targeted to the citrus borer *Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville) (Cerambycidae: Cerambycinae), a species that produces large amounts of (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one likely serving as a sex-aggregation pheromone (Amorós et al., 2020). As a side experiment of our work, we have systematically recorded captures of other native cerambycines in traps baited with generic pheromone lures, and more recently we have added plant kairomone compounds to study potential pheromone-kairomone synergistic effects. We here report these results, which we intend as a contribution to the knowledge of chemical communication systems of native cerambycines in southern South America.

#### **4.2.3. Material and Methods**

*Field experiments* Field trials were performed in three citrus groves (34°48'58.6"S 56°22'53.6"W; 34°38'31.4"S 56°44'23.2"W; 34°37'11.2"S 56°22'02.7"W) and in one peach orchard (34°38'33.5"S 56°43'40.0"W), all located in southern Uruguay. Homemade cross-vane traps with standard design (e.g., Alpha Scents Inc., West Linn, Oregon, USA; ChemTica Internacional SA, San Jose, Costa Rica) were used as trapping devices (black corrugated plastic, panel measures: 74 x 40 cm). Trap panels, funnels and collector basins were coated with Fluon® (Insect-A-Slip, PTFE DISP30, BioQuip Products, Inc) (Graham et al., 2010). Trap basins (adapted Mc Phail traps, 19 cm height, 13 cm diameter) were partially filled with soapy water and salt to kill and preserve captured beetles.

Different trapping setups were laid out during summer and early fall (December to April) in 2015-2016 (season I), 2017-2018 (season II), 2018-2019 (season III), 2019-2020 (season IV). Two trapping experiments were also set up in the 2020-2021 (season V, Experiment Va: December-March; Experiment Vb: March-May). Variables such as



trap height, pheromone dispenser and combinations of attractant volatile stimuli were evaluated throughout the seasons (Table 1). In all cases, the traps were deployed at least 6 m from the plot border and with a separation of at least 20 m between traps. Trap arrangements followed randomized block designs, with each block containing all treatments. Each block was considered a replicate (Table 1). Although merely descriptive, results obtained from isolated monitoring traps are also reported. These were hung individually, one trap per orchard.

Traps were serviced every 15 days in seasons I and II and weekly from season III onward, recording all cerambycid beetles trapped. The treatments were initially assigned randomly to the traps, then rotated when lures were replaced to control for location effects (Table 1). Combined lures were hung as separate dispensers within a trap.

As mentioned, the rationale behind all experiments was the testing of attractants for *Diploschema rotundicolle*. Hence, the tested pheromones were those actually produced by *D. rotundicolle* males (Amorós et al. 2020). The tested kairomones include ethanol, a widespread chemical cue for xylophagous insects, and lemon essential oil due to the preference of *D. rotundicolle* for lemon trees. Further details on stimuli selection, specific pheromone release rates and trap layout details, have been previously reported (Amorós et al., 2020).

*Chemicals* Racemic 3-hydroxyhexan-2-one (hereafter ketol) was purchased from ChemTica International, S.A. (product no longer available, Purity 96.4 %) and Bedoukian Inc (purity 83.1 %). (*R*)-3-Hydroxyhexan-2-one and 2,3-hexanediol (hereafter diol; mixture of four diastereomers) were synthesized according to (Heguaburu et al., 2017) (purity > 99% as determined by NMR spectrometry). Lemon essential oil (hereafter LEO) was kindly provided by Novacore S.A (Paysandú, Uruguay) (pure lemon essential oil obtained through cold pressing with a Brown Oil Extractor).

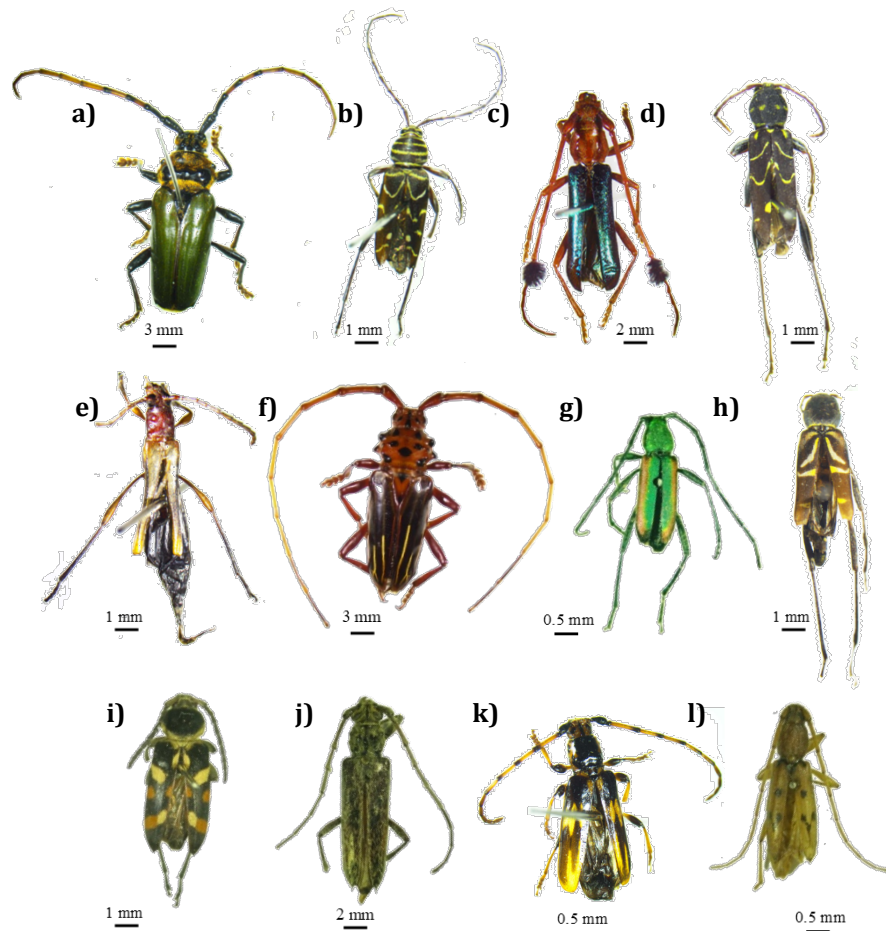
*Insect identification* Identification of captured beetles was carried out in collaboration with a specialist on Neotropical Cerambycidae (MM, Museu Nacional, Universidade

Federal do Rio de Janeiro, Brasil). Comparison with reference specimens from the entomological collection of Facultad de Agronomía (Universidad de la República, Uruguay), as well as online databases and specialized checklists were also used (Barriga-Tuñón, 2009; Bezark, Monné, 2019; Monné, 2021; Monné, Bezark, 2009).

*Statistical analysis* Statistical analyses were exclusively performed to *R. t. thoracicus* catches from seasons II, III, Va and Vb; and for *M. acuta* catches from season Va and Vb. Each experiment and species were analyzed separately. Beetle trap captures (*i.e.* total catches per replicate throughout the season) were subjected to a generalized linear mixed model (GLM) with Poisson distribution. Treatment means were compared using Tukey's HSD test ( $\alpha = 0.05$ ) [multcomp package (Hothorn et al., 2008)]. Due to limitations of GLM models, treatments with zero catches throughout spatial replicates and evaluation dates were not considered in the analysis. Analysis were performed using R statistical software (0.99.892 version – © 2009-2016 RStudio, Inc.) (RStudioTeam, 2015).

#### **4.2.4. Results**

Overall, 13 diurnal species of Cerambycinae belonging to seven tribes were captured (Figure 1) (photograph of *Thelgetra adustus* (Burmeister) is not available). All but one species (*Achryson surinamum* (Linnaeus)) are endemic to the Neotropics (Monné, 2021) (Table 2). Seven species were trapped in higher numbers and are hence included with details in Table 3. Of these, most catches were obtained in pheromone-baited traps, with zero or very low catches in control traps (Table 3). Species caught in the isolated monitoring traps were the same as those obtained in the experiments performed over seasons (Table 3). These results are also reported although no comparisons can be made with control traps.



**Fig. 1** Photographs of representative specimens of cerambycine beetles trapped in pheromone-baited traps. **a)** *Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier); Trachyderini. **b)** *Megacyllene acuta* (Germar); Clytini. **c)** *Compsocerus violaceus* (White); Compsocerini. **d)** *Cotyclytus curvatus* (Germar); Clytini. **e)** *Odontocroton flavicauda* (Bates); Rhinotragini. **f)** *Chydarteres striatus striatus* (Fabricius); Trachyderini. **g)** *Chrysoprasia aurigena* (Germar); Dichophyiini. **h)** *Neoclytus pusillus* (Laporte & Gory); Clytini. **i)** *Megacyllene mellyi* (Chevrolat); Clytini. **j)** *Achryson unicolor* (Bruch); Achrysonini. **k)** *Trachelissa maculicollis* (Audinet-Serville); Trachyderini. **l)** *Achryson surinamum* (Linnaeus); Achrysonini

*Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier) was the most common species attracted to pheromone traps, with more than 350 beetles captured. Almost all catches were obtained in traps baited with the ketol, whereas control traps caught 6 insects throughout the whole study. This result was consistently observed over all seasons and different study sites (Table 3). During seasons II and III, the high numbers of *R. t. thoracicus* captured allowed for a statistical comparison of captures using the pure enantiomer (3*R*) vs. racemic ketol, as well as for lures containing the diol added as a minor component. In both cases, no significant differences were observed with respect to the traps baited only with the racemic ketol (GLM, Tukey's HSD,  $P = 0.424$  and  $P = 0.578$ , respectively). Almost all catches were females, with 358 females and only 2 males obtained throughout the whole study.

Table 1. Materials and methods details of all experiments performed throughout the seasons of study.

	Season	Treatments	Abbreviation	Loading	Dispenser	Hung on	Replicates (traps/treatment)	Trap height <sup>a</sup>	Lure replace (weeks) <sup>c</sup>
Summer	Isolated traps	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Double <sup>b</sup> polyethylene press seal bags (5 x 7 cm) plus a 5 cm cotton wick	Citrus trees	4	60 cm	3
2015-2016	I	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Simple polyethylene press seal bags <sup>b</sup> 5 x 7 cm plus a 5 cm cotton wick	Citrus trees	2	60 cm	2
		2,3-hexanediol (mixture of stereoisomers)	Diol	50 mg/1 mL of isopropanol					
		Isopropanol	Control	1 mL isopropanol					
2017-2018	II	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Double polyethylene press seal bags 5 x 7 cm plus a 5 cm cotton wick	Citrus trees	10	60 cm	2
		( <i>R</i> )-3-hydroxy-2-hexanone	3 <i>R</i> -Ketol	25 mg/1 mL of isopropanol					
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus lemon essential oil	Ketol : LEO	50 mg/1 mL of isopropanol : 10 mL					
		Isopropanol	Control	1 mL isopropanol					
2018-2019	III	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Double polyethylene press seal bags 5 x 7 cm plus a 5 cm cotton wick - separate bags for each stimuli	Citrus, peach and eucalyptus trees	6	60 cm	2
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus 2,3-hexanediol (mixture of stereoisomers)	Ketol : diol	50 mg/1 mL of isopropanol : 25 mg/1 mL of isopropanol					
		Isopropanol	Control	1 mL isopropanol					

2019-2020	IV	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 and 500 mg neat	Eppendorf tube (1 mL) with a perforated cap (1 mm) (low emission rate) - Simple polyethylene press seal bags (5 x 7 cm) plus a 5 cm cotton wick (high emission rate)	Citrus trees : PVC Water pipes next to citrus trees	5	60 cm (low traps) - 180 cm (high traps)	1
		Dispenser materials	Control	x	x				
2020-2021	Va	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	500 mg neat	Simple polyethylene press seal bags (5 x 7 cm) plus a 5 cm cotton wick	PVC Water pipes next to citrus trees	3	180 cm (high traps)	2
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus ethanol 95%	Ketol:EtOH	500 mg neat: 100 mL	Simple polyethylene press seal bags (5 x 7) cm plus a 5 cm cotton wick : Simple press seal bags (10 x 15) cm				
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus lemon essential oil	Ketol:LEO	500 mg neat : 10 mL	Simple polyethylene press seal bags (5 x 7 cm) plus a 5 cm cotton wick : two separate press seal bags (5 x 7) cm plus two 5 cm cotton wick				
		Dispenser materials	Control	x	x				
	Vb	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol:EtOH	500 mg neat	Simple polyethylene press seal bags (5 x 7 cm) plus a 5 cm cotton wick : Simple polyethylene press seal bags (10 x 15 cm)		6		
		Ethanol 95%	EtOH	100 mL	Simple press seal bags 10 x 15 cm				Not needed

Table 2. Distribution of Neotropical cerambycines trapped according to (Monné, 2021).

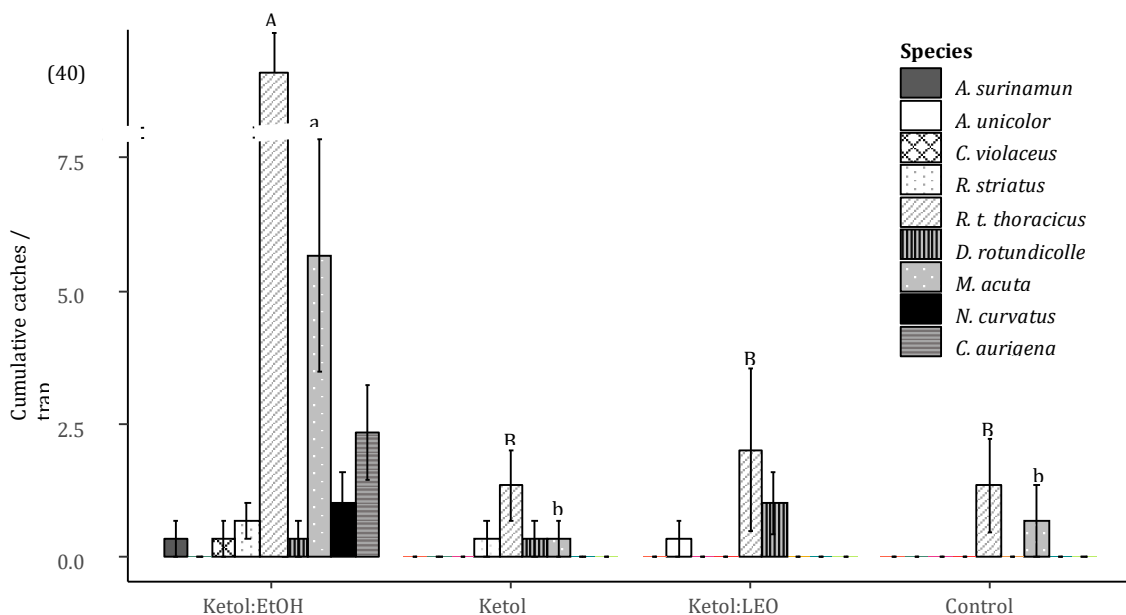
Species	Tribe	Distribution	Total individuals trapped
<i>Retrachydes thoracicus</i> (Olivier, 1790:300)	<u>Trachyderini</u>	Brazil, Paraguay, Bolivia, Argentina, Uruguay	360
<i>Megacyllene acuta</i> (Germar, 1821:170)	Clytini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	71
<i>Compsocerus violaceus</i> (White, 1853)	Compsocerini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	42
<i>Neoclytus curvatus</i> (Germar, 1821:171)	Clytini	Brazil, Paraguay, Argentina, Uruguay	40
<i>Chrysoprasia aurigena</i> (Germar, 1824)	Dichophyiini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	7
<i>Chydarteres striatus</i> (Fabricius, 1787:133)	<u>Trachyderini</u>	Brazil, French Guiana, Paraguay, Argentina, Uruguay	5
<i>Odontocroton flavicauda</i> (Bates, 1873)	Rhinotragini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	4
<i>Achryson unicolor</i> (Bruch, 1908)	Achrysonini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Neoclytus pusillus</i> (Laporte & Gory, 1838)	Clytini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay, Peru	1
<i>Megacyllene mellyi</i> (Chevrolat, 1862)	Clytini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Thelgetra adustus</i> (Burmeister, 1865)	Pteroplatini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Trachelissa maculicollis</i> (Audinet-Serville, 1834)	Trachyderini	Brazil, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Achryson surinamum</i> (Linnaeus, 1767)	Achrysonini	United States, Mexico, Central America, West Indies, South America.	1

a Ground level to collector bucket. b Double press seal bags were made by filling one bag with the tested attractant, then enclosing this bag in another. c Pheromone presence in the dispensers at the end of the field use period was checked through GC-MS.

*Megacyllene acuta* (Germar) (71 individuals), *Compsocerus violaceus* (White) (42 individuals) and *Cotylytus curvatus* (Germar) (38 individuals), were the next most abundant trapped species. Almost all catches were obtained in ketol baited traps (Table 3). A few specimens of *Odontocroton flavicauda* (Bates) (4 individuals) and *Chydarteres striatus striatus* (Fabricius) (5 individuals) were also caught exclusively in ketol baited traps (Table 3).

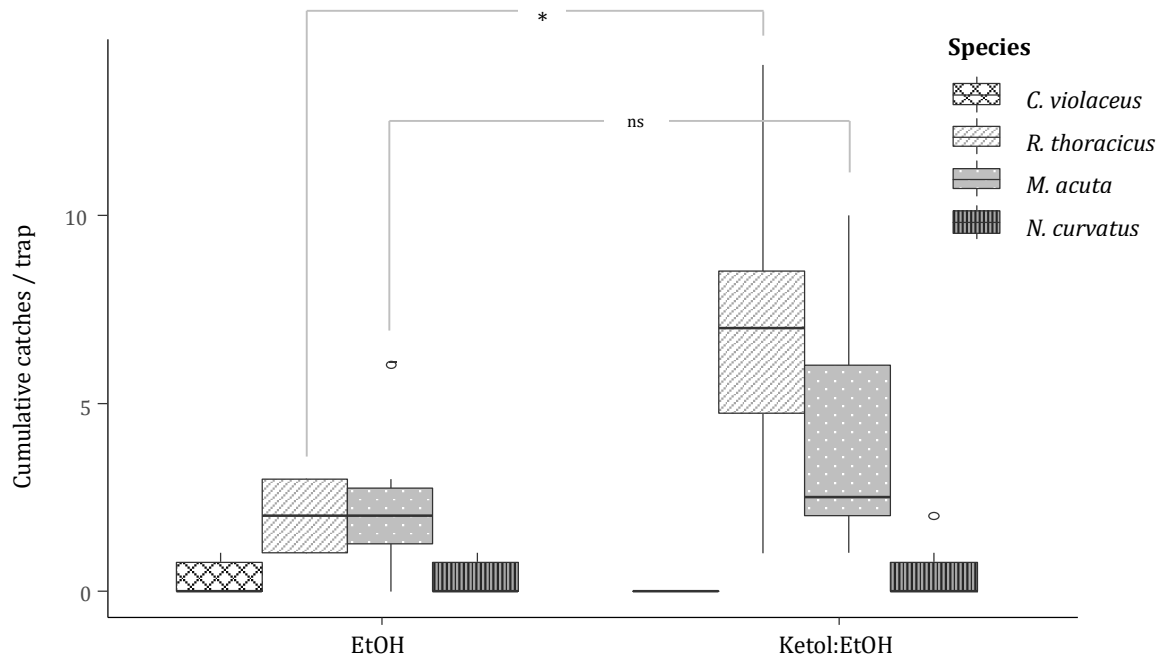
The addition of ethanol to the ketol traps in season V showed a dramatic increase in the numbers of *R. t. thoracicus* and *M. acuta* captures compared to ketol-only baited traps (GLM, Tukey's HSD,  $P < 0.001$  for both species). For *R. t. thoracicus* ketol baited traps collected  $1.3 \pm 1.2$  beetles per trap, whereas ketol plus ethanol trapped  $42.7 \pm 5.7$ ; likewise, for *M. acuta* the results were  $0.3 \pm 0.6$  and  $5.6 \pm 3.8$  respectively (media  $\pm$  stdev of accumulated catches per trap throughout the whole season) (Figure 2). In addition, *Chrysoprasis aurigena* (Germar) was captured for the first time in season V, only trapped in Ketol:EtOH traps (7 individuals) (Table 3).

Experiment Vb showed that *R. t. thoracicus* was significantly more attracted to the ketol:EtOH baited traps compared with traps baited only with ethanol (GLM, Tukey's HSD:  $P = 0.00013$ ; Fig. 3), suggesting a synergistic effect of the combination of stimuli. Conversely, in the case of *M. acuta* the attractivity of the combined ketol:EtOH lures was not significantly different from that of ethanol alone (GLM, Tukey's HSD:  $P = 0.08239$ ) (Figure 3).





**Fig. 2** Field results of Season V - Experiment Va. The bars show the mean catches  $\pm$  stdev (n = 3) for each evaluated attractant from December through March. Different letters indicate significant differences (GLM, Tukey's HSD,  $P < 0.001$ )



**Fig. 3** Field results of Season V - Experiment Vb. Boxplots show the catches over the season for each evaluated attractant (n = 6) from March through May. Asterisks show significant differences (GLM, Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ), ns stands for not significant.

Single catches of *Trachelissa maculicollis* (Audinet-Serville), *Neoclytus pusillus* (Laporte & Gory), *Megacyllene mellyi* (Chevrolat) and *Thelgetra adustus* (Burmeister) were obtained in ketol taps. One *Achryson unicolor* (Bruch) and one *Achryson surinamum* (Linnaeus) in Ketol:LEO and Ketol:EtOH traps, respectively. These were only found in pheromone-baited traps, but they may be regarded as anecdotic due to their low numbers.

Table 3. Total sum of cerambycine beetles captured in pheromone-baited traps in different setups and seasons.

	Monitoring isolated traps <sup>a</sup>	season I: 2015-2016 <sup>b</sup>			season II: 2017-2018 <sup>c</sup>				season III: 2018-2019 <sup>d</sup>		
	Ketol	Ketol	Diol	Control	Ketol	3 <i>R</i> -Ketol	Ketol:LEO	Control	Ketol	Ketol:diol	Control
<i>Retrachydes t. thoracicus</i>	8	5	0	0	23	31	23	0	34	31	2
<i>Megacyllene acuta</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0
<i>Compsocerus violaceus</i>	5	0	4	0	1	0	6	0	17	3	3
<i>Cotyclytus curvatus</i>	17	5	0	0	0	3	3	0	3	1	0
<i>Odontocroton flavicauda</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>Chydarteres s. striatus</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Chrysoprasia aurigena</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	season IV: 2019-2020 <sup>e</sup>		season V: 2020-2021 Experiment Va <sup>f</sup>				season V: 2020-2021 Experiment Vb <sup>g</sup>		Totals		TOTAL
	Ketol	Control	Ketol	Ketol:EtO H	Ketol:LE O	Contro l	Ketol:EtOH	EtOH	All lured treatments	Control s	
<i>Retrachydes t. thoracicus</i>	13	0	4	128	6	4	42	12	354	6	360
<i>Megacyllene acuta</i>	0	0	1	17	0	2	25	14	69	2	71
<i>Compsocerus violaceus</i>	0	0	0	1	0	0	2	0	39	3	42
<i>Cotylytus curvatus</i>	0	0	0	3	0	0	3	2	38	0	38
<i>Odontocroton flavicauda</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
<i>Chydarteres s. striatus</i>	0	0	1	2	0	0	0	0	5	0	5
<i>Chrysoprasia aurigena</i>	0	0	0	7	0	0	0	0	7	0	7

<sup>a</sup> 4 traps; <sup>b</sup> citrus grove - 4 traps/treatment; <sup>c</sup> citrus grove - 10 traps/treatment; <sup>d</sup> citrus and peaches groves - 16 traps/treatment;

<sup>e</sup> citrus grove - 5 traps/treatment; <sup>f</sup> citrus grove - 3 traps/treatment; <sup>g</sup> citrus grove - 6 traps/treatment.

*Ketol* stands for 3-hydroxy-2-hexanone; *Diol* stands for 2,3-hexanediol; *LEO* stands for Lemon essential oil.

#### 4.2.5. Discussion

In this study, 12 species of Neotropical cerambycines were trapped in cross-vane traps baited with different pheromone-plant volatile combinations. Pheromone records are available for five of these species: *M. acuta*, *C. curvatus*, *C. aurigena*, *N. pusillus* and *A. surinamum* (Hanks, Millar, 2016; Silva et al., 2017).

*Retrachydes thoracicus thoracicus* was the species with highest trapping numbers. This is a Neotropical cerambycine that belongs to the Trachyderini tribe, with yet unknown pheromone chemistry. It is highly polyphagous, with records from various host plants (Bentancourt, Scatoni, 2010; Monné, 2021), including fruit and forestry crops such as eucalyptus, with some potential for economic damage (Bentancourt, Scatoni, 2010; Lindenberg Martins Mesquita et al., 2017; Monné et al., 2002). It is considered a pest of plants of the families Fabaceae (Costa et al., 2019), Moraceae, Ulmaceae (Di Lorio, 1997) and Salicaceae (Machado et al., 2012). The fact that mostly females were trapped suggests that females might be the more active sex, or that the species presents a biased sex ratio. Similar results were obtained for another cerambycine, *Diploschema rotundicolle*, in our previous studies (Amorós et al., 2020). Regarding the knowledge of the chemical communication system in species of the Trachyderini tribe, reports are available for four species. 3-Hydroxyhexan-2-one, the ketol in our study, has been identified in *Batyle suturalis* (Say) and *Tragidion armatum* (LeConte) (Hanks, Millar, 2016). Silva et al. reported field trapping of *Chydarteres dimidiatus dimidiatus* (Fabricius) and *Trachyderes succinctus duponti* (Aurivillius) in traps with racemic ketol and racemic 2-methylbutan-1-ol (Silva et al., 2018). These results suggest that the ketol may be an important compound in the pheromone communication of species within this tribe. We also observed catches of another trachyderini species, *C. striatus striatus*, all of them in traps baited with ketol (Table 3). Even though pheromone collection and analysis have not been yet reported for *R. t. thoracicus*, the consistent attraction of adults to the ketol strongly suggests that this compound is an important component of the chemical communication system in this species. Millar et al. (2017, 2018) discussed the value of field screening bioassays as

tools for initiating research on the chemical ecology of cerambycid beetles. Specifically, chemicals or blends of chemicals that attract cerambycid species in the field are likely pheromone components of these species (Millar et al., 2018a; Millar et al., 2018b). This seems logical and highlights the value of conducting screening studies such as this one, given the difficulty of collecting or raising live cerambycid adults in enough numbers for volatile collections in the laboratory.

When ethanol was added as a potential plant kairomone to the traps, we observed a remarkable increase in *R. t. thoracicus* catches, suggesting a synergistic effect of ethanol and the ketol in the attraction of this species. Ethanol is produced by stressed or diseased plants, or by woody plants that are long dead and decaying, so it is not surprising that ethanol attracts many species of hard-wood boring insects. Consistent with their attraction to ethanol, some cerambycid species whose larvae develop in deciduous woody plants are attracted to fermenting molasses or sugar solutions. It also has been suggested that fermenting baits might attract cerambycids because they mimic the volatiles from fermenting sap on which adult beetles feed, rather than volatiles from larval hosts (reviewed by (Wang, 2017)). As it has been mentioned, *R. t. thoracicus* is highly polyphagous and has been reported both on healthy as well as decaying woody plants. The adults also visit fruits, and attraction to fermenting lures has been reported (Bentancourt, Scatoni, 2010; Bruhn, Beltrame, 1980; Holdefer Woldan, 2007; Lindenberg Martins Mesquita et al., 2017). In addition to a potential role as a cue for adult or larval feeding resources, the ketol-ethanol blend might provide the insect with a mechanism to avoid cross-attraction with other sympatric and synchronic species, in the context of shared pheromone compounds, as is the case in the subfamily (reviewed by (Wang, 2017)).

*Compsocerus violaceus* (tribe Compsocerini) was another commonly trapped species which lacks reports on pheromone chemistry. In line with our results, Silva et al. have reported field catches of *C. violaceus* with racemic ketol and racemic 2-methylbutan-1-ol (Silva et al., 2018).

*Megacyllene acuta* and *C. curvatus*, belong to the Clytine tribe, in which (3*R*)-ketol has been identified as an important or even sole component of male-emitted pheromones in Neotropical species (Silva et al., 2017). Pheromone chemistry reports are available for these two species: Silva et al. reported that *C. curvatus* males emit exclusively (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one, whereas *M. acuta* produces the same compound along with lesser amounts of (2*S*,3*S*)-2,3-hexanediol and (*S*)-2-methylbutan-1-ol (Silva et al., 2018). Another Clytine species, *N. pusillus*, has been shown to emit exclusively the ketol (Silva et al., 2017). We obtained one capture of this species in ketol traps.

*Megacyllene acuta* was strongly attracted to Ketol:EtOH and ethanol alone, without significant differences between both treatments. Hence, in this case there does not seem to be a synergistic effect of the mixture in the attraction. This species is known to visit flowers and feed on rotting fruit (Martins,Galileo, 2011), and poses a threat as an invasive species in other regions of the world because their larvae are easily transported overseas in wooden cratings (Duffy, 1953). Along with *C. curvatus* larvae, *M. acuta* can cause economic damage to fruit trees such as apple, pear, quince (Rosaceae), avocado (Lauraceae), and fig (Moraceae) (Martins,Galileo, 2011), so finding attractants may be relevant for surveillance programs. As mentioned for *R. t. thoracicus*, attraction to ethanol may be explained by ecological factors, and pheromone specificity may rely on minor compounds (Silva et al., 2018).

In our experiments, *C. aurigena* was only captured in Ketol:EtOH traps early in the summer of season V. Although no pheromone chemistry has been reported for *C. aurigena*, Silva et al. reported field catches in pheromone traps (blends of ketol plus 1-(1*H*-pyrrol-2-yl)-1,2-propanedione and ketol plus 1-(1*H*-pyrrol-2-yl)-1,2-propanedione plus 3-methylthioprop-1-ol) (Silva et al., 2017). Their follow up experiments, however, revealed that the adults do not produce either of these compounds. While our results suggest that ethanol may be important in attracting this species, no catches were obtained in traps baited with ethanol alone, so further experiments possibly targeting different flight periods are needed.

Species trapped in lesser amounts in ketol-baited traps include *O. flavicauda*, which belongs to the Rhinotragini tribe, with no reports of pheromone chemistry. *Trachelissa maculicollis*, *M. mellyi*, *A. unicolor*, *A. surinamum* may be considered incidental catches, or they may be the result of low populations of these species in the agroecosystems in which we based our study. *Achryson surinamum* is a widely distributed species that has been reported to produce anti-2,3-octanediol and traces of 2-methylbutan-1-ol (Hanks, Millar, 2016). In our study, one individual of *A. unicolor* and one of *A. surinamum* were caught in Ketol:LEO and Ketol:EtOH traps, with no other *Achryson* species caught in any of our experiments.

It is likely that the species captured in our study either use ketol in their chemical communication systems, or that they “eavesdrop” on the pheromone communication system of other guild members. This may serve as an efficient method of finding suitable hosts for mating and oviposition, as has been reported for other species (Hanks, Millar, 2013). Our results open new possibilities for trapping and surveillance devices for these potentially damaging cerambycids. Furthermore, further information about the chemical ecology of Neotropical cerambycid beetles is provided, again highlighting the remarkable parsimony in pheromone chemistry among cerambycines from all over the world.

#### **4.2.6. Bibliography**

Aguirre Gil OJ et al. (2021) Screening known Cerambycidae pheromones for activity with the Peruvian fauna. Agr Forest Entomol. doi:<https://doi.org/10.1111/afe.12454>

Amorós ME, Lagarde L, Do Carmo H, Heguaburu V, González A (2020) Pheromone chemistry of the citrus borer, *Diploschema rotundicollis* (Coleoptera:

Cerambycidae). *J Chem Ecol.* 46:809-819 doi:DOI 10.1007/s10886-020-01203-4

Barriga-Tuñón, J. E. (2009) Coleoptera Neotropical [http://www.coleoptera-neotropical.org/paginas/2\\_PAISES/Uruguay/Cerambycidae/cerambycinae-uru.html](http://www.coleoptera-neotropical.org/paginas/2_PAISES/Uruguay/Cerambycidae/cerambycinae-uru.html). Accessed June 2019.

Bentancourt CM, Scatoni IB (2010) Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. 3 edn. Facultad de Agronomía, Montevideo

Bezark LG, Monné MA (2019) Checklist of the Oxypeltidae, Vesperidae, Disteniidae and Cerambycidae, (Coleoptera) of the Western Hemisphere 2019 Edition (updated through 31 December 2018).

