

Variabilidad intraespecífica de la respuesta electroantenográfica en *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera, Cerambycidae). Influencia de factores anatómicos, fisiológicos y experimentales

I. Sánchez-Osorio*, R. Tapias, L. Domínguez, G. López-Pantoja

Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Politécnica Superior, Universidad de Huelva.
Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21.819, Palos de la Frontera, Huelva.

Resumen

En este trabajo se estudia la variabilidad intraespecífica de la respuesta electroantenográfica de *Cerambyx welensii*. No se han encontrado diferencias de respuestas entre sexos, ni entre el tipo de solvente empleado, hexano o aceite de parafina; pero sí se encontró variabilidad entre individuos ($0,92 \text{ mV} \pm 0,6$. Media \pm DT) frente al (*E*)-2-hexenal (50% v/v). Más del 68% de esta variabilidad pudo ser explicada considerando tres factores: la aptitud previa de los insectos, su estado fisiológico (vigor en el momento del estudio) y el diámetro en punta fina del capilar del electrodo de referencia. Las características anatómicas de los individuos no influyeron sobre su respuesta electroantenográfica. La variabilidad de respuesta intraespecífica encontrada en *C. welensii* puede distorsionar la caracterización del comportamiento olfativo de esta especie, por lo que es deseable realizar las pruebas electroantenográficas a partir de insectos obtenidos en condiciones controladas o bien estandarizar las respuestas a partir de un estímulo estándar, además de normalizar el diámetro del capilar del electrodo de referencia.

Palabras clave: Electroantenografía, *Cerambyx welensii*, estado fisiológico, aptitud previa.

Abstract

Intraspecific variability of olfactory responses in *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera, Cerambycidae). Influence of anatomical, physiological and experimental factors

Intraspecific variability of EAG responses in *Cerambyx welensii* has been studied. We have not found significant differences of EAG responses neither between sexes nor types of solvent, paraffin oil and hexane, but there was a highly significant variability of responses between individuals ($0,92 \text{ mV} \pm 0,6$. Mean \pm DT) to (*E*)-2-hexenal (50% v/v). More than 68% of individual variability can be explained by the combination of the previous aptitude of insects, its physiological state (vitality at the moment of study) and the capillary's diameter in the reference electrode. Anatomical features of the individuals had not influence in the response. In order to avoid or minimize the effect caused for this variability, it is advisable to carry out EAG tests with insects obtained under controlled conditions. In other case, the EAG responses must be standardized using a standard stimulus, as well as to homogenize the tip diameter of the reference electrode.

Key words: Electroantennography, *Cerambyx welensii*, physiological state, previous aptitude.

Introducción

La electroantenografía (EAG) es una técnica electrofisiológica que permite medir la respuesta global, de naturaleza eléctrica, de las células receptoras de la antena de un insecto frente a un estímulo (Schneider, 1969;

Wadhams, 1992; Gullan y Cranston, 2000); esta técnica se aplica en la actualidad con éxito en coleópteros de la familia Cerambycidae (Liendo *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2006; Fan y Sun, 2007; Sánchez-Osorio *et al.*, 2007). La respuesta de EAG surge como una variación de voltaje entre la base y el extremo de la antena, originada por la

* Corresponding author: isanchez@uhu.es
Received: 06-08-08. Accepted: 08-06-09.

despolarización rápida de las membranas de sus receptores tras la recepción del estímulo. Como consecuencia, la línea base de la respuesta de EAG (lectura del potencial en reposo) experimenta una caída de potencial, seguida de una recuperación más lenta hasta el nivel de base (Nagai, 1981; Roelofs, 1984; Park *et al.*, 2002). Esta caída de potencial se puede registrar, empleando un ordenador personal que actúa como osciloscopio, gracias a la continuidad eléctrica establecida entre la hemolinfa de la antena y una solución salina confinada en dos capilares de vidrio que se emplean como electrodos.

