

CARACTERIZACIÓN DEL CORTEJO Y CÓPULA EN *Callisphyris apicicornis*: HERRAMIENTA PARA DEFINIR LA VIABILIDAD PARA DESARROLLAR ESTRATEGIAS DE MANEJO

CHARACTERIZATION OF COURTSHIP AND MATING IN *Callisphyris apicicornis*: TOOL TO DEFINE THE VIABILITY TO DEVELOP MANAGEMENT STRATEGIES

Tomislav Curkovic-S.^{*}, Javier Muñoz-M.

Departamento de Sanidad Vegetal, Universidad de Chile. Casilla 1004. Santiago, Chile.
(tcurkovi@uchile.cl).

RESUMEN

La caracterización del comportamiento de cortejo y cópula en *Callisphyris apicicornis* (Coleoptera: Cerambycidae) es importante en el eventual desarrollo de estrategias de control/manejo, basadas en la modificación de conductas mediadas por la feromona sexual de esta especie plaga. Las secuencias conductuales de *C. apicicornis* fueron filmadas en campo (La Pintana, Región Metropolitana, Chile, entre los meses de septiembre y diciembre de 2009 y 2010). Además se registró la temperatura ambiental, velocidad del viento y hora. Los videos permitieron identificar y describir los pasos que forman las secuencias y sus respectivas frecuencias. Los resultados evidenciaron que en esta especie la secuencia es altamente estereotipada y no ocurre azarosamente, atributos que sugieren una pre-programación de los individuos expuestos a estos estímulos químicos, lo que permitiría el contacto con cebos tóxicos o sistemas de monitoreo específicos que contengan la feromona de la especie. En machos la secuencia consiste en: acercamiento, monta, aproximación de genitales, cópula, desacople, guardia y alejamiento. La hembra, en general, permanece inmóvil durante esta etapa, excepto cuando rechaza al macho, escapando de él o golpeándolo con sus patas traseras. Estas conductas fueron influidas significativamente por la temperatura ambiental, mientras que la velocidad del viento y la hora del día no influyeron significativamente. Además, se observó que la hembra de *C. apicicornis* fue capaz de atraer a machos de otra especie (*Hephaestion violaceipennis*) perteneciente a la misma subfamilia (Lepturinae), los cuales fueron rechazados de la misma manera que lo fueron los conspecíficos.

Palabras clave: estereotipia, ecogramas, feromonas, Lepturinae.

^{*}Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Enero, 2011. Aprobado: Marzo, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 453-464. 2011.

ABSTRACT

The characterization of courtship and mating behaviors in *Callisphyris apicicornis* (Coleoptera: Cerambycidae) is important in the eventual development of strategies of control/management, based on behavior modification mediated by the sex pheromone of this species. The behavioral sequences of *C. apicicornis* were filmed in the field (La Pintana, Región Metropolitana, Chile, between September and December 2009 and 2010). Also temperature, wind speed, and time were registered. The videos helped identify and describe the steps included in the sequences and their respective frequencies. Results showed that in this species the sequence is highly stereotyped, of first order and does not occur randomly, attributes that suggest a pre-programming of the individuals that would allow contact with toxic baits or specific monitoring systems. In males, the sequence consists of: approach, mounting, approximation of genitalia, copulation, undocking, guarding, and departure. The female generally remains stationary during this stage, except when it rejects the male, escaping from it or hitting it with its hind legs. These behaviors were significantly influenced by environmental temperature, whereas wind speed and time of day did not significantly affect behavior. It was also noted that the female of *C. apicicornis* was able to attract males of another species (*Hephaestion violaceipennis*) belonging to the same subfamily (Lepturinae), which were rejected in the same way the conspecifics were.

Keywords: stereotyping, ethograms, pheromones, Lepturinae.

INTRODUCTION

Sierra del manzano, *Callisphyris apicicornis* F. & G. (Coleoptera: Cerambycidae), an insect native to Chile, inhabits from the Región of Valparaíso to La Araucanía (Artigas, 1994). Of

INTRODUCCIÓN

La sierra del manzano, *Callisphyrus apicicornis* F. & G. (Coleoptera: Cerambycidae), insecto nativo de Chile, se distribuye desde la Región de Valparaíso a La Araucanía (Artigas, 1994). De hábito xilófago y muy polífaga, tiene 19 hospederos (Prado, 1991; Barriga *et al.*, 1993; Artigas, 1994), incluyendo especies de importancia frutal como *Ribes* spp. (Grossulariaceae), *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae), *Cydonia oblonga* Mill. y *Malus domestica* Borkh (Rosaceae), en las cuales se le considera plaga (Curkovic, 2008).

La larva vive y se desarrolla exclusivamente en madera viva (Barriga *et al.*, 1993), incluyendo ramas y troncos funcionales, en los cuales construye galerías longitudinales subcorticales y hace cortes transversales, que pueden ocasionar su fractura y caída (Artigas, 1994). Las larvas y pupas se encuentran protegidas bajo la corteza, lo que impide controlarlas por métodos convencionales pues no quedan expuestas a los tratamientos con insecticidas (Curkovic, 2008). El control natural es ejercido por especies de Tachinidae (Diptera) (Barriga, 1990) y Aulacidae (Hymenoptera) (Elgueta y Lanfranco, 1994), pero su eficiencia es reducida, alcanzando alrededor del 10 % de parasitismo para el caso del aulácido (datos no publicados obtenidos de crías de *C. apicicornis*; T. Curkovic). La poda de ramas afectadas, como práctica cultural, puede permitir la eliminación de los individuos en la madera deteniendo la infestación, pero ello requiere la detección oportuna de los síntomas, lo que es difícil en el campo. Por esto es necesario encontrar nuevas formas de manejo para *C. apicicornis*. Una estrategia propuesta en otros cerambycoides (Lacey *et al.*, 2004; Silk *et al.*, 2007) es la modificación y manipulación del comportamiento sexual de adultos, frecuentemente mediado por semioquímicos (Rhainds *et al.*, 2001; Hanks *et al.*, 2007), lo cual requiere estudios de la conducta y de la química ecológica de estos organismos (Harris y Foster, 1995). En cerambycoides, la química ecológica tiene un incipiente desarrollo con la identificación de feromonas sexuales en varias especies (Millar *et al.*, 2009). Paralelamente ha sido necesario estudiar la conducta sexual para identificar la forma y las condiciones en que los insectos producen feromonas, y sus respuestas a estos compuestos (Crook *et al.*, 2004; Morewood *et al.*, 2004; Fonseca y Zarbin, 2009). Así, se han desarrollado tecnologías

xilófagas habit y muy polífagas, it has 19 hosts (Prado, 1991; Barriga *et al.*, 1993; Artigas, 1994), including important fruit species such as *Ribes* spp. (Grossulariaceae), *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae), *Cydonia oblonga* Mill, and *Malus domestica* Borkh (Rosaceae), in which it is considered a pest (Curkovic, 2008).