Brockerhoff EG, Jones DC, Kimberley MO, Suckling DM, Donaldson T (2006) Nationwide survey for invasive wood-boring and bark beetles (Coleoptera) using traps baited with pheromones and kairomones. *For Ecol Manag.* 228:234-240

Bruhn JC, Beltrame JBI (1980) Los taladros *Praxithea derourei* Chabrilac, *Trachyderes thoracicus* (Olivier) y *T. striatus* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae) y su



- relación con los cultivos de manzanas en Uruguay. *Investigaciones Agronomicas* 1:11-14
- Costa MKC, Diodato MA, Fernandes JPP, Santos JPS (2019) Insetos nocivos a *Prosopis* sp. no Rio Grande do Norte (Brasil) e Piura (Peru). *Agrop Cient Semiárido* 15:158-116
- Di Lorio ORR (1997) Plantas hospedadoras de Cerambycidae (Coleoptera) en el Espinal periéstépico y en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 44(3)/45(1):159-165
- Duffy EAJ (1953) A monograph of the immature stages of British and imported timber beetles (Cerambycidae). Brit. Mus. (Nat. Hist.), London
- Fan J et al. (2018) Multi-component blends for trapping native and exotic longhorn beetles at potential points-of-entry and in forests. *J Pest Sci.* doi:<https://doi.org/10.1007/s10340-018-0997-6>
- Graham EE, Mitchell RF, Reagel PF, Barbour JD, Millar JG, Hanks LM (2010) Treating panel traps with a fluoropolymer enhances their efficiency in capturing cerambycid beetles. *J Econ Entomol.* 103:641-647
- Hanks LM, Millar JG (2013) Field bioassays of cerambycid pheromones reveal widespread parsimony of pheromone structures, enhancement by host plant volatiles, and antagonism by components from heterospecifics. *Chemoecology* 23:21-44
- Hanks LM, Millar JG (2016) Sex and aggregation-sex pheromones of cerambycid beetles: Basic science and practical applications. *J Chem Ecol.* 42:631-654 doi:[10.1007/s10886-016-0733-8](https://doi.org/10.1007/s10886-016-0733-8)
- Hanks LM, Millar JG, Mongold-Diers JA, Wong JCH, Meier LR, Reagel PF, Mitchell RF (2012) Using blends of cerambycid beetle pheromones and host plant volatiles

to simultaneously attract a diversity of cerambycid species Canadian Journal of Forest Research 42:1050-1059

Heguaburu V, do Carmo H, Parpal F, Amorós ME, González A (2017) Synthesis of aggregation pheromone components of cerambycid species through  $\alpha$ -hydroxylation of alkylketones Tetrahedron Letters 58:1738-1741

Holdefer Woldan DR (2007) Análise faunística de cerambycidae (Coleoptera) em duas situações florísticas no município de União da Vitória – Paraná. UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ

Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous Inference in General Parametric Models Biometrical J. 50:346–363

Lindemberg Martins Mesquita A, Teles Portela Policarpo G, Emilson Cardoso J, Cavalcante de Souza Mota M (2017) Novas Ocorrências de Cerambycidae

(Insecta:Coleoptera) em cajueiro no Brasil e recomendações de manejo vol  
Comunicado Técnico, 231. Embrapa Agroindústria Tropical

Machado VS, Botero JP, Carelli A, Cupello M, Quintino HY, Simões MVP (2012) Host  
plants of Cerambycidae and Vesperidae (Coleoptera, Chrysomeloidea) from  
South America. *Revista Brasileira de Entomologia* 56:186-198

Martins UR, Galileo MHM (2011) Tribo Clytini Mulsant, 1839. In: Martins UR GM (ed)  
Cerambycidae Sul-Americanos (Coleoptera): taxonomia, vol 12. Sociedade  
Brasileira de Entomologia, São Paulo, pp 8-64

Millar JG et al. (2018) Identifying possible pheromones of cerambycid beetles by field  
testing known pheromone components in four widely separated regions of the  
United States. *J Econ Entomol.* 111:252-259 doi:doi: 10.1093/jee/tox31

Millar JG et al. (2017) Identifying possible pheromones of cerambycid beetles by field  
testing known pheromone components in four widely separated regions of the  
United States. *J Econ Entomol.* 111(1), 2018, 252–259

Millar JG, Richards AB, Halloran S, Zou Y, Boyd EA, Quigley KN, Hanks LM (2019)  
Pheromone identification by proxy: identification of aggregation-sex  
pheromones of North American cerambycid beetles as a strategy to identify  
pheromones of invasive Asian congeners. *J Pest Sci.* 92:213–220  
doi:<https://doi.org/10.1007/s10340-018-0962-4>

Miller DR, Crowe CM, Mayo PD, Reid LS, Silk PJ, Sweeney JD (2017) Interactions  
between ethanol, syn-2,3-hexanediol, 3-hydroxyhexan-2-one, and 3-

- hydroxyoctan-2-one lures on trap catches of hardwood longhorn beetles in Southeastern United States. *J Econ Entomol.* 1-10 doi:doi: 10.1093/jee/tox188
- Mitchell RF, Millar JG, Hanks LM (2013) Blends of (R)-3-hydroxyhexan-2-one and alkan-2-ones identified as potential pheromones produced by three species of cerambycid beetles *Chemoecology* 23:121-127
- Monné M (2021) Catalogue of the Cerambycidae (Coleoptera) of the Neotropical Region. Part I. Subfamily Cerambycinae. Available from [cerambyxcat@com](mailto:cerambyxcat@com)/Part 1 Cerambycinae. pdf. Accessed August 2021
- Monné MA, Bezark L (2009) Checklist of the Cerambycidae, or longhorned beetles (Coleoptera) of the Western Hemisphere. <https://www.cerambycoidea.com/titles/monnebezark2009.pdf>.
- Monné MM, Bianchi M, Sánchez A, Escudero R (2002) Cerambícidos (Coleoptera) que atacan *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus grandis* en Uruguay. *Agrociencia* 6:63-68
- RStudioTeam (2015) RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Boston, MA Patent
- Silva WD, Hanks LM, Alvarez JCS, Madalon FZ, Bento JMS, Bello JE, Millar JG (2020) Variations on a theme: two structural motifs create species-specific pheromone channels for multiple species of South American cerambycid

beetles Insects: Special Issue "Ecology and Management of Invasive Insects in Forest Ecosystems" 11 doi:doi:10.3390/insects11040222

Silva WD, Millar JG, Hanks LM, Bento JMS (2016) 10-methyldodecanal, a novel attractant pheromone produced by males of the south american cerambycid beetle *Eburodacrys vittata* vol 11. doi:10.1371/journal.pone.0160727

Silva WD, Millar JG, Hanks LM, Costa CM, Leite MOG, Tonelli M, Bento JMS (2018) Interspecific cross-attraction between the south american cerambycid beetles *Cotyclytus curvatus* and *Megacyllene acuta* is averted by minor pheromone components. *J Chem Ecol.* 44:268-275 doi:<https://doi.org/10.1007/s10886-018-0933-5>

Silva WD, Zou Y, Bento JMS, Hanks LM, millar JG (2017) Aggregation-sex pheromones and likely pheromones of 11 South American Cerambycid beetles, and partitioning of pheromone channels. *Front Ecol Evol.* 5:1-9

Wang Q (2017) *Cerambycidae of the world: biology and pest management.* Cerambycidae of the world: biology and pest management. CRC Press, Boca Raton, Florida

## 5. MONITOREO Y ESTUDIO DE ASPECTOS BIO-ECOLÓGICOS DEL TALADRO DE LOS CÍTRICOS, *Diploschema rotundicolle* (COLEOPTERA:CERAMBYCIDAE), EN QUINTAS DE LIMÓN DEL SUR DE URUGUAY\*

### 5.1. RESUMEN

El taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle*, es un cerambícido sudamericano considerado plaga primaria de los cítricos en Uruguay. Se observan explosiones poblacionales focalizadas, particularmente en cultivo de limón. Las larvas se alimentan de la madera, causando un deterioro en los árboles que impacta en la productividad y valor de las quintas. El manejo recae en el control cultural, el cual es costoso e ineficiente parcialmente por la realización fuera de tiempo de las intervenciones. No existen herramientas de monitoreo de adultos, los cuales tienen hábitos nocturnos, ni información sobre su período de vuelo en Uruguay. Trabajando en quintas de limón en el sur de Uruguay durante cuatro temporadas (2015-2020), relevamos el vuelo de adultos en trampas de panel cruzado acopladas a luz blanca, y registramos emergencia de adultos mediante enmallado de árboles. Asimismo, se registró la actividad larval a lo largo del año y el daño de oviposición. Finalmente, se revisaron cortezas de cortinas de *Eucalyptus globulus* como refugio de adultos. En todas las temporadas, el vuelo y la emergencia de adultos sucedió entre enero y abril, con un máximo a mediados de febrero. En general, el daño de oviposición se observó inmediatamente después del pico de mayores capturas. Se capturaron mayormente hembras en las trampas de luz y mallas. Se registró actividad larval durante todo el año. Se encontraron adultos refugiados bajo las cortezas de *E. globulus*; en este caso mayormente machos aislados o parejas hembra-macho. Este trabajo provee una herramienta de monitoreo para el vuelo de adultos y aporta conocimiento sobre aspectos bio-ecológicos de *D. rotundicolle* en Uruguay.

**Palabras clave:** Manejo Integrado de Plagas; trampas de luz; Cerambícidos; Cerambicinos Neotropicales.

---

\* Este capítulo fue publicado en *Agrociencia* Uruguay, 26, (2) (2022). Article 1064.  
DOI:10.31285/AGRO.26.1064

Autores : María Eugenia Amorós<sup>1</sup>, Lautaro Lagarde<sup>1</sup>, Valentina Poloni<sup>1</sup>, Andrés González<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

## 5.2. INTRODUCCIÓN

*Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville, 1834) (Coleoptera: Cerambycidae) es una plaga de cítricos de América del Sur distribuida por las regiones centro-sur de Brasil, Argentina y Uruguay (Machado y Filho, 1999). Los adultos son alargados (25-40 mm x 8-10 mm) y se caracterizan por tener élitros de color marrón claro con un borde continuo de color marrón oscuro, cabeza, pronoto, antenas y patas de color marrón oscuro (Faria et al., 1987). Los adultos son nocturnos, la hembra pone huevos en el ápice de las ramas sobre brotes jóvenes y axilas de las hojas (Machado y Berti Filho, 2006). Después de la eclosión del huevo, las larvas perforan la epidermis y una vez en el tejido leñoso cavan galerías longitudinales que se dirigen a ramas más gruesas, llegando generalmente al tronco principal (Machado et al., 1991). Al final de la etapa larval, las larvas preparan una cámara pupal con una abertura de salida para que salga el adulto (Faria et al., 1987).

En áreas subtropicales -Sao Paulo, Brasil-, se reportó actividad larval ininterrumpido por 8 a 10 meses, y los adultos se observan de noviembre a abril (Faria et al., 1987). En las regiones templadas -Santa Catarina, RS, Brasil- la actividad larvaria se registró de enero a octubre del segundo año, alcanzando hasta los 20-22 meses, sin actividad en los períodos invernales (Link y Corrêa Costa, 1994). En estas condiciones, los adultos se reportaron activos de noviembre a enero. En Pelotas, RS más cerca de Uruguay, se reportaron adultos en febrero y marzo (Biezanko y Bosq, 1956). No existen registros de aspectos biológicos de esta plaga en las condiciones climatológicas de Uruguay.

Actualmente *D. rotundicolle* es considerada una plaga primaria para los cítricos en Uruguay (Bentancourt y Scatoni, 2010). En los últimos años, el manejo ineficiente de esta plaga ha provocado serios brotes poblacionales focalizados, particularmente en los huertos de limoneros del sur (datos no publicados). El deterioro que provocan los niveles de infestación graves es actualmente una de las limitantes en la vida útil de un huerto y tiene un impacto directo en su productividad y valor patrimonial. La



alimentación de las larvas resulta en una baja de los rendimientos, debilitamiento de los árboles y daños indirectos debido a otros organismos invasores de galerías vacías (Machado y Filho, 1999).

El control de este taladro es extremadamente dificultoso ya que las larvas están protegidas dentro de la madera (Shanley et al., 2009). El uso de insecticidas también está muy restringido en los cultivos de cítricos destinados al consumo de fruta fresca. Por lo tanto, la estrategia de manejo actual para este insecto se basa casi exclusivamente en el control cultural, que consiste en la poda de ramas con evidencia de daño por oviposición. Esta estrategia ha demostrado ser costosa e ineficaz, en parte debido a la imprecisión en el momento de las intervenciones. Hasta el momento no hay disponibles herramientas de monitoreo para adultos.

El objetivo de este estudio fue determinar el período de vuelo de adultos en las condiciones prevalcientes en el sur de Uruguay, y evaluar un dispositivo de monitoreo de adultos.

### **5.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizaron estudios de campo en cuatro quintas de cítricos ubicados en San José (Kiyú, 2 quintas 34°42'1"S 56°43'37"W; 34°25'59.8"S 57°40'56.3"W); Montevideo (El Espinillo, 34°48'58.6"S 56°22'53.6"W); y Canelones (Las Brujas, 34°37'13.1"S 56°21'18.5"O), todos en el sur de Uruguay. Realizamos ensayos de diciembre a abril, en cuatro temporadas (2015-2016, 2017-2018, 2018-2019 y 2019-2020). En Kiyú se trabajó en una quinta "Quinta 20" en 2015-2016, y para las otras temporadas se trabajó en otra quinta cercana (a 4,7 Km de distancia) "Quinta 7".

Como dispositivos de captura se utilizaron trampas caseras de paletas cruzadas con diseño estándar (p. ej., Alpha Scents Inc., West Linn, Oregón, EE. UU.; ChemTica Internacional SA, San José, Costa Rica) (paneles de plástico corrugado negro o chapa, medidas: 74 x 40 cm) y acoplados en la parte inferior a recipientes colectores de

plástico. Estos se llenaron parcialmente con agua jabonosa y sal para matar y preservar los escarabajos capturados. Se acoplaron a las trampas tubos fluorescentes blancos (60 cm; 380-750 nm – blanco frío, 6500 K) o dispositivos de luz LED (50 cm por veleta; LED 5730, 120 LED/m - blanco frío, 6000-6500 K).

Las poblaciones fueron monitoreadas con 1 a 3 trampas/árbol dependiendo del lugar y año. Las trampas se colocaron dentro de parcelas de cítricos de 1 ha, a 6 m de distancia del borde de la parcela y con una separación de al menos 20 m entre trampas. Se colgaron de las ramas de los árboles o de un soporte de PVC, con una altura de 60 cm desde el suelo hasta el recipiente colector.

Se instalaron mallas alrededor de árboles altamente infestados elegidos a partir de la observación visual de abundante aserrín en su base. Los árboles fueron podados parcialmente y la malla cubrió toda la estructura del árbol, y esta fue atada alrededor del tronco a nivel del suelo. A lo largo de las temporadas se cubrieron con malla un total de 25 árboles entre todas las quintas estudiadas.

Las trampas y los árboles envueltos se revisaron semanalmente desde principios del verano (mediados de diciembre) hasta principios del otoño (abril).

Cuando presentes, las cortinas rompeviento de *Eucalyptus globulus* que rodeaban las parcelas de cítricos se revisaron en busca de adultos refugiados de *D. rotundicollis*. Esto se realizó extrayendo cortezas sueltas y buscando los adultos debajo de ellas. Los árboles que rodean al menos cuatro bloques de cítricos fueron revisados en cada fecha de monitoreo.

Durante todo el año se realizó una observación visual mensual de la actividad larvaria, registrada como presencia de aserrín fresco en la base de los árboles. Además, se registró la observación visual del daño por oviposición. El daño se observa como un marchitamiento característico del ápice de las ramas en sus primeros 20 centímetros aproximadamente.

Se obtuvieron registros meteorológicos de la Estación Experimental INIA Las Brujas, Canelones Uruguay.

*Análisis estadístico:* Las comparaciones de las capturas de machos y hembras en trampas de luz, emergencia en árboles enmallados y extracción de cortezas de cortavientos, se realizaron con pruebas de Chi-cuadrado.

Los datos incluidos en el artículo se procesaron para mayor claridad. Los datos sin procesar están disponibles a pedido.

#### **5.4. RESULTADOS**

Las trampas de luz mostraron un buen desempeño para monitorear el vuelo de adultos de *D. rotundicollis*. En todas las quintas y temporadas de estudio se observaron capturas de adultos entre fines de enero y abril. El pico de capturas más altas se observó a mediados de febrero, excepto en la temporada 2015-2016 en la que se registraron capturas más altas a fines de febrero (Figuras 1 y 2). Se observaron daños de oviposición poco después del pico de capturas más altas: 2015-2016: 16 de febrero; 2017-2018: 19 de febrero; 2018-2019: 20 de febrero; y 2019-2020: 27 de marzo.

Los resultados de las temporadas 2015-2016 podrían tener ligeras imprecisiones temporales causadas por las fechas de monitoreo.

En general, la temporada 2019-2020 mostró capturas más bajas en comparación con temporadas anteriores (Figura 1), lo que puede explicarse por una temporada de verano seca con bajas precipitaciones (Figura 1 en Material complementario). En 2018-2019 se monitorearon tres quintas y los resultados muestran ligeras diferencias en el inicio de vuelos de adultos entre ellas (Figura 2).

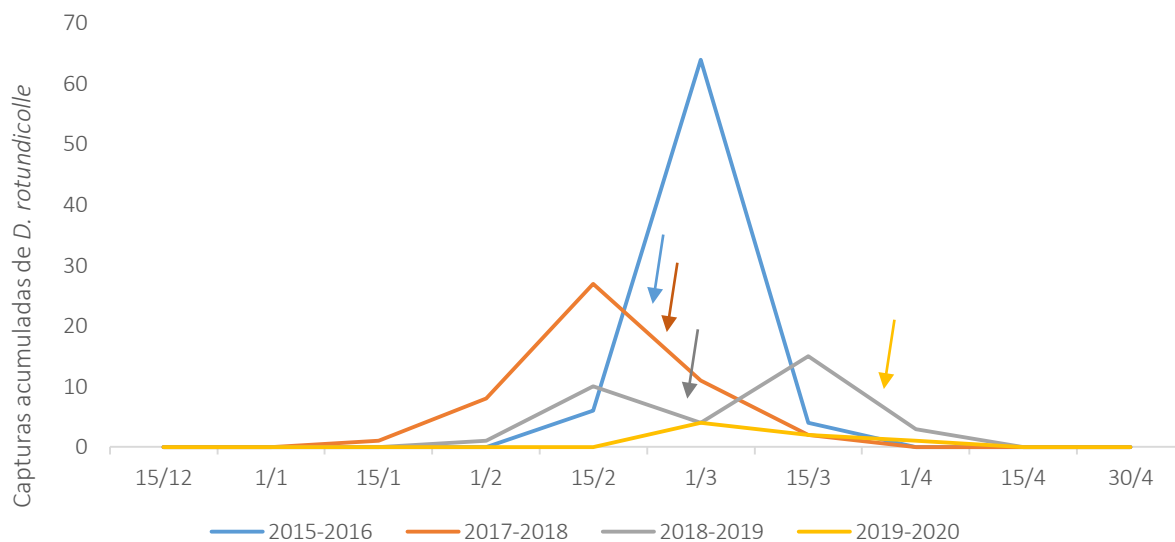


Figura 1. Período de vuelo de adultos de *Diploschema rotundicolle* en las quintas de Kiyú, durante las cuatro temporadas estudiadas (2015-2020). Las flechas indican las fechas de observación de daño de oviposición. Las capturas totales no son comparables dado que los dispositivos evaluados (mallas y trampas de luz) en cada quinta y temporada no fueron equivalentes. Se muestran las capturas acumuladas para una mejor observación del pico.

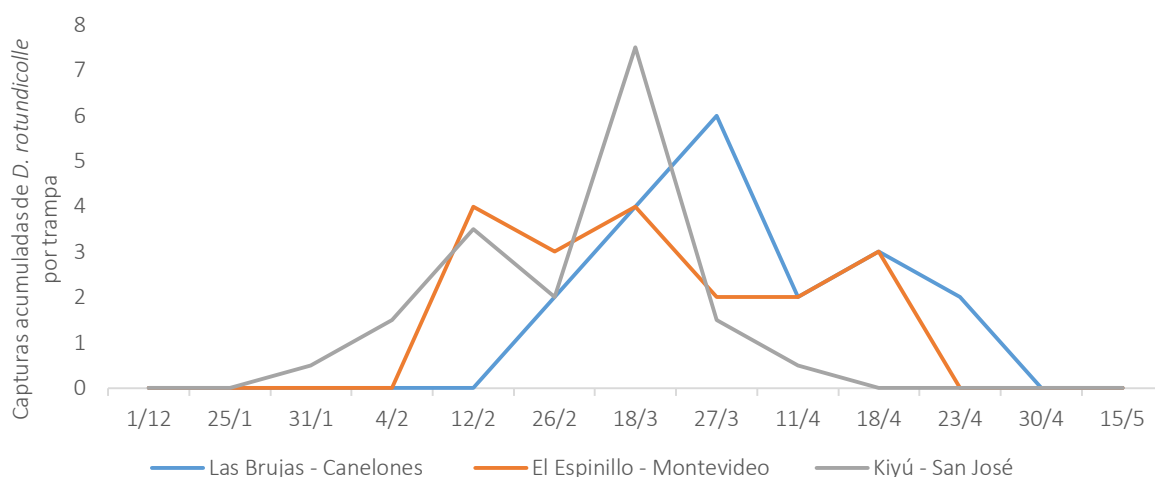


Figura 2. Capturas acumuladas de adultos de *Diploschema rotundicolle* por trampa en tres quintas en la temporada 2018-2019.

Cantidades significativamente más altas de hembras quedaron atrapadas en trampas de luz en todas las estaciones (5,2 hembras por macho;  $P < 0,00001$ ) (Figura 3A). Además, la emergencia sobre árboles cubiertos de malla también mostró una mayor emergencia de hembras (1,8 hembras por macho;  $P < 0,0001$ ) (Figura 3B). Emergió una media de  $6,8 \pm 5,4$  adultos por árbol.

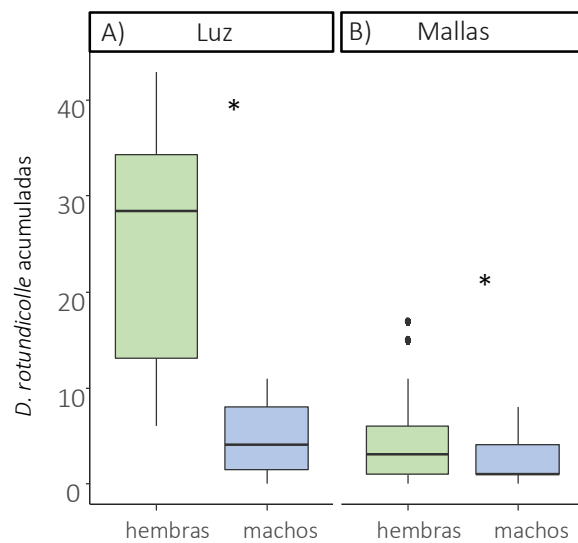


Figura 3. Comparación de capturas de hembras y machos en trampas de luz (A) y emergencia en mallas (B). Los datos se muestran como diagramas de cajas (boxplots) y corresponden a las capturas acumuladas en todas las quintas y todas las temporadas. Los asteriscos indican diferencias significativas (Chi-square test,  $P < 0,05$ ).

Durante la temporada de vuelo, se encontraron adultos debajo de las cortezas sueltas de las cortinas de *Eucalyptus globulus* que rodean las parcelas de cítricos, particularmente en temporadas y quintas con altos niveles de población. Los adultos se encontraron como machos individuales o como una sola pareja macho-hembra, lo que sugiere que el refugio durante el día ocurre sin un comportamiento gregario. En general, se encontraron más machos que hembras bajo las cortezas de *E. globulus* (Figura 4).

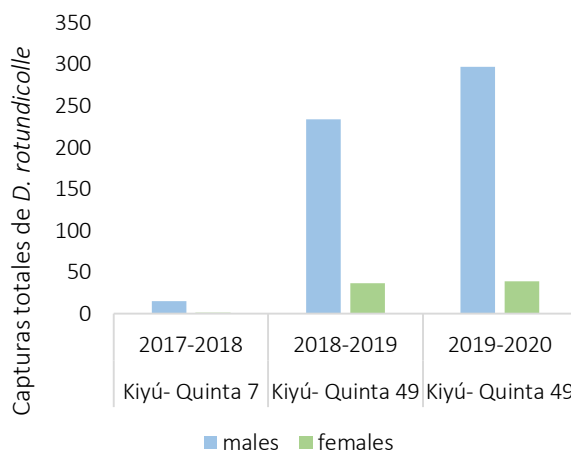


Figura 4. Extracción de *D. rotundicolle* bajo las cortezas sueltas de las cortinas de *Eucalyptus globulus* perimetrales a los cuadros de citrus. Los asteriscos indican diferencias significativas (Chi-square test,  $P < 0,05$ ).

La observación visual de la actividad larvaria se registró durante todo el año. Los daños no se distribuyeron uniformemente en el huerto, sino que se concentraron en determinadas parcelas.

Todas las figuras de material suplementario se encuentran en el anexo III.

## 5.5. DISCUSIÓN

En el marco de un manejo integrado de plagas el monitoreo de las poblaciones de insectos en el espacio y el tiempo es de suma importancia para tomar decisiones informadas sobre las medidas de control (Horton et. al 1999). Los resultados de este estudio mostraron que las trampas de panel cruzadas colgadas en altura demostraron ser una herramienta eficaz para monitorear adultos de *D. rotundicolle*. El vuelo se observó consistentemente entre enero y abril en las condiciones del sur de Uruguay, con un pico poblacional entre mediados y fines de febrero. Se observó la emergencia de adultos de árboles cubiertos de malla en el mismo período que las capturas de

adultos en trampas de luz. Las mallas pueden ser un método alternativo para detectar el período de emergencia de adultos, aunque es una metodología más disruptiva y laboriosa.

El daño por oviposición se observó generalmente cerca o poco después del pico de capturas más altas en las trampas de luz, entre mediados y finales de febrero. Sin embargo, en la temporada 2019-2020 se observó daño por oviposición aproximadamente un mes después del período habitual registrado. Esta temporada, también caracterizada por bajas capturas con trampas, fue particularmente seca, lo que puede haber causado una mayor desecación de los huevos o un retraso en la oviposición. También se observó una humedad relativa ligeramente más baja y temperaturas más altas durante esta temporada en comparación con los veranos 2017-2018 y 2018-2019 (material complementario, figuras 1 y 2).

Se observó cierta variabilidad entre temporadas y quintas. Destacan especialmente los resultados obtenidos en la temporada 2019-2020 en las tres quintas estudiadas de Kiyú y Las Brujas, separadas por menos de 50 km. En esta temporada se observó que el inicio del vuelo de adultos se diferenció en un intervalo de alrededor de un mes entre quintas. Esta brecha en el comienzo del período de vuelo puede ser extremadamente relevante para la selección del momento apropiado de intervenciones de control cultural y sugiere que cada quinta debe monitorearse de forma independiente para maximizar la efectividad de la poda. De hecho, nuestras observaciones indican que la poda puede optimizarse significativamente si se planifica de acuerdo con la información de monitoreo de adultos en lugar de la observación visual de marchitamiento de ramas, cuando las larvas ya pueden haber migrado a ramas más centrales y no pueden ser retiradas al podar.

En este estudio se trabajó con 1-3 trampas por cuadro de cítricos, número de trampas que resultó suficiente en años y cuadros de mayor población; cuando surgen situaciones problemáticas y hay necesidad de intervenciones más fuertes. Cabe mencionar, sin embargo, que se obtuvieron peores resultados en épocas de baja

población, en las que se podrían haber obtenido resultados más concluyentes con un mayor número de trampas por parcela. Sin embargo, 1-3 trampas fueron suficientes para generar un conocimiento general del período de vuelo, suficiente para la toma de decisiones de gestión a escala de predio. Es posible que se necesiten más estudios para definir la estrategia de monitoreo en situaciones de densidades de población más bajas.

El hecho de que se hayan capturado más hembras en las trampas de luz puede deberse a una proporción de sexos desequilibrada, como se observa en la emergencia de árboles cubiertos de malla. Otra hipótesis es que las hembras son el sexo más móvil y quedan atrapadas en su búsqueda de sitios de oviposición. De hecho, la captura de más machos debajo del refugio de cortezas sueltas de las cortinas de *E. globulus*, muy cerca de los árboles de cítricos, está en línea con esta última hipótesis. Es posible que el cortejo y el apareamiento se lleven a cabo dentro de los sitios de refugio, después de lo cual las hembras despegan para oviponer en los árboles de cítricos.

Es de remarcar que, nuestra confirmación de que los adultos de *D. rotundicolle* se esconden en los eucaliptos permite otra estrategia de control cultural, es decir, la eliminación manual de cortezas y escarabajos. Esta estrategia también debe definirse con base en el seguimiento del vuelo de adultos. A pesar de que esta medida requiere mano de obra y puede ser tan costosa como la poda de brotes, se puede realizar de forma intensiva en las zonas y temporadas más afectadas. Además, cuando sea posible, sería deseable eliminar esta especie de eucalipto como cortina rompevientos en las quintas y evitarlos quintas nuevas.

Finalmente, la actividad larvaria se observó como no interrumpida observada durante todo el año, al igual que lo reportado por Faria et al. (1987), y la infestación fue observada en focos con mayor daño dentro de los cuadros. Esta observación destaca que sería de relevancia el monitoreo del vuelo de adultos en diferentes áreas de la quinta, para maximizar los beneficios temporales y espaciales del seguimiento de la dinámica de las poblaciones de adultos.



## 5.6. CONCLUSIONES

Este estudio proporciona evidencia de que las trampas de luz de panel cruzado son una herramienta eficaz para monitorear el período de vuelo de los adultos de *D. rotundicolle*. Una trampa por ha sería suficiente para definir las intervenciones, especialmente cuando las poblaciones son altas. En el sur de Uruguay, el período de vuelo de los adultos se extiende entre enero y abril, con un pico a mediados de febrero. El daño por oviposición generalmente se observa a mediados o fines de febrero. Deben evitarse las cortinas rompevientos de *Eucalyptus globulus* que rodean los huertos de cítricos, ya que proporcionan un refugio adecuado para *D. rotundicolle*.

## 5.7. BIBLIOGRAFÍA

- Bentancourt CM, y Scatoni IB. 2010. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo: Facultad de Agronomía. 582p.
- Biezanko CM, y Bosq JM. 1956. Cerambycidae de Pelotas e seus arredores. Agros, 9: 3-16.
- Faria AM, Fernandes SCS, dos Santos JCC, Bergmann E, Brisolla AD, Takematsu AD, Negri JD, y Sempinoato OR. 1987. Estudo sobre controle da broca-dos ramos e do tronco dos citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Coleoptera - Cerambycidae). Biologico, Sao Paulo, 53: 13-18.
- Horton DR. 1999. Monitoring of pear psylla for pest management decisions and research. Integrated Pest Management Reviews 4: 1-20.
- Link D, y Corrêa Costa E. 1994. Nível de infestação da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle* (serville, 1834) em cinamomo e plantas cítricas, em Santa Maria - RS. Ciencia Rural 24.

- Machado LA, y Berti Filho EB. 2006. Prática cultural associada ao controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate à broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle*. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 73: 439-445.
- Machado LA, y Filho B. 1999. Criação artificial da broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Col.: Cerambycidae). Biológico, São Paulo, 61: 5-11.
- Machado LA, Cruz BPB, Leite LG, Batista Filho A, y da Silva EM. 1991. Práticas para o controle da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle*, (Serville, 1834)(Coleoptera-Cerambycidae). En: XIII Congresso Brasileiro de Entomologia. 366.
- Shanley RP, Keena M, Wheeler MM, Leland J, y Hajek AE. 2009. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). Biological Control 50: 94-102.

## 6. EVALUACIÓN DE ATRAYENTES DE LUZ Y FEROMONAS PARA EL TRAMPEO DEL TALADRO DE LOS CÍTRICOS, *Diploschema rotundicolle* (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE)\*

### 6.1. RESUMEN

El taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle*, es un cerambícido nativo de Sudamérica, donde es considerado en algunas regiones una plaga principal de los cítricos. Su manejo recae, principalmente, en el control cultural, el cual es costoso económicamente e ineficiente. En búsqueda de nuevas estrategias de manejo direccionadas al trapeo de adultos de esta plaga, en este trabajo se evaluaron a campo atrayentes lumínicos, químicos y sus combinaciones. Los diferentes atrayentes se evaluaron en trampas de panel cruzado, en quintas de limones con infestación alta en el sur de Uruguay. Las trampas de luz fueron atrayentes eficientes y se observó que la combinación de luz y feromona capturó significativamente más adultos respecto a las trampas con luz únicamente. Se evaluaron, a su vez, distintas fuentes de luz, led y fluorescentes, con distintas intensidades y temperaturas de color: cálida, fría y luz negra. La luz negra resultó el estímulo más atractivo para adultos de *D. rotundicolle*. Se evaluaron también diferentes ubicaciones de las trampas y se observó que las trampas ubicadas en los focos con árboles con mayor ataque de larvas, y, en particular, sobre los bordes del cuadro, mostraron mayores capturas. Finalmente, se evaluó, en la temporada 2021-2022, una primera aproximación a un trapeo masivo de esta plaga con una densidad a 10 trampas de luz/ha. Se utilizaron trampas elevadas con tubo de luz fluorescente de luz negra y se registró el trapeo de más de 1100 adultos, mayormente hembras. Datos preliminares de estimación de daño del cuadro con trampas mostraron menor ataque que un cuadro lindero sin este tratamiento.