La respuesta de los insectos en las pruebas de EAG puede verse afectada por variables de distinta naturaleza: experimentales (estímulo, dosis, diámetro del capilar, entre otros), ambientales (temperatura durante el ensayo), dependientes de la propia especie o individuo, así como otras no bien determinadas aún (Roelofs, 1984; Syntech, 1998). Dentro de los factores relacionados con las diferencias entre individuos, hay que diferenciar aquellos que les son inherentes (relacionados con su constitución genética) de otros asociados al estado del ejemplar en el momento del ensayo (madurez sexual, edad, vigor). Así, se han sugerido diferencias de sensibilidad olfativa entre individuos de diferente procedencia y vitalidad, como ocurre en el curculiónido *Otiorhynchus sulcatus* (Van Tol y Visser, 2002), o con diferente grado de madurez sexual, lo que se constató para el crisomélido *Leptinotarsa decemlineata* (Dickens, 2000); también se han hallado diferencias de sensibilidad a lo largo del tiempo así como entre antenas del mismo ejemplar dentro de la familia Cerambycidae, como sucede en *Hylotrupes bajulus* (Weisbecker *et al.*, 2004).

La diferencia de respuesta olfativa entre sexos es una cuestión variable según la especie estudiada y el estímulo considerado. Entre los cerambycidos, en algunas especies como *Phoracantha semipunctata* o *Steirastoma breve* no se ha encontrado tal diferencia al estudiar compuestos volátiles de sus plantas hospedantes (Barata *et al.*, 2000; Liendo *et al.*, 2005); tampoco se encontraron en *Anoplophora glabripennis* frente a productos sintéticos imitadores de la feromona masculina (Zhang *et al.*, 2002). En cambio, Ikeda *et al.* (1993) sí encontraron grandes diferencias entre machos y hembras en *Anaglyptus subfasciatus* y *Demonax transilis* frente a compuestos volátiles de flores que ambas especies frecuentan.

Cerambyx welensii es uno de los principales insectos xilófagos de encinas (*Quercus ilex*) y alcornoques (*Quercus suber*) en Andalucía Occidental (España). Las propuestas más recientes para el control integrado de sus poblaciones apuestan por estrategias basadas en la

aplicación de los compuestos semioquímicos para el seguimiento o la captura masiva, entre otros objetivos (Navarro *et al.*, 2004; Sánchez-Osorio *et al.*, 2005). La electroantenografía proporciona valiosa información sobre el abanico de sustancias percibidas por los insectos a través de su olfato, y permite estimar el nivel de sensibilidad de tal percepción. Por ello constituye una herramienta básica para abordar este tipo de estudios. En las primeras pruebas de EAG de *C. welensii* se han encontrado grandes diferencias de respuesta entre individuos (Sánchez *et al.*, 2004) que pueden dificultar la correcta caracterización del comportamiento olfativo de esta especie. En este contexto, los objetivos del presente trabajo son los siguientes: 1) determinar si existen diferencias en la aptitud previa de los individuos de *C. welensii* para la respuesta de EAG, 2) analizar el comportamiento en las pruebas de EAG según el sexo, y 3) determinar el grado de influencia sobre la variabilidad de respuestas entre individuos de algunos parámetros experimentales, anatómicos y fisiológicos.

Material y métodos

Insectos

Se ha trabajado con un total de 27 insectos. La mayoría de ellos (25) se capturaron en campo durante el período de vuelo (mayo – julio de 2004), en una dehesa de alcornoque (término municipal de Almonte, Huelva, España), mientras que dos ejemplares se capturaron antes de su emergencia a partir de ramas caídas (término municipal de Monesterio, Badajoz, España). Por lo tanto se desconocía la edad y el vigor de la mayoría de los ejemplares. Cada individuo se mantuvo en un recipiente de plástico de 20x20 cm en laboratorio, provisto de un vial con agua azucarada (4%) para su alimentación, a temperatura y humedad ambientales del laboratorio y en penumbra.

Obtención de respuestas electroantenográficas

Para la obtención de las respuestas de EAG se siguió un procedimiento similar al empleado por Barata (1997), adaptado a esta especie según Sánchez-Osorio *et al.* (2006). Las respuestas de EAG fueron amplificadas y registradas mediante el sistema USB-IDAC y el programa Autospike-32 (Syntech[®], Hilversum, Holanda). Los parámetros empleados para la adquisición de la

señal fueron los establecidos por Sánchez-Osorio *et al.* (2006).