The larvae live and develop only in living wood (Barriga *et al.*, 1993), including functional branches and trunks, in which they build subcortical and longitudinal galleries and make cross sections, which may cause the tree's fracture and fall (Artigas, 1994). The larvae and pupae are protected under the bark, which prevents the use of conventional methods to control them since they are not exposed to insecticide treatments (Curkovic, 2008). Natural control is exercised by species of Tachinidae (Diptera) (Barriga, 1990) and Aulacidae (Hymenoptera) (Elgueta and Lanfranco, 1994), but their efficiency is low, reaching about 10 % of parasitism in the case of the Aulacidae (unpublished data obtained from rearing of *C. apicicornis*; T. Curkovic). Pruning of affected branches, as a cultural practice, may allow elimination of individuals in the timber holding infestation, but it requires early detection of symptoms, which is difficult in the field. Therefore, it is necessary to find new ways of managing *C. apicicornis*. One strategy proposed for other Cerambycidae (Lacey *et al.*, 2004, Silk *et al.*, 2007) is the modification and manipulation of adult sexual behavior, often mediated by semiochemicals (Rhainds *et al.*, 2001; Hanks *et al.*, 2007), which requires studies of behavior and ecological chemistry of these organisms (Harris and Foster, 1995). In Cerambycidae, ecological chemistry has a recent and initial development with the identification of sex pheromones in several species (Millar *et al.*, 2009). At the same time it has been necessary to study the sexual behavior to identify the form and conditions in which insects produce pheromones, and their responses to these compounds (Crook *et al.*, 2004, Morewood *et al.*, 2004; Fonseca and Zarbin, 2009). Thus, technologies have been developed that incorporate pheromones as attractants, which contribute to the management of these species (Reddy, 2007). However, there are few studies of pest insect behavior in Chile (Curkovic and Ferrera, 2008).

Sexual behavior induced by insect semiochemicals has several stages: 1) calling, which often involves

que incorporan feromonas como atrayentes, las cuales contribuyen al manejo de estas especies (Reddy, 2007). Sin embargo, hay pocos estudios de comportamiento en insectos plaga en Chile (Curkovic y Ferrera, 2008).

El comportamiento sexual inducido por semioquímicos en insectos presenta varias etapas: 1) el llamado, que frecuentemente implica posturas o movimientos que ayudan a la emisión y posterior distribución de las feromonas (Cade, 1985); 2) la búsqueda y orientación, respuesta al llamado que hace el sexo opuesto mediante maniobras que favorecen la ubicación de la fuente (*e.g.* vuelo en zig-zag; Kennedy, 1977); 3) el cortejo, que incluye una serie de movimientos y posturas que ocurren cuando ambos sexos interactúan a corta distancia, previo a la cópula (Alexander *et al.*, 1997), lo que contribuye a la identificación y evaluación de un potencial compañero sexual; y 4) la cópula, que incluye el acople y transferencia de material genético del macho a la hembra (Cade, 1985). El cortejo y la cópula no se han descrito en *C. apicicornis*, pero el estudio de estos comportamientos es importante para diseñar estrategias de control basadas en feromonas específicas. Por ejemplo, la caracterización del cortejo y del primer contacto puede ser fundamental en el desarrollo de atracticidas orientados a la eliminación de machos de insectos (Curkovic *et al.*, 2006). Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) describir y caracterizar el cortejo y cópula en *C. apicicornis*; y 2) determinar su asociación con la temperatura ambiental, la velocidad del viento y la hora del día en que se observaron estas conductas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y época y de estudio

Los estudios se hicieron en la Estación Experimental Antumapu (34° 14' 31" S; 70° 38' 08" O), Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Comuna de La Pintana, Santiago, Chile. La crianza de insectos se efectuó en el laboratorio de Comportamiento y Ecología Química de Insectos, del Departamento de Sanidad Vegetal de la misma Facultad. Las observaciones se hicieron durante dos temporadas, entre fines de septiembre y principios de diciembre, en 2008-2009 y 2009-2010. El reducido período de tiempo de trabajo en cada año se debió a que la actividad de adultos de *C. apicicornis* se restringe a alrededor de 10 semanas en esta zona (Curkovic, 2008).

postures or movements that help the release and subsequent distribution of pheromones (Cade, 1985); 2) searching and orientation, a response to the call made by the opposite sex through maneuvers that favor the location of the source (*e.g.* zig-zag flight; Kennedy, 1977); 3) courtship, which includes a series of movements and postures that occur when both sexes interact at close range, before copulation (Alexander *et al.*, 1997), which contributes to the identification and evaluation of a potential sexual mate; and 4) mating, which includes coupling and transfer of male genetic material to females (Cade, 1985). Courtship and mating have not been described in *C. apicicornis*, but the study of these behaviors is important to design control strategies based on specific pheromones. For example, the characterization of courtship and first contact can be vital in developing attracticides aimed at the elimination of male insects (Curkovic *et al.*, 2006). Therefore, the objectives of this study were: 1) describe and characterize courtship and mating in *C. apicicornis*; and 2) determine their association with environmental temperature, wind speed, and the time of day when these behaviors were observed.

MATERIALS AND METHODS

Place and time of the study

The study was made at the experimental station Antumapu (34° 14' 31" S; 70° 38' 08" W), Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (Faculty of Agronomic Sciences, University of Chile), Comuna de La Pintana (County), Santiago, Chile. The insect rearing was carried out in the laboratory of Behavior and Chemical Ecology of Insects, Department of Plant Protection of the same Faculty. The observations were made during two seasons, between late September and early December in 2008-2009 and 2009-2010. The reduced working time in each year was due to the fact that the activity of *C. apicicornis* adults was restricted to about 10 weeks in this area (Curkovic, 2008).