**Palabras clave:** cerambícidos, manejo integrado de plagas, monitoreo, trapeo masivo

---

\* Este capítulo será publicado pasada la temporada de verano 2022-2023 que completará los resultados de campo.

Autores : María Eugenia Amorós<sup>1</sup>, Lautaro Lagarde<sup>1</sup>, Valentina Poloni<sup>1</sup>, Hugo Do Carmo<sup>2</sup>, Viviana Heguaburu<sup>2</sup>, José Buenahora<sup>3</sup>, Andrés González<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

<sup>2</sup> *Centro Universitario de Paysandú, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay*

<sup>3</sup> *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Salto Grande, Salto, Uruguay*

## 6.2. INTRODUCCIÓN

El taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera: Cerambycidae), es un cerambícido nativo de América del Sur, distribuido en las regiones centro y sur de Brasil, litoral de Argentina, Paraguay y Uruguay (2017). Las larvas se alimentan de la madera, con un extenso período de desarrollo reportado entre 8 meses a 2 años dependiendo de la zona (Faria et al., 1987) (Machado, 1998). Los adultos son coleópteros grandes (25-40 mm x 8-10 mm), de hábitos nocturnos. A diferencia de las larvas, este estadio vive poco tiempo; en condiciones de laboratorio, se reportó su duración de, aproximadamente, 40 días (Machado, 1998). En Uruguay, se ha reportado un único vuelo anual de adultos que sucede entre enero y abril (Amorós et al., 2022).

Los daños en cítricos se asocian al desarrollo y alimentación de las larvas dentro del árbol, lo que afecta su estructura. En la infestación temprana, las larvas recién eclosionadas secan el ápice de las ramas, donde la hembra coloca los huevos, lo que causa el marchitamiento del brote. Posteriormente, las larvas se desarrollan dentro de la madera en sentido descendente: abren galerías longitudinales y llegan a las ramas principales, pudiendo alcanzar el tronco y el sistema radicular de la planta (Machado, 1998). Con respecto a daños indirectos, las galerías abiertas por las larvas son posteriormente colonizadas por hormigas y otros organismos, y pueden ser vías de entrada de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos o pueden acelerar la degradación del vegetal (Machado, Filho, 1999).

El manejo de cerambícidos en cultivos arbóreos o forestales es, en general, dificultoso dadas las características de estos insectos con largos períodos de desarrollo protegido en el interior de la madera. Se ha reportado el control químico con insecticidas sistémicos, inyectados a la base del árbol, para el manejo del escarabajo de los cítricos, *Anoplophora chinensis* (Gyeltshen, Hodges, 2005). Sin embargo, es sabido el impacto negativo de este tipo de medidas sobre enemigos naturales, además de ser complejo y costoso por la modalidad de aplicación. También se ha reportado el uso de fibras

impregnadas con distintas cepas de hongos entomopatógenos para el control de cerambícidos, que se han mostrado efectivos para el control, por ejemplo, de los cerambícidos *Anoplophora glabripennis*, *Psacotha hilaris* y *Anoplophora chinensis* (Dubois et al., 2004; Higuchi et al., 1997; Shanley et al., 2009). Específicamente para *D. rotundicolle*, Machado (1998) evaluó el control de larvas mediante la aplicación del hongo *Metarhizium anisopilae* en las galerías utilizando larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como vector. Esto resultó en una alta mortandad de larvas (90 %). Posteriormente, (Machado, Berti Filho, 2006) probaron la aplicación del mismo hongo en polvo directamente en las galerías a través de los orificios de salida de aserrín de las larvas, del que obtuvieron también un control eficiente de larvas. Ambas metodologías, si bien efectivas, no parecen ser viables de ser llevadas a condiciones productivas al requerir la cría del insecto vector y el hongo y la aplicación manual de las larvas del vector en las galerías de *D. rotundicolle*. Finalmente, Faria et al. (1987) evaluaron el control químico con pulverizaciones de insecticidas, que resultó ineficiente, probablemente por la ubicación de las larvas protegidas en el interior de la madera, dificultando el contacto del insecticida con las larvas.

El método mayormente utilizado en condiciones productivas es el control cultural; esto es, llevar a cabo la poda de brotes con daños visibles de oviposición antes de que las larvas migren hacia ramas centrales (Machado et al., 1997). Sin embargo, resulta insuficiente cuando las poblaciones son altas, además de ser extremadamente costoso por la alta demanda de personal (comunicación personal Ings. Agrs. Yamandú Pochintesta, Martín Lanfranco, Federico Montes, noviembre 2018). Además, la ventana de tiempo para adoptar esta medida es muy limitada, 30-40 días (Machado et al., 1991), o incluso menor con base en observaciones de nuestro grupo de trabajo. Pasado este período, la poda ya no es efectiva porque las larvas han migrado en forma proximal en la rama. Otra forma de control cultural es la extracción manual de adultos de debajo de las cortezas de *Eucalyptus globulus*, que se utilizan, muchas veces, como cortinas rompeviento rodeando los cuadros de cítricos. En nuestro trabajo previo, hemos reportado que los adultos se refugian durante el día bajo las cortezas sueltas

de esta especie de eucalipto, y en condiciones de altas poblaciones se pueden extraer grandes cantidades de escarabajos del ambiente con esta técnica (Amorós et al., 2022). Sin embargo, este método es igualmente costoso y tiene los mismos inconvenientes que la poda previamente descrita.

Respecto a estrategias de manejo basadas en el control de adultos, existe poca bibliografía. El trampeo masivo en cerambícidos ha sido poco explorado, probablemente debido a la complejidad de medir su efecto real sobre las poblaciones en el tiempo. Existen algunos ejemplos en la literatura, pero, en todos los casos, se encuentra aún en etapas de investigación y desarrollo (Barbour et al., 2019; Maki et al., 2011; Sanchez-Husillos et al., 2015). En el caso de *D. rotundicolle*, cuyos adultos están presentes en el campo en un período relativamente corto de tiempo, estas estrategias serían de interés, pues los esfuerzos se concentrarían durante este período y contribuirían a la baja consecutiva de las poblaciones en los predios. Para tener una estrategia de trampeo masivo eficiente, es necesario disponer de un dispositivo trampa-atrayente adecuado. Nuestro equipo de trabajo ha explorado la utilización de trampas de feromonas (Amorós et al., 2020) con resultados aún insuficientes a campo. Otra estrategia posible es la utilización de trampas de luz, en particular en insectos de hábitos nocturnos como *D. rotundicolle*. En los últimos años, se ha generado un considerable interés en tecnologías de manejo de plagas que utilizan la respuesta de los insectos a la luz como una forma «limpia» de control de plagas que no utiliza pesticidas de síntesis [Shimoda, Honda (2013) y citas allí incluidas].

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un dispositivo trampa-atrayente efectivo para adultos de *D. rotundicolle*, y evaluarlo en estrategias de trampeo a campo. Se evaluaron trampas de panel cruzado con distintos tipos de luz, combinación de luz y feromonas y distintas ubicaciones de trampas. Una vez seleccionadas las mejores condiciones para el trampeo, se realizó una primera evaluación de trampeo masivo aumentando la densidad de trampas por superficie.

### 6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en dos quintas de producción de limón (*Citrus aurantifolia*) (variedad limón criollo, de entre 8 y 15 años de edad) con infestación severa. Las quintas están ubicadas en el sur de Uruguay, en los departamentos de San José (localidad Kiyú: 34°42'1"S 56°43'37"W) y de Colonia (34°25'59.8"S 57°40'56.3"W). Se utilizaron trampas de panel cruzado de diseño estándar (ej. Alpha Scents Inc., West Linn, Oregon, EE. UU.; ChemTica Internacional SA, San José, Costa Rica), de confección artesanal (cartonplast negro, medidas de panel: 74 x 40 cm). Los paneles y embudo se pintaron con una solución de teflón líquido, Fluon® (BioQuip Products, Inc.) para mejorar la retención de insectos (Graham et al., 2010). El recipiente colector se llenó parcialmente con agua jabonosa y sal para preservar los insectos capturados. Las trampas se revisaron semanalmente y los adultos capturados fueron sexados por observación visual de diferencias en sus élitros (Machado, Filho, 1999). En los casos en que se utilizó feromona, el compuesto utilizado como atrayente fue la 3-hidroxi-2-hexanona (en adelante, HC) (Amorós et al., 2020). Se utilizó HC racémica de origen comercial (ChemTica Internacional, SA y Bedoukian Inc.) u obtenida por síntesis local (Heguaburu et al., 2017).

Se realizaron tres experimentos durante los veranos australes 2018-2019, 2019-2020 y 2021-2022, todos involucrando atrayentes lumínicos y dos (exp. 1 y 3) con el agregado de atrayente químico. En el experimento 1, los dispositivos atrayentes químicos consistieron en bolsas de polietileno dobles (una bolsa dentro de otra), de cierre hermético, de 5 x 7 cm. Dentro de las bolsas se colocó una mecha de algodón de 4 cm embebido con 50 mg de feromona disuelta en 1 mL de isopropanol. En el experimento 3, los dispositivos fueron tubos Eppendorf de 1,5 mL con un algodón de 1 cm y un orificio de 1 mm en la tapa. Estos dispositivos se cargaron con 100 mg de HC sin disolvente. En ambos experimentos, los dispositivos dispensadores de feromona se recambiaron y se rotaron de trampa cada 15 días para evitar desvíos posicionales. En el caso de los atrayentes lumínicos, se acoplaron a los paneles de las



trampas de manera que se iluminen las 4 caras de las trampas. Todos los experimentos se realizaron entre diciembre y abril. En todos los casos, las trampas se separaron al menos 6 m del borde del cuadro (excepto el experimento 3, detallado su sección correspondiente) y al menos 25 m entre ellas.

En los experimentos 1 y 2, las trampas se colgaron a 60 cm del nivel del suelo (medida desde el recipiente colector al suelo), dentro de la copa de los árboles. Debido al mejor desempeño de trampas colgadas a mayor altura observada en nuestro trabajo previo (Amorós et al., 2020), en el experimento 3 las trampas se colgaron en pipas de PVC entre árboles, a una altura de 180 cm del suelo (figura 1).



Figura 1. Trampas de panel cruzado a las dos alturas evaluadas.

**Experimento 1 (E1 - 2018-2019)** El primer experimento se llevó a cabo en el verano 2018-2019 en la quinta de Kiyú. Se evaluaron trampas de led de luz fría de baja intensidad (especificaciones en tabla 1), alimentadas con panel solar y baterías de 12 V. Los tratamientos fueron i) trampas de luz (led blanca), ii) trampas de luz más

feromona (led blanca + HC) y iii) control, trampas sin atrayente. A su vez, se evaluaron 2 ubicaciones de trampas, colgadas sobre las cortinas de *Eucalyptus globulus* circundantes al cuadro de cítricos o dentro de los cuadros de limón; de esta manera, se compararon las capturas en “cortina vs. cuadro”. Se siguió un diseño de bloques completos al azar con 10 repeticiones; cada repetición se ubicó en un cuadro diferente de la quinta. Cada bloque contuvo los 3 tratamientos. Se distribuyeron 5 repeticiones en las cortinas y 5 dentro de los cuadros.

**Experimento 2 (E2 - 2019-2020).** El experimento 2 se realizó en la temporada 2019-2020 en la quinta de Kiyú. Los tratamientos consistieron en diferentes luces acopladas a las trampas de panel cruzado (figura 2). Las especificaciones de los diferentes tratamientos (estímulos lumínicos) se detallan en la tabla 1. El experimento se realizó en dos bloques de citrus de 1 ha cada uno, siguiendo un diseño de bloques completos al azar con 3 repeticiones. Cada bloque contuvo los 6 tratamientos.



Figura 2. Trampas de panel cruzado ensayadas con atrayentes lumínicos: a. con led UV, b. led fría de mayor intensidad, c. led fría de menor intensidad alimentada con panel solar, d. Tubo de luz fluorescente de luz fría.

Tabla 1. Tratamientos en experimento 2.

	Tratamiento	Emisión de color	Especificaciones	Alimentación y potencia
1	Led luz negra	395-405 nm	3528 (60 leds/m)-30 leds/cara de panel	Electricidad de red y transformador a 12 V-consumo 4,8 W/m-2,4 W por cara de panel
2	Led fría intensa	Blanco frío (6500 K)	módulos COB Led chip10 módulos por cara	Electricidad de red y transformador a 12 V-consumo 2,5 W por módulo-250 W por cara de panel
3	Led fría	Blanco frío: (5500-6500 K)	3528 (60 leds/m) - 30 leds/cara de panel	Panel solar y batería 12 V-consumo 4,8 W/m-2,4 W por cara de panel
4	Led cálida	Blanco cálido: (2800-3200 K)	3528 (60 leds/m) - 30 leds/cara de panel	Panel solar y batería 12 V-consumo 4,8 W/m-2,4 W por cara de panel
5	Tubo frío fluorescente	Blanco frío: 380-750 nm (6500 K)	Tubo fluorescente 60 cm TL-D 18W/54-765 1SL/25	Electricidad de red y transformador a 12 V-18 W
6	Control	---	---	---

**Experimento 3 (E3 - 2021-2022).** En la temporada 2021-2022, se llevó a cabo el primer prototipo de trapeo masivo en la quinta ubicada en el departamento de Colonia. En función de los resultados previos (ver «Resultados»), se determinó que la luz negra resultó el estímulo más efectivo. Sin embargo, debido a inconvenientes de funcionamiento, las tiras led se sustituyeron por tubos fluorescentes de luz negra (tubo fluorescente 60 cm, “Blacklight Blue” emisión de color 360-405 nm, TL-D 18W BLB 1SL, electricidad de red y transformador a 12 V-18 W). Las trampas se alimentaron a corriente eléctrica por cableado (figura 3).



Figura 3. Trampas de panel cruzado acopladas a tubo de luz negra utilizadas en el experimento 3.

Desde el 20 de diciembre, se instalaron 16 trampas de luz que funcionaron de forma variable e intermitente hasta el 21 de enero. En esta fecha, se dispusieron 4 tratamientos: control (trampas sin luz) 3 repeticiones, trampas de feromona (sin luz) 3 repeticiones, trampas de luz + feromona (6 repeticiones) y trampas de luz (6



repeticiones). Se realizó un mapeo por observación visual del daño de alimentación de larvas observado como aserrín a la base del árbol. Se determinaron 3 zonas de bajo, medio y alto daño (figura 4). Los tratamientos se distribuyeron en cada una de las zonas, las que fueron consideradas bloques. Al finalizar la temporada, se realizó una estimación del daño de oviposición del cuadro trampeado y un cuadro lindero. Esto se realizó contabilizando la totalidad de brotes con daño visible de oviposición en 40 árboles por cuadro elegidos al azar, 20 del borde y 20 del interior del cuadro. A su vez, los tratamientos se distribuyeron en postes en las filas borde del cuadro (cubriendo los 4 laterales) y trampas en el interior del cuadro. Al igual que en el experimento 1, se compararon las capturas en “borde vs. cuadro”.

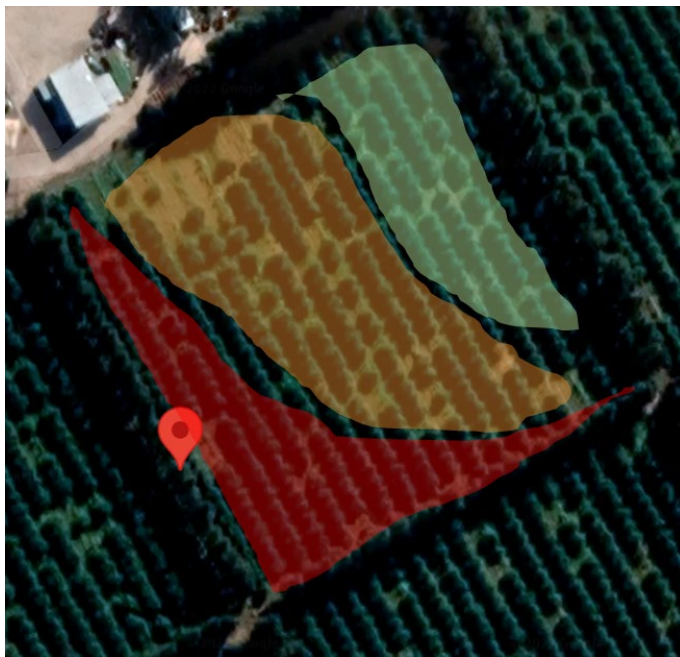


Figura 4. Mapeo de intensidad de daño en el cuadro de trabajo en el experimento (3) de trampeo masivo. Se realizó una estimación visual con base en el daño de alimentación de larvas. Los colores indican daño leve (verde), intermedio (amarillo), e intenso (rojo).

**Análisis estadístico** En los experimentos 1 y 3 las capturas se analizaron mediante modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) con distribución de Poisson. Se utilizó la función “glmer” del paquete “lme4” (Bates et al., 2015). En E1, se analizaron las capturas acumuladas de *D. rotundicolle*, en cada repetición y tratamiento durante toda la temporada; los bloques se incorporaron al modelo como factor aleatorio. En el experimento 3, se incorporó, a su vez, la fecha y repetición como factores aleatorios, ya que, debido a roturas de trampas, las repeticiones por fecha de monitoreo fueron diferentes. Las medias por tratamiento se separaron mediante el test de Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ) test, usando el paquete “multcomp” (Hothorn et al., 2008). En el experimento 2, debido a las bajas capturas, las capturas acumuladas durante toda la temporada para cada tratamiento se analizaron mediante el test de Friedman ( $\alpha = 0,05$ ).

Para la comparación de daño, en el experimento 3, se transformaron mediante raíz cuadrada los datos del número de brotes con picado por árbol. Estos datos se analizaron por análisis de la varianza (ANOVA) y las medias se separaron mediante el test de Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

Los análisis se realizaron con los softwares estadísticos R (0.99.892 version-© 2009-2016 RStudio, Inc.) (RStudioTeam, 2015) e Infostat (Di Rienzo et al., 2011). Los resultados se muestran como promedio de capturas acumuladas  $\pm$  desviación estándar.

## 6.4. RESULTADOS

**Experimento 1.** Los resultados mostraron, en primer lugar, que dentro de los cuadros se capturaron significativamente más individuos que en las trampas ubicadas en las cortinas (25 vs. 77 insectos, GLMM, Tukey HSD,  $P < 0,001$ ), por lo que se observaron diferencias en el comportamiento de las trampas en función de la ubicación. Las trampas de luz y luz más feromona ubicadas en las cortinas circundantes a los cuadros no se diferenciaron en atraktividad respecto del control (figura 5). Por otro lado, las

trampas de luz mostraron mayor atractividad respecto al control (GLMM, Tukey HSD,  $P < 0,001$ ) cuando fueron ubicadas dentro de los cuadros (figura 5). Las trampas de luz cebadas, a su vez, con feromona mostraron una tendencia a mayores capturas que las trampas únicamente con luz, aunque esta diferencia no fue significativa ( $P = 0,747$ ). En total, se capturaron 102 adultos, en una relación hembra:macho de 3,75.

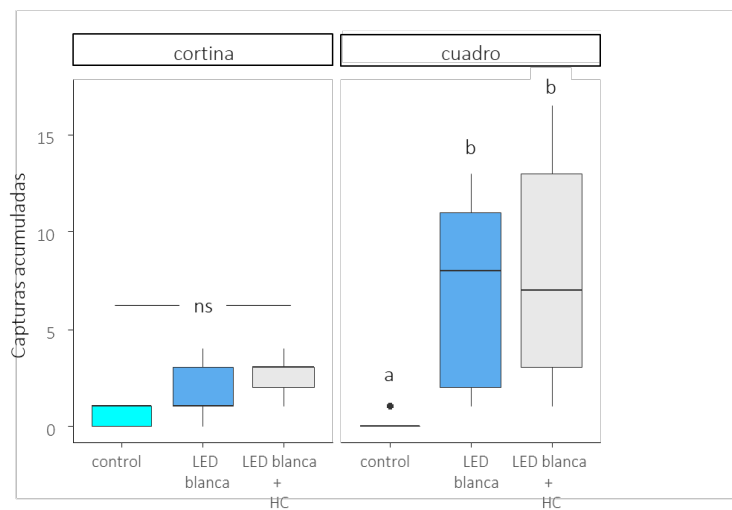


Figura 5. Experimento 1 -capturas de *D. rotundicollis* acumuladas durante toda la temporada. Letras diferentes indican diferencias significativas (GLMM, Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ).

**Experimento 2.** Si bien la temporada 2018-2019 presentó bajas capturas, en general, respecto a otras temporadas, fue posible observar diferencias significativas entre los tratamientos lumínicos (Friedman,  $P = 0,0026$ ). Los resultados mostraron que las trampas con led negra ( $5 \pm 4$ ), led de mayor intensidad ( $3.7 \pm 0.6$ ) y tubo fluorescente de luz blanca ( $2.3 \pm 2.3$ ) fueron los estímulos que presentaron significativamente mayores capturas ( $P = 0,0026$ ) (figura 6). En total, se capturaron 38 adultos, con una relación hembra:macho de 3,2.

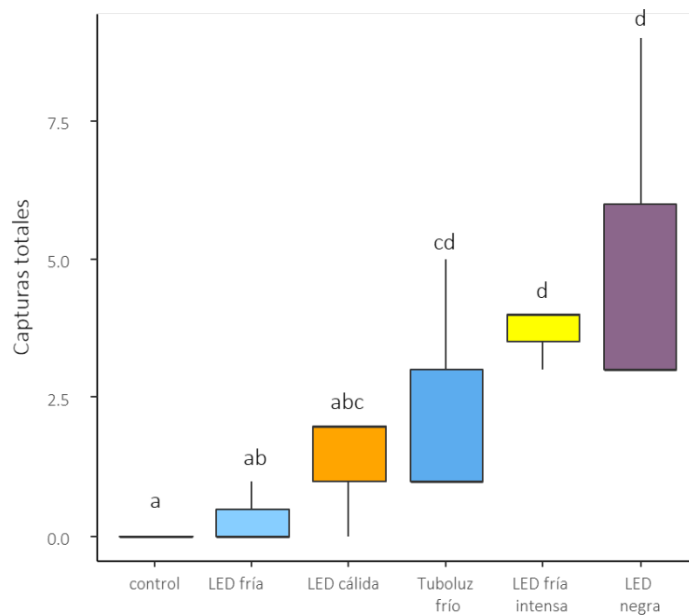


Figura 6. Experimento 2 -capturas de *D. rotundicolle* acumuladas durante toda la temporada en diferentes trampas de luz. Letras diferentes indican diferencias significativas (Friedman,  $P \leq 0,05$ ).

**Experimento 3.** En la totalidad de la temporada 2021-2022, se capturaron 1084 adultos, con un promedio de 10 trampas de luz funcionales, debido a roturas y reparaciones varias en el transcurso de la temporada. En la figura 7, se observa la comparación de las capturas obtenidas por bloque en la que se ve una correlación positiva entre el daño visual de aserrín y las capturas de adultos.



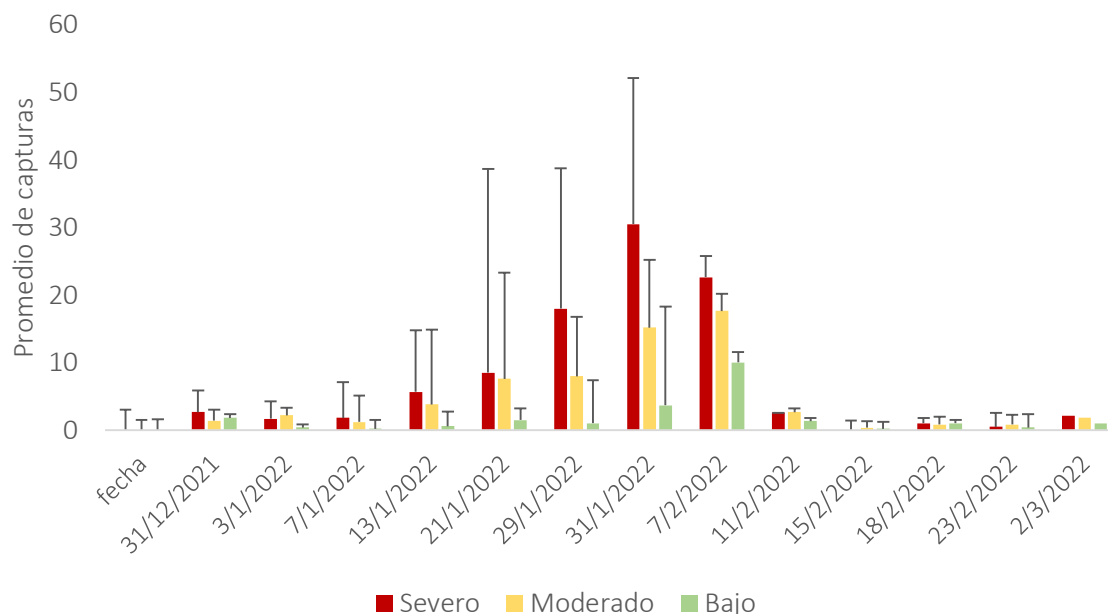


Figura 7. Experimento 3 –capturas en trampas acumuladas de *D. rotundicollis* durante la temporada, por bloque de intensidad de daño. Los colores indican daño leve (verde), intermedio (amarillo) e intenso (rojo), determinado al inicio del trabajo visualmente.

En el transcurso de toda la temporada, se observaron significativamente mayores capturas en las trampas ubicadas sobre los árboles en filas borde respecto a las ubicadas dentro del cuadro (en total 600 vs. 484) (GLMM, Tukey HSD,  $P < 0,001$ ).

La comparación de estímulos mostró altas capturas en las trampas de luz + HC y de luz sola; la suma de los promedios de capturas acumuladas de *D. rotundicollis* fueron de  $68 \pm 34$ , y  $51 \pm 32$  adultos, respectivamente. Las trampas cebadas con luz + HC capturaron significativamente más adultos que las trampas cebadas únicamente con luz (GLMM, Tukey HSD,  $P = 0,0086$ ) (figura 8). Fue posible el sexado del 60 % de los adultos, lo que resulta en una relación hembra:macho capturados de 2,6 (469:181).

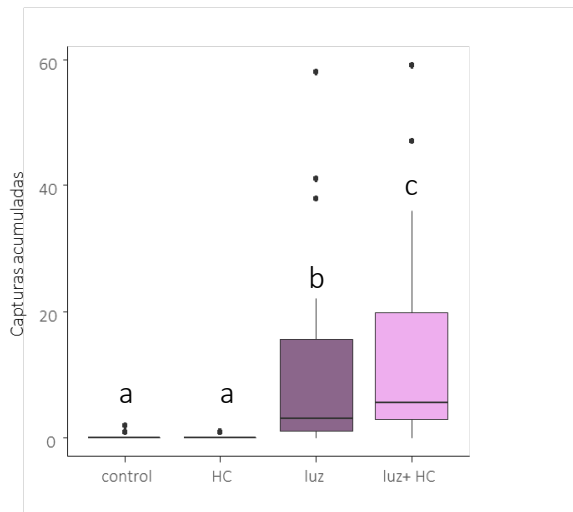


Figura 8. Experimento 3 -evaluación de estímulos atrayentes. Los resultados se muestran como la suma de los promedios de capturas de *D. rotundicolle* por fecha para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (GLMM, Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ).

Respecto a la estimación de daño, se observó significativamente menos daño en cuadro trampeado respecto al cuadro lindero. A su vez, en ambos casos se observó mayor daño sobre los bordes (en ambos casos ANOVA, Tukey HSD,  $P < 0,001$ ) (figura 9).

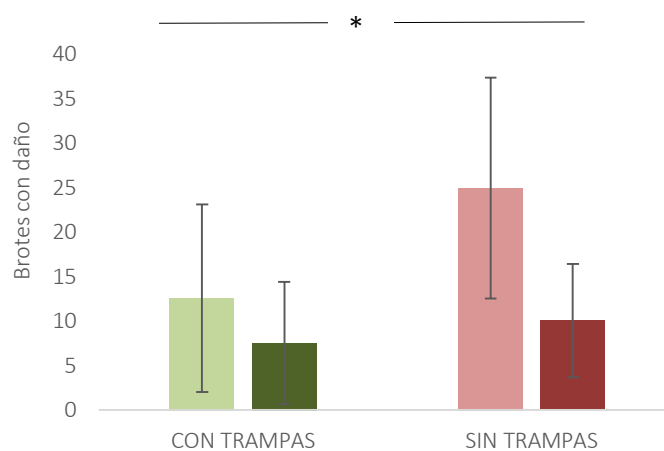


Figura 9. Experimento 3 -estimación de daño de oviposición. Los resultados se muestran como el promedio de brotes con daño de picado  $\pm$  desviación estándar. Las barras claras corresponden a árboles borde y las barras oscuras a los árboles dentro del cuadro. El asterisco indica diferencias significativas (ANOVA, Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ).

## 6.5. DISCUSIÓN

En este trabajo, reportamos la utilización de trampas lumínicas solas o combinadas con atrayentes químicos, para estrategias de monitoreo y control de *D. rotundicolle*. Es ampliamente conocida la respuesta de los insectos hacia fuentes de luz. Estas respuestas están sustancialmente influenciadas por una variedad de factores, incluyendo la intensidad de la luz y la longitud de onda, combinaciones de longitudes de onda, tiempo de exposición, dirección de la fuente de luz y el contraste de la intensidad de la fuente de luz y color al de la luz ambiental. Además, el impacto de la luz sobre el comportamiento de los insectos varía tanto cualitativamente como cuantitativamente dependiendo de la fuente de luz (bombilla o diodo emisor de luz (led) y material (diodo emisor de luz lámina) [Shimoda, Honda (2013) y citas allí incluidas].

Los resultados de los 3 experimentos realizados en este trabajo muestran claramente la atracción de los adultos de *D. rotundicolle* hacia estímulos lumínicos y su respuesta diferencial a las diferentes fuentes de luz e intensidades presentadas. Particularmente, los adultos de *D. rotundicolle* se vieron más fuertemente atraídos por las trampas con luz negra, con longitudes de onda que pueden considerarse dentro del espectro ultravioleta (menores a 400 nm). Los resultados del E2 mostraron que las luces led negras y los tubos fluorescentes de luz fría, aunque estos levemente inferiores, fueron los estímulos con mayores capturas. Los tubos fluorescentes de luz blanca tienen un amplio espectro de emisión que también alcanza longitudes por debajo de los 400 nm. Tampoco se diferenciaron de estos estímulos las luces led de mayor intensidad, lo cual también ha sido reportado como un factor importante en la visión de los insectos (revisado por (Shockley Cruz, Lindner, 2011)). El E3 mostró un muy buen desempeño de las luces con tubo fluorescente de luz negra. Estos tubos emiten longitudes de onda inferiores a las demás luces evaluadas hasta alcanzar los 360 nm. Estos resultados son consistentes con la noción general de que los insectos son capaces de ver la radiación UV. Esta sensibilidad juega un papel importante en la búsqueda de alimento, la navegación y la selección de pareja en animales invertebrados terrestres y voladores [Shockley Cruz, Lindner (2011) y citas allí incluidas]. En particular, los insectos nocturnos, como es el caso de *D. rotundicolle*, son atraídos por fuentes de luz que emiten grandes cantidades de radiación UV [Shimoda, Honda (2013) y citas allí incluidas].

El prototipo de trampa obtenido en este trabajo es eficiente para capturar adultos de *D. rotundicolle* y muestra la luz negra como un buen estímulo atrayente. Sin embargo, se considera que es un prototipo experimental. Estas trampas aún requieren de alimentación eléctrica por cableado, lo cual es una limitación importante al momento de su instalación. Los predios tienen, en general, acceso limitado a la corriente eléctrica, y mantener altas intensidades de luz a campo resulta complejo logísticamente. Nuestros resultados utilizando luces led acopladas a paneles solares y baterías sugieren que este es un camino viable, pero requiere más investigación y

desarrollo. En el correr del trabajo, se presentaron numerosos inconvenientes de funcionamiento de los atrayentes lumínicos tipo cinta led, los que llevaron a la continuación de la investigación con trampas de tubo fluorescente. Tanto el cableado como la tendencia mundial al desuso de los tubos fluorescentes hacen que esta sea una limitante importante de estos dispositivos. La optimización del prototipo de trampa se presenta como una lógica continuación de este trabajo.