Para el estudio de EAG 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 (mitad apical) del undécimo segmento de la antena, y el electrodo de referencia se insertó a través de la membrana intersegmental entre el escapo y el pedicelo. Tras la medición de la respuesta, los capilares empleados en el electrodo de referencia fueron extraídos de la antena cuidadosamente, midiéndose su diámetro en punta fina con la ayuda de un ocular micrométrico.

La disolución estimulante empleada, en adelante *estímulo estándar*, consistió en 20 microlitros de (*E*)-2-hexenal (pureza del 98%; Sigma-Aldrich) al 50% (v/v) en dos tipos de solvente: hexano y aceite de parafina. Esta concentración asegura la respuesta de todos los individuos pero sin que se produzca saturación antenal (Sánchez *et al.*, 2004; Sánchez-Osorio *et al.*, 2007). El (*E*)-2-hexenal es un “volátil de hojas verdes” (“Green Leaf Volatil” o “GLV”) de amplia presencia en los vegetales, que ha sido detectado como compuesto volátil cortical de *Quercus robur* (Vrkocova *et al.*, 2000), uno de los robles hospedantes de *C. welensii* (Vives, 2000), y ha sido empleado ya como estímulo estándar en el cerambícido *Phoracantha semipunctata* (Barata, 1997). La mezcla estimulante se aplicó sobre una tira de papel de filtro Whatman nº 1 (50 x 5 mm), que fue introducida en una pipeta Pasteur de vidrio. Tras la aplicación de la mezcla en el papel de filtro, se dejó evaporar el solvente durante un tiempo aproximado de 5 minutos (Brockerhoff y Grant, 1999).

La inyección control empleada (variable *Vcontrol*) contenía únicamente 20 microlitros del solvente, mientras que la inyección en blanco (variable *Vseco*) consistió en una pipeta Pasteur provista de papel Whatman limpio. En todos los casos la aplicación del estímulo se efectuó manualmente mediante una jeringa de plástico, empleando un volumen de aire de 10 mililitros. La frecuencia de aplicación osciló entre 15 y 60 segundos, suficiente para evitar la saturación de la antena (Sánchez *et al.*, 2004; Sánchez-Osorio *et al.*, 2007).

La identificación previa de observaciones aberrantes para las distintas series de datos se efectuó a partir del método de Grubbs (Dagnelie 1998). El procesado estadístico se realizó mediante el software SPSS® 11.5, salvo los análisis mediante métodos robustos, para los cuales se empleó el programa R (GNU Operating System Free Software Foundation, www.gnu.org/); en ambos casos se consideró un nivel de significación $\alpha=0,05$.

Aptitud previa de los insectos y variabilidad de respuestas entre sexos

Dada la procedencia de los insectos era de esperar la falta de homogeneidad en su estado fisiológico, y con ello en su aptitud inicial de cara a las pruebas de EAG. El análisis de covarianza (ANCOVA) permite, considerando como covariable la respuesta al control (*Vcontrol*), poner de relieve tal heterogeneidad (García, 1998). Se planteó de esta manera un diseño experimental factorial con dos factores (sexo y solvente), y la covariable *Vcontrol*. Los insectos empleados (16 individuos) se repartieron en dos grupos según el solvente utilizado: hexano (*grupo He*. $N_{\text{machos}}=4$, $N_{\text{hembras}}=4$) o aceite de parafina (*grupo Pa*. $N_{\text{machos}}=4$, $N_{\text{hembras}}=4$). La variable descriptiva de la respuesta de EAG de cada insecto fue la respuesta total media (sin restar la respuesta al control) para una serie de nueve estimulaciones (excepcionalmente, siete). Las medias marginales obtenidas mediante estimación clásica se acompañaron de dos estimaciones robustas, con el fin de obtener el valor del parámetro de posición más ajustado a la dispersión de las respuestas de los individuos. Para ello se empleó la media 0,1-recortada, que se encuentra en el módulo base del programa R, así como el M-estimador de Huber, calculado mediante la librería “robustbase” (Rousseeuw *et al.*, 2009). La influencia del sexo y el solvente se analizó mediante la Generalización robusta del test de Welch, a partir de la librería “Rallfun-v9” (Wilcox, 2005).