Collection, rearing and handling of insects

Females and some males used in this study were obtained from branches of quince (*C. oblonga*), feijoa (*A. sellowiana*) and crategus (*Crataegus oxyacantha* L.), in which the characteristic symptoms of infestation of *C. apicicornis* were detected, as described by Barriga *et al.* (1993). Most of the observations were

Recolección, crianza y manipulación de insectos

Las hembras y algunos machos usados en este estudio se obtuvieron de ramas de membrillero (*C. oblonga*), feijoa (*A. sellowiana*) y crategus (*Crataegus oxyacantha* L.), en los que se detectaron los síntomas característicos de infestación de *C. apicicornis*, descritos por Barriga *et al.* (1993). La mayoría de las observaciones se hicieron de machos que provenían del entorno y que arribaron a los sitios donde se mantenían las hembras. La madera infestada se obtuvo en Lo Cañas (Santiago; 33° 32' 04" S; 70° 33' 24" O), El Olivar (Región del Libertador General Bernardo O'Higgins; 34° 13' 56" S; 70° 52' 25" O) y Antumapu. La madera recolectada fue examinada para verificar el estado de desarrollo y sexo de la pupa (los machos tienen antenas más largas y abdomen más corto que las hembras; Curkovic, 2008). La madera infestada con machos se mantuvo separada de la de hembras en baterías Flanders, bajo fotoperíodo ambiente, con temperatura promedio de $20 \pm 5^\circ \text{C}$ y humedad relativa de $50 \pm 5\%$ (registradas con termo-higrómetro digital Boeco, BOE 330, Alemania). Las baterías se revisaron diariamente entre septiembre y diciembre, y los adultos nacidos se mantuvieron aislados en frascos plásticos transparentes (6.6 cm alto y 4 cm de diámetro) y se alimentaron a través de mechas de algodón embebidas en una solución de agua y azúcar al 5 %. Los individuos no copularon en el período previo a las observaciones de campo. Estos machos criados fueron llevados al campo en los mismos frascos tapados que se colocaron alrededor de 3 m viento abajo. Los frascos se abrieron luego de una aclimatación de cada individuo por alrededor de 10 min. Cabe señalar que no se observó ninguna diferencia entre la conducta de machos criados y aquellos que arribaron desde el entorno. Cada hembra (n=31; edad 1 d) fue trasladada al campo en frascos plásticos transparentes y liberada sobre una ramilla de *Tamarix parviflora* DC (en el sitio de observación), a una altura de 1.5 m del nivel del suelo. Tres de ellas escaparon al soltarlas y las demás permanecieron sobre la rama. Cada hembra se usó hasta que ocurrió una secuencia de cópula completa, aunque cuatro individuos copularon dos veces como consecuencia de desacoples anticipados. El observador se ubicó a alrededor de 1 m de distancia de la hembra y esperó hasta la aproximación de los machos (n=55 provenientes del entorno y 4 criados).

Filmación de secuencias de comportamiento y registro de condiciones ambientales

Al observar un macho acercándose a una distancia aproximada de 20 cm de la hembra, se inició la filmación de la secuencia con cámara de video (Sony Handycam, HDR-SR10, Japón) y zoom óptico (15x). Se realizaron filmaciones de machos acercándose a las hembras de *C. apicicornis* en los instantes previos, durante e

made of males coming from the environment and arriving at the sites where females were kept. Infested wood was obtained in Lo Cañas (Santiago; 33° 32' 04" S, 70° 33' 24" W), El Olivar (Region of El Libertador General Bernardo O'Higgins; 34° 13' 56" S; 70° 52' 25" W) and Antumapu. The collected wood was examined to check the state of development and sex of the pupae (males have longer antennae and shorter abdomen than females; Curkovic, 2008). The wood infested with males was kept separate from that of females in Flanders batteries under ambient photoperiod, with average temperature of $20 \pm 5^\circ \text{C}$ and relative humidity of $50 \pm 5\%$ (recorded with digital thermohygrometer Boeco, BOE 330, Germany). Flander batteries were checked daily between September and December and the adults born were isolated in transparent plastic vials (6.6 cm high and 4 cm in diameter) and fed through cotton wicks soaked in a solution of water and 5 % sugar. The individuals did not mate in the period prior to the field observations. These bred males were taken to the field in the same stoppered vials, which were placed about 3 m downwind from the females. The vials were opened after the acclimatization of each individual for about 10 min. It is worth noting that there was no difference between the behavior of bred males and those who arrived from the environment. Each female (n=31, 1 d age) was taken to the field in transparent plastic vials and released on a twig of *Tamarix parviflora* DC (on-site observation) at 1.5 m aboveground height. Three of them escaped after being released and the rest stayed on the branch. Females were used individually until there was a complete mating sequence, although four individuals copulated twice as a result of anticipated decoupling. The observer was located about 1 m away from the female and waited until the approach of the males (n=55 from the environment and 4 bred).

Shooting of behavior sequences and recording of environmental conditions

On watching a male approaching at a distance of about 20 cm from the female, the filming of the sequence began with a video camera (Sony Handycam HDR-SR10, Japan) and optical zoom (15x). Shootings were made of males approaching females of *C. apicicornis* in the moments before, during and immediately after mating. The observations were made between 10:00 and 14:00 h, a period of increased activity of calls among females and oriented flights in males. The recordings were reproduced directly from the camera to a television set (LG LCD 26LG30R, Korea), which allowed to define the sequence of observable steps, homogeneous (excluding the very rare) and discrete (with a beginning and an end clearly defined), during courtship and copulation. When shooting started, wind speed and environmental temperature were recorded with a thermo-anemometer (Extech Instruments,

inmediatamente después de la cópula. Las observaciones se hicieron entre las 10:00 y las 14:00 h, período de mayor actividad de llamado en hembras y vuelo orientado en machos. Las grabaciones se reprodujeron directamente desde la cámara a un televisor (LG, LCD 26LG30R, Corea), lo que permitió definir la secuencia de pasos observables, homogéneos (excluyendo aquellos muy infrecuentes) y discretos (con un inicio y un final claramente definido), durante el cortejo y la cópula. Al iniciar las filmaciones se registró la velocidad del viento y temperatura ambiental con un termo-anemómetro (Extech Instrument, 407119, EE.UU.). También se registró el horario en que ocurrió el cortejo y cópula.

Análisis de los resultados

El registro del número de machos que completaron las secuencias de cortejo y cópula, se dispuso en tablas de contingencia 6×6 (Fagen y Young, 1978). En cada celda se anotó el número de individuos que, haciendo un paso en particular (columnas), había realizado un paso previo (filas), considerando que la transición de un paso a otro depende sólo de la identidad de la unidad de conducta previa (= cadena de Markov de primer orden; Fagen y Young, 1978; Liimatainen y Hoikkala, 1998). Las probabilidades de transición se obtuvieron dividiendo las frecuencias de cada celda por el total de individuos de cada fila. Para evaluar el grado de dependencia general entre los pasos que conformaron las secuencias de cortejo y cópula en machos, se usó la prueba exacta de Fisher ($p \leq 0.05$) (SPSS Statistics 15). Las probabilidades de transición se utilizaron en la construcción de un etograma (Osorio-Osorio y Cibrián-Tovar, 2000) que muestra la secuencia de pasos y rutas que pueden seguir los individuos. La variabilidad de la secuencia de cortejo y cópula de machos se calculó con el índice de estereotipia (IE) usado por Girling y Cardé (2006). Las mediciones de las variables ambientales (temperatura, velocidad del viento) y de la hora del día en que ocurrieron las conductas de interés, se sometieron a regresión logística binaria para evaluar si cada variable independiente era significativa ($p \leq 0.05$) respecto de la ocurrencia del cortejo y cópula (Minitab Statistical software 13.32). La validez del modelo se explicó mediante el porcentaje de concordancia. Para las hembras no se usaron estos procedimientos cuantitativos debido a que permanecieron mayoritariamente inmóviles durante las filmaciones, excepto en los casos en que hubo rechazo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de las conductas de cortejo y cópula

Los pasos que forman la secuencia de cortejo y cópula se presentan en el Cuadro 1 y la Figura 1.

