

# Caracterización de la respuesta electroantenográfica de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean (Coleoptera: Cerambycidae)

I. Sánchez-Osorio\*, R. Tapias, I. Domínguez y G. López

Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Politécnica Superior.  
Universidad de Huelva. Ctra. Palos de la Frontera, s/n. 21819 Palos de la Frontera (Huelva). España

## Resumen

Los cerambícidos xilófagos de los géneros *Cerambyx* y *Prinobius* pueden desempeñar un papel relevante en el decaimiento del género *Quercus* en España. Las nuevas tendencias en el control integrado de plagas apuestan por medidas basadas en el comportamiento de los insectos ante la percepción de compuestos semioquímicos. La electroantenografía permite interpretar la relevancia de la estimulación olfativa en la selección de hospedantes, aspecto desconocido para muchos insectos xilófagos. *Cerambyx welensii* y *Prinobius germari* han respondido electroantenográficamente frente a dos tipos de sustancias: un volátil de hojas verdes –(*E*)-2-hexenal- y la esencia de trementina; *C. welensii* respondió además frente al ácido acético. Condiciones de estimulación fuertes (20 µl de mezcla estimulante a concentración 1:1 en volumen) favorecen la obtención de respuestas de EAG elevadas, sin saturar la antena. Bajo estas condiciones de estimulación, y empleando insectos completos, se ha encontrado que una preparación para estudio de EAG puede durar cinco horas al menos. Los resultados manifiestan una buena aptitud de dichas especies para la realización de estudios electrofisiológicos más amplios (como la cromatografía acoplada a la electroantenografía), que permitan interpretar la mediación de la estimulación olfativa en la localización de sus principales hospedantes.

**Palabras clave:** electroantenografía, *Cerambyx*, *Prinobius*, Cerambycidae, encina, alcornoque, (*E*)-2-hexenal.

## Abstract

### Characterization of the electroantennographic response by *Cerambyx welensii* Küster and *Prinobius germari* Germar (Coleoptera: Cerambycidae) to olfactory stimuli

Xylophagous cerambycids of *Cerambyx* and *Prinobius* genus can play an important role in «oak decline» in Spain. New trends in the integrated pest management are dealing with control strategies based on the relation between olfactory perception of semiochemicals and insect behaviour. Electroantennography of olfactory stimuli enables to interpret the significance of the olfactory stimulation in host selection, an unknown aspect within many xylophagous insects. *Cerambyx welensii* and *Prinobius germari* (Coleoptera, Cerambycidae), have responded in EAG tests to two different compounds: a green-leaves volatile (*E*)-2-hexenal and turpentine; *C. welensii* also responded to acetic acid. Strong stimulatory conditions (20 µl of stimulating blend at 1:1 v/v doses) favour high EAG responses, without causing antennal saturation. Under these stimulatory conditions, and using complete insects, we have obtained stable EAG responses during, at least, five hours. Results show a good aptitude of these species for deeper electrophysiological experiments (such chromatography linked to electroantennography), in search of the olfactory cues involved in host location.

**Key words:** electroantennography, *Cerambyx*, *Prinobius*, Cerambycidae, holm oak, cork oak, (*E*)-2-hexenal.

## Introducción

La acción de los cerambícidos xilófagos, principalmente los géneros *Cerambyx* y *Prinobius*, se ha considerado un factor desencadenante y/o agravante en el

problema de la «seca» del género *Quercus* en nuestro país (Montoya, 1992; Muñoz *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2004). A pesar de ello, se desconoce la importancia real del papel que desempeñan en el decaimiento de las formaciones forestales donde la encina y el alcornoque son especies arbóreas dominantes, en especial las dehesas y los alcornocales. A este desconocimiento contribuyen los hábitos de comportamiento de

\* Autor para la correspondencia: [isanchez@uhu.es](mailto:isanchez@uhu.es)  
Recibido: 04-07-05; Aceptado: 24-11-06.

estos insectos (López *et al.*, 2004), lo que ha dificultado el planteamiento de estudios rigurosos acerca de dos aspectos interesantes y relacionados: su mecanismo de selección de hospedantes y las posibilidades de control de sus poblaciones.

Los compuestos volátiles presentes en plantas, tanto hospedantes potenciales como no hospedantes, tienen una gran importancia de cara a la selección de huéspedes por parte de muchos insectos fitófagos, estando su detección a cargo de neuronas receptoras de estructuras olfativas localizadas en la antena (Masson y Mustaparta, 1990). En los cerambícidos, dicha selección puede estar motivada por la búsqueda de sustratos adecuados para la oviposición y el desarrollo de las nuevas generaciones, así como por la localización de recursos alimenticios para los adultos (Hanks *et al.*, 1998; Meurer y Tavakilian, 1997). La atracción ejercida por el hospedante sobre los coleópteros xilófagos puede verse influida, aparte de por sustancias químicas que impregnan la madera, por condicionantes tales como la época del año, el órgano vegetativo (ramas, tronco, raíz), la edad del árbol y su estado fisiológico (Compte y Caminero, 1982). Además, un estímulo químico a larga distancia puede ser aumentado por estímulos visuales a corta distancia, como la silueta del árbol (McIntosh *et al.*, 2001) e incluso su color (Groot y Nott, 2001).

Las técnicas electrofisiológicas, en particular la electroantenografía, permiten estudiar la relevancia que tiene para los insectos la detección olfativa de compuestos volátiles. La mayor parte de las referencias sobre la aplicación de estas técnicas están relacionadas con lepidópteros, ya que han sido aplicadas principalmente al estudio de feromonas sexuales (Wadhams, 1992). En los coleópteros, los estudios se refieren principalmente a feromonas de agregación y kairomonas. En la familia Cerambycidae existen pocos estudios electrofisiológicos, y de estos la mayor parte se centran en compuestos de actividad kairomonal (Ikeda *et al.*, 1993; Barata *et al.*, 1992 y 2000; Suckling *et al.*, 2001), tratando algún caso específico sobre feromonas sexuales (Zhang *et al.*, 2000 y 2002; Rhainds *et al.*, 2001; Liendo *et al.*, 2005). Por lo que se refiere a cerambícidos xilófagos del género *Quercus*, únicamente se pueden encontrar, hasta el momento, las experiencias de Sánchez *et al.* (2004) y Sánchez-Osorio *et al.* (2006) con *Cerambyx welensii* y *Prinobius germari*.

La electroantenografía de estímulos olfativos resulta especialmente útil para estudiar grupos numerosos de

sustancias volátiles tanto de actividad kairomonal, relacionada con hospedantes potenciales y no hospedantes, como de actividad feromonal. En este tipo de análisis la respuesta de EAG se suele expresar como valor normalizado respecto a la de un compuesto «estándar» de referencia. Este compuesto estándar puede ser cualquier sustancia que origine respuestas aceptables (Syntech, 1998; sin que los autores especifiquen ningún rango concreto), aunque Roelofs (1984) considera que debería ser capaz de provocar respuestas de 1 a 2 milivoltios. La necesidad de trabajar con respuestas relativas al estándar cobra especial importancia en especies como *C. welensii* y *P. germari*, ya que las dificultades para la obtención de adultos en condiciones controladas hacen que los insectos deban ser capturados en campo, lo cual introduce un factor de variabilidad de respuestas importante: el estado fisiológico del insecto. Además de este factor, la respuesta de EAG puede verse afectada por otras variables de tipo experimental o ambiental, así como por características propias de la especie o la población (Roelofs, 1984; Syntech, 1998; Dickens, 2000; Van Tol y Visser, 2002; Sánchez-Osorio, 2005).