La utilización de luz en combinación con feromona (HC) mostró una tendencia a aumentar las capturas, la cual no fue estadísticamente significativa en E1, pero sí en E3. En promedio, en E3, el estímulo conjunto capturó un 25% más de adultos que las trampas lumínicas. En el contexto de un trampeo masivo, donde se requiere alta atractividad de trampas, cualquier medida que mejore las capturas es deseable; por lo que se continuará estudiando esta alternativa en la próxima temporada de vuelo para concluir si la relación costo/beneficio de utilizar feromona justifique su implementación.

La ubicación de las trampas es relevante para la optimización del trampeo. Los resultados de este trabajo permitieron determinar algunas ubicaciones óptimas para su instalación, lo cual tiene implicancias prácticas al momento de la toma de decisiones, en particular si las trampas se utilizarán para monitoreo de poblaciones donde se usan unas pocas trampas por cuadro (Amorós et al., 2022). La observación visual del daño por alimentación de larvas (aserrín en la base de los árboles) muestra una correlación positiva, evaluada en forma cualitativa, con el número de capturas en trampas, por lo que, al momento de seleccionar las ubicaciones de las trampas en un cuadro, es recomendable el mapeado previo por observación visual para la detección de los focos de mayor daño. A su vez, es recomendable maximizar la cantidad de trampas sobre las filas borde, teniendo en cuenta las zonas de mayor daño.

En líneas generales, los resultados del E3 indican que el trampeo masivo en circunstancias de altas poblaciones de *D. rotundicolle* podría ser una estrategia efectiva para la contribución a la baja poblacional. El hecho de que las trampas

capturen mayoritariamente hembras es relevante, ya que se ha reportado que, en condiciones de laboratorio, cada hembra puede depositar entre 30 y 65 huevos (Machado,Filho, 1999). Este efecto de mayores capturas en trampas de hembras fue observado por nuestro equipo de trabajo en nuestro trabajo previo (Amorós et al., 2020)(Amorós et. al 2022). Nuestro trabajo también ha sugerido que es mayor la emergencia de hembras que la de machos.

Si bien es muy dificultosa tanto la estimación de poblaciones como la medición del efecto de un trampeo masivo sobre ellas, en función de nuestro trabajo previo y de datos bibliográficos, es posible pensar algunas hipótesis. En trabajos previos, nuestro equipo enmalló árboles con severa infestación (situación comparable a la quinta de Colonia donde se realizó el experimento de trampeo masivo) para cuantificar la emergencia por árbol (Amorós et al., 2020)(Amorós et. al 2022). Nuestros resultados mostraron un promedio de 5 insectos emergidos por árbol en estas circunstancias. Siguiendo este criterio, en un bloque con 500 árboles se podría estimar una emergencia de 2500 insectos. Si estimáramos la emergencia esperada en función de la poda, en promedio, se observaron 10 brotes con picado por árbol en el cuadro trampeado. Machado (1998) reportaron que un 19 % de inviabilidad larval en San Pablo; teniendo en consideración este dato, tendríamos, aproximadamente, 8 insectos por árbol: un total de 4000 en 500 árboles. Con base en estas situaciones hipotéticas, el trampeo de 1100 adultos con 10 trampas entraría en un orden razonable de capturas para producir un impacto en las poblaciones.

Los resultados de estimación de daño se consideran preliminares, pues las diferencias entre cuadros podrían ser una consecuencia de diferencias poblacionales basales, no necesariamente relacionadas al tratamiento de trampeo. Se replicará la misma evaluación en la próxima temporada de vuelo de adultos con el fin de observar y comparar la tendencia observada y sacar, eventualmente, conclusiones sobre el efecto del trampeo.

En conclusión, este trabajo pone a disposición una herramienta efectiva de trampeo de adultos. Las trampas de luz negra evaluadas son eficientes para realizar el monitoreo del vuelo de adultos, lo cual es fundamental en un contexto de manejo integrado de plagas. El monitoreo posibilita la optimización en tiempo y espacio de medidas de control cultural, en caso de realizarse. Por otro lado, los resultados sugieren que el trampeo masivo es una estrategia posible, eventualmente, como medida puntual en zonas de serias infestaciones, pudiendo contribuir a la baja poblacional en montes citrícolas.

## 6.6. BIBLIOGRAFÍA

- Amorós ME, Lagarde L, Do Carmo H, Heguaburu V, y González A. 2020. Pheromone chemistry of the citrus borer, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Chemical Ecology*, 46: 809-819.
- Amorós ME, Lagarde L, Poloni V, González A. 2022. Monitoring and study of bio-ecological aspects of the citrus borer, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera:Cerambycidae), in southern-Uruguay lemon orchards. *Agrociencia Uruguay*, 26 (2): e1064. doi:10.31285/AGRO.26.1064.
- Barbour JD, Alston DG, Walsh DB, Pace M, y Hanks LM. 2019. Mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop and sweet cherry *Journal of Economic Entomology*.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, y Walker S. 2015. Fitting linear mixedeffects models using lme4. *J Stat Softw*, 67: 1–48.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, y Robledo CW. 2011. InfoStat. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Dubois T, Li Z, Jiafu H, y Hajeka AE. 2004. Efficacy of fiber bands impregnated with *Beauveria brongniartii* cultures against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biological Control* 31: 320-328.

- Faria AM, Fernandes SCS, dos Santos JCC, Bergmann E, Brisolla AD, Takematsu AD, Negri JD, y Sempinoato OR. 1987. Estudo sobre controle da broca-dos ramos e do tronco dos citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Coleoptera - Cerambycidae). *Biologico*, Sao Paulo, 53: 13-18.
- Graham EE, Mitchell RF, Reagel PF, Barbour JD, Millar JG, y Hanks LM. 2010. Treating panel traps with a fluoropolymer enhances their efficiency in capturing cerambycid beetles. *Journal of Economic Entomology*, 103: 641-647.
- Gyeltshen J, y Hodges A. 2005. Citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis* (Forster) (Insecta: Coleoptera: Cerambycidae). Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponible en:
- Heguaburu V, do Carmo H, Parpal F, Amorós ME, y González A. 2017. Synthesis of aggregation pheromone components of cerambycid species through  $\alpha$ -hydroxylation of alkylketones. *Tetrahedron Letters*, 58: 1738-1741.
- Higuchi T, Saika T, Senda S, Mizobata T, Kawata Y, y Nagai J. 1997. Development of biorational pest control formulation against longicorn beetles using a fungus *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 236-243.
- Hothorn T, Bretz F, y Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50: 346–363.
- Machado LA, y Berti Filho EB. 2006. Prática cultural associada ao controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate à broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle*. *Arquivos do Instituto Biologico*, São Paulo, 73: 439-445.
- Machado LA, y Filho B. 1999. Criação artificial da broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Col.: Cerambycidae). *Biológico*, São Paulo, 61: 5-11.



- Machado LA. 1998. Bioecologia e manejo da broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834). [Tesis de maestría]. Piracicaba, Brasil: Universidad de San Pablo. 98p.
- Machado LA, da Silva EM, M. SM, y A. JO. 1997. Viabilidade operacional e econômica no controle da broca-dos-citros (Col: Cerambycidae) *Diploschema rotundicolle*. En: Congresso Brasileiro de Entomologia.
- Machado LA, Cruz BPB, Leite LG, Batista Filho A, y da Silva EM. 1991. Praticas para o controle da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle*, (Serville, 1834)(Coleoptera-Cerambycidae). En: XIII Congresso Brasileiro de Entomologia. 366.
- Maki EC, Millar JG, Rodstein J, Hanks LM, y Barbour JD. 2011. Evaluation of mass trapping and mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop production yards. *Journal of economic entomology*, 104: 933-938.
- RStudioTeam. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
- Sanchez-Husillos E, Etxebeste I, y Pajares J. 2015. Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *Journal of Applied Entomology*, 139: 747-758.
- Shanley RP, Keena M, Wheeler MM, Leland J, y Hajek AE. 2009. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biological Control* 50: 94-102.
- Shimoda M, y Honda K. 2013. Insect reactions to light and its applications to pest management. *Journal of Applied Entomology and Zoology*, 48: 413-421.
- Shockley Cruz M, y Lindner R. 2011. Insect Vision: Ultraviolet, Color, and LED Light. University of Georgia Department of Entomology: Disponible en:

[https://www.discoverlife.org/moth/OTHER/InsectVision\\_UVColorandLEDLight.pdf](https://www.discoverlife.org/moth/OTHER/InsectVision_UVColorandLEDLight.pdf).

Wang Q. 2017. *Cerambycidae of the world: biology and pest management*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 628p.

## 7. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis es la primera contribución formal al conocimiento científico en Uruguay sobre el taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle*, y una contribución al desarrollo de estrategias de manejo novedosas para esta plaga. Como se describe a lo largo del trabajo, esta plaga siempre ha sido parte de los ecosistemas citrícolas, y por mucho tiempo y aun en muchos casos y regiones no causa perjuicios económicos de forma constante (comunicación personal Dr. Juan Pedro Bouvet, diciembre 2022). Incluso en Uruguay se consideró una plaga secundaria por mucho tiempo (Bentacourt, Scatoni, 1999). Diversos factores, tales como el aumento del costo y disponibilidad de mano de obra para la poda, restricción de pesticidas, aumento del área de las quintas citrícolas, son posibles causas para los severos ataques observados en determinadas regiones del país, lo que ha hecho que la clasificación actual sea de plaga principal para la citricultura en Uruguay (Bentacourt, Scatoni, 2010).

A nivel global, constituye el primer estudio sobre la química de feromonas del taladro de los cítricos. Los resultados de las cinco temporadas de estudio indican que los machos de esta especie emiten una feromona compuesta principalmente por la (*R*)-3-hidroxi-2-hexanona, con la presencia de forma inconsistente de 2,3-hexanodiona y 2,3-hexanodiol. Se observó respuesta fisiológica de hembras y machos al compuesto mayoritario en ensayos de laboratorio (electro-antenograma). Estos resultados sugieren que podría tratarse en este caso, como en muchas otras especies de cerambícinos (Hanks y Millar, 2016 y citas allí incluidas), de una feromona sexual-de agregación, reafirmando la amplia parsimonia reportada en la química de feromonas de estas especies. Las evaluaciones a campo, sin embargo, mostraron que necesariamente debe haber otros factores que modulen la atractividad hacia este compuesto. Nuestros esfuerzos por encontrar otros atrayentes químicos basados en combinaciones con compuestos minoritarios y volátiles de plantas, así como distintos *ratios* de emisión, alturas y formatos de trampas, no generaron grandes cambios en la captura de adultos en trampas. La utilización de trampeo con base en semioquímicos sería una excelente herramienta para el trampeo a gran escala, por lo que

consideramos relevante profundizar en el estudio de otros atrayentes sinérgicos a la feromona, otros dispositivos de emisión y/o formulaciones que puedan ser eficientes para el trapeo de *D. rotundicolle*.

En el transcurso de los experimentos destinados al estudio de la feromona de *D. rotundicolle*, se obtuvieron interesantes resultados inesperados. Se observaron consistentemente en todas las temporadas de trabajo numerosas capturas de diversas especies de cerambicinos nativos, en las trampas cebadas con feromonas “genéricas” (3-hidroxi-2hexanona, dioles); la mayoría de ellos de feromona desconocida. Estos resultados constituyen un aporte al conocimiento sobre química de feromonas de cerambícidos neotropicales. Particularmente, las importantes capturas de *R. thoracicus thoracicus* fue para nuestro trabajo un inesperado “control positivo”. Los resultados validaron en los distintos experimentos la utilidad de las trampas en cuanto a diseño y dispensadores de feromona para el trapeo y retención de cerambícidos de gran tamaño, ya que *R. thoracicus thoracicus* y *D. rotundicolle* son anatómicamente similares. A su vez, este trabajo deja a disposición un atrayente eficiente para los adultos de esta especie, la 3-hidroxi-2-hexanona en conjunto con etanol. Esto podría ser utilizado en eventuales casos de perjuicios causados por aumentos poblacionales de esta especie polífaga en diversos cultivos, en particular del sector frutícola y vitícola.

Por otro lado, este trabajo de tesis es la primera contribución formal sobre aspectos bio-ecológicos de *Diploschema rotundicolle* en Uruguay. En el correr de los experimentos llevados a cabo en el transcurso de las 5 temporadas de campo de este trabajo, el monitoreo con trampas de luz y la observación de la emergencia de adultos de árboles con daño de larvas, cubiertos con malla; se determinó el momento y duración del vuelo de adultos de esta plaga. Los resultados mostraron, en primer lugar, que el único cerambícido emergido de los árboles con daño enmallados fue *D. rotundicolle*. A su vez, consistentemente que, en el sur de nuestro país, el vuelo se desarrolló entre enero y abril; con un pico en febrero sobre el comienzo o el final dependiendo del año. Se observó también el daño de oviposición o “picado”, que

utilizan los productores para definir la poda, posteriormente a las fechas de mayores capturas en trampas.

Es de relevancia remarcar que algunos aspectos sobre la bio-ecología de *D. rotundicolle* mencionados en este trabajo, como el momento de observación de daño por picado, la actividad larvaria in-interrumpida, el daño focalizado dentro de los cuadros de cítricos, o la presencia de adultos individuales (mayormente machos) sin comportamiento gregario bajo las cortezas flojas aún adheridas de los árboles de *Eucalyptus globulus*; se reportan como observaciones de tipo descriptivo. Las mismas se desprendieron de diferentes experimentos realizados, en algunos casos para otros fines y en otros obtenidas incidentalmente, por lo no fue posible la extracción sistemática de datos. Estas observaciones, sin antecedentes, quedan de esta forma plasmadas en este documento de tesis meramente como observaciones puntuales, pero consistentes en el transcurso del trabajo. Al tratarse de una plaga regional, existen realmente muy pocos reportes sobre la misma. Todos estos reportes provienen de San Pablo y Santa Catarina, Brasil (Faria et al., 1987; Machado et al., 1991; Machado, 1992; Link, Corrêa Costa, 1994; Machado, 1998; Machado, Berti Filho, 2006), donde las condiciones agro-ecológicas difieren de las uruguayas. En Uruguay recabamos valiosa información de trabajadores del sector, tanto técnicos como productores y trabajadores de los predios, con mucha experiencia en el campo, lo que fue el único antecedente local con el que se contó para este trabajo. Este hecho dificultó también enriquecer la discusión en este aspecto. También quedan algunas de ellas reportadas en este documento. Los resultados generados son una primera contribución. Como perspectivas sobre este aspecto puntual, sería de gran interés profundizar en el ciclo biológico, como la presencia o no de ciclos superpuestos, duración total del ciclo, movilidad, comportamiento en la zona norte de nuestro país, así como en otras variedades cítricas, donde también se reportan daños en menor medida.

Desde un punto de vista aplicado, este trabajo pone a disposición una herramienta para el monitoreo del pico de vuelo de adultos, no disponible hasta el momento. Este

dispositivo son las trampas de panel cruzado acopadas a tubos de luz, colgadas en altura. Tanto la luz blanca fría como luz negra mostraron ser útiles para este propósito, siendo más efectiva la luz negra. Las trampas ubicadas en los focos de mayor daño visual de aserrín, así como sobre los bordes del cuadro, mostraron mayores capturas. Para el monitoreo en casos de infestación severa, donde se dan los mayores problemas relacionados a esta plaga, una trampa por cuadro sería suficiente para estimar el pico de vuelo y predecir el momento de picado. El trabajo en los predios evidenció la necesidad de orientar espacio-temporalmente, las medidas de control cultural, en caso de ser aplicadas, para optimizar su efectividad, particularmente a través del monitoreo de adultos. A su vez, la extracción de adultos de las cortinas de eucaliptos se muestra como otra estrategia de control cultural que podría tener un impacto en las poblaciones en situaciones de alta infestación, cuando esta especie es utilizada en cortinas de los montes citrícolas. Como perspectiva de este componente sería de interés evaluar la ventana real de tiempo de extracción de larvas luego de la observación de daño de oviposición. A su vez sería relevante lograr una medida estimación de severidad de infestación en los predios y evaluar la densidad de trampas necesaria en condiciones de bajas poblaciones, que permitan evaluar correctamente el pico de vuelo. Este mismo dispositivo mostró ser potencialmente útil para ser utilizado en una estrategia de trapeo masivo de adultos, como una opción viable para el eventual manejo en zonas muy afectadas. Para esto es necesaria una simplificación y la producción a mayor escala de las trampas de luz. Las trampas de luz negra se encuentran a disposición como producto de esta tesis para ser utilizadas a campo. Sin embargo, se considera que es aún un prototipo experimental. La optimización tecnológica del dispositivo de iluminación en cuanto a la inminente necesidad del pasaje de tubos fluorescentes a luces LED y la necesidad de independencia de la corriente eléctrica en las quintas abren un nuevo camino por recorrer.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre Gil OJ, Paredes-Espinosa R, Briones RA, Alarcon IM, Vejarano EG, Monné ML, González A, y Allison JD. 2021. Screening known Cerambycidae pheromones for activity with the Peruvian fauna. *Agr Forest Entomol.* , 23: 506-511.
- Allison JD, Bhandari BD, McKenney JL, y Millar JG. 2014. Design factors that influence the performance of flight intercept traps for the capture of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae) from the subfamilies Lamiinae and Cerambycinae. *PLoS ONE*, 9: e93203.
- Allison JD, Borden JH, y Seybold SJ. 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology*, 14: 123-150.
- Amorós ME, Lagarde L, Do Carmo H, Heguaburu V, y González A. 2020. Pheromone chemistry of the citrus borer, *Diploschema rotundicollis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Chemical Ecology*, 46: 809-819.
- Amorós ME, Lagarde L, Poloni V, González A. 2022. Monitoring and study of bio-ecological aspects of the citrus borer, *Diploschema rotundicollis* (Coleoptera:Cerambycidae), in southern-Uruguay lemon orchards. *Agrociencia Uruguay*, 26 (2): e1064. doi:10.31285/AGRO.26.1064.
- Barbour JD, Alston DG, Walsh DB, Pace M, y Hanks LM. 2019. Mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop and sweet cherry *Journal of Economic Entomology*, 112: 1130-1137.
- Barriga-Tuñón JE. 2009. Coleoptera Neotropical. Barriga-Tuñón, J. E. Disponible en: [http://www.coleopteraeotropical.org/paginas/2\\_PAISES/Uruguay/Cerambycidae/cerambycinae-uru.html](http://www.coleopteraeotropical.org/paginas/2_PAISES/Uruguay/Cerambycidae/cerambycinae-uru.html).
- Bates D, Maechler M, Bolker B, y Walker S. 2015. Fitting linear mixedeffects models using lme4. *J Stat Softw*, 67: 1–48.
- Bentancourt CM, y Scatoni IB. 2010. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo: Facultad de Agronomía. 582p.

- Bentancourt CM, y Scatoni IB. 1999. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur. 582p.
- Bezark LG, y Monné MA. 2019. Checklist of the Oxypeltidae, Vesperidae, Disteniidae and Cerambycidae, (Coleoptera) of the Western Hemisphere 2019 Edition (updated through 31 December 2018). p.
- Boina DR, y Bloomquist JR. 2015. Chemical control of the Asian citrus psyllid and of Huanglongbing disease in citrus. *Pest Management Science*, 71: 808-823.
- Brockerhoff EG, Jones DC, Kimberley MO, Suckling DM, y Donaldson T. 2006. Nationwide survey for invasive wood-boring and bark beetles (Coleoptera) using traps baited with pheromones and kairomones. *Forest Ecology and Management*, 228: 234-240.
- Bruhn JC, y Beltrame JBI. 1980. Los taladros *Praxithea derourei* Chabrilac, *Trachyderes thoracicus* Olivier y *T. striatus* Fabricius (Coleoptera: Cerambycidae) y su relación con los cultivos de manzanas en Uruguay. *Investigaciones Agronomicas*, 1: 11-14.
- Cocco A, Deliperi S, y Delrio G. 2013. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. *Journal of Applied Entomology*, 137: 16-28.
- Cocco A, Deliperi S, y Delrio G. 2012. Potential of mass trapping for *Tuta absoluta* management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps. *Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate* 80: 319-324.
- Cohnstaedt LW, Rochon K, Anderson JF, Barrera R, Su NY, Gerry AC, Obenauer PJ, Campbell JF, Lysyk TJ, y Allan SA. 2012. Arthropod surveillance programs: basic components, strategies and analysis. *Annals of Entomological Society of America*, 105: 135-149.
- Čokl AA, y Millar JG. 2009. Manipulation of insect signaling for monitoring and control of pest insects. En: Ishaaya I y Horowitz A. (Eds.). *Biorational Control of Arthropod Pests*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 279-316p.



- Costa MKC, Diodato MA, Fernandes JPP, y Santos JPS. 2019. Insetos nocivos a *Prosopis* sp. no Rio Grande do Norte (Brasil) e Piura (Peru). . Agrop. Cient. Semiárido, 15: 158-16.
- Di Lorio ORR. 1997. Plantas hospedadoras de Cerambycidae (Coleoptera) en el Espinal periéstépico y en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Revista de Biología Tropical, 44(3)/45(1): 159-165.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, y Robledo CW. 2011. InfoStat. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Dodds KJ, Dubois GD, y Hoebeke R. 2010. Trap type, lure placement, and habitat effects on Cerambycidae and Scolytinae (Coleoptera) catches in the northeastern United States. Journal of economic entomology, 103: 698-707.
- Dubois T, Li Z, Jiafu H, y Hajeka AE. 2004. Efficacy of fiber bands impregnated with *Beauveria brongniartii* cultures against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). Biological Control 31: 320-328.
- Duffy EAJ. 1953. A monograph of the immature stages of British and imported timber beetles (Cerambycidae). London: Brit. Mus. (Nat. Hist.). 350p.
- El-Sayed AM, Suckling DM, Wearing CH, y Byers JA. 2006. Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species. Journal of Economic Entomology, 99: 1550-1564.
- Fan J, Denux O, Courtin C, Bernard A, Javal M, Millar JG, Hanks LM, y Roques A. 2018. Multi-component blends for trapping native and exotic longhorn beetles at potential points-of-entry and in forests. Journal of Pest Science, 92: 281-297.
- Faria AM, Fernandes SCS, dos Santos JCC, Bergmann E, Brisolla AD, Takematsu AD, Negri JD, y Sempinoato OR. 1987. Estudo sobre controle da broca-dos ramos e do tronco dos citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Coleoptera - Cerambycidae). Biologico, Sao Paulo, 53: 13-18.

- Graham EE, Poland TM, y Millar JG. 2012. A comparison of trap type and height for capturing cerambycid beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology*, 105: 837-846
- Graham EE, Mitchell RF, Reagel PF, Barbour JD, Millar JG, y Hanks LM. 2010. Treating panel traps with a fluoropolymer enhances their efficiency in capturing cerambycid beetles. *Journal of Economic Entomology*, 103: 641-647.
- Gyeltshen J, y Hodges A. 2005. Citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis* (Forster) (Insecta: Coleoptera: Cerambycidae). Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponible en:
- Hanks LM, y Millar JG. 2018. Conservation of pheromone chemistry within the cerambycidae on a global scale, and implications for invasion biology. Annapolis, MD: Disponible en:
- Hanks LM, y Millar JG. 2016. Sex and aggregation-sex pheromones of cerambycid beetles: Basic science and practical applications. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 631-654.
- Hanks LM, y Millar JG. 2013. Field bioassays of cerambycid pheromones reveal widespread parsimony of pheromone structures, enhancement by host plant volatiles, and antagonism by components from heterospecifics. *Chemoecology*, 23: 21-44.
- Hanks LM, Millar JG, Mongold-Diers JA, Wong JCH, Meier LR, Reagel PF, y Mitchell RF. 2012. Using blends of cerambycid beetle pheromones and host plant volatiles to simultaneously attract a diversity of cerambycid species. *Canadian Journal of Forest Research*, 42: 1050-1059.
- Hanks LM. 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Annual Review of Entomology*, 44: 483-505.
- Hansen L, Xu T, Wickham J, Chen Y, Dejun Hao3, Hanks LM, Millar JG, y Teale SA. 2015. Identification of a male-produced pheromone component of the citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis*. *PLoS ONE*, 10: e0134358.

- Heguaburu V, do Carmo H, Parpal F, Amorós ME, y González A. 2017. Synthesis of aggregation pheromone components of cerambycid species through  $\alpha$ -hydroxylation of alkylketones. *Tetrahedron Letters*, 58: 1738-1741.
- Higuchi T, Saika T, Senda S, Mizobata T, Kawata Y, y Nagai J. 1997. Development of biorational pest control formulation against longicorn beetles using a fungus *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 236-243.
- Holdefer Woldan DR. 2007. Análise faunística de cerambycidae (Coleoptera) em duas situações florísticas no município de União da Vitória – Paraná. [Tesis de maestría]. UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ 64p.
- Horton DR. 1999. Monitoring of pear psylla for pest management decisions and research. *Integrated Pest Management Reviews* 4: 1-20.
- Hothorn T, Bretz F, y Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50: 346–363.
- Kline DL. 2007. Semiochemicals, trap/targets and mass trapping technology for mosquito management. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23: 241-251.
- Lemes Fernandes F, Coutinho Picanço M, Chediak M, Sena Fernandes ME, Soares Ramos R, y de Sá Moreira S. 2010. A low-cost trap for Cerambycidae monitoring in forest plantations in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 1044-1047.
- Li C, L. Smith M, Fulcher A, E. Kaufman P, Zhao T, y Xue R. 2015. Field evaluation of three new mosquito light traps against two standard light traps to collect mosquitoes (Diptera: Culicidae) and non-target insects in Northeast Florida. 98, 1: 114-117.
- Lindemberg Martins Mesquita A, Teles Portela Policarpo G, Emilson Cardoso J, y Cavalcante de Souza Mota M. 2017. Novas Ocorrências de Cerambycidae (Insecta:Coleoptera) em cajueiro no Brasil e recomendações de manejo. Embrapa Agroindústria Tropical. Disponible en:

- Link D, y Corrêa Costa E. 1994. Nível de infestação da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle* (serville, 1834) em cinamomo e plantas cítricas, em Santa Maria - RS. Ciencia Rural 24: 7-10.
- Machado L, Oliveira MM, y Silva VB. 2007. Ocorrência de *Epacroplon cruciatum* (Aurivillius, 1899) (Coleóptera: Cerambycidae) como uma nova praga para a citricultura paulista. Disponible en: [http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_3/pragacitrus/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_3/pragacitrus/index.htm).
- Machado LA, y Berti Filho EB. 2006. Prática cultural associada ao controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate à broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle*. Arquivos do Instituto Biologico, São Paulo, 73: 439-445.
- Machado LA, y Filho B. 1999. Criação artificial da broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Col.: Cerambycidae). Biológico, São Paulo, 61: 5-11.
- Machado LA. 1998. Bioecologia e manejo da broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834). [Tesis de maestría]. Piracicaba, Brasil: Universidad de San Pablo. 98p.
- Machado LA, da Silva EM, M. SM, y A. JO. 1997. Viabilidade operacional e econômica no controle da broca-dos-citros (Col: Cerambycidae) *Diploschema rotundicolle*. En: Congresso Brasileiro de Entomologia.
- Machado LA, Cruz BPB, Leite LG, Batista Filho A, y da Silva EM. 1991. Praticas para o controle da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle*, (Serville, 1834)(Coleoptera-Cerambycidae). En: XIII Congresso Brasileiro de Entomologia. 366.
- Machado VS, Botero JP, Carelli A, Cupello M, Quintino HY, y Simões MVP. 2012. Host plants of Cerambycidae and Vesperidae (Coleoptera, Chrysomeloidea) from South America. . Revista Brasileira de Entomologia, 56: 186-198.
- Maki EC, Millar JG, Rodstein J, Hanks LM, y Barbour JD. 2011. Evaluation of mass trapping and mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera:

- Cerambycidae) in hop production yards. *Journal of economic entomology*, 104: 933-938.
- Martins UR, y Galileo MHM. 2011. Tribo Clytini Mulsant, 1839. En: Martins UR GM. (Eds.). *Cerambycidae Sul-Americanos (Coleoptera)*, Suplemento 3. São Paulo: Sociedade Brasileira de Entomologia. 104p.
- Millar JG, Richards AB, Halloran S, Zou Y, Boyd EA, Quigley KN, y Hanks LM. 2019. Pheromone identification by proxy: identification of aggregation-sex pheromones of North American cerambycid beetles as a strategy to identify pheromones of invasive Asian congeners *Journal of Pest Science*, 92: 213–220.
- Millar JG, Mitchell RF, Mongold-Diers JA, Zou Y, Bográn CE, Fierke MK, Ginzel MD, Johnson CW, Meeker JR, Poland TM, y Ragenovich I. 2018a. Identifying possible pheromones of cerambycid beetles by field testing known pheromone components in four widely separated regions of the United States. *Journal of economic entomology*, 111: 252–259.
- Millar JG, Mitchell RF, Mongold-Diers JA, Yunfan Z, Bográn CE, Fierke MK, Ginzel MD, Johnson CW, Meeker JR, Poland TM, Ragenovich I, y Hanks LM. 2018b. Identifying possible pheromones of cerambycid beetles by field testing known pheromone components in four widely separated regions of the United States. *Journal of Economic Entomology*, 111: 252-259.
- Millar JG, y Hanks LM. 2018. New pheromones for invasive cerambycids: From the bench to the field. Annapolis, MD.: Disponible en:
- Miller DR, Crowe CM, Mayo PD, Reid LS, Silk PJ, y Sweeney JD. 2017. Interactions between ethanol, syn-2,3-hexanediol, 3-hydroxyhexan-2-one, and 3-hydroxyoctan-2-one lures on trap catches of hardwood longhorn beetles in Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 110: 1-10.
- Mitchell RF, Reagel PF, Wong JCH, Meier LR, Dias Silva W, Mongold-Diers JA, Millar JG, y Hanks LM. 2015. Cerambycid beetle species with similar pheromones are segregated by phenology and minor pheromone components. *Journal of chemical ecology*, 41: 431-440.

- Mitchell RF, Millar JG, y Hanks LM. 2013. Blends of (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one and alkan-2-ones identified as potential pheromones produced by three species of cerambycid beetles. *Chemoecology* 23: 121-127.
- Monné M 2021. Catalogue of the Cerambycidae (Coleoptera) of the Neotropical Region. Part I. Subfamily Cerambycinae. Consultado August 2021. Disponible en: Available from [cerambyxcat@com](mailto:cerambyxcat@com)/Part 1 Cerambycinae. pdf.
- Monné MA, y Bezark L 2009. Checklist of the Cerambycidae, or longhorned beetles (Coleoptera) of the Western Hemisphere. Consultado Disponible en: <https://www.cerambycoidea.com/titles/monnebezark2009.pdf>.
- Monné MM, Bianchi M, Sánchez A, y Escudero R. 2002. Cerambícidos (Coleoptera) que atacan *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus grandis* en Uruguay. *Agrociencia*, 6: 63-68.
- Morewood WD, Hein KE, Katinic PJ, y Borden JH. 2002. An improved trap for large wood-boring insects, with special reference to *Monochamus scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Can. J. For. Res.*, 32: 519-525
- Pedigo LP. 1989. *Entomology and Pest Management*. New York: Macmillan.p.
- Ray AM, Lacey ES, y Hanks LM. 2006. Predicted taxonomic patterns in pheromone production by longhorned beetles. *Naturwissenschaften* 93: 543-55.
- RStudioTeam. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
- Sanchez-Husillos E, Etxebeste I, y Pajares J. 2015. Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *Journal of Applied Entomology*, 139: 747-758.
- Schmeelk TC, Millar JG, y Hanks LM. 2016. Influence of trap height and bait type on abundance and species diversity of cerambycid beetles captured in forests of east-central Illinois. *Journal of Economic Entomology*, 109: 1750-1757.
- Schröder F, Fettköther R, Noldt U, Dettner K, König WA, y Francke W. 1994. Synthesis of (3*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol and (2*S*,3*R*)-2,3-hexanediol, the male sex pheromone of *Hylotrupes bajulus* and *Pyrrhidium*

- sanguineum (Cerambycidae). European Journal of Organic Chemistry: 1211 - 1218.
- Shanley RP, Keena M, Wheeler MM, Leland J, y Hajek AE. 2009. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). Biological Control 50: 94-102.
- Sharma AK, Vaishampayan S, y Vaishampayan SM. 2006. Distribution of insect pests fauna of rice ecosystem collected through light trap at Jabalpur. JNKVV Research Journal, 40: 50-60.
- Shimoda M, y Honda K. 2013. Insect reactions to light and its applications to pest management. Journal of Applied Entomology and Zoology, 48: 413-421.
- Shockley Cruz M, y Lindner R. 2011. Insect Vision: Ultraviolet, Color, and LED Light. University of Georgia Department of Entomology: Disponible en:
- Silva WD, Hanks LM, Alvarez JCS, Madalon FZ, Bento JMS, Bello JE, y Millar JG. 2020. Variations on a theme: two structural motifs create species-specific pheromone channels for multiple species of South American cerambycid beetles. Insects: Special Issue "Ecology and Management of Invasive Insects in Forest Ecosystems, 11.
- Silva WD, Millar JG, Hanks LM, Costa CM, Leite MOG, Tonelli M, y Bento JMS. 2018. Interspecific cross-attraction between the south american cerambycid beetles *Cotyclytus curvatus* and *Megacyllene acuta* is averted by minor pheromone components. Journal of Chemical Ecology, 44: 268-275.
- Silva WD, Zou Y, Bento JMS, Hanks LM, y millar JG. 2017. Aggregation-sex pheromones and likely pheromones of 11 South American Cerambycid beetles, and partitioning of pheromone channels. Frontiers in Ecology and Evolution, 5: 1-9.
- Silva WD, Millar JG, Hanks LM, y Bento JMS. 2016. 10-methyldodecanal, a novel attractant pheromone produced by males of the south american cerambycid beetle *Eburodacrys vittata*. e0160727p.