407119, USA). Also the times of courtship and copulation were registered.

Analysis of results

The number of males who completed the sequences of courtship and copulation was recorded in a 6×6 contingency table (Fagen and Young, 1978). In each cell, the number of individuals who through a particular step (columns) had made a previous step (rows) was registered, considering that the transition from one step to another depends only on the identity of the previous behavior unit (= Markov chain of first order; Fagen and Young, 1978; Liimatainen and Hoikkala, 1998). Transition probabilities were obtained by dividing the frequencies of each cell by the total number of individuals of each row. To evaluate the general dependence among the steps making up the sequences of courtship and copulation in males, the exact Fisher test was used ($p \leq 0.05$) (SPSS Statistics 15). Transition probabilities were used in the construction of an ethogram (Osorio-Osorio and Cibrián-Tovar, 2000) that shows the sequence of steps and paths that individuals can follow. The variability of the sequence of courtship and copulation of males was calculated with the stereotypy index (SI) used by Girling and Cardé (2006). The measurements of environmental variables (temperature, wind speed) and time of day in which behaviors of interest occurred were subjected to a binary logistic regression to assess if each independent variable was significant ($p \leq 0.05$) compared to the occurrence of courtship and copulation (Minitab Statistical software 13.32). The validity of the model was explained through the concordance index. For females these quantitative procedures were not used because they remained still most of the time during filming, except in cases of rejection.

RESULTS AND DISCUSSION

Description of the courtship and mating behaviors

The steps forming the sequence of courtship and mating are presented in Table 1 and Figure 1. It was noted that the *C. apicicornis* male flies in zig-zag towards the female who is in the action of calling; the flight ends with a landing near the female. In other species, during this phase prior to mating, there is active and relatively prolonged interaction that involves contact between the male antennae and different parts of females' bodies (Michelsen, 1963, 1966), which could be interpreted as an assessment typical of a formal courtship behavior. However, the

Cuadro 1. Unidades y códigos de conducta de machos de *Callisphyris apicicornis* en secuencias que terminan en cópula.
Table 1. Units and codes of behavior of *Callisphyris apicicornis* males in sequences ending in copulation.

Unidad de conducta y código	Definición
Acercamiento (Ac)	El macho aterriza a unos cuantos centímetros y luego camina hacia la hembra o, menos frecuentemente, aterriza directamente sobre ella.
Monta (M)	El macho contacta brevemente a la hembra y se monta sobre su dorso, abrazándola con sus patas anteriores y segundo par, el que rodea la región mesotorácica. Las patas posteriores se apoyan en la rama
Aproximación de genitales (AG)	El macho inclina hacia abajo el abdomen y lo ubica a mm del orificio genital femenino; al mismo tiempo la hembra ha doblado su abdomen hacia arriba.
Cópula (C)	El macho y la hembra se acoplan y se mantienen unidos a través de sus genitales. Durante esta etapa, el macho frota periódicamente sus palpos maxilares y mandíbulas sobre el pronoto de la hembra.
Desacople (D)	El macho se desacopla separando su abdomen del de la hembra y, usualmente, se desmonta.
Guardia (G)	Una vez desacoplado el macho se queda montado sobre la hembra.
Vuelo (V)	Luego del desacople, o del período de guardia, el macho vuela, alejándose de la hembra.

Se observó que el macho de *C. apicicornis* vuela en zig-zag hacia la hembra que se encuentra llamando; el vuelo finaliza con un descenso cerca de la hembra. En otras especies, durante esta fase previo a la monta, hay una activa y relativamente prolongada interacción que involucra contacto entre las antenas de los machos y diferentes partes del cuerpo de las hembras (Michelsen, 1963, 1966), lo que podría interpretarse como una evaluación propia de una conducta de cortejo formal. Sin embargo, la aproximación y el intento de monta del macho de *C. apicicornis* sólo consistió en contactos breves entre sus antenas y patas, y el cuerpo de la hembra. Este tipo de aproximación es compatible con el uso de trampas o cebos tóxicos (Curkovic *et al.*, 2006), estrategias que requieren el contacto entre el insecto y la fuente para monitoreo y control, siempre que no necesiten al mismo tiempo de otras pistas (por ejemplo visuales o auditivas).

La aproximación del macho de *C. apicicornis* tuvo dos respuestas en las hembras: 1) aceptación (31 secuencias terminaron en cópula), permitiendo al macho realizar los pasos subsecuentes; o 2) rechazo (27 secuencias no exitosas), caracterizado por el escape (ocurrió en 13 de las 27 secuencias) de la hembra que se aleja caminando rápidamente, similar a lo reportado para *Phytoecia rufiventris* Gautier (Coleoptera:

approach and mounting attempt by the *C. apicicornis* male was only of short contacts between their antennae and legs, and the female body. This type of approach is compatible with the use of traps or toxic baits (Curkovic *et al.*, 2006), strategies that require contact between the insect and the source for monitoring and control, provided they do not need at the same time other clues (*e.g.* visual or auditory).

The approach of the *C. apicicornis* male had two responses in females: 1) acceptance (31 sequences ended in copulation), allowing the male to perform the subsequent steps; or 2) rejection (27 unsuccessful sequences), characterized by escape (occurring in 13 of the 27 sequences) of the female that walks away quickly, similar to that reported for *Phytoecia rufiventris* Gautier (Coleoptera: Cerambycidae) (Wang *et al.*, 1996). Females fleeing were persecuted by the males who could not mount them, and would finally decline chasing them. Sometimes the female instead of escaping remained in place and rejected the male with a stroke (also in 13 of 27 sequences) with its hind legs, preventing the male from approaching. The remaining unsuccessful sequence occurred when a male approached a female (that did not escape nor kick it), but after inspecting it, left without attempting to mate. Males approached females mainly by the side or back, but this does