Variabilidad de respuestas entre individuos

Para este análisis se emplearon los mismos 16 ejemplares de la prueba anterior. El contraste de hipótesis entre respuestas medias se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, a partir de las respuestas netas (restada la respuesta al control) para las series de estimulaciones descritas en el apartado anterior. Junto con la respuesta de EAG, se midieron las variables experimentales, anatómicas y fisiológicas que se consideraron mejores exponentes de las diferencias encontradas tanto entre los insectos estudiados como en las condiciones de experimentación (tabla 1). El estudio de la influencia de estas variables sobre la variabilidad de respuestas de EAG se realizó analizando la matriz de correlaciones (R_{pearson}), en la cual tanto la respuesta neta de EAG como la respuesta al control se transformaron mediante la función raíz cuadrada (*Rai_EAGn* y *Rai_Vcon* respectivamente).

Tabla 1. Parámetros considerados en el análisis de la variabilidad de respuestas de EAG entre individuos

Tipo de parámetro	Descripción	Rango	Variable	Transformación
Experimental	Temperatura del laboratorio al inicio de la sesión de EAG (°C)	23-32,9	<i>Temp</i>	No
	Diámetro en punta fina del capilar del electrodo de referencia (µm)	70-270	<i>Capi</i>	No
	Anchura de la línea base de la respuesta de EAG (mV)	0,04-0,6	<i>Lg_lib</i>	Logaritmo decimal
Anatómico	Longitud mandíbulas-extremo del élitro (cm)	2,73-5,26	<i>Longit</i>	No
	Longitud total de la antena derecha (cm)	2,99-8,43	<i>Lg_ant</i>	Logaritmo decimal
	Ancho del pronoto en la zona próxima al mesonoto (cm)	0,72-1,49	<i>Ancho</i>	No
Fisiológico	Peso en el momento de EAG (gr)	0,53-4	<i>Peso</i>	No
	Días de supervivencia tras la captura	4-171	<i>Lg_scap</i>	Logaritmo decimal
	Días de supervivencia tras la prueba de EAG	1-49	<i>Lg_seag</i>	Logaritmo decimal
	Días de retraso en el estudio de EAG tras la captura	1-137	<i>Lg_ret</i>	Logaritmo decimal
	Cociente longitud del insecto /peso	1,24-5,15	<i>Lon_P</i>	No
	Cociente peso/ancho del pronoto	1,10-4,29	<i>An_P</i>	No

Modelos explicativos de la variabilidad de respuestas entre individuos

Para analizar la contribución de los parámetros citados a la variabilidad de respuestas entre individuos se emplearon métodos estadísticos multivariantes. Como método exploratorio inicial se aplicó un análisis factorial por componentes principales ($n=26$), que incluyó también la variable *Vcontrol*. En el modelo final sólo se consideraron los componentes con valor propio mayor que uno, adoptándose la solución dada tras aplicar una rotación de tipo “varimax“. La selección de variables integrantes del modelo final se efectuó considerando las correlaciones entre la variables, los resultados de las pruebas de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y de esfericidad de Bartlett, las tablas de comunalidades y los valores de la matriz de correlaciones anti-imagen.

A partir de los resultados del análisis factorial se realizó un análisis de regresión lineal ($n=21-27$). En primer lugar se efectuó un análisis de regresión lineal simple con cada variable significativamente correlacionada con la respuesta de EAG; posteriormente se efectuaron dos análisis de regresión lineal múltiple, uno para el conjunto de estas variables y otro a partir de las nuevas variables definidas por el modelo factorial final.

Tras el análisis de regresión se realizó un análisis de conglomerados con el fin de identificar grupos de individuos con respuestas significativamente diferentes. Los conglomerados se formaron a partir de variables independientes, ya fueran individuales o en grupo, participantes en modelos de regresión significativos. El establecimiento de los conglomerados definitivos se llevó a cabo comparando las soluciones arrojadas por los métodos jerárquicos de Ward y Centroides (estimando

do la similitud mediante la distancia euclídea al cuadrado) y el no jerárquico Análisis de Conglomerados de K-medias.