- Solsoloy AD, Tolentino MBJ, Castillo A, Valdez L, Mones PL, y Padill A. 2010. Enhancing the utilization of the light trapping technology for insect pest management of major crops in selected provinces of Region 1 [Ilocos Region] Philippines. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 16: 133-134.
- Sweeney J, Gutowski JM, Price J, y De Groot P. 2006. Effect of semiochemical release rate, killing agent, and trap design on detection of *Tetropium fuscum* (F.) and other longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Environmental Entomology*, 35: 645-654.
- Symonds MRE, y Elgar MA. 2008. The evolution of pheromone diversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 23: 220-228.
- Wang Q. 2017. *Cerambycidae of the world: biology and pest management*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 628p.
- Wickham JD, Harrison RD, Lu W, Guo Z, Millar JG, Hanks LM, y Chen Y. 2014. Generic lures attract cerambycid beetles in a tropical montane rain forest in southern China. *Journal of economic entomology*, 107: 259.
- Witzgall P, Kirsch P, y Cork A. 2010. Sex pheromone and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology*: 80-100.
- Wong JCH, Mitchell RF, Striman BL, Millar JG, y Hanks LM. 2012. Blending synthetic pheromones of cerambycid beetles to develop trap lures that simultaneously attract multiple species. *Journal of economic entomology*, 105: 906-915.



## 9. ANEXOS

*Pheromone Chemistry of the Citrus Borer,  
Diploschema rotundicolle (Coleoptera:  
Cerambycidae)*

**María Eugenia Amorós, Lautaro  
Lagarde, Hugo Do Carmo, Viviana  
Heguaburu & Andrés González**

**Journal of Chemical Ecology**

ISSN 0098-0331

J Chem Ecol

DOI 10.1007/s10886-020-01203-4



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Pheromone Chemistry of the Citrus Borer, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera: Cerambycidae)

María Eugenia Amorós<sup>1</sup> · Lautaro Lagarde<sup>1</sup> · Hugo Do Carmo<sup>2</sup> · Viviana Heguaburu<sup>2</sup> · Andrés González<sup>1</sup>Received: 14 April 2020 / Revised: 4 July 2020 / Accepted: 20 July 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

## Abstract

The citrus borer, *Diploschema rotundicolle*, is a Neotropical longhorn beetle that has become a serious citrus pest in southern South America. Management strategies for this insect rely on trimming off damaged shoots, which is expensive and inefficient. We studied the chemical communication system in *D. rotundicolle* in search of attractants for monitoring or control. GC-MS and enantioselective GC analyses of volatile extracts from field-collected adults showed that males produce (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, irregularly accompanied by minor amounts of 2,3-hexanediol (all four stereoisomers) and 2,3-hexanedione. Males emit the compounds only at night, when the adults are active. GC-EAD analyses of natural and synthetic compounds showed that both male and female antennae respond to the natural enantiomer (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, suggesting that it may function as an aggregation-sex pheromone as seen in many cerambycines. The non-natural (*S*) enantiomer as well as the minor component 2,3-hexanediol did not trigger antennal responses. Field tests with the racemic 3-hydroxy-2-hexanone, enantiomerically pure (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, as well as a mixture of racemic 3-hydroxy-2-hexanone and 2,3-hexanediol, showed in all cases low capture levels of *D. rotundicolle*. However, increasing the elevation of the trap and the emission rate of dispensers enhanced field captures in traps baited with racemic hydroxyketone. Incidental catches of another native cerambycine, *Retrachydes thoracicus*, in traps baited with 3-hydroxy-2-hexanone are also reported. This is the first report of pheromone chemistry in the genus *Diploschema* and in the tribe Torneutini, reaffirming the pheromone parsimony well established for the Cerambycinae. Potential factors explaining the weak attraction of *D. rotundicolle* in the field are discussed.

**Keywords** Citrus borer · Longhorn beetles · Attractants · Pheromone traps · Neotropical Cerambycinae · *Retrachydes thoracicus*

## Introduction

The identification of cerambycid beetle pheromones has experienced remarkable progress in the past 15 years (reviewed by Hanks and Millar (2016)). A remarkable finding that has emerged from the study of longhorn beetle pheromones is the parsimony of pheromone components, with the same or similar compounds shared by species across genera, tribes, and even subfamilies

(Hanks and Millar 2016). The sub-family Cerambycinae is characterized by male-produced aggregation-sex pheromones that attract both sexes (Hanks and Millar 2016). Chemically, short chain  $\alpha$ -hydroxyketone type pheromones are highly conserved within the Cerambycinae, and have been reported for numerous species from different regions of the world (Hanks and Millar 2016), including species native to the Neotropical region (Silva et al. 2018; Silva et al. 2017). (*R*)-3-Hydroxy-2-hexanone seems to be the major and in some cases the only component of the sex-aggregation pheromones in many sympatric and synchronic species of this subfamily (Mitchell et al. 2013).

Traps baited with semiochemicals, in particular pheromones, are becoming a valuable tool for the detection and monitoring of invasive cerambycid species (Fan et al. 2018). Even at low densities, during the early stages of establishment, pheromone traps can be sensitive and reliable enough to detect target species (Hansen et al. 2015a, b). The potential of cerambycid pheromones as tools for surveillance has been explored to a greater extent than their potential for pest control. Still, a number of studies have explored this possibility by testing cerambycid pheromones, both sex and aggregation pheromones, in control

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10886-020-01203-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ María Eugenia Amorós  
eamoros@fq.edu.uy

✉ Andrés González  
agonzal@fq.edu.uy

<sup>1</sup> Facultad de Química, Universidad de la República, Avda. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, CP, Uruguay

<sup>2</sup> Centro Universitario de Paysandú, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay

strategies such as mass trapping or mating disruption (Barbour et al. 2019; Maki et al. 2011; Sanchez-Husillos et al. 2015). The use of cerambycid pheromones for pest control may be more realistic for fruit crops than for forest pests, particularly in the production of fresh fruit for direct consumption, which is severely restricted in the use of insecticides.

*Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville, 1834) (Coleoptera: Cerambycidae) is a South American citrus pest distributed through the center-south regions of Brazil, Argentina and Uruguay (Machado and Filho 1999). The adults are elongated (25–40 mm × 8–10 mm) and characterized by light-brown elytra with a continuous dark-brown border, dark-brown head, pronotum, antennae and legs (Faria et al. 1987). The adults are nocturnal and the female oviposits in the apex of branches upon young flush and leaf axils (Machado and Berti Filho 2006). After egg eclosion, the larvae perforate the epidermis and once in woody tissue they dig longitudinal galleries heading to thicker branches, usually reaching the principal trunk (Machado et al. 1991). By the end of the larval stage, the larvae prepare a pupal chamber with an opening for the adult to exit (Faria et al. 1987). The life cycle varies from 8 to 10 months in sub-tropical areas (Sao Paulo, Brazil) (Faria et al. 1987) up to 20–22 months in temperate regions (Link and Corrêa Costa 1994).

Until recently *D. rotundicolle* was considered a secondary citrus pest in the region (Bentancourt and Scatoni 1999), but in recent years populations have dramatically increased in localized areas, particularly in lemon orchards (Yamandú Ponchitesta, personal communication). Serious infestation levels result in poor yields, tree weakening, and indirect damages due to invaders of empty galleries (Machado and Filho 1999). Woodborer control is extremely complicated since the larvae are protected inside the wood (Shanley et al. 2009). Insecticides are also restricted in citrus crops destined for fresh fruit consumption. Therefore, the current management strategy for this insect relies exclusively on cultural control, which consists of pruning of twigs with evidence of oviposition damage, a strategy that has proven expensive and ineffective.

The objective of this study was to characterize the chemical communication system in *D. rotundicolle*, aimed at the development of pheromone-based management strategies. We used air entrainment, GC-MS, enantioselective GC, and GC-EAD methods to analyze volatile compounds from field-collected adults. We also conducted field experiments to study the effect of stereochemistry, minor compounds, trap location, and dispenser emission rate, in the trapping of *D. rotundicolle* adults. This study also contributes to the growing but scant knowledge of pheromone chemistry in neotropical Cerambycidae.

## Methods and Materials

**Insects** *D. rotundicolle* adults were collected in the field during the austral summers of 2017–2018 (season I), 2018–2019

(season II) and 2019–2020 (season III), in a citrus orchard located in San José, Uruguay (34°42'1"S 56°43'37"W). To capture live adults upon emergence, mesh covers were set up around highly infested trunks chosen from visual observation of abundant sawdust at their base. Wrapped trees were checked daily from early summer (mid-December) throughout the adult emergence period spanning from late January through April. Daily checking prevented the desiccation of emerged beetles and provided young adults for volatile collections. Live adults (mostly males) were also collected underneath the bark of *Eucalyptus globulus* windbreaks surrounding the citrus plots. Presumably, the loose bark of this eucalypt species provides shelter to the adults during the day. All captured beetles were maintained individually in small transparent plastic cages (12 cm diameter, 14 cm height) under laboratory conditions (22 ± 1 °C, 66 ± 9% RH, 14:10 L:D).

**Volatile Collection and Analysis** Insect volatiles were collected in an aeration system composed of a cylindrical glass chamber (23 cm long, 5 cm diameter), PTFE tubing (6 mm i.d.) and a flow of charcoal-filtered humidified air (0.5 L/min) obtained from a PTFE diaphragm pump (N035 AT.18, KNF, Germany). Volatile compounds were adsorbed in glass Pasteur pipettes containing 50 mg of HaySep-Q 80/100 mesh (HayeSep® Q, Sigma-Aldrich). Adsorbed volatiles were eluted with 1 mL hexane and 100 µL of internal standard solution (IS, geraniol 1 mg/mL), then stored at –4 °C. Immediately before GC-MS analysis the samples were concentrated to 100 µL under a gentle flow of nitrogen.

Volatile collections were performed according to insect availability, under controlled environmental conditions (22 ± 2 °C, 55 ± 10% RH, 14:10 L:D). To compare volatiles from males and females, aerations were performed simultaneously for 24 h from individual males and females placed in separate chambers. To determine the diel cycle of male emission, volatiles were collected in two time periods, daytime (9–17 h) and nighttime (17–9 h).

GC-MS analyses were performed by using a QP-2010 GC-MS (Shimadzu Corp, Japan) equipped with an apolar column (AT-5MS, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm, Alltech, USA) operated at a constant carrier gas flow of 1 mL/min (He). The injector was set at 100 °C to avoid thermal decomposition of volatile compounds, a problem that has been reported for cerambycid pheromones based on  $\alpha$ -hydroxy ketones (Schröder et al. 1994). The oven temperature was programmed from an initial temperature of 40 °C (1 min), then raised to 90 °C at 5 °C/min and to 250 °C at 10 °C/min. The transfer line was heated to 250 °C, and the injection (1 µL) was performed either in split or splitless modes depending on the objective of the analysis. Mass spectra were obtained from  $m/z$  28 to  $m/z$  350 in the scan mode (70 eV). Enantioselective GC analyses were performed with a Shimadzu 2010 GC equipped with an enantioselective column (MEGA-DEX DAC-Beta, 25 m × 0.25 mm, 0.25 µm,



MEGA, Italy) and a FID detector, operated with a constant carrier gas flow of 1 mL/min ( $H_2$ ). The oven temperature was programmed from 60 °C (5 min) to 120 °C at 1 °C/min (5 min), then to 18 °C at 5 °C/min (5 min). The injector and detector temperatures were 200 and 230 °C, respectively, and the injection (1  $\mu$ L) was in the splitless mode.

**Electroantennography Studies** GC-EAD analyses were performed by using a HP 5890 Series II gas chromatograph equipped with an EC-WAX column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m; Alltech Econo-Cap™, USA), operated with a constant carrier gas ( $H_2$ ) flow of 2 ml/min. The column effluents were split (1:1) in a vitreous silica outlet splitter (SGE, Austin, TX, USA), adding  $N_2$  as make-up gas (30 ml/min) prior to the splitter. The split effluents were directed through inert capillary column pieces (50 cm, 0.25 mm i.d.) to the FID and EAD detectors. The column directed towards the antenna passed through a transfer line (Syntech, Germany) heated to 240 °C, then discharged into a glass tube (1 cm diameter) with a current of humidified, charcoal-filtered air (150 ml per min), which delivered the volatiles to the antennal preparation located 4 cm downstream. The antenna was excised from the insect and attached to glass electrodes filled with saline solution (NaCl 7.5 g/L, KCl 0.4 g/L,  $CaCl_2$  0.2 g/L,  $NaHCO_3$  0.2 g/L), with the antennal tip removed to ensure better contact. The glass electrodes were connected to an EAG pre-amplified probe and further to a high impedance amplifier (IDAC 2) (Syntech, Germany) to receive simultaneous signals from the FID and EAD detectors. Data were analyzed using GC-EAD 2014 software (Syntech v.1.2.5).

To evaluate the response of male and female antenna to natural male volatiles, GC conditions were as previously described for GC-MS analyses. To evaluate the antennal response to the stereoisomers of 3-hydroxy-2-hexanone, an isothermal (90 °C) method was used, and 1  $\mu$ L of each stimulus was sequentially injected in the split mode at 1-min intervals, with continuous acquisition of FID and antennal response. The compounds were injected as follows: synthetic (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, synthetic (*S*)-3-hydroxy-2-hexanone, natural male volatiles, synthetic racemic 3-hydroxy-2-hexanone. Finally, to evaluate the antennal response to 2,3-hexanediol, the oven was programmed with an initial temperature of 70 °C (3 min), then raised to 90 °C (5 °C/min) and to 250 °C (10 °C/min). The injector temperature was maintained at 100 °C, and the injection was 1  $\mu$ L in split mode. The test solution contained synthetic racemic 3-hydroxy-2-hexanone and synthetic generic 2,3-hexanediol (all four stereoisomers).

**Field Tests** The attraction of *D. rotundicolle* adults to the synthetic pheromone compounds and blends was evaluated in a highly infested lemon (*Citrus aurantifolia*) grove located in Kiyú, San José, Uruguay, during three consecutive seasons (I, II and III). The trapping devices consisted of homemade cross-

vane traps (74 cm height, corrugated black cartonplast) attached to buckets half filled with soapy water. The trap panels were coated with Fluon® (Insect-A-Slip, PTFE DISP30, BioQuip Products, Inc) to improve trapping efficiency (Graham et al. 2010). In seasons I and II the traps were suspended from tree branches so that the buckets were 60 cm above ground. In season III two trap heights were evaluated. Ground level traps were hung as in the previous seasons, while elevated traps were hung from water pipes so that the buckets were 1.8 m above ground (elevated traps).

In seasons I and II, the lures consisted in double polyethylene sachets (press-seal bags, 5 × 7 cm) with one 4-cm cotton wick loaded with an isopropanol solution (1 mL) of the tested stimuli. In season I the major pheromone compound was evaluated both as racemic mixture and as pure enantiomer. The lures were loaded with 50 mg of racemic 3-hydroxy-2-hexanone or 25 mg of (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone. In season II the goal was to test the addition of 2,3-hexanediol, so the lures were loaded with 50 mg of racemic 3-hydroxy-2-hexanone or 50 mg of racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus 25 mg of generic 2,3-hexanediol (mixture of stereoisomers) in separate sachets. In both seasons control lures were loaded with 1 ml isopropanol. In season III only racemic 3-hydroxy-2-hexanone was used, and the lures were modified to test different emission rates. Two different dispensers were used: low-rate emission dispensers consisted of an Eppendorf tube (1 mL) with a perforated cap (1 mm) and a 1-cm cotton wick inside, loaded with 50 mg of neat racemic 3-hydroxy-2-hexanone. The high-rate emission dispensers were single polyethylene sachets with cotton wicks as used in the previous seasons, loaded with a high dose (500 mg) of neat racemic 3-hydroxy-2-hexanone. The use of solvent-less lures allowed for a more precise control over the emission rates of 3-hydroxy-2-hexanone. These were evaluated under laboratory conditions resulting in initial emission rates of 4 mg/day and 40 mg/day for the low and high emission rate dispensers, respectively (Table S1). These emission rates were in turn 10 and 100 times higher than the highest emission rate observed for a single male (see Results). Treatments in season III were hence arranged so that ground and elevated traps were baited with *i*) low-rate dispensers, *ii*) high-rate dispensers, *iii*) control (dispenser materials). In addition, to compare captures across seasons, an additional ground trap treatment was included with lures identical to those used in the previous seasons, i.e. 50 mg racemic 3-hydroxy-2-hexanone in 1 mL of isopropanol.

The traps were deployed within the 1-ha citrus plots (but see below), 6 m from the plot border and with a separation of at least 20 m between traps. Trap arrangement followed a randomized block design, with each replicate containing all treatments. Ten replicates were set up in seasons I and II and five in season III. In season II five replicates were set up within the citrus plots and five were arranged along the eucalyptus

windbreaks surrounding the plots. The reason for adding this factor was the observation of an important number of adults, mostly males, hiding underneath the loosened barks of the eucalypt trees during daytime. Lure replacement and trap service was done every 15 days in seasons I and II and weekly in season III. The treatments were assigned to the traps randomly on the day of set up, then rotated in every lure replacement to control for location effects. Other cerambycid beetles trapped were recorded.

**Chemicals** Racemic 3-hydroxy-2-hexanone for lures was purchased from ChemTica International, S.A. and Bedoukian Inc. (*R*)-3-Hydroxy-2-hexanone, (*S*)-3-hydroxy-2-hexanone and 2,3-hexanediol were synthesized according to (Heguaburu et al. 2017). The four stereoisomers of 2,3-hexanediol were obtained from carbonyl reduction of (*R*)- and (*S*)-3-hydroxy-2-hexanone, following column separation of diastereomers and NMR assignment of absolute configuration at C2. (*R*)- and (*S*)-3-hydroxy-2-hexanone standards were also kindly provided by Prof. Jocelyn Millar (UC-Riverside, USA).

**Statistical Analysis** Day and night pheromone emission were expressed as amount of 3-hydroxy-2-hexanone relative to the internal standard and subjected to a *Wilcoxon test* for paired samples. Beetle trap captures (i.e. total catches per block/replicate throughout the season) in seasons I and II were subjected to a generalized linear mixed model (*GLMM*) with Poisson distribution and “block” as a random factor, performed in R (R Core Team 2018) with the *glmer* function from the *lme4* package (4 1.1–21, Bates et al. 2015). Treatment means were compared using *Tukey's HSD test* ( $\alpha = 0.05$ ) using the *multcomp* package (1.4–8, Hothorn et al. 2008). Due to limitations of *GLM* models, any treatment with zero catches was not included in the analysis. In season II, trap location (within plot vs. windbreak) was considered as a fixed factor. In season III, due to low beetle captures, differences among treatments for *D. rotundicolle* and *R. thoracicus* captures were analyzed with the *Friedman's test* followed by the *Conover* post-hoc test ( $\alpha = 0.05$ ) (Infostat statistical software; Di Rienzo et al. 2011). Male and female comparisons across seasons were done with *Chi-square* tests using the pooled number of beetles caught per season in all treatments and blocks.

## Results

**Volatile Collection and Analysis** Aeration samples of male and female *D. rotundicolle* were obtained and analyzed throughout seasons I and II. Male volatile samples consistently showed a major compound that accounted for 96.8% [92.8–98.8] (median [interquartile range],  $N = 10$ ) of the GC relative

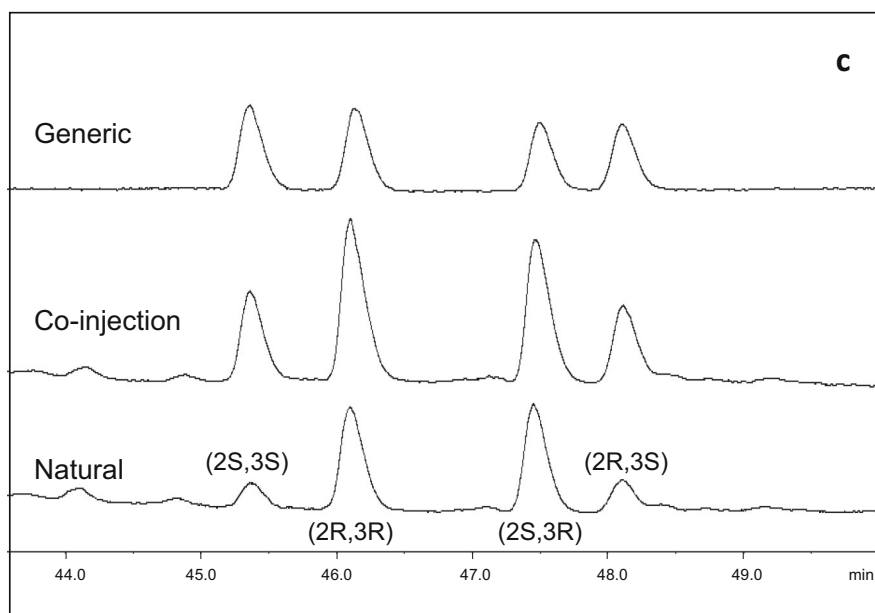
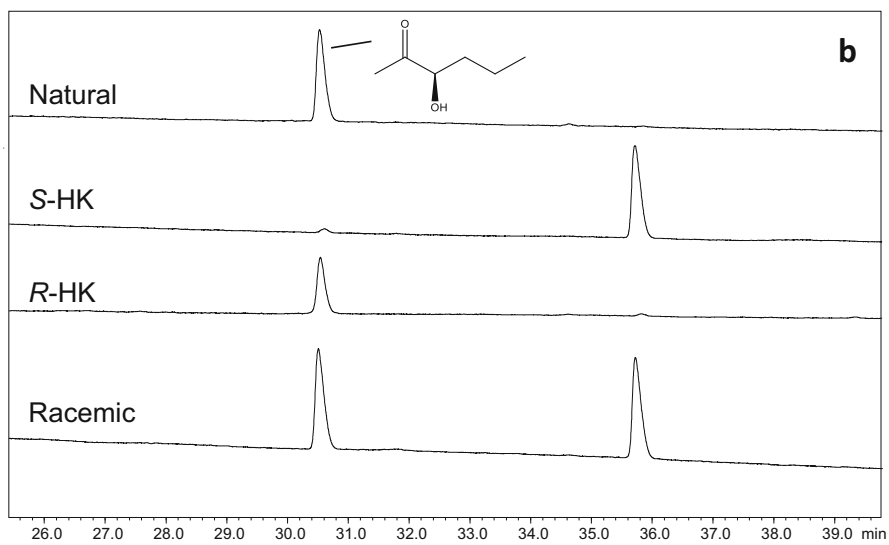
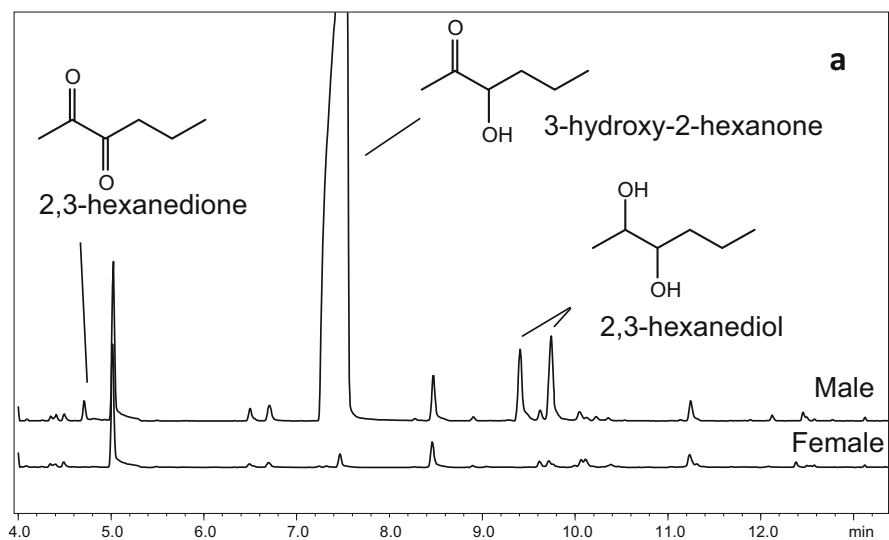
**Fig. 1** Chemical analysis of *D. rotundicolle* volatile extracts: **a** Representative total ion chromatograms of individual male (upper trace) and female (lower trace) volatile extracts after 24 h of aeration (see Fig. S1 for mass spectra). Note: small peaks at 7.5 min and 9.7 min in the female trace are contaminants. **b** Enantioselective GC analysis of male volatile extracts compared to racemic and enantiomerically pure (*3R/3S*)-hydroxy-2-hexanone. **c** Enantioselective GC analysis of 2,3-hexanediol isomers in male volatile extracts (lower trace), synthetic generic diol (upper trace) and the co-injection of natural and synthetic diols (middle trace). The four stereoisomers were assigned based on isolated synthetic standards

area. No samples from females showed this compound or any other distinctive volatile (Fig. 1a). The retention time and mass spectrum of the male-specific compound clearly matched those of a synthetic standard of 3-hydroxy-2-hexanone (Fig. S1). Enantioselective GC analysis with stereochemically pure synthetic standards showed that the natural enantiomer emitted by the males is (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone (Fig. 1b). Quantification of 3-hydroxy-2-hexanone by peak area comparison with an internal standard showed that males emit highly variable amounts, ranging from 0.5 to 391  $\mu\text{g}$  in 24 h (8.8  $\mu\text{g}$  [0.9–54.5], median [interquartile range],  $N = 17$ ).

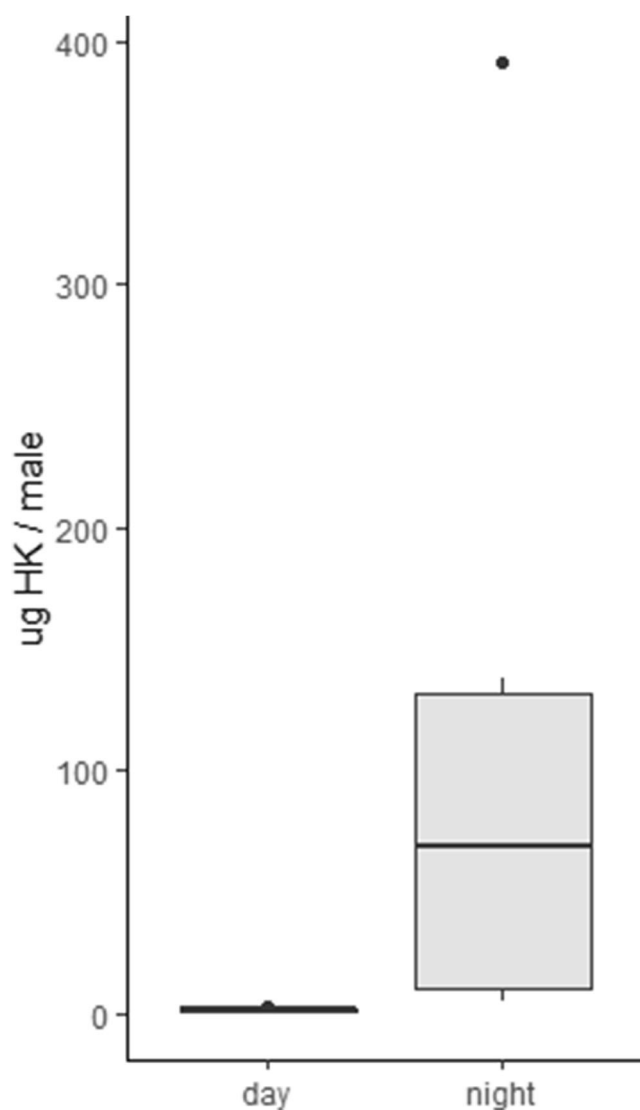
Males also produce some minor compounds that were not consistently observed even in different samples from a single male. When present, minor compounds accounted for 2.8% [1.2–5.3] (median [interquartile range],  $N = 10$ ) of the GC relative area. The more abundant minor compounds showed matching retention times and mass spectra with synthetic standards of diastereomers of 2,3-hexanediol (Fig. S1). Enantioselective GC comparisons with standards of all 4 stereoisomers of 2,3-hexanediol showed that all are present in the natural samples, with the (*3R*)-diastereomers more abundant than the (*3S*) (Fig. 1c). Another minor compound with shorter retention time was also observed in male aerations, again inconsistently. The mass spectrum of this compound suggests it to be 2,3-hexanedione (Fig. S1).

The study of diel pheromone emission pattern showed that males emit (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone almost exclusively between 17 and 9 h (scotophase  $\pm 3$  h) (Wilcoxon,  $P = 0.002165$ ) (Fig. 2). Samples collected overnight contained 68.6  $\mu\text{g}/\text{male}$  [4.8–201.3] (median [interquartile range],  $N = 6$ ), whereas diurnal collections showed only traces of the compound 1.5  $\mu\text{g}/\text{male}$  [0.8–1.8] (median [interquartile range],  $N = 6$ ).

**Electroantennography Studies** Coupled GC-EAD analyses were performed to evaluate the response of *D. rotundicolle* female and male antennae to volatile extracts and synthetic compounds. The antennae showed low signal to noise ratios, allowing to obtain clear data only from a limited number of insects. Nevertheless, well-defined responses to natural (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone from male volatile extracts were received from both male and female antennae (Fig. 3a). The







**Fig. 2** Diel pheromone emission of 3-hydroxy-2-hexanone (HK) by *D. rotundicolle* males. Night: 17–9 h; day 9–17 h; scotophase: 20–6 h. An asterisk indicates a significant difference (Wilcoxon  $P < 0.05$ )

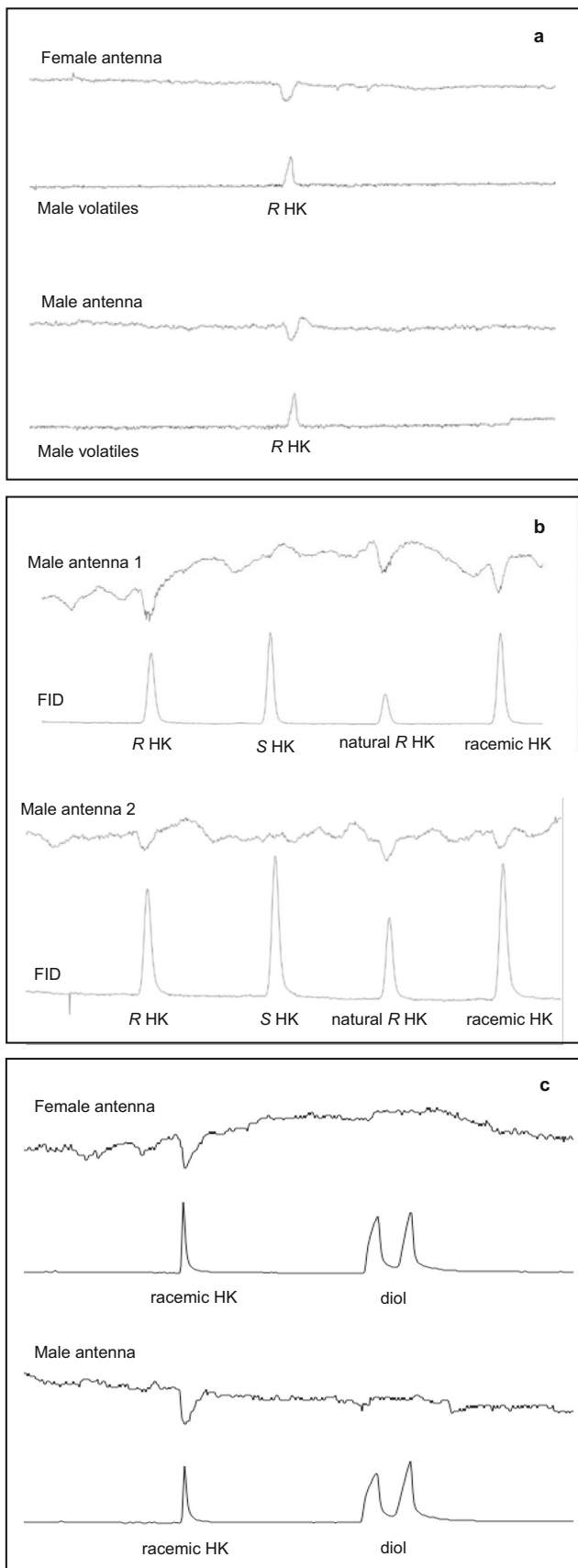
antennae do not seem to respond to the non-natural (*S*)-3-hydroxy-2-hexanone. This was shown by subsequent applications of four samples to the same antennae, namely synthetic *R*- and *S*-enantiomers of 3-hydroxy-2-hexanone, male volatiles extracts, and racemic 3-hydroxy-2-hexanone. By working under isothermal conditions and injecting the samples with 1-min differences, the same antennae was stimulated with compounds eluting 1 min apart. Male antennae responded to the synthetic and natural *R*-enantiomer, as well as to the racemic 3-hydroxy-2-hexanone, but not to the *S*-enantiomer even though it was applied between the other stimuli (Fig. 3b). The corresponding experiments with female antennae did not show conclusive results, although the response pattern appears to be the same as in males (Fig. S2). Finally, 2,3-hexanediol (mixture of all stereoisomers) did not trigger any response from male ( $N = 5$ ) or female ( $N = 6$ )

antennae, even though the same antennae clearly responded to racemic 3-hydroxy-2-hexanone that was co-injected with the diol (Fig. 3c).