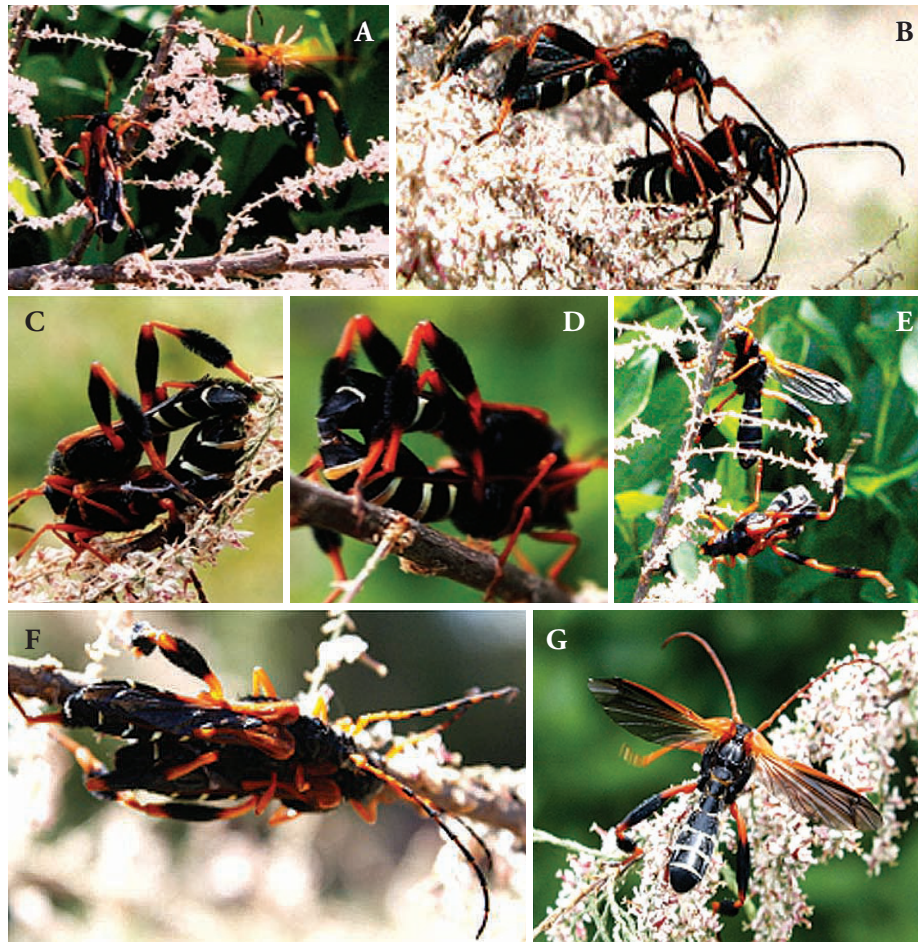


Figura 1. Fotos de los pasos del comportamiento de machos durante el cortejo y cópula de *Callisphyrus apicicornis*. A: Acercamiento; B: Monta; C: Aproximación de genitalias; D: Cópula; E: Desacople; F: Guardia; G: Vuelo.

Figure 1. Photos of the steps of male behavior during courtship and copulation of *Callisphyrus apicicornis*. A: Approach; B: Mounting; C: Alignment of genitalia; D: Copulation; E: Decoupling; F: Guarding; G: Flight.

Cerambycidae) (Wang *et al.*, 1996). Las hembras que escapaban eran perseguidas por el macho que no lograba montarlas, y finalmente desistía de perseguirlas. A veces la hembra, en lugar de escapar, se mantuvo en su lugar y rechazó al macho con un golpe (también en 13 de 27 secuencias) propinado con sus patas traseras, impidiéndole aproximarse. La secuencia no exitosa restante ocurrió cuando un macho se aproximó a la hembra (que no escapó ni lo pateó), pero luego de inspeccionarla se alejó sin intentar montarla. Los machos se aproximaron a las hembras principalmente por el costado o por su parte posterior, pero ello no parece incidir en el resultado final, pues las respectivas proporciones de individuos fueron similares en secuencias exitosas y no exitosas. Según

not seem to affect the outcome, as the respective amounts of individuals were similar in relation to successful and unsuccessful sequences. According to these results, courting in *C. apicicornis* is not evident, there is no interaction involving postures or complex maneuvers, observing only the final decision (*i.e.* acceptance or rejection) of the female to the male's approach, similar to what has been reported for *P. rufiventris* (Wang *et al.*, 1996). The rejections observed in *C. apicicornis* suggest that the female could recognize and evaluate the approaching male, but the mechanism used is unknown.

The not rejected *C. apicicornis* males mounted females. During this stage, the females remained stationary, perched on the branch or hanging from

estos resultados, el cortejo en *C. apicicornis* es poco evidente, sin una interacción que involucre posturas o maniobras complejas, observándose sólo la decisión final (*i.e.* aceptación o rechazo) de la hembra ante la aproximación del macho, similar a lo que se ha informado para *P. rufiventris* (Wang *et al.*, 1996). Los rechazos observados en *C. apicicornis* sugieren que la hembra podría reconocer y evaluar al macho que se aproxima, pero el mecanismo usado es desconocido.

Los machos de *C. apicicornis* no rechazados se montaron sobre la hembra. Durante esta etapa las hembras permanecieron estacionarias, posadas o colgando de la rama. Las antenas del macho se dirigían siempre hacia adelante, pero las de la hembra permanecían fijas hacia abajo. Una vez encima de la hembra, el macho intentó el acople inmediatamente. La cópula duró 10 a 15 min en promedio, tiempo durante el cual hubo repetidos contactos entre palpos labiales y mandíbulas del macho y el cuerpo de la hembra, similar a lo descrito en *Dectes texanus texanus* LeConte (Crook *et al.*, 2004). En dos ocasiones, cuando una pareja de *C. apicicornis* se encontraba en cópula, un segundo macho se aproximó y se montó sobre el primero, quedando los tres individuos uno encima de otro. Montas entre machos han sido reportadas para *P. rufiventris*, incluso con intentos de cópula homosexual (Wang *et al.*, 1996). En *C. apicicornis* cuando ocurrió esta monta triple se observó que la cópula sólo se efectuó entre la hembra y el macho que se encontraba inmediatamente encima de ella. En algunas ocasiones ocurrió un desacople ocasionado por la llegada del segundo macho. La hembra de *C. apicicornis* suele estar inmóvil durante la cópula, pero ocasionalmente (7/31 secuencias) se desplaza a lo largo de la rama con el macho sobre su dorso, provocando también el desacople, similar a lo observado con *Tetraopes tetraphthalmus* (Forster) (Droney y Thaker, 2006). En todos los desacoples observados en *C. apicicornis*, los machos se alejaron de la hembra volando y eventualmente algunos regresaron para iniciar una nueva secuencia. La cópula finalizó cuando se separaron las genitales de los individuos. Entonces el macho se alejó volando, mientras que la hembra permaneció inmóvil. Por ello, se considera que la cópula en *C. apicicornis* es finalizada por los machos, similar a lo descrito en *P. rufiventris* (Wang *et al.*, 1996). En tres secuencias los machos de *C. apicicornis*, luego de finalizar la cópula se mantuvieron inmóviles