En *Q. ilex*, uno de los principales hospedantes de *C. welensii* y *P. germari*, se ha encontrado la mayor variedad de monoterpenos procedentes de emisión foliar entre 40 especies leñosas mediterráneas (Owen *et al.*, 2001). Además, las tasas de emisión de monoterpenos de *Q. ilex* y *Q. suber* se consideran de las más altas entre las especies emisoras de este tipo de compuestos volátiles, resultando el  $\alpha$ -pineno y el  $\beta$ -pineno dos de los cinco compuestos dominantes (Kesselmeier y Staudt, 1999; Owen *et al.*, 2002; Staudt *et al.*, 2004). Otros compuestos tradicionalmente empleados en los estudios de EAG son el (*E*)-2-hexenal y el ácido acético. El primero es un volátil de hojas verdes (GLV) de amplia presencia en los vegetales, pero no detectado aún en el género *Quercus* (Kesselmeier y Staudt, 1999; Mannschreck *et al.*, 2002; Staudt *et al.*, 2004; Pio *et al.*, 2005). El ácido acético se ha encontrado entre las emisiones foliares de *Q. ilex* (Kesselmeier *et al.*, 1997).

Estas evidencias recomiendan estudiar la repercusión de este tipo de emisiones sobre la selección de hospedantes por parte de *C. welensii* y *P. germari*. Estudios electrofisiológicos como la electroantenografía podrían proporcionar una información relevante, de cara a la propuesta de medidas para el control integrado de plagas (Pickett *et al.*, 1991; Witzgall *et al.*, 1991). Este tipo de información sería de especial importancia tratándose de especies como *C. welensii* y

*P. germani*, para las cuales algunas de las medidas clásicas de control resultan discutibles en términos de eficacia y admisibilidad ecológica.

En el presente trabajo se pretende analizar la respuesta de *C. welensii* y *P. germani* en pruebas de EAG, en particular: a) comparar la respuesta frente a tres sustancias (ácido acético, esencia de trementina comercial y (*E*)-2-hexenal) candidatas para ser empleadas como estímulo estándar; b) determinar el efecto sobre la respuesta de la concentración de la mezcla estimulante, así como de la cantidad de estímulo empleado; c) determinar la duración de una preparación para estudio de EAG en las dos especies.

## Material y Métodos

### Insectos

Los insectos se capturaron durante el período de vuelo (mayo-julio de 2003) en una dehesa de alcornoque (término municipal de Almonte, Huelva). Cada ejemplar se mantuvo en un recipiente de plástico de 20 × 20 cm en laboratorio hasta el momento del estudio, a la temperatura y humedad ambiental y en penumbra.

### Obtención de respuestas electroantenográficas

Para la obtención de respuestas de EAG se siguió la técnica descrita por Sánchez-Osorio *et al.* (2006). Para ello se emplearon insectos completos y se utilizaron electrodos capilares de vidrio, estirados manualmente, con filamento de plata y solución salina (KCl 0,1 N). El electrodo registrador se colocó recubriendo el extremo intacto del undécimo segmento de la antena; el electrodo de referencia se insertó a través de la membrana intersegmental entre el escapo y el pedicelo. El análisis y medición de las respuestas de EAG se efectuó en un ordenador personal mediante el programa informático Autospike-32 (Syntech<sup>®</sup>. Hilversum, Holanda).

La inyección estimulante consistió en una mezcla de la sustancia estudiada al 50% en un solvente (hexano o aceite de parafina). Se aplicaron 20 microlitros de la mezcla sobre una tira de papel de filtro Whatman n.º 1, que fue introducida en una pipeta Pasteur desechable. Como control se emplearon 20 microlitros del

solvente, impregnando la tira de papel Whatman. La aplicación del estímulo se efectuó inyectando, mediante una jeringa de PVC, un volumen de 10 ml de aire a través de la pipeta Pasteur. Antes de proceder al sellado de las pipetas cargadas con el estímulo, se permitió la evaporación del solvente durante un tiempo aproximado de cinco minutos.

### Elección de estímulo estándar y aplicación de estímulos

Como sustancias estimulantes se emplearon tres de distinta naturaleza: por un lado el volátil de hojas verdes (*E*)-2-hexenal (98% de pureza; Sigma-Aldrich), empleado ya como estímulo estándar con *Phoracantha semipunctata* (Barata, 1997). Se empleó además esencia de trementina (99,5% de pureza, Panreac), mezcla de monoterpenos presente en la resina, cuya composición resultó ser:  $\alpha$ -pineno (80%),  $\beta$ -pineno (16,2%) y canfeno (3,8%) (Cromatografía de gases-espectrometría de masas. Agilent GC6890, MS5973; columna HP-5MS, 30 m × 0,25 mm DI, 0,25  $\mu$ m). Por último se utilizó ácido acético (99,5% de pureza; Fluka), compuesto empleado ya como estímulo estándar en Scolytidae (González *et al.*, 1994). A cada insecto ( $N_{Cerambyx} = 12$ ,  $N_{Prinobius} = 7$ ) le fue aplicada una serie constituida por la inyección control seguida de las tres mezclas estimulantes aplicadas en orden establecido al azar, la frecuencia de estimulación en cada serie con las distintas mezclas fue de 1 a 3 minutos. Las respuestas relativas se obtuvieron al expresar las absolutas en tanto por ciento respecto al mayor valor registrado (considerado el 100%).

### Análisis de la relación concentración-respuesta

Para los compuestos (*E*)-2-hexenal y trementina se prepararon cinco disoluciones en hexano (1:10.000, 1:1.000, 1:100, 1:10 y 1:1 v/v). Para cada insecto ( $N_{Cerambyx} = 4$ ,  $N_{Prinobius} = 5$ ) la sesión se inició con la inyección control, a continuación se aplicaron las sucesivas concentraciones en orden creciente, efectuándose tres inyecciones consecutivas para cada concentración (20  $\mu$ l). La frecuencia de estimulación para una misma concentración fue de 1 minuto, dejando un tiempo de entre 2 y 5 minutos entre series correspondientes a dosis distintas. Cada respuesta neta se estandarizó ex-

presándola como valor relativo (en tanto por uno) respecto a la media de las tres respuestas netas obtenidas frente a la concentración 1:1.

### Efecto de la cantidad de estímulo aplicado

Se analizó el efecto de aumentar la cantidad de mezcla estimulante aplicada de 5 a 20  $\mu\text{l}$  (incrementos de 5  $\mu\text{l}$ ). Como disolución estimulante se empleó, para *C. welensii*, una mezcla al 50% v/v de (*E*)-2-hexenal en aceite de parafina (en tres insectos) y en hexano (en los otros tres); en *P. germari* el estímulo estándar fue una disolución al 50% (v/v) de esencia de trementina en aceite de parafina. La inyección control se aplicó en las mismas cantidades que la mezcla estudiada. A cada ejemplar ( $N_{Cerambyx} = 6$ ,  $N_{Prinobius} = 9$ ), le fue aplicada la inyección control, seguida de tres estimulaciones consecutivas para cada una de las cantidades citadas. Las estimulaciones se efectuaron en orden creciente de cantidades, empleando una frecuencia de 15 segundos entre repeticiones correspondientes a cada cantidad y espaciando 2 minutos las series de inyecciones con cantidades distintas. Las respuestas netas se expresaron como valor relativo respecto a la respuesta provocada por la cantidad mayor (20  $\mu\text{l}$ ).