**Field Tests** In general, considering the high infestation levels of the field site, low captures of *D. rotundicolle* adults have been observed. In season I, a total of 29 beetles were found in the traps, with no significant differences among traps baited with racemic 3-hydroxy-2-hexanone, (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone and control traps (GLMM, Tukey's HSD:  $P > 0.5$  for all contrasts) (Fig. 4a). Interestingly, incidental catches of another cerambycine species was observed in numbers that surpassed that of the target species. The species was identified from local collections as *Retrachydes thoracicus* (Olivier, 1790), a well-known species native to the neotropics (Monné 2018). A total of 56 beetles were captured in season I, and in this case the captures were clearly different among pheromone and control traps, with all 56 beetles captured in pheromone-baited traps and zero catches in the control. No significant differences were observed between the two pheromone treatments (racemic vs. *R*-enantiomer) (GLMM, Tukey's HSD:  $P = 0.424$ ) (Fig. 4a).

In season II, a total of 35 *D. rotundicolle* adults were captured, 8 in the citrus plot traps and 27 in the windbreak traps. The data were pooled and analyzed altogether, showing significant differences between catches in the control and the racemic 3-hydroxy-2-hexanone (GLMM, Tukey's HSD:  $P = 0.0240$ ). Captures in control traps and traps baited with the mixture of racemic 3-hydroxy-2-hexanone and 2,3-hexanediol were not significantly different but showed a clear tendency in favor of traps baited with the mixture (GLMM, Tukey's HSD:  $P = 0.0669$ ). Finally, traps baited with the hydroxyketone alone or in combination with the diol showed no differences (GLMM, Tukey's HSD:  $P = 0.8495$ ) (Fig. 4b). Similar to the previous season, 56 *R. thoracicus* beetles were trapped in season II, 55 of them in pheromone-baited traps. No significant differences in *R. thoracicus* captures were found between traps baited with racemic 3-hydroxy-2-hexanone or with the hydroxyketone:diol blend (GLMM, Tukey's HSD:  $P = 0.58230$ ). When compared to the control traps, both captured significantly more beetles ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4b).

Season III resulted in the overall lowest captures of both beetle species, possibly due to a very dry summer. A population decrease in *D. rotundicolle* was evident from the notable decrease in oviposition damage in the citrus plants, the absence of adult emergence from meshed trees, and the lack of catches in control traps, all factors that clearly contrasted with the previous seasons. Nevertheless, some relevant observations can be made from the results. A total of 14 *D. rotundicolle* adults were trapped, all of them in traps baited with racemic 3-hydroxy-2-hexanone. Moreover, all but one beetle were captured in the elevated traps and most of them (8) in the traps with high-rate emission dispenser (Friedman



**Fig. 3** GC-EAD analysis of *D. rotundicollis* male volatile extracts and synthetic standards: **a** Male and female antennal response to (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone (*R* HK) in natural aeration samples. **b** Responses of male antennae to synthetic samples of 3-hydroxy-2-hexanone (*R*, *S* and racemic HK) and natural male volatiles (natural). The samples were sequentially injected at 1-min intervals under isothermal GC conditions. **c** Female and male antennal response to a blend of racemic 3-hydroxy-2-hexanone (racemic HK) and generic (four stereoisomers) 2,3-hexanediol (diols)

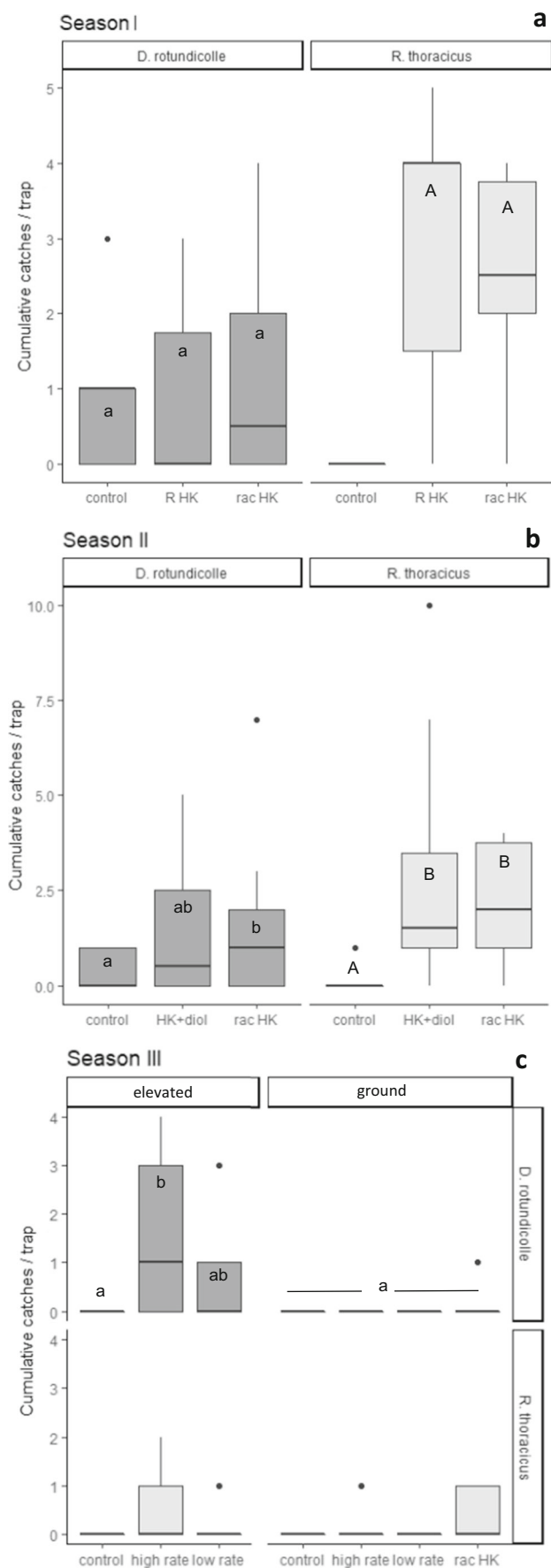
*Chi-squared*,  $P = 0.0053$ ) (Fig. 4c). In this third season, *R. thoracicus* catches were similarly low with 13 adults trapped, all of them, as observed in previous seasons, in 3-hydroxy-2-hexanone baited traps (*Friedman Chi-squared*,  $P = 0.0037$ ). In this case, no clear pattern was observed between different trap heights (7 catches in elevated traps and 6 in ground level traps) nor emission ratios (8 in high rate and 5 in low rate) (Fig. 4c).

It should be noted that throughout all three seasons significantly more females than males were captured for both beetle species ( $\chi^2 P < 0.05$  for all comparisons) (Fig. 5). Moreover, this pattern was observed in all trap treatments, including the control traps (Fig. S3).

## Discussion

Here we report on the pheromone chemistry of the South American citrus borer, *D. rotundicollis*. Similar to several cerambycine species (Hanks and Millar 2016), males of *D. rotundicollis* emit (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, along with minor compounds that are not consistently emitted. To our knowledge this is the first report of a species within the tribe Torneutini to share this conserved pheromone chemistry, further expanding the taxonomic distribution of this chemical motif within the Cerambycinae. Males emit (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone mostly at night, when they are behaviorally active. Emitted amounts in the laboratory proved to be highly variable among males, most commonly around 10–50  $\mu\text{g}$  per day, but reaching almost 400  $\mu\text{g}$  in a single night.

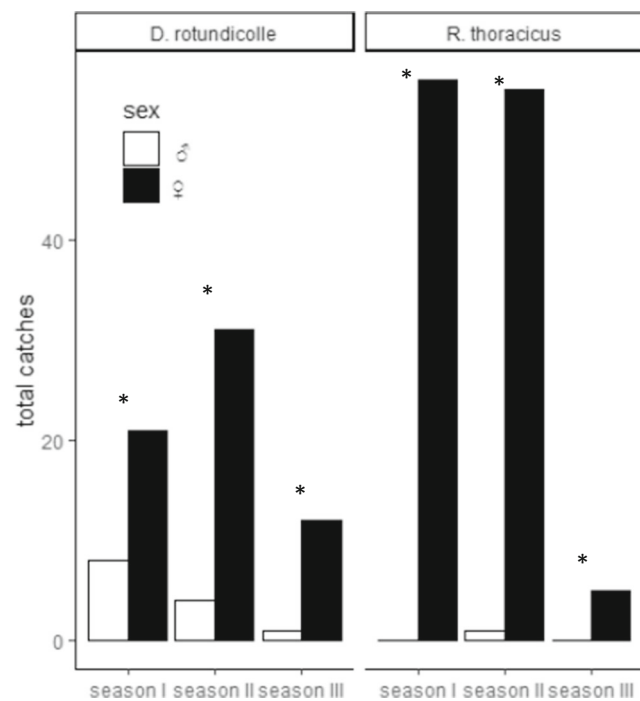
Our electroantennography results show that both male and female antennae respond to the male-specific compound, suggesting that (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone functions as a male pheromone involved in communication with both sexes. As shown for several related species (Hanks and Millar 2016), the compound most likely serves as an aggregation-sex pheromone. Our GC-EAD results also showed, clearly in the case of males, that the antenna does not respond to the non-natural (*S*)-3-hydroxy-2-hexanone. The fact that the insects do not perceive the “wrong” enantiomer is consistent with several studies showing that the non-natural enantiomer does not affect field captures. Furthermore, our results suggest similar amplitudes in the antennal responses to (*R*)-3-hydroxy-2-



**Fig. 4** Boxplots showing field trapping of *Diploschema rotundicolle* (dark grey) and *Retrachydes thoracicus* (light grey) in three consecutive seasons (austral summers of 2018–2020). HK stands for racemic 3-hydroxy-2-hexanone, diol stands for generic 2,3-hexanediol. Different letters indicate significant differences (post-hoc Friedman Conover test,  $\alpha = 0.05$ ). In C: elevated and ground stand for trap height, high rate / low rate stand for dispenser emission rate

hexanone before and after stimulation with the S-enantiomer, implying that the non-natural enantiomer does not inhibit pheromone detection. This is relevant from an applied perspective, since the racemic 3-hydroxy-2-hexanone is commercially available and cheaper to synthesize.

Field attraction of *D. rotundicolle* adults to traps baited with 3-hydroxy-2-hexanone, either racemic or enantiomerically pure, was not as strong as expected. Despite working in an area with high infestation levels, total catches did not exceed a few tens of adult beetles in three field seasons. Judging from the damage observed particularly in the first two seasons, and the fresh sawdust underneath almost every tree in the field, these catches likely represent an insignificant fraction of the population. An indication of the high abundance of the insect during the first two seasons was the unexpected captures in control traps. Indeed, captures in pheromone-baited traps in the first season were no different than by-chance captures in control traps and significantly but slightly higher in the second season. Clearly some other factors were missing that could be related to the chemistry of the bait, the emission rates of lures, the structure of the trap, or



**Fig. 5** Field trapping of male and female *Diploschema rotundicolle* (left) and *Retrachydes thoracicus* (right) per season. All treatments combined. Asterisks indicate  $P < 0.05$  in the Chi-square test

factors related to the biology of the insect. Regardless of the low captures, the first field season strongly suggested that the pure enantiomer and the racemic mixture would not behave differently as attractants in the field, which was expected from our GC-EAD results.

The lack of minor compounds was clearly a potential explanation for the low capture levels. It has been shown that minor compounds are important in determining pheromone specificity in cerambycines that share the main pheromone component (Mitchell et al. 2015). In our analysis of *D. rotundicolle* male volatiles we identified 2,3-hexanedione and 2,3-hexanediol, both known compounds from other cerambycine species. These compounds were found inconsistently, with some male volatile samples showing only the main hydroxyketone alone. 2,3-Hexanedione has been commonly found in cerambycines but has not shown any biological activity so far (Hanks and Millar 2016). We, therefore, focused on 2,3-hexanediol, which was more abundant and has shown pheromonal activity in other studies. Our GC-EAD and field results, however, suggest that the diol does not play an ecologically relevant role for *D. rotundicolle*. Male and female antennae that clearly detected the hydroxyketone showed no response to the co-injected diol in GC-EAD, and the addition of the diol to the hydroxyketone in lures did not increase attraction in the field. Interestingly, our enantioselective GC analysis showed the natural diol to be present in all four stereoisomers, whereas the hydroxyketone in *D. rotundicolle* is enantiomerically pure. Combined, these results led us to hypothesize that for some species, the diol may just be a byproduct in the formation of the hydroxyketone without a specific biological significance, while in other species it has acquired a communication value.

Trap architecture or placement may also be factors causing low captures of *D. rotundicolle* despite high population levels. While minor design details may be overlooked in home-made traps, lubricant-treated cross-vane traps have shown to be adequate devices for trapping cerambycines (Allison et al. 2014). Unexpected support for our trap design came from the incidental catches of *Retrachydes thoracicus* in our field experiments. *Retrachydes thoracicus* is a native cerambycine species reported in Argentina, Brazil, Paraguay, Bolivia and Uruguay (Bentancourt and Scatoni 1999). It is a polyphagous species associated with several woody hosts, among which are citrus, eucalyptus and casuarina trees, all present in our experimental site. Relatively large numbers of this beetle, similar in size to *D. rotundicolle*, were captured almost exclusively in the pheromone-baited traps (1 out of 125 in a control trap) in all three seasons of study. *Retrachydes thoracicus* is not regarded as a pest in citrus and they were not found emerging from mesh-covered citrus trees, so their population density is probably far lower than that of *D. rotundicolle* in our experimental site. We conclude that captured *R. thoracicus* adults were actually attracted from the surroundings towards the pheromone traps, thus representing

an unintended positive control for the capturing and retaining capacity of our traps. Our results strongly suggest that 3-hydroxy-2-hexanone plays an important role in the chemical communication of *R. thoracicus*. Being sympatric species, *R. thoracicus* and *D. rotundicolle* would not overlap or cross-attract each other because the former is active during the day (Bentancourt and Scatoni 1999), whereas *D. rotundicolle* is reported to have nocturnal habits, both for oviposition (Machado and Filho 1999) as for pheromone production (this study).

Trap location and dispenser emission rates were investigated during our third field season. Despite significantly lower catches in this season, the results show that elevated placement of the traps and higher emission rates have a positive effect in the attraction of *D. rotundicolle* to 3-hydroxy-2-hexanone. Trap height is a factor that has proven relevant for capturing cerambycids (Graham et al. 2012; Schmeelk et al. 2016). While the citrus crop does not present a large extent of vertical gradient, the elevated traps in our experiment performed clearly better (13 out of 14 *D. rotundicolle* were captured in elevated traps). Whether this is a result of elevated traps being more exposed or due to an actual flight stratification of the beetles cannot be concluded. Interestingly trap height had no effect in the case of *R. thoracicus*, suggesting that trap exposure alone is not an obvious explanation.

Dispenser emission rates also produced a significant effect on the capture of *D. rotundicolle*. It is known in cerambycids that male-produced aggregation-sex pheromones are often produced in large amounts, ranging up to tens or hundreds of micrograms per hour. Hence, lures may need to approximately match or exceed these rates to be effective, releasing at least several milligrams of pheromone per day (Millar and Hanks 2018). Because the lures used in the first two seasons contained solvent, our efforts to measure release rates did not produce reliable results. The use of solvent-free dispensers in the third season allowed us to measure release rates by weight loss. We used release rates of 4 and 40 mg per day, representing 10 and 100 times more than the highest amount of pheromone emitted by a male in the laboratory (ca. 400  $\mu\text{g}$ /day). Traps with high-emission rate dispensers captured about twice as many adults of *D. rotundicolle*, but again, the low overall captures prevent a definite conclusion.

In summary, we show that males of the South American citrus borer *Diploschema rotundicolle* emit (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, to which both male and female antenna respond. The antennae respond to the racemic mixture as well, but not to the non-natural enantiomer. Males also emit all four stereoisomers of 2,3-hexanediol, which do not trigger antennal responses or enhance field captures. Traps baited with racemic 3-hydroxy-2-hexanone showed low captures levels, although these were enhanced by higher emission rate dispensers and elevated trap height. Unintended but abundant catches of *Retrachydes thoracicus* in pheromone-baited traps are also reported. For both species, significantly more females were



captured across treatments and seasons, suggesting that females are the more active sex or that the species have biased sex ratios.

Effective trapping of *D. rotundicollae* adults would be a significant contribution to pest management in the citrus sector in southern South America. While other emerging pests and diseases pose important threats to citrus crops in the region, local population explosions of *D. rotundicollae* are becoming more common. Although (*R*)-3-hydroxy-2-hexanone must play a role in the chemical communication of the insect, some cerambycids are moderately or not attracted at all to their pheromones alone, requiring for instance the presence of host plant volatiles (Hanks et al. 2018). This and other factors will be the focus of our future work to optimize pheromone traps for *D. rotundicollae*.

**Acknowledgments** We would like to thank the citrus companies San Miguel Global and Agrisur-Uruder for granting financial support and access to their groves. Additional financial support from CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica from Universidad de la República) and PEDECIBA (Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas, Uruguay) are also acknowledged. We would also like to thank Alejandro Borges, Marcelo Saavedra, Yamandú Pochintesta, Martín Lanfranco, Gabriela Asplanato, Carmen Rossini, Diana Valle, Anna Paula Burgueño, Federico Rodrigo, María Laura Umpiérrez, Valentina Ocampo and Paula Altesor for various contributions. Chemical standards provided by Jocelyn G. Millar and valuable advice by Lawrence Hanks are much appreciated.

## References

- Allison JD, Bhandari BD, McKenney JL, Millar JG (2014) Design factors that influence the performance of flight intercept traps for the capture of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae) from the subfamilies Lamiinae and Cerambycinae. *PLoS One* 9(3):e93203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093203>
- Barbour JD, Alston DG, Walsh DB, Pace M, Hanks LM (2019) Mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop and sweet cherry. *J Econ Entomol* 112: 1130–1137. <https://doi.org/10.1093/jee/toy430>
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67(1):1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bentancourt CM, Scatoni IB (1999) Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay, 3rd edn. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011) InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Fan J, Denux O, Courtin C, Bernard A, Javal M, Millar JG, Hanks LM, Roques A (2018) Multi-component blends for trapping native and exotic longhorn beetles at potential points-of-entry and in forests. *J Pest Sci* 92:281–297. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0997-6>
- Faria AM, Fernandes SCS, dos Santos JCC, Bergmann E, Brisolla AD, Takematsu AD, Negri JD, y Sempinato OR (1987) Estudo sobre controle da broca-dos ramos e do tronco dos citros *Diploschema rotundicollae* (Serville, 1834) (Coleoptera - Cerambycidae). *Biologico*, Sao Paulo 53:13–18
- Graham EE, Mitchell RF, Reigel PF, Barbour JD, Millar JG, Hanks LM (2010) Treating panel traps with a fluoropolymer enhances their efficiency in capturing cerambycid beetles. *J Econ Entomol* 103: 641–647
- Graham EE, Poland TM, Millar JG (2012) A comparison of trap type and height for capturing cerambycid beetles (Coleoptera). *J Econ Entomol* 105:837–846. <https://doi.org/10.1603/EC12053>
- Hanks LM, Millar JG (2016) Sex and aggregation-sex pheromones of cerambycid beetles: basic science and practical applications. *J Chem Ecol* 42:631–654. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0733-8>
- Hanks LM, Mongold-Diers JA, Atkinson TH, Fierke MK, Ginzel MD, Graham EE, Poland TM, Richards AB, Richardson ML, Millar JG (2018) Blends of pheromones, with and without host plant volatiles, can attract multiple species of cerambycid beetles simultaneously. *J Econ Entomol* 111:716–724. <https://doi.org/10.1093/jee/tox373>
- Hansen L, Xu T, Wickham J, Chen Y, Hao D, Hanks LM, Millar JG, Teale SA (2015a) Identification of a male-produced pheromone component of the citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis*. *PLoS One* 10(8):e0134358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134358>
- Hansen L, Xu T, Wickham J, Chen Y, Hao D, Hanks LM, Millar JG, Teale SA (2015b) Identification of a male-produced pheromone component of the citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis*. *PLoS One* 10:e0134358
- Heguaburu V, do Carmo H, Parpal F, Amorós ME, González A (2017) Synthesis of aggregation pheromone components of cerambycid species through  $\alpha$ -hydroxylation of alkylketones. *Tetrahedron Lett* 58:1738–1741
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* 50:346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Link D, Corrêa Costa E (1994) Nível de infestação da broca dos citros, *Diploschema rotundicollae* (Serville, 1834) em cinamomo e plantas cítricas, em Santa Maria - RS. *Cienc Rural* 24(1):7–10. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781994000100002>
- Machado LA, Berti Filho EB (2006) Prática cultural associada ao controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate à broca-dos-citros *Diploschema rotundicollae*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo 73:439–445
- Machado LA, Filho B (1999) Criação artificial da broca-dos-citros *Diploschema rotundicollae* (Serville, 1834) (Col.: Cerambycidae) *Biológico*, São Paulo 61:5–11
- Machado LA, Cruz BPP, Leite LG, Batista Filho A, da Silva EM (1991) Práticas para o controle da broca-dos citros, *Diploschema rotundicollae* (Serville, 1834) (Coleoptera: Cerambycidae). In: XIII Congresso Brasileiro de Entomologia, Sociedade Entomologica do Brasil, Recife, PE, p 313
- Maki EC, Millar JG, Rodstein J, Hanks LM, Barbour JD (2011) Evaluation of mass trapping and mating disruption for managing *Prionus californicus* (Coleoptera: Cerambycidae) in hop production yards. *J Econ Entomol* 104:933–938
- Millar JG, Hanks LM (2018) New pheromones for invasive cerambycids: from the bench to the field. In: proceedings of the 29<sup>th</sup> USDA inter-agency research forum on invasive species, Annapolis, MD
- Mitchell RF, Millar JG, Hanks LM (2013) Blends of (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one and alkan-2-ones identified as potential pheromones produced by three species of cerambycid beetles. *Chemoecology* 23:121–127
- Mitchell RF, Reigel PF, Wong JC et al (2015) Cerambycid beetle species with similar pheromones are segregated by phenology and minor pheromone components. *J Chem Ecol* 41(5):431–440. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0571-0>

- Monné M (2018) Catalogue of the Cerambycidae (Coleoptera) of the Neotropical region. Part I. Subfamily Cerambycinae. <https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.946.1.1>. Accessed July 2019
- R Core Team (2018) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna <https://www.R-project.org>
- Sanchez-Husillos E, Etxebeste I, Pajares J (2015) Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *J Appl Entomol* 139:747–758
- Schmeelk TC, Millar JG, Hanks LM (2016) Influence of trap height and bait type on abundance and species diversity of cerambycid beetles captured in forests of east-Central Illinois. *J Econ Entomol* 109:1750–1757
- Schröder F, Fettköther R, Noldt U, Dettner K, König WA, Francke W (1994) Synthesis of (3*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol and (2*S*,3*R*)-2,3-hexanediol, the male sex pheromone of *Hylotrupes bajulus* and *Pyrrhidium sanguineum* (Cerambycidae). *Liebigs Ann Chem* 1994:1211–1218. <https://doi.org/10.1002/jlac.199419941212>
- Shanley RP, Keena M, Wheeler MM, Leland J, Hajek AE (2009) Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biol Control* 50:94–102
- Silva WD, Zou Y, Bento JMS, Hanks LM, Millar JG (2017) Aggregation-sex pheromones and likely pheromones of 11 south American cerambycid beetles, and partitioning of pheromone channels front. *Ecol Evol* 5:1–9
- Silva WD, Millar JG, Hanks LM, Costa CM, Leite MOG, Tonelli M, Bento JMS (2018) Interspecific cross-attraction between the south American cerambycid beetles *Cotyclytus curvatus* and *Megacyllene acuta* is averted by minor pheromone components. *J Chem Ecol* 44:268–275. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0933-5>



# Trapping of *Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier) and Other Neotropical Cerambycid Beetles in Pheromone- and Kairomone-Baited Traps

María Eugenia Amorós<sup>1</sup>  · Lautaro Lagarde<sup>1</sup> · Hugo Do Carmo<sup>2</sup> · Vivivana Heguaburu<sup>2</sup> · Marcela Monné<sup>3</sup> · José Buenahora<sup>4</sup> · Andrés González<sup>1</sup>

Received: 18 October 2021 / Accepted: 21 March 2022

© Sociedade Entomológica do Brasil 2022

## Abstract

The subfamily Cerambycinae, one of the most diverse in longhorn beetles, is well known for its remarkable chemical parsimony in male-emitted pheromones. Conserved shared structural motifs have been reported in numerous species, sometimes working in combination with plant volatile kairomones. Among other compounds, the most ubiquitous male pheromone in cerambycine species is 3-hydroxyhexan-2-one. We conducted field trials using intercept traps baited with 3-hydroxyhexan-2-one and observed abundant captures of several Neotropical cerambycine species. These were *Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier), *Megacyllene acuta* (Germar), *Compsocerus violaceus* (White), and *Cotyclytus curvatus* (Germar) in high numbers, as well as *Chydarteres striatus striatus* (Fabricius) and *Odontocroton flavicauda* (Bates) in smaller numbers. When ethanol was added to the traps, a remarkable increase in the attractiveness of 3-hydroxyhexan-2-one was observed for *R. thoracicus thoracicus* and *M. acuta*. Adding ethanol also resulted in the capture of *Chrysoprasis aurigena* (Germar). Finally, incidental catches in pheromone-baited traps of *Trachelissa maculicollis* (Audinet-Serville), *Neoclytus pusillus* (Laporte & Gory), *Achryson unicolor* (Bruch, 1908) and *Achryson surinamum* (Linnaeus), *Megacyllene mellyi* (Chevrolat) and *Thelgetra adustus* (Burmeister) were also observed. Pheromone chemistry has been reported for *C. curvatus*, *M. acuta* and *N. pusillus*, all three producing 3-hydroxyhexan-2-one, and for *C. aurigena* and *A. surinamum*, which produce other compounds. Our findings suggest that the captured species probably produce 3-hydroxyhexan-2-one for their pheromone communication system. Alternatively, they might be “eavesdropping” on the pheromones of other cerambycine species. The probable synergistic effect of ethanol is likely explained from its kairomonal role as a volatile cue for plant stress or ripeness.

**Keywords** Longhorn beetles · Cerambycinae · Kairomone-pheromone synergism · 3-hydroxy-2-hexanone · Ethanol

Edited by Gabriel Manrique

✉ María Eugenia Amorós  
eamoros@fq.edu.uy

✉ Andrés González  
agonzal@fq.edu.uy

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Univ de La República Udelar, Avda. Gral. Flores 2124, CP 11800 Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Centro Universitario de Paysandú, Universidad de La República, Paysandú, Uruguay

<sup>3</sup> Museu Nacional, Univ Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup> Estación Experimental INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Montevideo, Uruguay

## Introduction

There has been a remarkable progress in the identification of cerambycid beetle pheromones in the past 15 years. As new pheromones were discovered, it became evident that cerambycids show a high degree of biosynthetic parsimony of male-emitted sex-aggregation pheromones. The same or similar pheromone components are shared by several species across genera, tribes, and even subfamilies [reviewed by (Hanks and Millar 2016)].  $\alpha$ -Hydroxyketones and 2,3-alkanediols are the most conserved chemical motifs within the subfamily Cerambycinae, with (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one as the most widespread major or sole pheromone component (Hanks and Millar 2016). Indeed, this compound has been fully identified or suggested as a pheromone component for cerambycine species belonging

to at least 25 genera across 10 tribes (Millar et al. 2019), including several sympatric and synchronic species (Mitchell et al. 2013). For this reason, these compounds have been used to prepare “generic pheromone lures” in the context of cerambycid pheromone studies (Wang 2017). Research on chemical communication of Neotropical cerambycids also indicates that this hydroxyketone is also used by many species native to the region (Aguirre Gil et al. 2021; Amorós et al. 2020; Silva et al. 2020, 2016, 2018, 2017).

Cerambycids are also known for using plant volatiles as kairomonal cues for resources such as food or refuge. Moreover, since many cerambycid species mate on the same host plants on which the adults and larvae feed, these plant chemical cues may also serve to bring the sexes together (Hanks and Millar 2016; Wang 2017). Many cerambycid species are attracted to stressed hosts, so research on host plant attractants has naturally focused on volatiles associated with plant stress. This is the case of ethanol, which is produced by stressed or diseased plants and has been reported to attract many species of wood-boring insects. Indeed, ethanol is commonly used as a general attractant for monitoring and quarantine surveillance programs in forests (Brockerhoff et al. 2006; Fan et al. 2018; Hanks and Millar 2013; Hanks et al. 2012; Miller et al. 2017). Plant volatile kairomones have also been shown to synergize with pheromones in the attraction of cerambycids, possibly adding specificity to unspecific pheromone communication systems (reviewed by Hanks and Millar 2016; Wang 2017)).

Over the last few years, our group has conducted field trapping experiments specifically targeted to the citrus borer *Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville) (Cerambycidae: Cerambycinae), a species that produces large amounts of (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one likely serving as a sex-aggregation pheromone (Amorós et al. 2020). As a side experiment of our work, we have systematically recorded captures of other native cerambycines in traps baited with generic pheromone lures, and more recently, we have added plant kairomone compounds to study potential pheromone-kairomone synergistic effects. We here report these results, which we intend as a contribution to the knowledge of chemical communication systems of native cerambycines in southern South America.

## Material and methods

### Field experiments

Field trials were performed in three citrus groves (34°48′58.6″S 56°22′53.6″W; 34°38′31.4″S 56°44′23.2″W; 34°37′11.2″S 56°22′02.7″W) and in one peach orchard (34°38′33.5″S 56°43′40.0″W), all located in southern Uruguay. Homemade cross-vane traps with standard design

(e.g., Alpha Scents Inc., West Linn, Oregon, USA; ChemTica Internacional SA, San Jose, Costa Rica) were used as trapping devices (black corrugated plastic, panel measures: 74×40 cm). Trap panels, funnels, and collector basins were coated with Fluon® (Insect-A-Slip, PTFE DISP30, BioQuip Products, Inc.) (Graham et al. 2010). Trap basins (adapted Mc Phail traps, 19 cm height, 13-cm diameter) were partially filled with soapy water and salt to kill and preserve captured beetles.

Different trapping setups were laid out during summer and early fall (December to April) in 2015–2016 (season I), 2017–2018 (season II), 2018–2019 (season III), and 2019–2020 (season IV). Two trapping experiments were also set up in 2020–2021 (season V, experiment Va: December–March; experiment Vb: March–May). Variables such as trap height, pheromone dispenser, and combinations of attractant volatile stimuli were evaluated throughout the seasons (Table 1). In all cases, the traps were deployed at least 6 m from the plot border and with a separation of at least 20 m between traps. Trap arrangements followed randomized block designs, with each block containing all treatments. Each block was considered a replicate (Table 1). Although merely descriptive, results obtained from isolated monitoring traps are also reported. These were hung individually, one trap per orchard.

Traps were serviced every 15 days in seasons I and II and weekly from season III onward, recording all cerambycid beetles trapped. The treatments were initially assigned randomly to the traps, then rotated when lures were replaced to control for location effects (Table 1). Combined lures were hung as separate dispensers within a trap.

As mentioned, the rationale behind all experiments was the testing of attractants for *Diploschema rotundicolle*. Hence, the tested pheromones were those actually produced by *D. rotundicolle* males (Amorós et al. 2020). The tested kairomones include ethanol, a widespread chemical cue for xylophagous insects, and lemon essential oil due to the preference of *D. rotundicolle* for lemon trees. Further details on stimuli selection, specific pheromone release rates, and trap layout details have been previously reported (Amorós et al. 2020).