Resultados

Aptitud previa de los insectos y variabilidad de respuestas entre sexos

El rango de respuestas encontrado para el grupo de insectos estudiado fue bastante amplio, variando la media total por insecto frente al estándar entre $0,22\text{mV} \pm 0,07$ y $2,38\text{mV} \pm 0,2$ (media \pm DT), y entre 0 y $0,31\text{mV} \pm 0,02$ (media \pm DT) frente al control (tabla 2). Pero el conjunto de respuestas de cada individuo resultó muy homogéneo, encontrándose un valor medio para los coeficientes de variación de las respuestas de todos los insectos del $18,6\% \pm 7,9$ (media \pm DT). El efecto de la covariable *Vcontrol* resultó muy significativo (ANCOVA: $F= 18,433$; $p= 0,001$) lo que refuerza la hipótesis inicial sobre la aptitud desigual entre los individuos de cara a las pruebas de EAG.

La disparidad de respuestas de EAG encontradas ($CV_{\text{hembras}} = 63,03\%$; $CV_{\text{machos}} = 50,53\%$. Valores medios de los dos grupos. Tabla 2) hace que tal variable no siga una distribución normal. En estas condiciones, una estimación robusta para la respuesta media de EAG, y preferentemente la dada por el M-estimador de Huber (tabla 2), se considera la más adecuada (García, 2002). Las diferencias de respuesta media no resultaron, sin embargo, significativas entre sexos, entre tipos de solvente ni para la interacción sexo*solvente (Generalización robusta del test de Welch aplicada a las medias 0,1-

Tabla 2. Estimaciones clásica y robusta para las respuestas totales de EAG frente al estándar, y respuesta frente al control ($V_{control}$). M= media; DT= desviación típica; CV= coeficiente de variación; $M_{0,1-rec}$ = media 0,1-recortada; $DT_{0,1-rec}$ = desviación típica para la media 0,1-recortada; M_{Huber} = M-estimador de Huber; NMAD= Desviación absoluta mediana estandarizada; M_c = respuesta media frente al control

Sexo	Solvente	N	Respuesta de EAG frente al estándar (mV)				$V_{control}$ (mV)	M/M _c
			Estimación clásica		Estimación robusta			
			M ± DT	CV (%)	$M_{0,1-rec} \pm DT_{0,1-rec}^*$	M_{Huber} (NMAD)		
Machos	Parafina	4	1,30 ± 0,82	63,1	1,31 ± 0,52	1,26 (0,74)	0,11 ± 0,05	11,82
	Hexano	4	0,95 ± 0,36	37,9	0,95 ± 0,22	0,95 (0,36)	0,20 ± 0,06	4,75
	Total	8	1,13 ± 0,62	54,9	1,13 ± 0,27	1,07 (0,64)	0,15 ± 0,07	7,54
Hembras	Parafina	4	0,98 ± 0,62	63,3	0,98 ± 0,39	0,98 (0,72)	0,14 ± 0,13	7,00
	Hexano	4	0,43 ± 0,27	62,8	0,43 ± 0,17	0,34 (0,19)	0,05 ± 0,04	8,60
	Total	8	0,70 ± 0,53	75,7	0,7 ± 0,24	0,61 (0,40)	0,09 ± 0,10	7,78
Total	Parafina	8	1,14 ± 0,70	61,4	1,14 ± 0,31	1,11 (0,76)	0,12 ± 0,09	9,50
	Hexano	8	0,69 ± 0,60	86,9	0,69 ± 0,18	0,67 (0,47)	0,12 ± 0,10	5,75

* Diferencias de medias 0,1-recortadas no significativas. Generalización robusta del test de Welch: F= 2,280; p= 0,171; F= 2,613; p= 0,146; y F= 0,126, punto crítico= 7,505. Para sexo, solvente y sexo*solvente.

recortadas: F= 2,280; p= 0,171; F= 2,613; p= 0,146; y F= 0,126, punto crítico= 7,505. Para sexo, solvente y sexo*solvente respectivamente).

La respuesta al control representó un 13,4% de la respuesta total frente al estímulo estándar, presentando ambas variables una correlación positiva elevada y muy significativa ($R_{Pearson} = 0,762$; $R^2 = 0,53$; $p = 0,01$, n=16. Variables transformadas por la función raíz cuadrada). Por otra parte, la inyección en blanco originó respuestas de $0,06 \text{ mV} \pm 0,05$ (media \pm DT, n=8), valor que no resultó significativamente diferente al obtenido con cada solvente (prueba “t” de Student, n=8 en cada caso: $t = -1,767$; $p = 0,099$; $t = -1,754$, $p = 0,101$. Grupo He y grupo Pa respectivamente).