### Efecto de la duración de la preparación

El estudio de la duración de una preparación de EAG en condiciones aceptables se efectuó grabando las respuestas obtenidas durante cinco horas ( $N_{Cerambyx} = 8$ ,  $N_{Prinobius} = 9$ ), mediante la aplicación cada hora de tres inyecciones del estímulo estándar espaciadas 15 segundos y precedidas por una inyección de la preparación control (parafina). Dado que el solvente empleado es no volátil, únicamente transcurrió un tiempo de  $\approx 2$  minutos entre la aplicación de la mezcla estimulante en el papel de filtro y el sellado de la pipeta. Como variable ilustrativa de la respuesta para cada hora se consideró la respuesta neta estandarizada, expresada como valor relativo en tanto por uno respecto al valor correspondiente a la primera hora.

### Análisis estadístico

En todos los casos se empleó el paquete estadístico SPSS 11.5<sup>®</sup>, considerando un nivel de significación

$\alpha = 0,05$ . La identificación de datos aberrantes se efectuó a partir del método de Grubbs (Dagnelie, 1998) tomando como valor crítico el tabulado para la serie determinada por el parámetro  $(d'_{\text{máx}})_{1-\alpha/2}$  y el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Debido a que se contó generalmente con muestras pequeñas, se analizó el cumplimiento del requisito de normalidad a partir de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors, y Shapiro-Wilk. Se consideró cumplido tal requisito sólo cuando ambas pruebas aceptaban la hipótesis nula. La homocedasticidad se comprobó mediante la prueba de Levene.

En todos los análisis se trataron separadamente los datos correspondientes a cada especie. Para cada insecto, la respuesta considerada (ya fuera neta o bruta) consistió generalmente en el promedio a partir de tres inyecciones consecutivas. Las respuestas netas se obtuvieron en todos los casos restando a cada valor medido la respuesta provocada por el control.

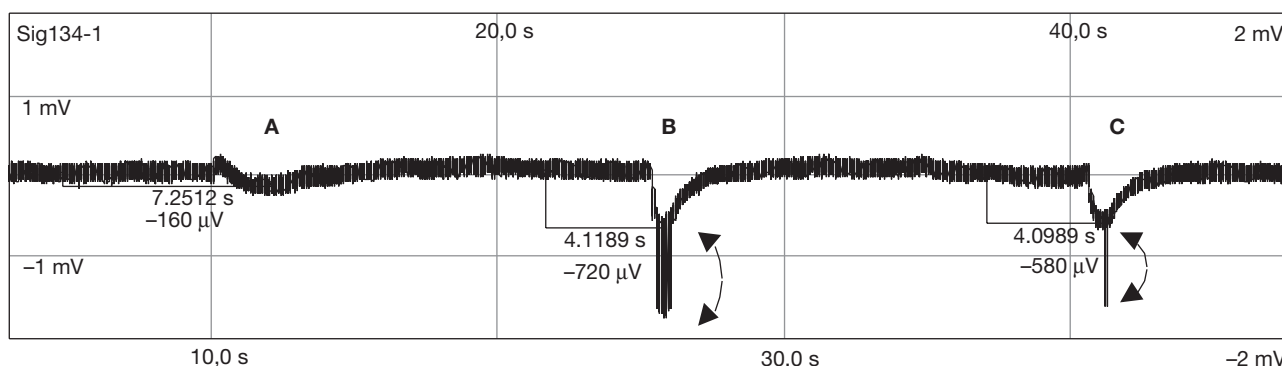
Los datos se analizaron mediante la aprueba ANOVA seguida del test de Games-Howell, o bien mediante el procedimiento Modelo Lineal General para Medidas Repetidas. El contraste de medias para una o dos muestras se realizó mediante el test «t» de Student o las pruebas de Wilcoxon o Mann-Whitney, según resultara asumible o no el requisito de normalidad. En ningún caso se transformaron las variables estudiadas.

## Resultados

### Repuestas de EAG frente al (*E*)-2-hexenal, esencia de trementina y ácido acético

La Figura 1 ilustra la forma típica que presentan las respuestas electroantagráficas —caída rápida del potencial causada por la despolarización en los receptores, seguida de la recuperación más lenta del nivel de base— en este caso pertenecientes a *C. welensii*, así como la diferencia entre las intensidades de las respuestas frente a las tres sustancias, aplicadas con un espaciado de 15 segundos. Se puede observar, además, la diferencia en la forma de la respuesta provocada por el ácido acético: fluctuación más suave que para las otras dos sustancias y con una leve oscilación inicial positiva.

Este tipo de comportamiento en las respuestas de EAG se ha encontrado para las dos especies, aunque las intensidades medidas fueron distintas. La Tabla 1 refleja las respuestas brutas obtenidas para *C. welensii* y *P. germari* frente a las tres mezclas estimulantes



**Figura 1.** Respuestas típicas de EAG de *C. welensii* frente al ácido acético (A), (*E*)-2-hexenal (B) y trementina (C). Las flechas indican anomalías en la señal, no consideradas en la medición de la respuesta.

probadas, así como frente al control.

Las respuestas encontradas en las dos especies no reflejaron diferencias significativas entre sexos para ninguna de las tres mezclas estimulantes (Mann-Whitney:  $p > 0,3$  y  $p > 0,05$ , para *C. welensii* y *P. germari* respectivamente). Sin embargo, para *P. germari*, el escaso número de hembras estudiado, así como la baja significación asociada al test estadístico para la trementina y el (*E*)-2-hexenal, aconsejan interpretar con precaución este aspecto. Para el conjunto de individuos se encontró que las respuestas provocadas en *C. welensii* por los tres estímulos así como por la inyección control fueron significativamente mayores que las obtenidas en *P. germari*. En esta especie, la mayor respuesta absoluta se obtuvo frente a la trementina, alcanzándose un valor medio (0,39 mV) próximo al doble del obtenido para el (*E*)-2-hexenal. En *C. welensii*, las mayores respuestas fueron para el (*E*)-2-hexenal y la trementina, provocando estimulaciones similares (0,98 y 0,91 mV respectivamente). El ácido acético resultó el compuesto menos estimulante para las dos especies, provocando respuestas bajas en los dos casos (<21%

de la respuesta al (*E*)-2-hexenal en *C. welensii*, y <16% de la respuesta a la trementina en *P. germari*).

La Figura 2 muestra las respuestas de EAG expresadas en forma relativa frente al compuesto más estimulante en cada insecto [(*E*)-2-hexenal en *C. welensii* y trementina en *P. germari*]. No se observaron diferencias significativas entre las respuestas provocadas en *C. welensii* por la trementina y el (*E*)-2-hexenal, pero sí entre ambas y el ácido acético. Estas tres sustancias provocaron respuesta significativamente mayores que el control. En *P. germari*, la respuesta frente a la trementina superó significativamente a las provocadas por los otros estímulos; la respuesta provocada por el ácido acético no se puede considerar significativamente diferente a la encontrada frente al control.