### Chemicals

Racemic 3-hydroxyhexan-2-one (hereafter ketol) was purchased from ChemTica International, S.A. (product no longer available, Purity 96.4%) and Bedoukian Inc. (purity 83.1%). (*R*)-3-Hydroxyhexan-2-one and 2,3-hexanediol (hereafter diol; mixture of four diastereomers) were synthesized according to (Heguaburu, 2017) (purity > 99% as determined by NMR spectrometry). Lemon essential oil (hereafter LEO) was kindly provided by Novacore S.A.



**Table 1** Materials and methods details of all experiments performed throughout the seasons of study

Season	Treatments	Abbreviation	Loading	Dispenser	Hung on	Replicates (traps/treatment)	Trap height <sup>a</sup>	Lure replace (weeks) <sup>c</sup>
Summer	Isolated traps	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Citrus trees	4	60 cm	3
2015–2016	I	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Citrus trees	2	60 cm	2
		2,3-Hexanediol (mixture of stereoisomers)	Diol	50 mg/1 mL of isopropanol	Citrus trees	2	60 cm	2
2017–2018	II	Isopropanol	Control	1 mL isopropanol	Citrus trees	10	60 cm	2
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Citrus trees	10	60 cm	2
		(R)-3-Hydroxy-2-hexanone	3R-Ketol	25 mg/1 mL of isopropanol	Citrus trees	10	60 cm	2
2018–2019	III	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus lemon essential oil	Ketol:LEO	50 mg/1 mL of isopropanol: 10 mL	Citrus, peach, and eucalyptus trees	6	60 cm	2
		Isopropanol	Control	1 mL isopropanol	Citrus, peach, and eucalyptus trees	6	60 cm	2
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 mg/1 mL of isopropanol	Citrus, peach, and eucalyptus trees	6	60 cm	2
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus 2,3-hexanediol (mixture of stereoisomers)	Ketol:diol	50 mg/1 mL of isopropanol: 25 mg/1 mL of isopropanol	Citrus, peach, and eucalyptus trees	6	60 cm	2
2019–2020	IV	Isopropanol	Control	1 mL isopropanol	Citrus trees: PVC water pipes next to citrus trees	5	60 cm (low traps)—180 cm (high traps)	1
		Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol	50 and 500 mg neat	Citrus trees: PVC water pipes next to citrus trees	5	60 cm (low traps)—180 cm (high traps)	1
	Dispenser materials	Control	x	Eppendorf tube (1 mL) with a perforated cap (1 mm) (low emission rate)—simple polyethylene press seal bags (5 × 7 cm) plus a 5-cm cotton wick (high emission rate)				

Table 1 (continued)

Season	Treatments	Abbreviation	Loading	Dispenser	Hung on	Replicates (traps/treatment)	Trap height <sup>a</sup>	Lure replace (weeks) <sup>c</sup>
2020–2021	Va	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	500 mg neat	Simple polyethylene press seal bags (5 × 7 cm) plus a 5-cm cotton wick	PVC water pipes next to citrus trees	3	180 cm (high traps)	2
Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus ethanol 95%		500 mg neat; 100 mL	Simple polyethylene press seal bags (5 × 7 cm) plus a 5 cm cotton wick; simple press seal bags (10 × 15) cm					
Racemic 3-hydroxy-2-hexanone plus lemon essential oil		500 mg neat; 10 mL	Simple polyethylene press seal bags (5 × 7 cm) plus a 5-cm cotton wick; two separate press seal bags (5 × 7) cm plus two 5-cm cotton wick					
	Dispenser materials	Control	x	x				
Vb	Racemic 3-hydroxy-2-hexanone	Ketol:EtOH	500 mg neat	Simple polyethylene press seal bags (5 × 7 cm) plus a 5 cm cotton wick; simple polyethylene press seal bags (10 × 15 cm)		6		
	Ethanol 95%	EtOH	100 mL	Simple press seal bags 10 × 15 cm				Not needed

<sup>a</sup>Ground level to collector bucket. <sup>b</sup>Double press seal bags were made by filling one bag with the tested attractant, then enclosing this bag in another. <sup>c</sup>Pheromone presence in the dispensers at the end of the field use period was checked through GC–MS

(Paysandú, Uruguay) (pure lemon essential oil obtained through cold pressing with a Brown Oil Extractor).

## Insect identification

Identification of captured beetles was carried out in collaboration with a specialist on Neotropical Cerambycidae (MM, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil). Comparison with reference specimens from the entomological collection of Facultad de Agronomía (Universidad de la República, Uruguay), as well as online databases and specialized checklists were also used (Barriga-Tuñón 2009; Bezark and Monné 2019; Monné 2021; Monné and Bezark 2009).

## Statistical analysis

Statistical analyses were exclusively performed on *R. t. thoracicus* catches from seasons II, III, Va and Vb, and for *M. acuta* catches from season Va and Vb. Each experiment and species were analyzed separately. Beetle trap captures (i.e., total catches per replicate throughout the season) were subjected to a generalized linear mixed model (GLMM) with Poisson distribution. Treatment means were compared using Tukey's HSD test ( $\alpha=0.05$ ) (multcomp package (Hothorn et al. 2008)). Due to limitations of GLM models, treatments with zero catches throughout spatial replicates and evaluation dates were not considered in the analysis. Analysis was performed using R statistical software (0.99.892 version – © 2009–2016 RStudio, Inc.) (RStudioTeam 2015).

## Results

Overall, 13 diurnal species of Cerambycinae belonging to seven tribes were captured (Fig. 1) (photograph of *Thelgetra adustus* (Burmeister) is not available). All but one species (*Achryson surinamum* (Linnaeus)) are endemic to the Neotropics (Monné 2021) (Table 2). Seven species were trapped in higher numbers and are hence included with details in Table 3. Of these, most catches were obtained in pheromone-baited traps, with zero or very low catches in control traps (Table 3). Species caught in the isolated monitoring traps were the same as those obtained in the experiments performed over seasons (Table 3). These results are also reported although no comparisons can be made with control traps.

*Retrachydes thoracicus thoracicus* (Olivier) was the most common species attracted to pheromone traps, with more than 350 beetles captured. Almost all catches were obtained in traps baited with the ketol, whereas control traps caught 6 insects throughout the whole study. This result was consistently observed over all seasons and different study sites

(Table 3). During seasons II and III, the high numbers of *R. t. thoracicus* captured allowed for a statistical comparison of captures using the pure enantiomer (3*R*) vs. racemic ketol, as well as for lures containing the diol added as a minor component. In both cases, no significant differences were observed with respect to the traps baited only with the racemic ketol (GLM, Tukey's HSD,  $P=0.424$  and  $P=0.578$ , respectively). Almost all catches were females, with 358 females and only 2 males obtained throughout the whole study.

*Megacyllene acuta* (Germar) (71 individuals), *Compso-cerus violaceus* (White) (42 individuals), and *Cotylytus curvatus* (Germar) (38 individuals) were the next most abundant trapped species. Almost all catches were obtained in ketol-baited traps (Table 3). A few specimens of *Odontocroton flavicauda* (Bates) (4 individuals) and *Chydarteres striatus striatus* (Fabricius) (5 individuals) were also caught exclusively in ketol-baited traps (Table 3).

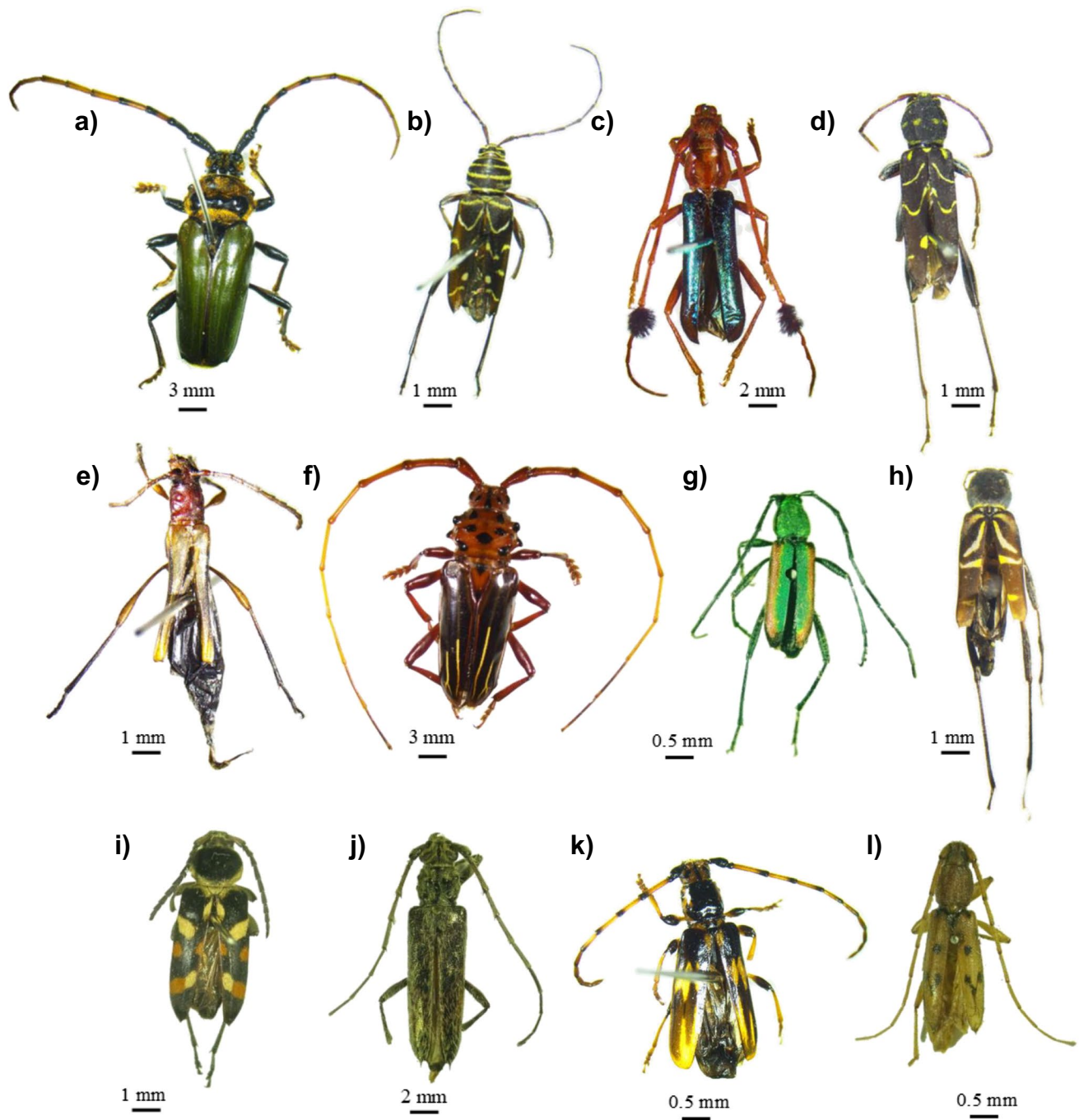
The addition of ethanol to the ketol traps in season V showed a dramatic increase in the numbers of *R. t. thoracicus* and *M. acuta* captures compared to ketol-only-baited traps (GLM, Tukey's HSD,  $P<0.001$  for both species). For *R. t. thoracicus*, ketol-baited traps collected  $1.3 \pm 1.2$  beetles per trap, whereas ketol plus ethanol trapped  $42.7 \pm 5.7$ ; likewise, for *M. acuta*, the results were  $0.3 \pm 0.6$  and  $5.6 \pm 3.8$  respectively (mean  $\pm$  stdev of accumulated catches per trap throughout the whole season) (Fig. 2). In addition, *Chryso-praxis aurigena* (Germar) was captured for the first time in season V, only trapped in ketol:EtOH traps (7 individuals) (Table 3).

Experiment Vb showed that *R. t. thoracicus* was significantly more attracted to the ketol:EtOH-baited traps compared with traps baited only with ethanol (GLM, Tukey's HSD:  $P=0.00013$ ; Fig. 3), suggesting a synergistic effect of the combination of stimuli. Conversely, in the case of *M. acuta*, the attractivity of the combined ketol:EtOH lures was not significantly different from that of ethanol alone (GLM, Tukey's HSD:  $P=0.08239$ ) (Fig. 3).

Single catches of *Trachelissa maculicollis* (Audinet-Serville), *Neoclytus pusillus* (Laporte & Gory), *Megacyllene mellyi* (Chevrolat), and *Thelgetra adustus* (Burmeister) were obtained in ketol taps. One *Achryson unicolor* (Bruch) and one *Achryson surinamum* (Linnaeus) in ketol:LEO and ketol:EtOH traps, respectively. These were only found in pheromone-baited traps, but they may be regarded as anecdotic due to their low numbers.

## Discussion

In this study, 12 species of Neotropical cerambycines were trapped in cross-vane traps baited with different pheromone-plant volatile combinations. Pheromone records are available for five of these species: *M. acuta*, *C. curvatus*, *C. aurigena*,



**Fig. 1** Photographs of representative specimens of cerambycine beetles trapped in pheromone-baited traps. **a)** *Retrachydesthoracicus thoracicus* (Olivier); Trachyderini. **b)** *Megacylleneacuta* (Germar); Clytini. **c)** *Compsocerusviolaceus* (White); Compsocerini. **d)** *Cotylytuscurvatus* (Germar); Clytini. **e)** *Odontocrotonflavicauda* (Bates); Rhinotragini. **f)** *Chydarteressstriatusstriatus* (Fabricius); Trachyderini.

**g)** *Chrysoprasisaurigena* (Germar); Dichophyiini. **h)** *Neoclytuspusillus* (Laporte & Gory); Clytini. **i)** *Megacyllenemellyi* (Chevrolat); Clytini. **j)** *Achrysonunicolor* (Bruch); Achrysonini. **k)** *Trachelissamaculicollis* (Audinet-Serville); Trachyderini. **l)** *Achrysonsurinamum* (Linnaeus); Achrysonini.

*N. pusillus*, and *A. surinamum* (Hanks and Millar 2016; Silva et al. 2017).

*Retrachydes thoracicus thoracicus* was the species with the highest trapping numbers. This is a Neotropical

cerambycine that belongs to the Trachyderini tribe, with yet unknown pheromone chemistry. It is highly polyphagous, with records from various host plants (Bentancourt and Scatoni 2010; Monné 2021), including fruit and forestry

**Table 2** Distribution of Neotropical cerambycines trapped according to Monné (2021)

Species	Tribe	Distribution	Total individuals trapped
<i>Retrachydes thoracicus thoracicus</i> (Olivier, 1790:300)	Trachyderini	Brazil, Paraguay, Bolivia, Argentina, Uruguay	360
<i>Megacyllene acuta</i> (Germar, 1821:170)	Clytini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	71
<i>Compsocerus violaceus</i> (White, 1853)	Compsocerini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	42
<i>Neoclytus curvatus</i> (Germar, 1821:171)	Clytini	Brazil, Paraguay, Argentina, Uruguay	40
<i>Chrysoprasis aurigena</i> (Germar, 1824)	Dichophyiini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	7
<i>Chydarteres striatus striatus</i> (Fabricius, 1787:133)	Trachyderini	Brazil, French Guiana, Paraguay, Argentina, Uruguay	5
<i>Odontocroton flavicauda</i> (Bates, 1873)	Rhinotragini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	4
<i>Achryson unicolor</i> (Bruch, 1908)	Achrysonini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Neoclytus pusillus</i> (Laporte & Gory, 1838)	Clytini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay, Peru	1
<i>Megacyllene mellyi</i> (Chevrolat, 1862)	Clytini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Thelgetra adustus</i> (Burmeister, 1865)	Pteroplatini	Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Trachelissa maculicollis</i> (Audinet-Serville, 1834)	Trachyderini	Brazil, Paraguay, Argentina, Uruguay	1
<i>Achryson surinamum</i> (Linnaeus, 1767)	Achrysonini	USA, Mexico, Central America, West Indies, South America	1

Monné M (2021) Catalogue of the Cerambycidae (Coleoptera) of the Neotropical Region. Part I. Subfamily Cerambycinae (available from [cerambyxcat@com](mailto:cerambyxcat@com)/Part 1 Cerambycinae. pdf. Accessed August 2021)

crops such as eucalyptus, with some potential for economic damage (Bentancourt and Scatoni 2010; Lindemberg Martins Mesquita et al. 2017; Monné et al. 2002). It is considered a pest of plants of the families Fabaceae (Costa et al. 2019), Moraceae, Ulmaceae (Di Lorio 1997), and Salicaceae (Machado et al. 2012). The fact that most females were trapped suggests that females might be the more active sex or that the species presents a biased sex ratio. Similar results were obtained for another cerambycine, *Diploschema rotundicolle*, in our previous studies (Amorós et al. 2020). Regarding the knowledge of the chemical communication system in species of the Trachyderini tribe, reports are available for four species. 3-Hydroxyhexan-2-one, the ketol in our study, has been identified in *Batyle suturalis* (Say) and *Tragidion armatum* (LeConte) (Hanks and Millar 2016). Silva et al. reported field trapping of *Chydarteres dimidiatus dimidiatus* (Fabricius) and *Trachyderes succinctus duponti* (Aurivillius) in traps with racemic ketol and racemic 2-methylbutan-1-ol (Silva et al. 2018). These results suggest that ketol may be an important compound in the pheromone communication of species within this tribe. We also observed catches of another trachyderini species, *C. striatus striatus*, all of them in traps baited with ketol (Table 3). Even though pheromone collection and analysis have not been yet reported for *R. t. thoracicus*, the consistent attraction of adults to the ketol strongly suggests that this compound is an important component of the chemical communication system in this species. Millar et al. (2017, 2018a, 2018b) discussed the value of field screening bioassays as tools for initiating research on the chemical ecology of cerambycid beetles. Specifically, chemicals or blends of chemicals that attract cerambycid

species in the field are likely pheromone components of these species (Millar et al. 2018a, b; Miller et al., 2017). This seems logical and highlights the value of conducting screening studies such as this one, given the difficulty of collecting or raising live cerambycid adults in enough numbers for volatile collections in the laboratory.

When ethanol was added as a potential plant kairomone to the traps, we observed a remarkable increase in *R. t. thoracicus* catches, suggesting a synergistic effect of ethanol and the ketol in the attraction of this species. Ethanol is produced by stressed or diseased plants or by woody plants that are long dead and decaying, so it is not surprising that ethanol attracts many species of hardwood-boring insects. Consistent with their attraction to ethanol, some cerambycid species whose larvae develop in deciduous woody plants are attracted to fermenting molasses or sugar solutions. It also has been suggested that fermenting baits might attract cerambycids because they mimic the volatiles from fermenting sap on which adult beetles feed, rather than volatiles from larval hosts (reviewed by (Wang 2017)). As it has been mentioned, *R. t. thoracicus* is highly polyphagous and has been reported both on healthy as well as decaying woody plants. The adults also visit fruits, and attraction to fermenting lures has been reported (Bentancourt and Scatoni 2010; Bruhn and Beltrame 1980; Holdefer Woldan 2007; Lindemberg Martins Mesquita et al. 2017). In addition to a potential role as a cue for adult or larval feeding resources, the ketol-ethanol blend might provide the insect with a mechanism to avoid cross-attraction with other sympatric and synchronic species, in the context of shared pheromone compounds, as is the case in the subfamily (reviewed by (Wang 2017)).

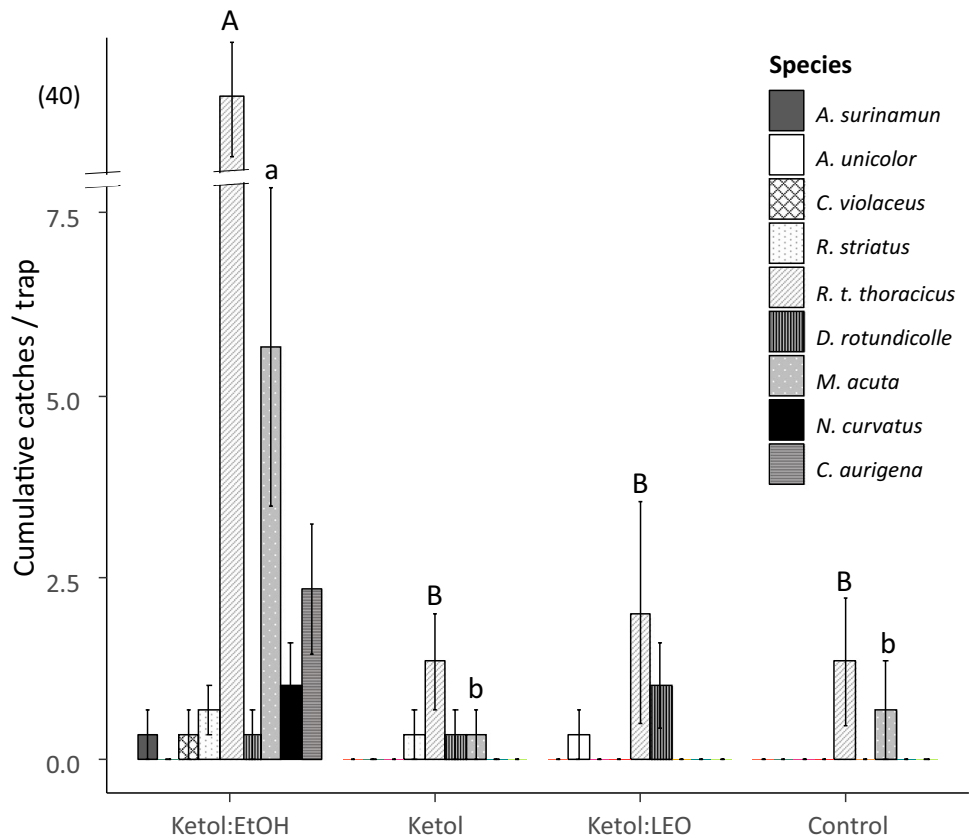
**Table 3** Total sum of cerambycine beetles captured in pheromone-baited traps in different setups and seasons

Momi- isole- traps <sup>a</sup>	Season I: 2015–2016 <sup>b</sup>			Season II: 2017–2018 <sup>c</sup>			Season III: 2018–2019 <sup>d</sup>			Season IV: 2019–2020 <sup>e</sup>			Season V: 2020–2021 Experiment Va <sup>f</sup>			Season V: 2020–2021 Experiment Vb <sup>g</sup>			Totals				
	Ketol	Diol	Con- trol	Ketol	3R-Ketol	Ketol:LEO	Con- trol	Ketol	Ketol:diol	Con- trol	Ketol	Ketol	Con- trol	Ketol	Ketol:EtOH	Ketol:LEO	Con- trol	Ketol	Ketol:EtOH	EtOH	All lured treat- ments	Con- trols	Total
<i>Retrachydes t. thoracicus</i>	8	5	0	0	23	31	23	0	34	31	2	13	0	4	128	6	4	4	42	12	354	6	360
<i>Megacyllene acuta</i>	3	0	0	0	0	2	0	0	2	7	0	0	0	1	17	0	2	25	14	69	2	71	
<i>Compso-cerus violaceus</i>	5	0	4	0	1	0	6	0	17	3	3	0	0	0	1	0	0	2	0	39	3	42	
<i>Corylytus curvatus</i>	17	5	0	0	0	3	3	0	3	1	0	0	0	0	3	0	0	3	2	38	0	38	
<i>Odonocroton flavicauda</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	
<i>Chydarteres s. striatus</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	5	0	5	
<i>Chryso-prasis aurigena</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	7	0	7	

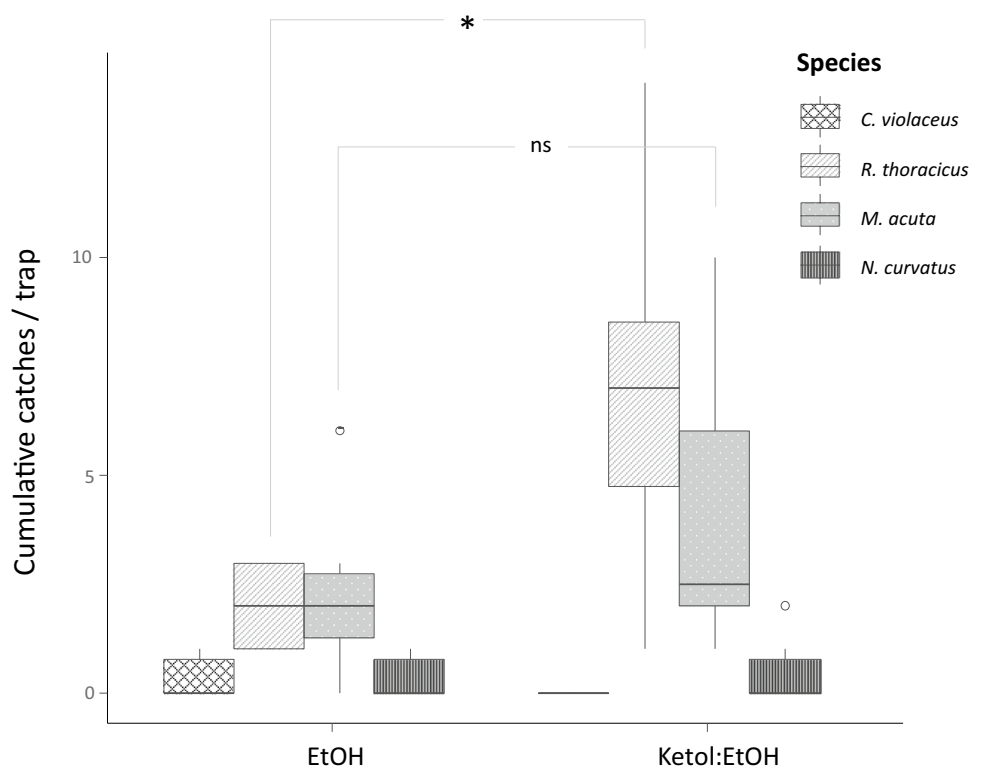
<sup>a</sup>4 traps; <sup>b</sup>citrus grove, 4 traps/treatment; <sup>c</sup>citrus grove, 10 traps/treatment; <sup>d</sup>citrus and peaches groves, 16 traps/treatment; <sup>e</sup>citrus grove, 5 traps/treatment; <sup>f</sup>citrus grove, 3 traps/treatment; <sup>g</sup>citrus grove, 6 traps/treatment

*Ketol* stands for 3-hydroxy-2-hexanone; *Diol* stands for 2,3-hexanedio; *LEO* stands for lemon essential oil

**Fig. 2** Field results of Season V -Experiment Va. The bars show the mean catches  $\pm$  stdev (n = 3) for each evaluated attractant from December through March. Different letters indicate significant differences (GLM, Tukey's HSD,  $P < 0.001$ )



**Fig. 3** Field results of Season V -Experiment Vb. Boxplots show the catches over the season for each evaluated attractant (n = 6) from March through May. Asterisks show significant differences (GLM, Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ), ns stands for not significant





*Compsocerus violaceus* (tribe Compsocerini) was another commonly trapped species which lacks reports on pheromone chemistry. In line with our results, Silva et al. have reported field catches of *C. violaceus* with racemic ketol and racemic 2-methylbutan-1-ol (Silva et al. 2018).

*Megacyllene acuta* and *C. curvatus* belong to the Clytine tribe, in which (3*R*)-ketol has been identified as an important or even sole component of male-emitted pheromones in Neotropical species (Silva et al. 2017). Pheromone chemistry reports are available for these two species: Silva et al. reported that *C. curvatus* males emit exclusively (*R*)-3-hydroxyhexan-2-one, whereas *M. acuta* produces the same compound along with lesser amounts of (2*S*,3*S*)-2,3-hexanediol and (*S*)-2-methylbutan-1-ol (Silva et al. 2018). Another Clytine species, *N. pusillus*, has been shown to emit exclusively the ketol (Silva et al. 2017). We obtained one capture of this species in ketol traps.

*Megacyllene acuta* was strongly attracted to ketol:EtOH and ethanol alone, without significant differences between both treatments. Hence, in this case, there does not seem to be a synergistic effect of the mixture in the attraction. This species is known to visit flowers and feed on rotting fruit (Martins et al., 2011) and poses a threat as an invasive species in other regions of the world because their larvae are easily transported overseas in wooden cratings (Duffy 1953). Along with *C. curvatus* larvae, *M. acuta* can cause economic damage to fruit trees such as apple, pear, quince (Rosaceae), avocado (Lauraceae), and fig (Moraceae) (Martins et al., 2011), so finding attractants may be relevant for surveillance programs. As mentioned for *R. t. thoracicus*, attraction to ethanol may be explained by ecological factors, and pheromone specificity may rely on minor compounds (Silva et al. 2018).

In our experiments, *C. aurigena* was only captured in ketol:EtOH traps early in the summer of season V. Although no pheromone chemistry has been reported for *C. aurigena*, Silva et al. reported field catches in pheromone traps (blends of ketol plus 1-(1*H*-pyrrol-2-yl)-1,2-propanedione and ketol plus 1-(1*H*-pyrrol-2-yl)-1,2-propanedione plus 3-methylthioprop-1-ol) (Silva et al. 2017). Their follow-up experiments, however, revealed that the adults do not produce either of these compounds. While our results suggest that ethanol may be important in attracting this species, no catches were obtained in traps baited with ethanol alone, so further experiments possibly targeting different flight periods are needed.

Species trapped in lesser amounts in ketol-baited traps include *O. flavicauda*, which belongs to the Rhinotragini tribe, with no reports of pheromone chemistry. *Trachelissa maculicollis*, *M. mellyi*, *A. unicolor*, and *A. surinamum* may be considered incidental catches or they may be the result of low populations of these species in the agro-ecosystems in which we based our study. *Achryson surinamum* is a widely distributed species that has been reported to

produce anti-2,3-octanediol and traces of 2-methylbutan-1-ol (Hanks and Millar 2016). In our study, one individual of *A. unicolor* and one of *A. surinamum* were caught in ketol:LEO and ketol:EtOH traps, with no other *Achryson* species caught in any of our experiments.

It is likely that the species captured in our study either use ketol in their chemical communication systems or that they “eavesdrop” on the pheromone communication system of other guild members. This may serve as an efficient method of finding suitable hosts for mating and oviposition, as has been reported for other species (Hanks and Millar 2013). Our results open new possibilities for trapping and surveillance devices for these potentially damaging cerambycids. Furthermore, further information about the chemical ecology of Neotropical cerambycid beetles is provided, again highlighting the remarkable parsimony in pheromone chemistry among cerambycines from all over the world.

**Acknowledgements** Technical advice and field assistance was kindly provided by Yamandú Pochintesta, Martín Lanfranco, Ramiro Vacca, Gabriel Bueno, Alejandro Borges, José Berreta, Johana Dalla Valle, Gustavo Rodríguez, Roy Mazondo, Anna Paula Burgueño, Diana Valle, and Federico Rodrigo.

**Author contribution** María Eugenia Amorós and Andrés González contributed to the study conception and design, and wrote the manuscript. Lautaro Lagarde and María Eugenia Amorós performed material preparation, data collection, and analysis. Hugo Do Carmo, Vivivana Heguaburu, and José Buenahora contributed with the synthetic compounds. Marcela Monné identified the insects.

**Funding** The authors wish to thank financial support from CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) Universidad de la República, PEDECIBA (Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas, Uruguay), and INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria).