it. The antennae of the male and female headed always straight ahead, but those of the female were always down. Once on top of the female, the male attempted coupling immediately. Copulation lasted 10 to 15 minutes on average, period during which there were repeated contacts between labial palps and mandibles of the male and the female body (head, pronotum, and elytra), similar to that described in *Dectes texanus texanus* LeConte (Crook *et al.*, 2004). On two occasions, when a pair of *C. apicicornis* was mating, a second male approached and mounted on the first male, thus having three individuals mounted on top of each other. Matings between males have been reported for *P. rufiventris*, including homosexual copulation attempts (Wang *et al.*, 1996). When this triple mount occurred in *C. apicicornis*, it was observed that copulation took place only between the female and the male that was immediately on top of it. In some cases, there was decoupling caused by the arrival of the second male. The female of *C. apicicornis* usually stayed still during copulation, but occasionally (7/58 sequences) it moved along the branch with the male on its back, also causing the uncoupling, similar to that observed in *Tetraopes tetraphthalmus* (Forster) (Droney and Thaker, 2006). In all the decoupling of *C. apicicornis* observed, males flew away from the female and eventually some of them returned to start a new sequence. Copulation ended when the genitalia of individuals separated. Then the male flew away, while the female remained motionless. It is therefore considered that the copula in *C. apicicornis* is completed by males, similar to that described in *P. rufiventris* (Wang *et al.*, 1996). In three sequences, the males of *C. apicicornis* after completing copulation remained motionless over the female, which could correspond to a guarding behavior, whose role in other species is to prevent another male arriving later from copulating with the female already covered. This behavior has been described for the *Cerambycidae* *Oemona hirta* (F.) (Wang and Davis, 2005) and *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Morewood *et al.*, 2004).

Quantitative analysis of the courtship/mating sequence

The results indicate that the sequences do not occur by chance ($p \leq 0.001$) and therefore there is an

sobre la hembra, lo que podría corresponder a una conducta de guardia, cuya función en otras especies es evitar que un macho que llegue posteriormente, copule con la hembra ya cubierta. Esta conducta se ha descrito para los cerambycidos *Oemona hirta* (F.) (Wang y Davis, 2005) y *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Morewood *et al.*, 2004).

Análisis cuantitativo de la secuencia de cortejo/cópula

Los resultados indican que las secuencias no ocurren por azar ($p \leq 0.001$) y por tanto existe asociación entre los pasos que conforman el cortejo y la cópula. Considerando que la tabla de contingencia analizada se construyó con el criterio de cadenas de Markov de primer orden (Fagen y Young, 1978), esta relación se puede designar como una de dependencia de primer orden. Además, la magnitud de esta asociación es elevada, lo que se refleja en el valor del coeficiente de contingencia (0.89). El etograma (Figura 2) muestra que la secuencia es unidireccional y altamente estereotipada ($IE=0.98$), pues presenta sólo una ruta alternativa hecha por 9 % de los individuos, los que hacen guardia post cópula, mientras que 91 % se salta este paso y va directamente del desacople al vuelo de alejamiento del macho.

Asociación de variables ambientales y hora del día con el comportamiento

Los registros ambientales (Figura 3) se obtuvieron sólo al momento de iniciarse cada secuencia. La regresión logística entre la ocurrencia (o no ocurrencia) de las conductas (variable dependiente) y las condiciones ambientales y hora del día (variables independientes), mostró que el comportamiento de cortejo y cópula es influido significativamente sólo por la temperatura ($p=0.023$). El porcentaje de concordancia fue 73.8 %. Las secuencias exitosas ocurrieron entre 17 a 28 °C. No se encontraron referencias respecto a las conductas de cortejo y cópula y su relación con la temperatura, la velocidad del viento y la hora del día para Cerambycidae; sin embargo, una disminución de la temperatura ambiental reduce significativamente el cortejo en *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Shreve *et al.*, 2004). La hora del día (10:48 a 13:12) y la velocidad del viento (de 0 a 3 m s⁻¹) registradas al inicio de las secuencias, no fueron

asociación among the steps that make up courtship and mating (copulation). Considering that the contingency table analyzed was built with the first order Markov chains criterion (Fagen and Young, 1978), this relationship may be designated as one of first order dependency. Moreover, the magnitude of this association is high, which is reflected in the value of the contingency coefficient (0.89). The ethogram (Figure 2) shows that the sequence is unidirectional and highly stereotyped ($IE = 0.98$), since it has only one alternative route made by 9 % of individuals, who stand guard after mating, while 91 % skip this step and go directly from decoupling to the moving-away flight of the male.

Association of environmental variables and time of the day with behavior

Environmental records (Figure 3) were obtained only upon the beginning of each sequence. The logistic regression between the occurrence (or nonoccurrence) of behaviors (dependent variable) and environmental conditions and time of day (independent variables) showed that courtship and copulation are significantly influenced only by temperature ($p=0.023$). The percentage of concordance was 73.8 %. Successful sequences occurred between 17 to 28 °C. No references were found regarding the courtship and mating behaviors and their relationship with temperature, wind speed and time of day for Cerambycidae; however, a decrease of environmental temperature significantly reduced courtship in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Shreve *et al.*, 2004). The time of day (10:48 to 13:12) and wind speed (0 to 3 m s⁻¹) recorded at the beginning of the sequences were not

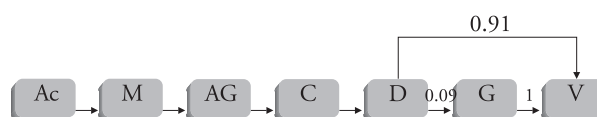


Figura 2. Etograma del comportamiento de cortejo y cópula de machos de *C. apicicornis*, mostrando rutas y probabilidades de transición entre conductas en secuencias exitosas (terminan en cópula) (n=31).

Figure 2. Ethogram of courtship and copulation behavior of *C. apicicornis* males, showing routes and transition probabilities between behaviors in successful sequences (ending in copulation) (n=31).