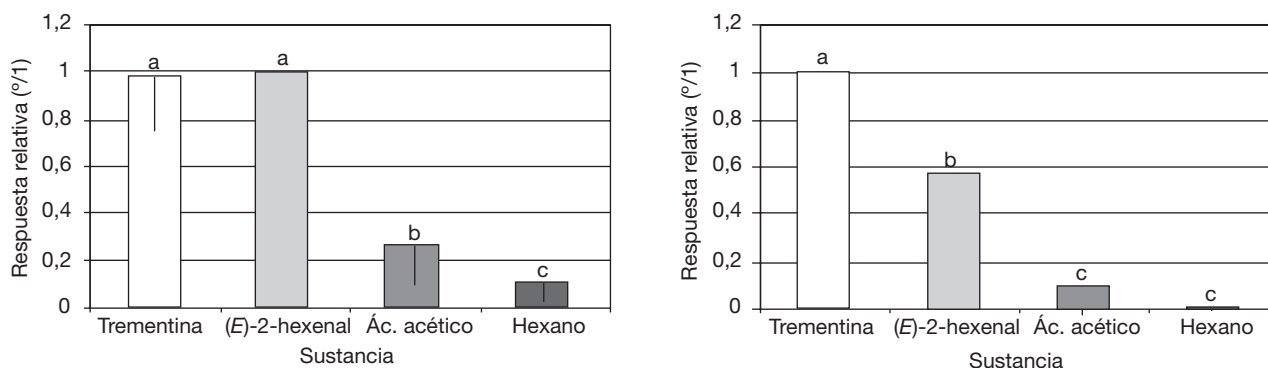
### Análisis de la relación concentración-respuesta

En las dos especies se produjo una fuerte dependencia concentración-respuesta (Fig. 3): las concen-

**Tabla 1.** Estadísticos descriptivos de la respuesta bruta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* frente al (*E*)-2-hexenal, ácido acético y trementina en mezclas con hexano (20 ml al 1:1 v/v)

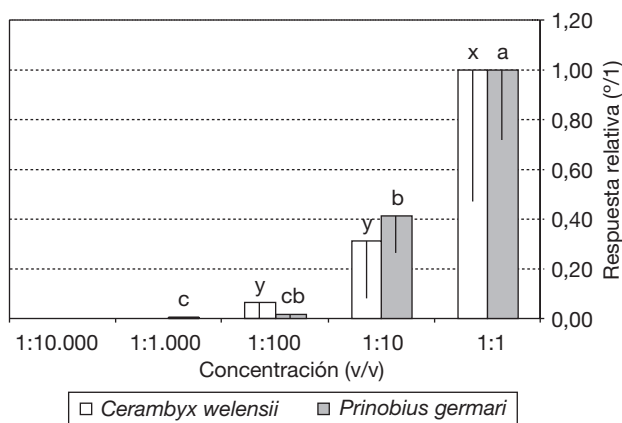
Sustancia	<i>C. welensii</i>				<i>P. germari</i>			
	N	M (mV)	DT (mV)	H/M	N	M (mV)	DT (mV)	H/M
( <i>E</i> )-2-hexenal	7+5	0,98b	0,47	0,71	2+5	0,19a	0,18	4,38
Ácido acético	7+4	0,2b	0,05	0,85	2+3	0,06a	0,07	1,67
Trementina	7+5	0,91b	0,41	0,93	2+5	0,39a	0,46	6,58
Hexano	7+5	0,11b	0,09	0,24	2+5	0,01a	0,02	—

Para cada estímulo, letras distintas en la media indican diferencias significativas entre especies («t» de Student,  $p < 0,03$  para las mezclas; Mann-Whitney,  $p < 0,01$  para el hexano). M: media. DT: desviación típica. H/M: cociente entre la respuesta media de las hembras y la de los machos. N: número de individuos, expresado como Nhembras + Nmachos.



**Figura 2.** Respuestas relativas de EAG en *C. welensii* (izquierda) y *P. germari* (derecha) frente al (*E*)-2-hexenal, trementina, ácido acético y el control de hexano. La respuesta relativa de *C. welensii* frente al (*E*)-2-hexenal y de *P. germari* frente a la trementina es igual a 1. Las líneas en el extremo de la barra muestran la desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas en cada especie (prueba «t» de Student frente al valor  $\mu_0 = 100$  y prueba de Wilcoxon entre pares de compuestos; ambas para un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ ).

traciones correspondientes a 1:10.000, 1:1.000 y 1:100 provocaron respuestas muy bajas o no medibles, el mayor aumento de respuestas se produjo entre las concentraciones 1:10 y 1:1, sin que tal incremento mostrara signos de atenuación. La respuesta frente a la concentración 1:1 fue significativamente mayor que para el resto en ambas especies (prueba «t»:  $\mu = 1$ ,  $p < 0,01$  y  $N = 4$  para *C. welensii*;  $p < 0,01$  y  $N = 5$  para *P. germari*); en cambio, las respuestas provocadas por las concentraciones 1:10 y 1:100 no resultaron significativamente distintas, si bien el valor de probabilidad fue muy bajo en *C. welensii* (ANOVA seguido de Games-Howell:  $p = 0,051$  y  $N_{1:10} = N_{1:100} = 4$  para *C. welensii*; Test de Wilcoxon:  $p = 0,068$  y  $N_{1:10} = N_{1:100} = 5$  para *P. germari*).



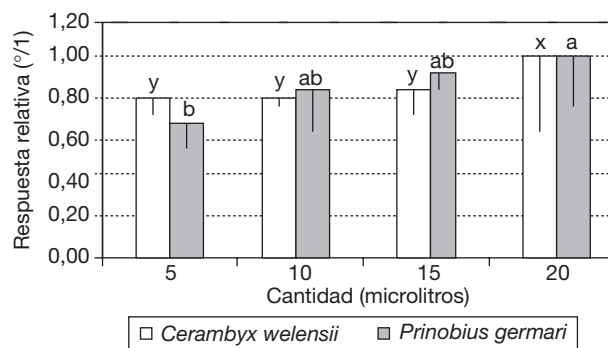
**Figura 3.** Respuestas netas de EAG de *C. welensii* y *P. germari* para distintas concentraciones del estímulo estándar. La línea vertical en el extremo de la barra muestra el intervalo de confianza al 95%. Letras distintas indican diferencias significativas.

### Efecto de la cantidad de estímulo aplicado

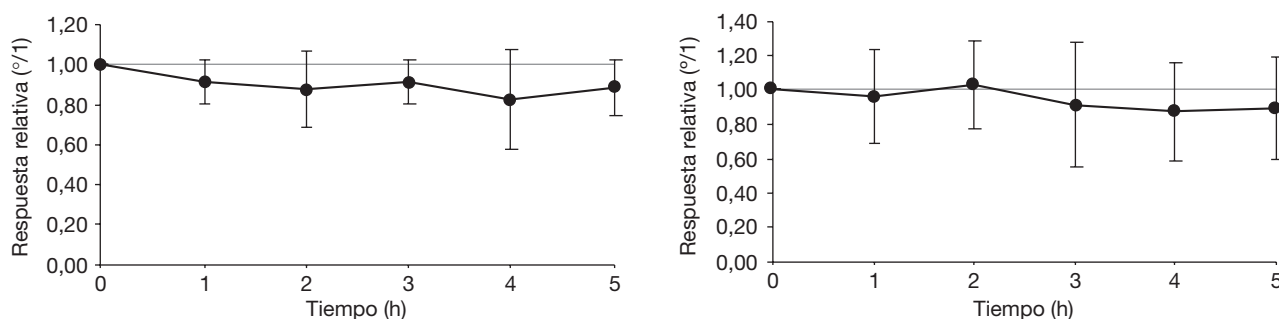
La intensidad media de las respuestas aumentó con el incremento de la cantidad de disolución empleada (Fig. 4). En *C. welensii* la variación sólo resultó significativa entre las respuestas para 5 y 20 microlitros (prueba «t»:  $\mu = 1$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ), mientras que en *P. germari* la media para 20 microlitros sí resultó significativamente mayor que las demás (prueba «t» para  $\mu = 1$ :  $p < 0,03$ ;  $N = 9$ ).