## Declarations

**Competing interests** The authors declare no competing interests.

## References

- Aguirre Gil OJ et al (2021) Screening known Cerambycidae pheromones for activity with the Peruvian fauna. *Agr Forest Entomol.* <https://doi.org/10.1111/afe.12454>
- Amorós ME, Lagarde L, Do Carmo H, Heguaburu V, González A (2020) Pheromone chemistry of the citrus borer, *Diploschema rotundicollis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J Chem Ecol* 46:809–819. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01203-4>
- Barriga-Tuñón JE (2009) Coleoptera Neotropical. [http://www.coleoptera-neotropical.org/paginas/2\\_PAISES/Uruguay/Cerambycidae/cerambycinae-uru.html](http://www.coleoptera-neotropical.org/paginas/2_PAISES/Uruguay/Cerambycidae/cerambycinae-uru.html). Accessed June 2019
- Bentancourt CM, Scatoni IB (2010) Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. 3 edn. Facultad de Agronomía, Montevideo



- Bezark LG, Monné MA (2019) Checklist of the Oxypeltidae, Vesperidae, Disteniidae and Cerambycidae, (Coleoptera) of the Western Hemisphere 2019 Edition (updated through 31 December 2018).
- Brockerhoff EG, Jones DC, Kimberley MO, Suckling DM, Donaldson T (2006) Nationwide survey for invasive wood-boring and bark beetles (Coleoptera) using traps baited with pheromones and kairomones. *For Ecol Manag* 228:234–240
- Bruhn JC, Beltrame JBI (1980) Los taladros *Praxithea derourei* Chabrilac, *Trachyderes thoracicus* (Olivier) y *T. striatus* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae) y su relación con los cultivos de manzanas en Uruguay. *Investigaciones Agronomicas* 1:11–14
- Costa MKC, Diodato MA, Fernandes JPP, Santos JPS (2019) Insetos nocivos a *Prosopis* sp. no Rio Grande do Norte (Brasil) e Piura (Peru). *Agrop Cient Semiárido* 15:158–116
- Di Lorio ORR (1997) Plantas hospedadoras de Cerambycidae (Coleoptera) en el Espinal periéstepico y en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 44(3)/45(1):159–165
- Duffy EAJ (1953) A monograph of the immature stages of British and imported timber beetles (Cerambycidae). *Brit Mus (Nat Hist)*, London
- Fan J et al (2018) Multi-component blends for trapping native and exotic longhorn beetles at potential points-of-entry and in forests. *J Pest Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0997-6>
- Graham EE, Mitchell RF, Reagel PF, Barbour JD, Millar JG, Hanks LM (2010) Treating panel traps with a fluoropolymer enhances their efficiency in capturing cerambycid beetles. *J Econ Entomol* 103:641–647
- Hanks LM, Millar JG (2013) Field bioassays of cerambycid pheromones reveal widespread parsimony of pheromone structures, enhancement by host plant volatiles, and antagonism by components from heterospecifics. *Chemoecology* 23:21–44
- Hanks LM, Millar JG (2016) Sex and aggregation-sex pheromones of cerambycid beetles: basic science and practical applications. *J Chem Ecol* 42:631–654. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0733-8>
- Hanks LM, Millar JG, Mongold-Diers JA, Wong JCH, Meier LR, Reagel PF, Mitchell RF (2012) Using blends of cerambycid beetle pheromones and host plant volatiles to simultaneously attract a diversity of cerambycid species. *Can J for Res* 42:1050–1059
- Heguaburu V, de Carmo H, Parpal F, Amorós ME, González A (2017) Synthesis of aggregation pheromone components of cerambycid species through  $\alpha$ -hydroxylation of alkylketones. *Tetrahedron Letters* 58:1738–1741
- Holdefer Woldan DR (2007) Análise faunística de cerambycidae (Coleoptera) em duas situações florísticas no município de União da Vitória – Paraná. UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical J* 50:346–363
- Lindemberg Martins Mesquita A, Teles Portela Policarpo G, Emilson Cardoso J, Cavalcante de Souza Mota M (2017) Novas Ocorrências de Cerambycidae (Insecta: Coleoptera) em cajueiro no Brasil e recomendações de manejo vol Comunicado Técnico, 231. Embrapa Agroindústria Tropical
- Machado VS, Botero JP, Carelli A, Cupello M, Quintino HY, Simões MVP (2012) Host plants of Cerambycidae and Vesperidae (Coleoptera, Chrysomeloidea) from South America. *Revista Brasileira De Entomologia* 56:186–198
- Martins UR, Galileo MHM (2011) *Tribo Clytini Mulsant, 1839*. In: Martins UR GM (ed) *Cerambycidae Sul-Americanos* (Coleoptera): taxonomia, vol 12. Sociedade Brasileira de Entomologia, São Paulo, pp 8–64
- Millar JG et al (2018a) Identifying possible pheromones of cerambycid beetles by field testing known pheromone components in four widely separated regions of the United States. *J Econ Entomol* 111:252–259. <https://doi.org/10.1093/jee/tox31>
- Millar JG et al (2018b) (2017) Identifying possible pheromones of cerambycid beetles by field testing known pheromone components in four widely separated regions of the United States. *J Econ Entomol* 111(1):252–259
- Millar JG, Richards AB, Halloran S, Zou Y, Boyd EA, Quigley KN, Hanks LM (2019) Pheromone identification by proxy: identification of aggregation-sex pheromones of North American cerambycid beetles as a strategy to identify pheromones of invasive Asian congeners. *J Pest Sci* 92:213–220. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0962-4>
- Miller DR, Crowe CM, Mayo PD, Reid LS, Silk PJ, Sweeney JD (2017) Interactions between ethanol, syn-2,3-hexanediol, 3-hydroxyhexan-2-one, and 3-hydroxyoctan-2-one lures on trap catches of hardwood longhorn beetles in Southeastern United States. *J Econ Entomol* 1–10. <https://doi.org/10.1093/jee/tox188>
- Mitchell RF, Millar JG, Hanks LM (2013) Blends of (R)-3-hydroxyhexan-2-one and alkan-2-ones identified as potential pheromones produced by three species of cerambycid beetles. *Chemoecology* 23:121–127
- Monné M (2021) Catalogue of the Cerambycidae (Coleoptera) of the Neotropical Region. Part I. Subfamily Cerambycinae. Available from [cerambyxcat@com/Part 1 Cerambycinae](mailto:cerambyxcat@com/Part%201%20Cerambycinae.pdf). pdf. Accessed August 2021
- Monné MA, Bezark L (2009) Checklist of the Cerambycidae, or longhorned beetles (Coleoptera) of the Western Hemisphere. <https://www.cerambycoidea.com/titles/monnebezark2009.pdf>.
- Monné MM, Bianchi M, Sánchez A, Escudero R (2002) Cerambycidos (Coleoptera) que atacan *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus grandis* en Uruguay. *Agrociencia* 6:63–68
- RStudioTeam (2015) RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Boston, MA Patent
- Silva WD, Hanks LM, Alvarez JCS, Madalon FZ, Bento JMS, Bello JE, Millar JG (2020) Variations on a theme: two structural motifs create species-specific pheromone channels for multiple species of South American cerambycid beetles *Insects: Special Issue “Ecology and Management of Invasive Insects in Forest Ecosystems”* 11 <https://doi.org/10.3390/insects11040222>
- Silva WD, Millar JG, Hanks LM, Bento JMS (2016) 10-methyldecane, a novel attractant pheromone produced by males of the south american cerambycid beetle. *Eburadacrys Vittata* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160727>
- Silva WD, Millar JG, Hanks LM, Costa CM, Leite MOG, Tonelli M, Bento JMS (2018) Interspecific cross-attraction between the south american cerambycid beetles *Cotyclytus curvatus* and *Megacyllene acuta* is averted by minor pheromone components. *J Chem Ecol* 44:268–275. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0933-5>
- Silva WD, Zou Y, Bento JMS, Hanks LM, millar JG, (2017) Aggregation-sex pheromones and likely pheromones of 11 South American Cerambycid beetles, and partitioning of pheromone channels. *Front Ecol Evol* 5:1–9
- Wang Q (2017) *Cerambycidae of the world: biology and pest management* Cerambycidae of the world: biology and pest management. CRC Press, Boca Raton



## Monitoring and study of bio-ecological aspects of the citrus borer, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera:Cerambycidae), in southern-Uruguay lemon orchards

Monitoreo y estudio de aspectos bio-ecológicos del taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera:Cerambycidae), en quintas de limón del sur de Uruguay

Monitoramento e estudo de aspectos bioecológicos da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle* (Coleoptera:Cerambycidae), em pomares de limões do sul do Uruguai

Amorós, M. E. <sup>1</sup>; Lagarde, L. <sup>1</sup>; Poloni, V. <sup>1</sup>; González, A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de la República, Facultad de Química, Laboratorio de Ecología Química, Montevideo, Uruguay

### Editor

Valentina Mujica   
Instituto Nacional de Investigación  
Agropecuaria (INIA), Montevideo, Uruguay

Received 16 Jun 2022

Accepted 30 Aug 2022

Published 27 Sep 2022

### Correspondence

María Eugenia Amorós  
eamoros@fq.edu.uy

### Abstract

The citrus borer, *Diploschema rotundicolle*, is a South American cerambycid beetle considered a primary citrus pest in Uruguay. Serious focalized population explosions have been registered in recent years, particularly in lemon orchards. The larvae feed on the woody tissue, causing tree deterioration and reducing grove productivity and value. Current management relies on cultural control, which is expensive and ineffective partially because of imprecise timing of interventions. Monitoring tools for adults or information of their flight periods in Uruguay are not available thus far. Working in lemon groves in southern Uruguay throughout four flight seasons (2015-2020), we used cross-vane traps coupled with white light devices to capture night-flying adults, and mesh covers around infested trees to study adult emergence. Visual observation of larval activity and oviposition damage were also performed throughout the year. Finally, *Eucalyptus globulus* windbreaks were checked underneath loosen barks for hidden adults. Throughout all four seasons, adult flight occurred between late January and early April, with a maximum around mid-February. Emergence from mesh-covered trees was observed in the same period. In general, oviposition damage was observed closely after the peak of adult catches. Mostly females were both trapped in light traps and emerged from infested trees. Larval activity was registered all year long. Adults were found sheltered under *E. globulus* barks; in this case, mostly individual males or couples were found. This study provides a monitoring tool for *D. rotundicolle* adult flight and information on bio-ecological aspects of this pest in southern Uruguay.

**Keywords:** integrated pest management, light traps, Cerambycid beetles, Neotropical Cerambycinae

### Resumen

El taladro de los cítricos, *Diploschema rotundicolle*, es un cerambícido sudamericano considerado plaga primaria de los cítricos en Uruguay. Se observan explosiones poblacionales focalizadas, particularmente en cultivo de limón. Las larvas se alimentan de la madera, causando un deterioro en los árboles que impacta en la productividad y el valor de las quintas. El manejo recae en el control cultural, que es costoso e ineficiente parcialmente por la realización fuera de tiempo de las intervenciones. No existen herramientas de monitoreo de adultos, que tienen hábitos nocturnos, ni información sobre su período de vuelo en Uruguay. Trabajando en quintas de limón en el sur de Uruguay durante cuatro temporadas (2015-



2020), relevamos el vuelo de adultos en trampas de panel cruzado acopladas a luz blanca, y registramos emergencia de adultos mediante enmallado de árboles. Asimismo, se registró la actividad larval a lo largo del año y el daño de oviposición. Finalmente, se revisaron cortezas de cortinas de *Eucalyptus globulus* como refugio de adultos. En todas las temporadas, el vuelo y la emergencia de adultos sucedieron entre enero y abril, con un máximo a mediados de febrero. En general, el daño de oviposición se observó inmediatamente después del pico de mayores capturas. Se capturaron mayormente hembras en las trampas de luz y mallas. Se registró actividad larval durante todo el año. Se encontraron adultos refugiados bajo las cortezas de *E. globulus*; en este caso, mayormente machos aislados o parejas hembra-macho. Este trabajo provee una herramienta de monitoreo para el vuelo de adultos y aporta conocimiento sobre aspectos bio-ecológicos de *D. rotundicolle* en Uruguay.

**Palabras clave:** manejo integrado de plagas, trampas de luz, cerambícidos, cerambicinos neotropicales

## Resumo

A broca dos citros, *Diploschema rotundicolle*, é um cerambicídeo sul-americano, considerado a principal praga dos citros no Uruguai. São observadas explosões populacionais, particularmente no cultivo de limão. Os adultos são noturnos e as larvas se alimentam da madeira, causando uma deterioração nas árvores que impacta a produtividade e o valor patrimonial das quintas. A gestão depende do controle cultural, que é caro e ineficiente, em parte devido aos tempos de intervenção inadequados. No Uruguai, não existem ferramentas de monitoramento dos insetos adultos, nem informações sobre seu período de voo. Durante 4 temporadas (2015-2020), usamos armadilhas de painel cruzado acopladas a luz branca e malhas envolvendo árvores infestadas, para estudar a emergência de adultos em limoeiros no sul do Uruguai. A atividade larval ao longo do ano e os danos à oviposição foram registrados. A casca dos arvores de *Eucalyptus globulus* que rodeiam os quadros foi revisada como refúgio para adultos. Em todas as estações, o voo e a emergência nas malhas ocorreram entre janeiro e abril, com máximo em meados de fevereiro. Em geral, o dano de oviposição foi observado imediatamente após o pico das maiores capturas. As fêmeas foram capturadas principalmente em armadilhas de luz e malha. A atividade larval foi registrada ao longo do ano. Adultos refugiados foram encontrados sob a casca de *E. globulus*; neste caso, principalmente machos isolados ou em pares fêmea-macho. Este trabalho fornece uma ferramenta de monitoramento do voo de adultos e fornece conhecimento sobre aspectos bioecológicos de *D. rotundicolle*.

**Palavras-chave:** controle integrado de pragas, armadilhas luminosas, Cerambicidos, Cerambicinos Neotropicais

## 1. Introduction

*Diploschema rotundicolle* (Audinet-Serville, 1834) (Coleoptera: Cerambycidae) is a South American citrus pest distributed throughout the center-south regions of Brazil, Argentina and Uruguay<sup>(1)</sup>. The adults are elongated (25-40×8-10 mm) and characterized by a light-brown elytra with a continuous dark-brown border, dark-brown head, pronotum, antennae and legs<sup>(2)</sup>. The adults are nocturnal, females oviposit in the apex of branches upon young flush and leaf axils<sup>(3)</sup>. After egg eclosion, the larvae perforate the epidermis and once in woody tissue they dig longitudinal galleries heading to thicker branches, usually reaching the principal trunk<sup>(4)</sup>. By the end of the larval stage, the larvae prepare a pupal chamber with an exit opening for the adult to exit<sup>(2)</sup>.

In subtropical areas —Sao Paulo, Brazil— the larval stage was reported to be uninterrupted from 8-10 months, and the adults were observed from November to April<sup>(2)</sup>. In temperate regions —Santa Catarina, RS, Brazil— larval activity was recorded from January to October of the second year, reaching up

to 20-22 months, with no activity in winter periods<sup>(5)</sup>. In these conditions, adults were reported active from November to January. In Pelotas, RS, Brazil, closer to Uruguay, adults were reported in February and March<sup>(6)</sup>. There are no records of biological aspects of this pest in Uruguayan climatological conditions.

Currently *D. rotundicolle* is considered a primary pest for citrus in Uruguay<sup>(7)</sup>. Over the last years, inefficient management of this pest has led to serious focalized population explosions, particularly in lemon orchards in the south (unpublished data). The deterioration caused by serious infestation levels is currently one of the limitations in an orchard's service life and has a direct impact on its productivity and value. Larval feeding results in poor yields, tree weakening and indirect damages due to invaders of empty galleries<sup>(1)</sup>.

Woodborer control is extremely complicated since the larvae are protected inside the wood<sup>(8)</sup>. Insecticides are also much restricted in citrus crops destined to fresh fruit consumption. Therefore, the cur-

rent management strategy for this insect relies almost exclusively on cultural control, which consists in the pruning of twigs with evidence of oviposition damage. This strategy has proven expensive and ineffective, partially because of imprecise timing of the interventions. No monitoring tools for adults are so far available.

The objective of this study was to determine the flight period of adults in the conditions prevalent in southern Uruguay and to evaluate a monitoring device for adults.

## 2. Materials and methods

Field surveys were performed in four citrus groves located in San José (Kiyú, 2 groves: 34°42'1"S 56°43'37"W; 34°25'59.8"S 57°40'56.3"W); Montevideo (El Espinillo, 34°48'58.6"S 56°22'53.6"W), and Canelones (Las Brujas, 34°37'13.1"S 56°21'18.5"W), all of them in southern Uruguay. Assays were performed from December to April, in four seasons (2015-2016, 2017-2018, 2018-2019 and 2019-2020). In Kiyú we worked in one grove, "Quinta 20", in 2015-2016; the others seasons we worked in another orchard nearby (4,7 km apart), "Quinta 7".

Homemade cross-vane traps with standard design (e. g., Alpha Scents Inc., West Linn, Oregon, USA; ChemTica Internacional SA, San Jose, Costa Rica) were used as trapping devices (black corrugated plastic or sheet iron; panel measures: 74×40 cm) and coupled in the bottom to plastic trap basins. These were partially filled with soapy water and salt to kill and preserve captured beetles. White fluorescent tubes (60 cm; 380-750 nm – Cold white, 6500 K) or LED light devices (50 cm per vane; LEDs 5730, 120 LEDs/m- cold white, 6000-6500 K) were coupled to the traps.

Populations were monitored with 1 to 3 traps/grove depending on the location and year. The traps were deployed within 1-ha citrus plots, 6 m apart from the plot border and with a separation of at least 20 m between traps. They were hung either from tree branches or a holder, with a height of 60 cm from the ground to the basin.

Mesh covers were set up around highly infested trees chosen from visual observation of abundant sawdust at their base. The trees were partially pruned and the mesh covered the whole tree structure, tied around the trunk at ground level. Throughout the seasons, a total of 25 trees were mesh-covered covering the four studied groves.

Traps and wrapped trees were checked weekly from early summer (mid-December) to early fall (April).

When present, *Eucalyptus globulus* windbreaks surrounding the citrus plots were checked for hidden *D. rotundicolle* adults. This was performed by extracting loosen barks and searching underneath for adults. Trees surrounding at least four citrus blocks were checked in each monitoring date.

Monthly visual observation of larval activity, recorded as presence of fresh frass in the base of the trees, was carried out throughout the whole year. Also, visual observation of oviposition damage was recorded. The damage is observed as characteristic wilting of the apex of branches in their first ca. 20 cm.

Weather recordings were obtained from Estación Experimental INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay.

*Statistical analysis:* Male and female comparisons of caches in light traps, emergence on mesh-covered trees and extraction of windbreaks barks were all done with Chi-square tests.

Data included in the article were processed for clarity. Raw data are available upon request.

## 3. Results

Light traps showed good performance for monitoring *D. rotundicolle* adult flight. In all seasons and groves, adult catches were observed between late January and April. Peak of higher catches was observed around mid-February, except for the 2015-2016 season, in which higher catches were recorded later in February (Figures 1 and 2). Oviposition damage was observed shortly after the peak of higher catches: 2015-2016: February 16; 2017-2018: February 19; 2018-2019: February 20, and 2019-2020: March 27.

Results of the 2015-2016 season could have slight timing inaccuracies caused by monitoring dates.

In general, 2019-2020 season showed lower catches in comparison with previous seasons (Figure 1), which may be explained by a dry summer season with low precipitations (Figure 1 in Supplementary material). In 2018-2019, three groves were monitored and the results show slight differences in the onset of adult flights in the different groves (Figure 2).



Figure 1. *Diploschema rotundicolle* flight period in Kiyú groves, throughout the four surveyed seasons (2015-2020). Arrows indicate oviposition damage observation dates. Total catches are not comparable since devices (meshes and light traps) evaluated per grove per season were not equivalent. Cumulative data is shown for better observation of the peak

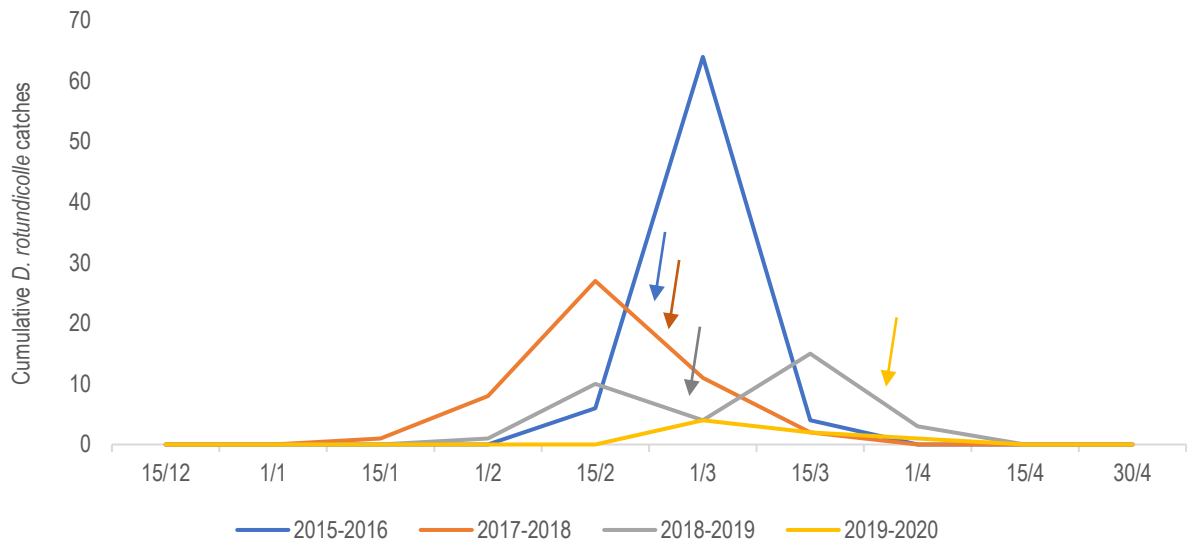
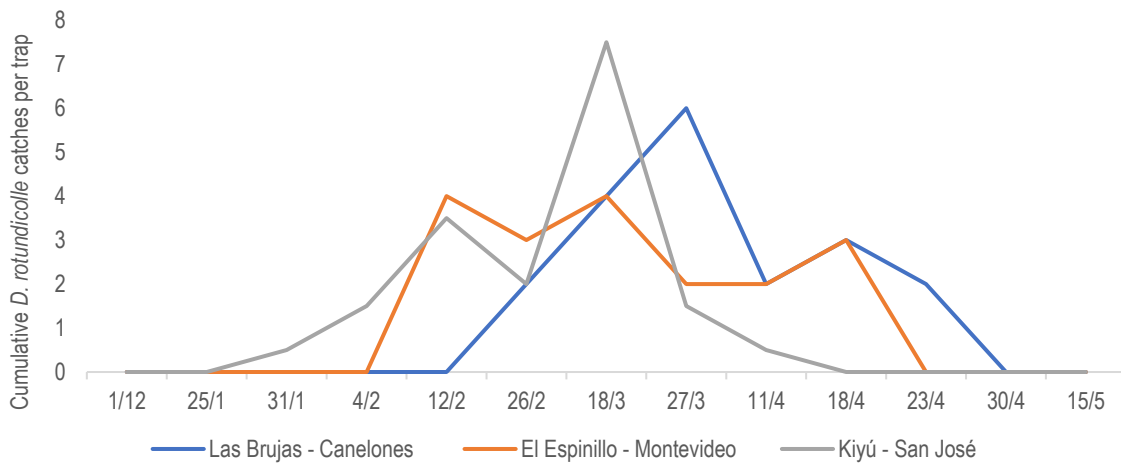


Figure 2. Cumulative *Diploschema rotundicolle* adult catches per trap in three groves in the 2018-2019 season



Significantly higher amounts of females were trapped in light traps in all seasons (5.2 females per male;  $P < 0,00001$ ) (Figure 3A). Further, emergence upon mesh-covered trees also showed higher female emergence (1.8 females per male;  $P < 0,0001$ ) (Figure 3B). A media of  $6.8 \pm 5.4$  adults emerged per tree.

During the flight season, adults were found underneath loosen barks of *Eucalyptus globulus* windbreaks surrounding the citrus plots, particularly in seasons and groves with high population levels. Adults where either found as individual males or as one single male-female couple, suggesting that daytime shelter occurs with no gregarious behavior. Overall, adults under *E. globulus* windbreaks barks were more males than females (Figure 4).

Figure 3. Comparison of females and males captured in light traps (A) and emergence from mesh-covered trees (B). Data are shown as boxplots and correspond to cumulative catches in all groves an

d seasons. Asterisks indicate significant differences (Chi-square test,  $P < 0,05$ )

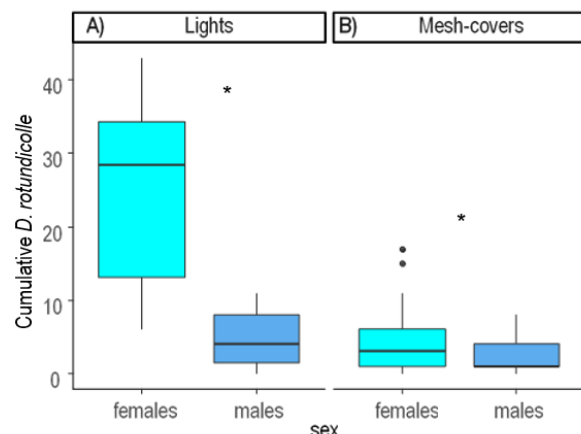
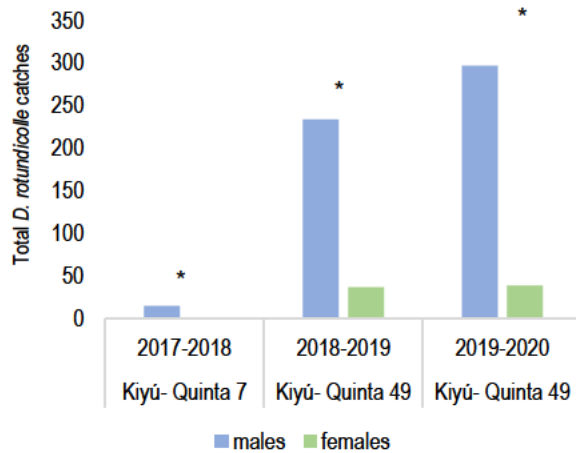


Figure 4. Extraction of *D. rotundicolle* adults from underneath loosen barks of *Eucalyptus globulus* windbreaks surrounding the citrus plots. Asterisks indicate significant differences (Chi-square test,  $P < 0,05$ )



Visual observation of larval activity was recorded throughout the whole year. Damage was not evenly distributed in the orchard but rather focused in certain parcels.

#### 4. Discussion

Within the framework of integrated pest management, monitoring of insect populations in space and time is remarkably important in order to make informed decisions on control measures<sup>(9)</sup>. The results of this study showed that light cross-vane traps proved an effective tool for monitoring *D. rotundicolle* adults. Flight was consistently observed between January and April in southern Uruguay conditions, with population peaks between mid and late February. Emergence from mesh-covered trees was observed in the same period as adult catches in light traps. This may be an alternative method to detect the adult emergence period, although it is a more disruptive and laborious methodology.

Oviposition damage was generally observed close or shortly after the peak of higher catches in light traps, between mid and late February. However, in the 2019-2020 season, oviposition damage was observed approximately one month after the usual recorded period. This season, also characterized by low trap catches, was particularly dry, which may have caused increased eggs desiccation or delayed oviposition. Slightly lower relative humidity and higher temperatures were also observed during this season compared to 2017-2018 and 2018-2019 summers (Supplementary material, Figures 1 and 2).

Some variability was observed across seasons and groves. Particularly remarkable are the results obtained in season 2019-2020 in the three surveyed groves within Kiyú and Las Brujas, less than 50 km apart. In this season, flight onset was observed with a gap of about a month between groves. This flight period gap may be extremely relevant for an appropriate timing of cultural control interventions, and suggests that each grove should be monitored independently to maximize trimming effectiveness. Indeed, our observations indicate that trimming may be significantly optimized if it is planned according to adult monitoring information rather by the visual observation of wilted twigs, when the larvae may have already migrated proximally within the branch.

In this study we worked with 1-3 traps per citrus plot, a number of traps that proved to be sufficient in years and plots of higher population levels; when problematic situations arise and there is a need for stronger interventions. It should be mentioned, however, that poorer results were obtained in seasons of low populations, in which more conclusive results might have been obtained with a higher number of traps per plot. However, 1-3 traps were sufficient to generate general knowledge of the flight period, enough for management decision making at the grove scale. Further studies may be needed to define the monitoring strategy in situations of lower populations densities.

The fact that more females are trapped in light traps may be due to an unbalanced sex ratio, as observed in the emergence from mesh-covered trees. Another hypothesis is that females are the more mobile sex, and are trapped in their search for oviposition sites. Indeed, the trapping of more males underneath the refuge of loosen barks of *E. globulus* windbreaks, very close to citrus trees, is in line with this last hypothesis. It is possible that courtship and mating may take place within refugee sites, after which females take off for oviposition on citrus trees.

Interestingly, our confirmation that *D. rotundicolle* adults hide in eucalyptus trees enables another strategy of cultural control, that is, the manual removal of barks and beetles. This strategy may also be defined based on monitoring adult flight. Despite the fact that this measure requires crew labor and it might be as expensive as twig pruning, it may be performed intensively in more affected areas and seasons. Further, when possible, it would be desirable to remove this species of eucalyptus as windbreakers in groves and to avoid them in new orchards.

Finally, non-interrupted larval activity was observed throughout the year, as reported by Faria and others<sup>(2)</sup>; further, attacked trees within the groves were observed in focalized spots. The later observation highlights the need for an effort to monitor adult flight in different areas of the grove, to maximize not only the temporal but also the special benefits of following the dynamics of adult populations.

## 5. Conclusions

This study provides evidence that cross-vane light traps are an effective tool for monitoring *D. rotundicolle* adult flight period. One trap per ha would be enough to define interventions, especially when populations are high. In southern Uruguay, the adult flight period spans between January and April, with a peak around mid-February. Oviposition damage is generally observed around mid-late February. *Eucalyptus globulus* windbreaks surrounding citrus groves should be avoided since they provide suitable shelter for *D. rotundicolle*.

## Acknowledgements

Technical advice and field assistance was kindly provided by Yamandú Pochintesta, Martín Lanfranco, Ramiro Vacca, Gabriel Bueno, Federico Montes, Alejandro Borges, Anna Paula Burgueño, Diana Valle and Federico Rodrigo.

The authors would also like to thank José Buenahora and José Luis Álvarez for the loan and maintenance of light traps.

## Author contribution statement

María Eugenia Amorós and Andrés González contributed to the study conception and design, and wrote the manuscript. Lautaro Lagarde, Valentina Poloni and María Eugenia Amorós performed material preparation, data collection and analysis.

## References

1. Machado LA, Filho B. Criação artificial da brocados-citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Col.: Cerambycidae). *O Biológico*. 1999;61(11):5-11.
2. Faria AM, Fernandes SCS, dos Santos JCC, Bergmann E, Brisolla AD, Takematsu AD, Negri JD, Sempinoato OR. Estudo sobre controle da brocados ramos e do tronco dos citros *Diploschema rotundicolle* (Serville, 1834) (Coleoptera - Cerambycidae). *O Biológico*. 1987;53(1-6):13-8.
3. Machado LA, Berti Filho EB. Prática cultural associada ao controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate à broca-dos-citros *Diploschema rotundicolle*. *Arq Inst Biol*. 2006;73(4):439-45.
4. Machado LA, Cruz BPB, Leite LG, Batista Filho A, da Silva EM. Práticas para o controle da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle*, (Serville, 1834) (Coleoptera-Cerambycidae). In: XIII Congresso Brasileiro de Entomologia; 1991; Recife, Brasil. Recife: Editora Raiz; 1991. p. 366.
5. Link D, Corrêa Costa E. Nível de infestação da broca dos citros, *Diploschema rotundicolle* (serville, 1834) em cinamomo e plantas cítricas, em Santa Maria - RS. *Cienc Rural*. 1994;24(1):7-10.
6. Biezanko CM, Bosq JM. Cerambycidae de Pelotas e seus arredores. *Agros*. 1956;9(3-4):3-16.
7. Bentancourt CM, Scatoni IB. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. 3a ed. Montevideo: Facultad de Agronomía; 2010. 582p.
8. Shanley RP, Keena M, Wheeler MM, Leland J, Hajek AE. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biol Control*. 2009;50:94-102.
9. Horton DR. Monitoring of pear psylla for pest management decisions and research. *Integrated Pest Manag Rev*. 1999;4:1-20.

**Supplementary material**

Figure 1. Effective precipitation period 2017-2020. Data extracted from Estación Experimental INIA Las Brujas, Canelones. The arrow shows a summer season of particular low precipitation records, which may explain unusual survey results in the 2019-2020 season.

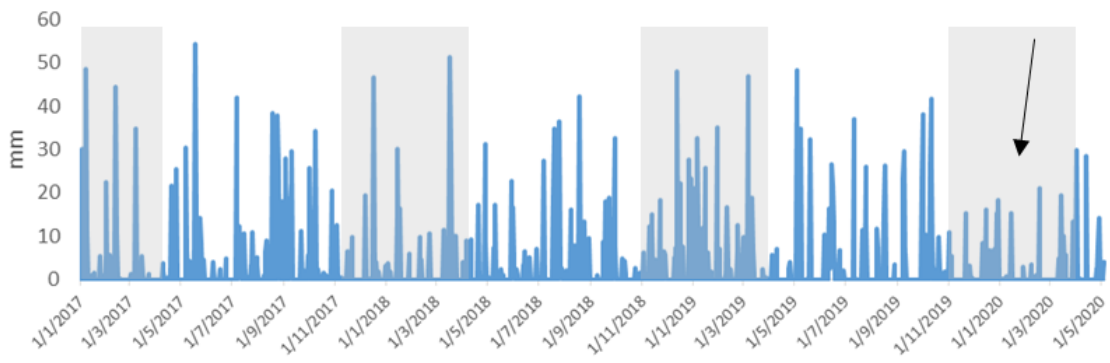


Figure 2. Boxplots of temperature (°C) and relative humidity (RH %) measurements from January to April in 2018, 2019 and 2020, in Kiyú, San José. Data extracted from a sensor in the grove.