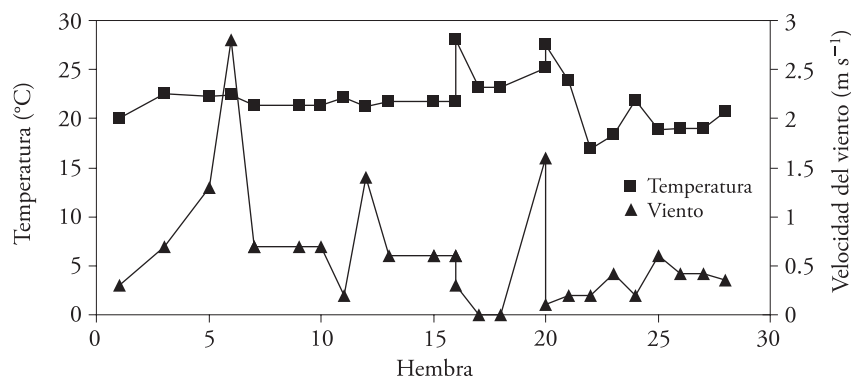


Figura 3. Temperatura (°C) y velocidad del viento (m s^{-1}) al inicio de secuencias exitosas ($n=31$) de cortejo y cópula en *C. apicicornis* para 28 hembras.

Figure 3. Temperature (°C) and wind speed (m s^{-1}) at the start of successful sequences ($n=31$) of courtship and mating in 28 females of *C. apicicornis*.

significativos ($p=0.47$; $p=0.86$) en la ocurrencia del cortejo y cópula.

significant ($p=0.47$; $p=0.86$) in the occurrence of courtship and copulation.

Atracción de otras especies

Las hembras de *C. apicicornis*, y presumiblemente la feromona sexual que emite durante el llamado, fueron atractivas para machos de *Hephaestion violaceipennis* F. & G., otra especie de Cerambycidae nativo de Chile y perteneciente a la misma subfamilia (Lepturinae; Cerda, 1986). Esto es similar a lo reportado por Krahmer (1990), quien informa de la aproximación de machos de *Platynocera viridis* (F. & G.) (también un Lepturinae) a una hembra de *Callisphyris macropus* Newman. Estas observaciones permiten plantear la hipótesis de que estas especies de cerambycoides nativos de Chile, filogenéticamente relacionadas entre ellas, comparten compuestos feromonales en su proceso de comunicación sexual. Ello sugiere que en el caso de las especies que compartan estos canales de comunicación, que sean sincrónicas y simpátricas, otros mecanismos desconocidos permitirían lograr el necesario aislamiento reproductivo entre ellas. Es posible que el estudio de las conductas que desarrollan las diferentes especies emparentadas contribuya a dilucidar esta pregunta.

CONCLUSIONES

El contacto inicial entre machos y hembras de *C. apicicornis* previo a la cópula, fue breve y simple, y no corresponde a un cortejo elaborado. Sin

Attraction of other species

Females of *C. apicicornis* and presumably the sex pheromone released during calling were attractive to males of *Hephaestion violaceipennis* F. & G., another species of Cerambycidae native to Chile and belonging to the same subfamily (Lepturinae; Cerda, 1986). This is similar to that reported by Krahmer (1990) about the approach of *Platynocera viridis* (F. & G.) (also a Lepturinae) males to a *Callisphyris macropus* Newman female. These findings raise the hypothesis that these species of cerambycoides native to Chile, phylogenetically related to each other, share pheromonal compounds in their process of sexual communication. This suggests that in the case of species that are synchronous and sympatric and share these communication channels, other unknown mechanisms would enable to achieve the necessary reproductive isolation between them. It is possible that the study of the behaviors developed by different related species will help to clarify this issue.

CONCLUSIONS

The initial contact between males and females of *C. apicicornis* prior to copulation was brief and simple, and far from being an elaborate courtship. However, rejection behaviors were observed in

embargo, se observaron conductas de rechazo por la hembra, lo que sugiere algún mecanismo de reconocimiento específico y evaluación del macho que se aproxima a ella.

Las conductas de cortejo y cópula se pueden definir como secuencias de primer orden, altamente estereotipadas y no azarosas, y por tanto parecen responder a una pre-programación de los individuos, dirigida presumiblemente por estímulos químicos (feromona sexual). Ello sugiere que, en el evento de la exposición de machos a la feromona sexual específica (por ejemplo incorporada a un atraccida o en un emisor usado en sistemas de monitoreo), los individuos se aproximarán y contactarán la fuente, de modo que será posible la intoxicación con el insecticida incorporado en el cebo tóxico específico o la captura del macho que contacta la trampa.

De las variables ambientales, sólo la temperatura fue significativa en la ocurrencia del cortejo y cópula (principalmente entre 19 y 23 °C), mientras que la velocidad del viento (0 a 3 m s⁻¹) y la hora del día (entre 10:00 y 14:00 h) no fueron significativas.

Las hembras de *C. apicicornis* atrajeron a machos de *H. violaceipennis* (ambos pertenecientes a la subfamilia Lepturinae), lo que sugiere la posibilidad del uso de señales químicas similares entre Géneros filogenéticamente cercanos.

females, suggesting a mechanism for specific recognition and evaluation of the males approaching them.

The courtship and mating behaviors can be defined as first order sequences, highly stereotyped and not random, and therefore seem to respond to a pre-programming of individuals, presumably led by chemical stimuli (sex pheromone). This suggests that in the event of exposure of males to the specific sex pheromone (e.g. incorporated into an attracticide or a device used in monitoring systems), individuals will approach and contact the source, so poisoning will be possible with the insecticide incorporated into the specific toxic bait, or the catch of the male that contacts the trap.

Of environmental variables, only temperature was significant in the occurrence of courtship and mating (mostly between 19 and 23 °C), while the wind speed (0 to 3 m⁻¹) and time of day (between 10:00 and 14:00 h) were not significant.

Females of *C. apicicornis* attracted *H. violaceipennis* males (both belonging to the Lepturinae subfamily), suggesting the possible use of similar chemical signals between phylogenetically close genus.

—End of the English version—



AGRADECIMIENTOS

A Conicyt de Chile por financiar el proyecto Fondecyt 11070072 "Caracterización del comportamiento de llamado, orientación y cortejo en *Callisphyris apicicornis* (Coleoptera: Cerambycidae) y evaluación de la respuesta de machos a volátiles aislados desde hembras vírgenes conespecíficas".