### Efecto de la duración de la preparación

Las respuestas medias disminuyeron con el paso del tiempo para las dos especies, pero la merma de respuesta al cabo de cinco horas resultó baja (11% en *C. welensii* y 10% en *P. germari*. Fig. 5) y no signifi-



**Figura 4.** Respuestas netas de *C. welensii* y *P. germari* frente al estímulo estándar aplicado en distintas cantidades. La línea vertical muestra el intervalo de confianza al 95%. Letras distintas indican diferencias significativas al nivel 0,05.



**Figura 5.** Variación de la respuesta relativa de *C. welensii* (izquierda) y *P. germari* (derecha) frente al estímulo estándar durante cinco horas (medias + desviación típica).

cativa (En los dos casos, prueba «t» para  $\mu = 1$ :  $p > 0,05$ ;  $N_{Cerambyx} = 8$ ,  $N_{Prinobius} = 9$ ). En *C. welensii* todas las preparaciones continuaron produciendo respuestas durante más de cinco horas, llegando a alcanzarse en alguna de ellas las ocho horas. En *P. germari* se registró respuesta al cabo de una hora más en cuatro preparaciones de las nueve empleadas encontrándose, además, respuestas al cabo de siete horas en una de las preparaciones.

## Discusión

La aplicación de la electroantenografía ha permitido comprobar que los cerambícidos xilófagos *C. welensii* y *P. germari* tienen capacidad para detectar olfativamente determinadas sustancias volátiles, en particular el (*E*)-2-hexenal y la esencia de trementina; el ácido acético sólo es percibido significativamente por la primera especie. Las intensidades de respuesta encontradas en las dos especies son comparables a las halladas en otros cerambícidos, como *Phoracantha semipunctata* (0,71 mV para el canfeno y 0,49 mV para el  $\alpha$ -pineno; 25  $\mu$ l al 50% v/v en aceite de parafina. Barata *et al.*, 1992), *Anaglyptus subfasciatus* (1 mV en las hembras y 0,3 mV en los machos) y *Demonax transilis* (1,6 mV en los machos y 0,3 mV en las hembras) (bencil acetato para ambas especies, 11  $\mu$ l al 10% en hexano. Ikeda *et al.*, 1993).

Considerando la clasificación orientativa para respuestas de EAG establecida por Barata *et al.* (2000), así como las consideraciones de Struble y Arn (1984), la respuesta media hallada frente a la sustancia más estimulante de las tres en cada especie cabe considerarse, en *C. welensii*, alta [0,98 mV para el (*E*)-2-hexenal], mientras que para *P. germari* sería de tipo medio (0,39 mV frente a la esencia de trementina).

Respecto al empleo de la electroantenografía como base para el análisis de la respuesta olfativa de los in-

sectos frente a grupos amplios de sustancias volátiles, los compuestos ensayados con los dos cerambícidos originan respuestas inferiores a los 1-2 mV recomendados por Roelofs (1984) para la selección de un compuesto como «estándar». No obstante, la intensidad de las respuestas provocadas por el (*E*)-2-hexenal para *C. welensii* y la esencia de trementina para *P. germari* hace que podamos considerar adecuadas tales sustancias, en tanto se encuentran otras más idóneas, para ser empleadas como estímulos estándar. Dado que el compuesto estándar tiene utilidad únicamente como «referente interno» durante el desarrollo de una determinada serie experimental, para paliar problemas de diferencia de respuesta entre ejemplares, así como mermas de respuesta en la misma preparación con el transcurso del tiempo (Roelofs, 1984; Jyothi *et al.*, 2002; Van Tol y Visser, 2002; Reinecke *et al.*, 2005), el empleo de un formulado comercial como la esencia de trementina —o cualquier otra mezcla con propiedades definidas y estables— es perfectamente válido. Algunos compuestos «estándar» empleados hasta el momento con cerambícidos han sido: linalol y linalil acetato disueltos en n-hexano con *Anaglyptus subfasciatus* (Ikeda *et al.*, 1993);  $\alpha$ -pineno en hexano para *Arhopalus tristis* (Suckling *et al.*, 2001); incluso (*E*)-2-hexenal en hexano con *Phoracantha semipunctata* (Barata, 1997).

La concentración y cantidad de estímulo aplicado influyen en la respuesta de EAG de *C. welensii* y *P. germari*. Estos factores, junto a otros relacionados con la preparación del insecto para las pruebas, contribuyen a la determinación de la duración de una preparación para este tipo de estudios. Las dos especies han mostrado un comportamiento típico en la relación concentración-respuesta, sobre todo *C. welensii*, que mostró respuestas de mayor intensidad. Dos aspectos se suelen tener en cuenta para determinar la concentración óptima del estímulo: por un lado el análisis de la

dispersión de valores en relación a la respuesta media, y por otro la posible saturación de las antenas al aumentar la concentración.

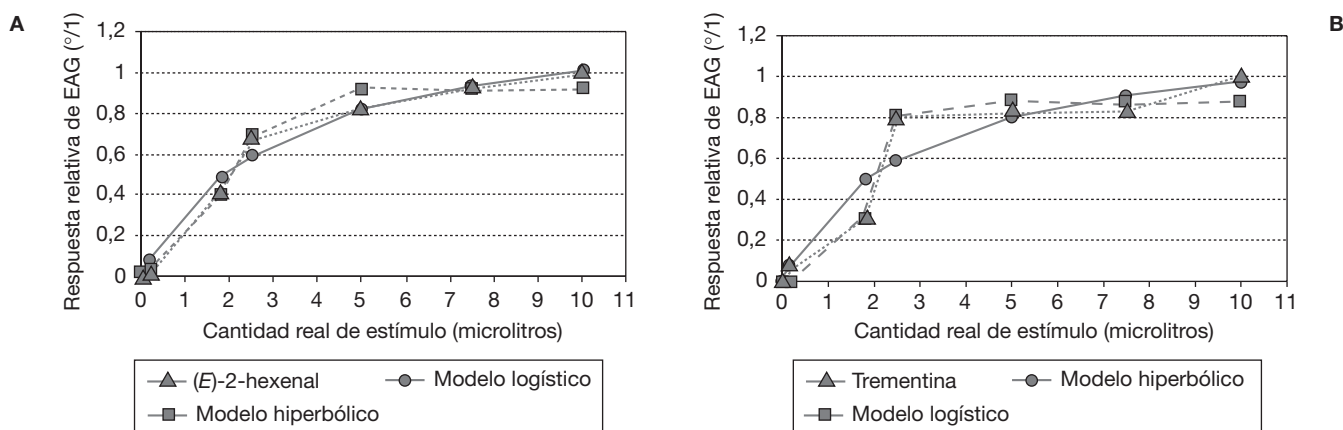
Respecto al primer criterio, se recomienda realizar las pruebas de EAG a concentraciones que originen una baja dispersión, que permita evidenciar diferencias entre compuestos. La dispersión en las respuestas halladas (porcentaje a partir del intervalo de confianza al 95%) fue, para *C. welensii*,  $\approx 15\%$  (concentración 1:10) y  $< 29\%$  (concentración 1:1); en *P. germari* resultó más elevada ( $\approx 25\%$  para 1:10 y  $> 52\%$  para la 1:1). Van Tol y Visser (2002) encontraron que para el curculiónido *Otiorhynchus sulcatus* las concentraciones de estimulación mayores al 1% (v/v) impedían la adecuada recuperación de la antena, por lo que se producía una alta variabilidad en las respuestas; esta variación fue, para el (*E*)-2-hexenal, de  $\approx 30\%$  a la dosis más alta (10% v/v en aceite de parafina). En cuanto a la cantidad de disolución, la estimulación con 20 y 15 microlitros originó diferencias de respuesta bajas y no significativa (8% en *C. welensii* y  $< 17\%$  en *P. germari*), lo que hace que no resulten preocupantes ligeras variaciones en la toma de muestras según la precisión de la pipeteadora automática.

Así pues, si se busca homogeneidad de respuestas, la concentración más adecuada sería la proporción 1:10. Pero el hecho de que las respuestas frente a la concentración 1:1 resulten significativamente mayores, unido a la existencia de cierta variabilidad intraespecífica difícil de evitar, y la comodidad de trabajar con respuestas altas, aconsejan el empleo de concentraciones elevadas para ambos insectos. Esta

conveniencia se acentúa para la especie *P. germari*, cuyas respuestas tienden a ser más discretas. La concentración aconsejable (1:1) es superior a la empleada para otros cerambícidos, como *Anaglyptus subfasciatus* y *Demonax transilis* (linalol a dosis 1:10 en hexano; Ikeda *et al.*, 1993); *Phoracantha semipunctata* [(*E*)-2-hexenal  $10^3$  ppm en hexano; Barata *et al.*, 2000]; *Arhopalus tristis* ( $\alpha$ -pineno al 10% en aceite de parafina; Suckling *et al.*, 2001). Junto a dicha concentración, el empleo de la cantidad de 20 microlitros garantiza la obtención de las respuestas más elevadas. Esta cantidad ha sido empleada normalmente en nuestros estudios de EAG, está en el rango generalmente manejado (Barata *et al.*, 2002) y ha sido ya empleada por otros autores (Thiéry y Marion-Poll, 1998; Birkett *et al.*, 2004).

La utilización conjunta de la información del estudio del efecto de la concentración y la cantidad de estímulo, permite comprobar la existencia de saturación de los receptores. Los valores obtenidos a partir del estudio de ambos efectos permiten elaborar una gráfica orientativa, a escala real, de la relación entre la respuesta relativa de EAG y la cantidad de estímulo estándar realmente aplicada en cada inyección (Fig. 6).

La figura 6 ofrece una referencia interesante sobre el comportamiento de las respuestas en el rango de concentraciones 1:10 <> 1:1 (1,82 a 10  $\mu$ l reales de compuesto estimulante). Para ambas especies, el aumento de la respuesta a partir de la cantidad de 2,5  $\mu$ l (1,25:10) se suaviza, continuando el incremento hasta la cantidad de 10  $\mu$ l (1:1). Aunque no tenemos



**Figura 6.** Variación de la repuesta de EAG de *C. welensii* (A) y *P. germari* (B) en función de las cantidades de estímulo estándar realmente aplicadas. Se reflejan los valores relativos respecto a la respuesta provocada por 20  $\mu$ l de disolución 1:1 (v/v) (10  $\mu$ l reales), así como dos modelos: logístico [ $Y = a / (1 + e^{(b-cX)})$ ;  $R^2 = 0,987$  para *C. welensii*, y  $R^2 = 0,980$ , para *P. germari*] e hiperbólico [ $Y = a * X / (b + X)$ ;  $R^2 = 0,984$  para *C. welensii*, y  $R^2 = 0,930$  para *P. germari*].



datos de respuesta frente a cantidades superiores, los modelos no lineales sugieren que la concentración 1:1 se encuentra próxima a la concentración de saturación de la antena en las dos especies (el nivel de respuesta relativa encontrada a la concentración 1:1 estaría, según indican los parámetros del modelo hiperbólico, al 76% de la intensidad máxima en *C. welensii* y al  $\approx$ 81% en *P. germani*; mientras que superaría la máxima respuesta esperable según el modelo logístico).

En estas circunstancias, el empleo de la máxima concentración (1:1) y la mayor de las cantidades de mezcla estimulante (20  $\mu$ l) podrían ayudar a reducir el efecto de la variación de la volatilidad de las sustancias que se estudien, debido a que ligeras modificaciones en la concentración del estímulo en la región próxima a la dosis 1:1 (Fig. 6) tendrán un escaso reflejo en la respuesta. En esta situación, diferencias de volatilidad «equivalentes» a una reducción de la concentración en el rango 1:1 a 2,5:10 (10 a 5  $\mu$ l realmente aplicados de cada sustancia) originarían, presumiblemente, una reducción máxima de  $\approx$ 20% en la respuesta de EAG de las dos especies.

Cada preparación de EAG para las especies *C. welensii* y *P. germani* puede ser empleada durante un tiempo de al menos cinco horas. Las mermas en las respuestas halladas al cabo de este tiempo (10% para *P. germani* y 11% en *C. welensii*) no resultaron significativas. El principal problema encontrado durante el transcurso de las sesiones fue la evaporación de la solución salina en el electrodo registrador; pero puede ser subsanado depositando una gota de solución en su abertura terminal, lo cual permite su rellenado rápido por capilaridad. La duración de preparación obtenida es comparable a la encontrada por Barata *et al.* (2000) para *P. semipunctata* (seis horas) y muy por encima de las 1-2 horas para *Leptinotarsa decemlineata* a partir de antenas escindidas (Weibbecker *et al.*, 1997). Con la duración obtenida se puede estudiar la respuesta de la misma preparación frente a un amplio abanico de volátiles (hasta 40, según la frecuencia de estimulación); y también pueden afrontarse pruebas CG-EAD, que llegan a exigir en algunos casos el empleo de la misma preparación durante un tiempo de hasta cinco horas (Barata, 1997).

El análisis de la respuesta de EAG de ambos cecarabíidos, en combinación con el conocimiento del perfil de emisión del arbolado, permite establecer un avance en la interpretación sobre la relevancia de la estimulación olfativa en la selección de hospedantes.

Los compuestos GLV resultan los volátiles predominantes en las emisiones de angiospermas arbóreas (Zhang y Schlyter, 2004). El (*E*)-2-hexenal resultó muy estimulante para *C. welensii* y *P. germani*, aunque no se ha encontrado en sus hospedantes principales (Kesselmeier y Staudt, 1999; Mannschreck *et al.*, 2002; Staudt *et al.*, 2004; Pio *et al.*, 2005); esto sugiere la posibilidad de que su detección contribuya a la discriminación entre potenciales hospedantes y no hospedantes, tal y como apuntó Barata (1997) para *Phoracantha semipunctata* y encontraron Suckling *et al.* (2001) para *Arhopalus tristis*.

La percepción de la trementina indica también una percepción individualizada de sus principales monoterpenos constituyentes ( $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno), hecho constatado en pruebas de EAG con estas especies (datos de los autores, sin publicar). Dada la gran relevancia de tales monoterpenos en la emisión foliar de *Q. ilex* y *Q. suber* (Staudt *et al.*, 2004; Pio *et al.*, 2005), así como la conocida actividad caïromonal de la trementina y el  $\alpha$ -pineno sobre algunas especies de Ceraurbycidae propias de coníferas (Waage y Hedin, 1990; Allison *et al.*, 2004; Miller, 2006), se abre un interesante campo de estudio sobre la influencia que la percepción de tales sustancias podría tener en la selección de hospedantes por parte de *C. welensii* y *P. germani*.

En cuanto al ácido acético, no se debería minimizar el posible significado de su detección a pesar de sus bajas respuestas de EAG asociadas, especialmente en el caso de *C. welensii* (la especie que muestra mayor capacidad colonizadora; López *et al.*, 2004). Esto se debe a que tan importante como el compuesto en sí puede serlo su tasa de emisión y las proporciones respecto a otros volátiles, de modo que compuestos que provocan respuestas de EAG débiles podrían, no obstante, afectar al comportamiento (Wadhams, 1990; Barata, 1997; Asaro *et al.*, 2004).