LITERATURA CITADA

- Alexander, R., D. Marshall, and J. Cooley. 1997. Evolutionary perspectives in insect mating. In: Choe, J. C., and B. J. Crespi (ed). Mating Systems in Insects and Arachnids. Cambridge University Press. pp: 4-31.
- Artigas, J. 1994. *Callisphyris vespa* Fairmaire & Germain. Sierra del manzano. In: Entomología Económica. Insectos de Interés Agrícola, Forestal, Médico y Veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). Ediciones Universidad de Concepción, Vol. II, pp: 140-141.
- Barriga, J. 1990. Parásitos y depredadores de larvas de Cerambycidae y Buprestidae (Coleoptera) en Chile. Rev. Chilena Entomol. 18: 57-59.
- Barriga, J., T. Curkovic, T. Fichet, J. Henríquez, y J. Macaya. 1993. Nuevos antecedentes de coleópteros xilófagos y plantas hospederas en Chile, con una recopilación de citas previas. Rev. Chilena Entomol. 20: 65-91.
- Cade, W. 1985. Insect mating and courtship behavior. Comprehensive Insect Physiol. Biochem. Pharmacol. 9: 591-619.
- Cerda, M. 1986. Lista sistemática de los cerambycoides chilenos (Coleoptera: Cerambycidae). Rev. Chilena Entomol. 14: 29-39.
- Crook, D., J. Hopper, S. Ramaswamy, and R. Higgins. 2004. Courtship Behavior of the Soybean Stem Borer *Dectes texanus texanus* (Coleoptera: Cerambycidae), evidence for a female contact sex pheromone. Ann. Entomol. Soc. Am. 97: 600-604.
- Curkovic, T., J. Brunner, and P. Landolt. 2006. Courtship behavior in *Choristoneura rosaceana* and *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 99: 617-624.
- Curkovic, T. 2008. La sierra del manzano: antecedentes biológicos y bases para el desarrollo del control de adultos. Aconex 98: 10-14.
- Curkovic, T., y C. Ferrera. 2008. Manejo etológico de plagas nativas en Chile en base al estudio del comportamiento y química ecológica. Rev. Antumapu 6: 3-5.

- Droney, D., and M. Thaker. 2006. Factors influencing mating duration and male choice in the red milkweed *Tetraopes tetraphthalmus* (Forster) (Coleoptera: Cerambycidae). *Ethol. Ecol. Evol.* 18: 173-183.
- Elgueta, M., y D. Lanfranco. 1994. La familia Aulacidae en Chile (Hymenoptera: Evanioidea). *Rev. Chilena Entomol.* 21: 85-97.
- Fagen, R., and D. Young. 1978. Temporal patterns of behaviors: durations, intervals, latencies, and secuencias. *In: Colgan, P. (ed). Quantitative Ethology.* Wiley, New York. pp: 100-107.
- Fonseca, M., and H. Zarbin. 2009. Mating behaviour and evidence for sex-specific pheromones in *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae). *J. Appl. Entomol.* 133: 695-701.
- Girling, R., and R. Cardè. 2006. Analysis of the courtship behavior of the navel orangeworm, *Ameylois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae), with a commentary on methods for the analysis of sequences of behavioral transitions. *J. Insect Behav.* 19: 497-520.
- Hanks, L., J. Millar, J. Moreira, J. Barbour, E. Lacey, J. McElfresh, F. Rayreuter, and A. Ray. 2007. Using Generic pheromone lures to expedite identification of aggregation pheromones for the Cerambycid beetles *Xylotrechus nauticus*, *Phymatodes lecontei*, and *Neoclitus modestus modestus*. *J. Chem. Ecol.* 33: 889-907.
- Harris, M., and S. Foster. 1995. Behavior and integration. *In: Bella, W. J., and R. T. Cardé (eds). Chemical Ecology of Insects.* Chapman & Hall. Sunderland, England. pp: 3-48.
- Kennedy, J. 1977. Olfactory responses to distant plants and other odor sources. *In: Shorey, H., and J. McKelvey, Jr. (eds). Chemical Control of Insect Behavior. Theory and Applications.* Wiley-Interscience. pp: 67-91.
- Krahmer, E. 1990. Feromona de una especie de cerambycidae atrae a los machos de otro género (Coleoptera). *Rev. Chilena Entomol.* 18: 95.
- Lacey, E., J. Matthew, J. Ginzel, J. Millar, and L. Hanks. 2004. Male produced aggregation pheromone of the Cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus*. *J. Chem. Ecol.* 30: 1493-1507.
- Liimatainen, J., and A. Hoikkala. 1998. Interactions of the males and females of three sympatric drosophila virilis-group species, *D. montana*, *D. littoralis*, and *D. lummei*, (Diptera: Drosophilidae) in intra- and interspecific courtships in the wild and in the laboratory. *J. Insect Behav.* 11: 399-417.
- Michelsen, A. 1963. Observations on the sexual behavior of some longicorn beetles, subfamily Lepturinae (Coleoptera: Cerambycidae). *Behavior* 34: 329-355.
- Michelsen, A. 1966. The sexual behavior of the some longhorned beetles (Col., Cerambycidae). *Entomologische Meddeleiser* 34: 329-355.
- Millar, J., L. Hanks, J. Moreira, J. Barbour, and E. Lacey. 2009. Pheromone chemistry of cerambycid beetles. *In: Nakamura, K., and J. Millar (eds). Chemical Ecology of Wood-Boring Insects.* Forestry and Forest Products Research Institute, Ibaraki, Japan. pp: 52-79.
- Morewood, W., P. Neiner, J. Sellmer, and K. Hoover. 2004. Behavior of adult *Anoplophora glabripennis* on a variety of trees under greenhouse conditions. *J. Insect Behav.* 17: 215-226.
- Osorio-Osorio, R., y J. Cibrián-Tovar, J. 2000. Conducta de cortejo del barrenador de la caña de azúcar *Diatraea considerata* Heinrich (Lepidoptera: Pyralidae). *Agrociencia* 34: 619-626.
- Prado, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Santiago, Chile. 207 p.
- Reddy, G. 2007. Improved semiochemical-based trapping method for old-house borer, *Hylotrupes bajulus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environ. Entomol.* 36: 281-286.
- Rhainds, M., C. Chiew Lan, S. King, L. Zhen-Mo, and G. Gries. 2001. Pheromone communication and mating behaviour of coffee white stem borer *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 36: 299-309.
- Shreve S., J. Kelty, and R. Lee. 2004. Preservation of reproductive behaviors during modest cooling: rapid cold-hardening fine-tunes organismal response. *J. Exp. Biol.* 207: 1797-1802.
- Silk, P., J. Sweeney, J. Wu, J. Price, J. Gutowski, and E. Kettela. 2007. Evidence for a male produced pheromone in *Tetropium fuscum* (F.) and *Tetropium cinnamopterum* (Kirby) (Coleoptera: Cerambycidae). *Naturwissenschaften* 94: 697-701.
- Wang, Q., L. Chen, J. Li, and X. Yin. 1996. Mating behavior of *Phytoecia rufiventris* Gautier (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect Behav.* 9: 47-60.
- Wang, Q., and L. Davis. 2005. Mating behavior of *Oemona hirta* (F.) (Coleoptera: Cerambycidae: Cerambycinae) in laboratory conditions. *J. Insect Behav.* 18: 187-191.