El comportamiento olfativo mostrado por *C. welensii* y *P. germani* en las pruebas electroantenográficas realizadas debe servir de base para el planteamiento de futuros trabajos, que profundicen en el análisis de su sensibilidad olfativa. Junto a estos análisis se deben realizar estudios sobre la influencia que los volátiles detectados significativamente en las pruebas de EAG ejercen sobre el comportamiento de estos insectos. Este tipo de estudios proporcionaría una valiosa información, que podría tener aplicación en el control integrado de poblaciones de estas especies.

## Referencias bibliográficas

- ALLISON J., BORDEN J., SEYBOLD J., 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14, 123-150.
- ASARO C., SULLIVAN B., DALUSKY M., BERISFORD C., 2004. Volatiles associated with preferred and non preferred hosts of the nantucket pine tip, *Rhyacionia frustrana*. *Journal of Chemical Ecology* 30, 977-990.
- BARATA E., 1997. Olfactory mechanism underlying host-finding by the *Eucalyptus* woodborer, *Phoracantha semipunctata* Fab. (Coleoptera: Cerambycidae). A behavioural and electrophysiological approach. Tesis doctoral. Universidad de Évora, Portugal. 202 pp.
- BARATA E.N., FONSECA P., MATEUS E., ARAÚJO J., 1992. Host-finding by *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera: Cerambycidae): Host volatiles, electroantennogram recordings and baited field traps. Proceedings of the 8th International Symposium on Insects-Plant Relationships. Kluwer Academic, Dordrecht. pp. 133-135.
- BARATA E.D., PICKETT J.A., WADHAMS L.J., WOODCOCK C.M., MUSTAPARTA H., 2000. Identification of host and non host semiochemicals of *Eucalyptus* wood borer *Phoracantha semipunctata* by gas chromatography-electroantennography. *Journal of Chemical Ecology* 26(8), 1877-1895.
- BARATA E., MUSTAPARTA H., PICKETT J., WADHAMS L., ARAÚJO J., 2002. Encoding of host and non-host plant odours by receptor neurones in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera: Cerambycidae) [en línea]. Disponible en <http://link.springer.de/link/service/journals/00359/contents/02/00282/paper> [Consulta: 15 de mayo de 2005].
- BIRKETT M., AGELOPOULOS N., JENSEN K., JESPERSEN J., PICKETT J., PRIJS H., THOMAS G., TRAPMAN J., WADHAMS L., WOODCOCK C., 2004. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology* 18, 313-322.
- COMPTE A., CAMINERO M., 1982. Las comunidades de coleópteros xilófagos de las encinas de los alrededores de Madrid. *Graellsia* 38, 201-217.
- DAGNELIE P., 1998. Statistique théorique et appliquée. Tome 2: inférence statistique à une et à deux dimensions. Bibliothèque des Universités, De Boeck Université, Paris, Bruxelles. 659 pp.
- DICKENS J., 2000. Sexual maturation and temporal variation of neural responses in adult colorado potato beetles to volatiles emitted by potato plants. *Journal of Chemical Ecology* 26, 1265-1279.
- GONZÁLEZ R., ÁLVAREZ A., CAMPOS M., 1994. An electroantennogram apparatus for testing the activity of semiochemicals on the olive beetle, *Phloeotribus scarabaeoides* (Coleoptera: Scolytidae): first recordings of the response to ethylene. *Physiological-Entomology* 19(4), 301-306.
- GULLAN P. J., CRANSTON P. S., 2000. The insects. An outline of Entomology. Blackwell Science. 470 pp.
- GROOT DE P., NOTT R., 2001. Evaluation of traps of six different designs to capture pine sawyer beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Agricultural and Forest Entomology* 3, 107-111.
- HANKS L., MILLAR J., PAINE T., 1998. Dispersal of the eucalyptus longhorned borer (Coleoptera: Cerambycidae) in urban landscapes. *Environmental Entomology* 27(6), 1418-1424.
- IKEDA T., OHYA E., MAKIHARA H., NAKASHIMA T., SAITOH A., TATE K., KOJIMA K., 1993. Olfactory responses of *Anaglyptus subfasciatus* Pic and *Demonax transilis* Bates (Coleoptera: Cerambycidae) to flower scents. *Journal of the Japanese Forestry Society* 75(2), 108-112.
- JYOTHI K.N., PRASUNA A.L., SIGHAMONY S., KRISHNA KUMARI B., PRASAD A.R., YADAV J.S., 2002. Electroantennogram responses of *Apanteles obliquae* (Hym., Braconidae) to various infochemicals. *J Appl Ent* 126, 175-181.
- KESSELMEIER J., BODE K., HOFMANN U., MÜLLER H., SCHÄFER L., WOLF A., CICCIOLO P., BRANCALEONI E., CECINATO A., FRATTONI M., FOSTER P., FERRARI C., JACOB V., FUGIT J.L., DUTAUR L., SIMON V., TORRES L., 1997. Emission of short chained organic acids, aldehydes and monoterpenes from *Quercus ilex* L. and *Pinus pinea* L. in relation to physiological activities, carbon budget and emission algorithms. *Atmospheric Environment* 31, 119-133.
- KESSELMEIER J., STAUDT M., 1999. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *J Atmos Chem* 33, 23-88.
- LANGENHEIM J.H., 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1223-1280.
- LIENDO C., MORILLO F., SÁNCHEZ P., MUÑOZ W., GUERRA J., CABRERA A., HERNÁNDEZ J.V., 2005. Olfactory behavior and electroantennographic responses of the cocoa beetle, *Steirastoma breve* (Coleoptera: Cerambycidae). *Florida Entomologist* 88, 117-122.
- LÓPEZ G., DOMÍNGUEZ L., SÁNCHEZ S., TAPIAS R., CREMADES D., PARAMIO A., ALESSO S.P., 2004. Population ecology of xylophagous beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in mediterranean *Quercus* forest (southwest of Iberian Peninsula). Incidencia on oak trees health (*Quercus ilex* L. spp *ballota* and *Quercus suber* L.). En: *Ecology, Conservation and Management of Mediterranean Climate Ecosystems. Proceedings 10<sup>th</sup> MEDECOS Conference, Rhodes, Greece, April 25-May 1. 8 pp.*
- MANNSCHECK K., BÄCHMANN K., BARNES I., BECKER K.H., HEIL TH., KURTENBACH R., MEMMESHEIMER M., MOHNEN V., OBERMEIER A., POPPE D., STEINBRECHER R., SCHMITZ TH., VOLZ-THOMAS A., ZABEL F., 2002. A database for volatile organic compounds. *Journal of Atmospheric Chemistry* 42, 281-286.
- MASSON C., MUSTAPARTA H., 1990. Chemical information processing in the olfactory system of insects. Part I: periphery. *Physiol Rev* 70, 199-245.
- McINTOSH R., KATINIC P., ALLISON J., BORDEN J., DOWNEY D., 2001. Comparative efficacy of five types of

- trap for woodborers in the *Cerambycidae*, *Buprestidae* and *Siricidae*. *Agricultural and Forest Entomology* 3, 113-120.
- METCALF R., METCALF E., 1992. *Plant kairomones in insect ecology and control*. Chapman and Hall. New York and London. 168 pp.
- MEURER B., TAVAKILIAN G., 1997. Chemistry of cerambycid host plants. Part I: Survey of leguminosae. A study in adaptive radiation. *Botanica review* 63(4), 356-394.
- MILLER D., 2006. Ethanol and (-)- $\alpha$ -pinene. Attractant kairomones for some large wood-boring beetles in southeastern USA. *Journal of Chemical Ecology* 32, 779-794
- MONTOYA J.M., 1992. Mortandad de quercíneas: la perspectiva selvícola y los antecedentes climáticos. La cuestión de *Hypoxylon mediterraneum* en el alcornoque de Mamora (Marruecos). *Ecología* 6, 123-130.
- MUÑOZ C., COBOS P., MARTÍNEZ G., SOLDEVILLA C., DÍAZ M., 1996. Micoflora y patología del alcornoque (*Quercus suber* L.). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 328 pp.
- NAVARRO R.M., FERNÁNDEZ P., TRAPERO A., CAETANO P., ROMERO M.A., SÁNCHEZ M.E., FERNÁNDEZ A., SÁNCHEZ I., LÓPEZ G., 2004. Los procesos de decaimiento de encinas y alcornoques. Monografía. Convenio Consejería de Medio Ambiente-Universidad de Córdoba. Dirección General de Gestión del Medio Natural. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. 32 pp.
- OWEN S., BOISSARD C., HEWITT C., 2001. Volatile organic compounds (VOCs) emitted from 40 Mediterranean plant species: VOC speciation and extrapolation to habitat scale. *Atmospheric Environment* 35, 5393-5409.
- OWEN S., HARLEY P., GUENTHER A., HEWITT C., 2002. Light dependency of VOC emissions from selected Mediterranean plant species. *Atmospheric Environment* 36, 3147-3159.
- PIO C.A., SILVA P.A., CERQUEIRA M.A., NUNES T.V., 2005. Diurnal and seasonal emissions of volatile organic compounds from cork oak (*Quercus suber*) trees. *Atmospheric Environment* 39, 1817-1827.
- PICKETT J.A., WADHAMS L.J., WOODCOCK C.M., 1991. New approaches to the development of semiochemicals for insect control. *Proceedings of the Congress Insect Chemical Ecology*, Tabor 1990. pp. 333-345.
- REINECKE A., RUTHER J., HILKER M., 2005. Electrophysiological and behavioural responses of *Melolontha melolontha* to saturated and unsaturated aliphatic alcohols. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115, 33-40.
- RHAINDS M., LAN C.C., KING S., GRIES R., MO L.Z., GRIES G., 2001. Pheromone communication and mating behaviour of coffee white stem borer, *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology* 36, 299-309.
- ROELOFS W.L., 1984. Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. En: *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. pp. 131-159.
- SÁNCHEZ-OSORIO I., 2005. Orientación olfativa de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean, principales cerambycidos xilófagos de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota*) y alcornoque (*Quercus suber* L.), para la localización de hospedantes. Tesis Doctoral, Universidad de Huelva. 185 pp.
- SÁNCHEZ I., TAPIAS R., LÓPEZ G., DOMÍNGUEZ L., ALESSO S.P., 2004. Aptitude for electroantennography (EAG) of olfactory stimuli of the holm oak (*Quercus ilex* L. spp. *ballota*) and cork oak (*Quercus suber* L.) woodborer *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera: Cerambycidae). En: *Ecology, Conservation and Management of Mediterranean Climate Ecosystems. Proceedings 10<sup>th</sup> MEDCOS Conference*, Rhodes, Greece, April 25-May 1. 8 pp.
- SÁNCHEZ-OSORIO I., TAPIAS R., LÓPEZ G., DOMÍNGUEZ L., 2006. Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo para el estudio electroantenográfico de estímulos olfativos en cerambycidos. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 32 (en prensa).
- STAUDT M., RAMBAL S., JOFFRE R., KESSELMEIER J., 2002. Impact of drought on seasonal monoterpene emissions from *Quercus ilex* in southern France. *Journal of Geophysical Research-Atmosphere* 107 (D21), 4602.
- STAUDT M., MIR C., JOFFRE R., RAMBAL S., BONIN A., LANDAIS D., LUMARET R., 2004. Isoprenoid emission of *Quercus* spp. (*Q. suber* and *Q. ilex*) in mixed stands contrasting in interspecific genetic introgression. *New Phytologist* 163, 573-584.
- STRUBLE D., ARN H., 1984. Combined gas chromatography and electroantennogram recording of insect olfactory response. En: *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. pp. 161-178.
- SUCKLING D., GIBB A., DALY J., CHEN X., BROCKERHOFF E., 2001. Behavioral and electrophysiological responses of *Arhopalus tristis* to burnt pine and other stimuli. *Journal of Chemical Ecology* 27(6), 1091-1104.
- SYNTECH, 1998. *Electroantennography: a practical introduction*. Syntech, Hilversum, The Netherlands. 13 pp.
- THIÉRY D., MARION-POLL F., 1998. Electroantennogram responses of douglas-fir seed chalcids to plant volatiles. *Journal of Insect Physiology* 44, 483-490.
- VANTOL R., VISSER J., 2002. Olfactory antennal responses of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* to plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102, 49-64.
- WAAGE S., HEDIN P., 1990. Plant Stimulants and Attractants (Kairomones). En: *Handbook of Natural Pesticides, volume VI: Insect Attractants and Repellents* (Morgan E.D., Mandava N.B., eds). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 161-180.
- WADHAMS L.J., 1990. The use of coupled gas chromatography: electrophysiological techniques in the identification of insect pheromones. En: *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones* (McCaffery A.R., Wilson I.D., eds). Plenum Press, New York. pp. 289-298.
- WADHAMS L.J., 1992. The perception of semiochemicals. En: *Insect Molecular Science. Proceedings, 16<sup>th</sup> Symposium of the Royal Entomological Society London*. Imperial College London, september 1991. Academic Press, London. pp. 152-162.

- WEIBBECKER B., SCHÜLTZ S., KLEIN A., HUMMEL H., 1997. Analysis of volatiles emitted by potato plants by means of a colorado beetle electroantennographic detector. *Talanta* 44, 2217-2224.
- WITZGALL P., FREROT B., MALOSSE C., 1991. Identification of the major component of the pheromone secretion of *Notocelia uddmanniana* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Applied Entomology* 112, 71-75.
- ZHANG A., OLIVER J., ALDRICH J., 2000. Asian longhorned beetle pheromone study. 17<sup>th</sup> ISCE Annual Meeting. Poços de Caldas, Minas Gerais (Brazil); 15-19<sup>th</sup> August, 2000 [en línea]. Disponible en: [www.chemecol.org/meetings/brazil/talks/oral1.htm](http://www.chemecol.org/meetings/brazil/talks/oral1.htm). [Consulta en junio de 2005].
- ZHANG A., OLIVER J., ALDRICH J., 2002. Stimulatory beetle volatiles for the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Coleoptera: Cerambycidae). *Z Naturforsch* 57, 553-558.
- ZHANG Q-H., SCHLYTER F., 1999. Host selection and nonhost compounds with potential for forest protection against conifer bark beetles. PhD Research Project of Zhang Q. [en línea]. Disponible en: [www.vv.slu.se/fs/zhang/sjfr\\_qhz.htm](http://www.vv.slu.se/fs/zhang/sjfr_qhz.htm). [Consulta en enero de 2005].
- ZHANG Q-H., SCHLYTER F., 2004. Olfactory recognition and behavioural avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. *Agricultural and Forest Entomology* 6, 1-19.