Variabilidad de respuestas entre individuos

Las diferencias encontradas entre individuos resultaron altamente significativas para el global de los insectos (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 125,90$; $p < 0,001$, n=16). Entre las variables estudiadas que podrían tener influencia sobre tal variabilidad, sólo cuatro (*Capi*, *Log_ret* y *Lg_lib* y *Lon_P*) presentaron correlaciones significativas con la respuesta de EAG, resultando tal correlación negativa para la primera y positivas para las demás (tabla 3).

Entre algunas variables independientes también se encontraron correlaciones significativas, destacando las que presentaron la respuesta al control y la anchura de

la línea base ($Rai_Vcon \diamond Lg_lib$), así como las encontradas entre las variables relacionadas con el peso del insecto (*Peso*, *An_P* y *Lon_P*) y su supervivencia tras la prueba de EAG (*Lg_seag*) (tabla 3).

Modelos explicativos de la variabilidad de respuestas entre individuos

El modelo factorial resultante permitió reducir el grupo de variables inicial a sólo 3 componentes, es decir tres nuevas variables aportadas por el modelo mediante combinaciones de las originales, que explicaron el 82,9 % de la varianza total (tabla 4). El componente 1 quedó representado por variables relacionadas con el estado fisiológico del individuo en el momento del estudio de EAG, correspondiendo la mayor carga a la variable *Lg_seag*; por lo tanto se denominó “Vigor” (*Vig*). El componente 2 se vinculó fuertemente con la anchura de la línea base de la respuesta, teniendo una elevada presencia la respuesta al control; por ello se denominó “aptitud previa” (*Apti*). El componente 3 quedó determinado por la tardanza en efectuarse el estudio de EAG tras la captura del insecto, por lo cual se denominó “retraso del estudio” (*Retra*).

Se excluyeron del modelo las variables implicadas en correlaciones no significativas, o significativas pero irrelevantes (por ejemplo: *Longit* \diamond *Temp*), así como otras fuertemente correlacionadas entre sí o con otra variable (*Peso*, *An_P* y *Lon_P*).

Tabla 3. Correlaciones significativas (R_{Pearson}) para la respuesta neta de EAG ($R_{\text{ai_EAGn}}$), la respuesta al control ($R_{\text{ai_Vcon}}$) y los parámetros potencialmente influyentes en la variabilidad de respuestas entre individuos. Las variables se identifican según se describió en la tabla 1

Correlación	R_{Pearson}	Correlación	R_{Pearson}
Rai_EAGn \diamond Rai_Vcon	0,762**	Lg_scap \diamond Lg_ret	0,537**
Rai_EAGn \diamond Lg_lib	0,455**	Lg_scap \diamond Lg_seag	0,649***
Rai_EAGn \diamond Capi	-0,527**	Lg_scap \diamond Peso	0,388*
Rai_EAGn \diamond Lg_ret	0,398*	Lg_seag \diamond Peso	0,596**
Rai_EAGn \diamond Lon_P	0,648*	Lg_seag \diamond Lon_P	-0,718*
Lg_lib \diamond Capi	-0,513**	Lg_seag \diamond An_P	0,880**
Rai_Vcon \diamond Lg_lib	0,443*	Peso \diamond Longit	0,682*
Lon_P \diamond An_P	-0,866**	Peso \diamond Lon_P	-0,957***
Longit \diamond Ancho	0,653*	Peso \diamond An_P	0,829**

(*). Indica correlación significativa, $\alpha=0.05$. (**). Indica correlación muy significativa, $\alpha=0.01$. (***). Indica correlación altamente significativa, $\alpha=0.001$.

Los resultados de los análisis de regresión lineal simple para las variables correlacionadas con la respuesta de EAG se muestran en la tabla 5.

El diámetro del capilar (*Capi*) fue la variable que explicó la mayor proporción de variabilidad de respuestas (27,8%). El mejor de los modelos de regresión lineal múltiple a partir de las tres variables, sin que existieran problemas de colinealidad, lo integraron las variables *Capi* y *Lg_ret* (44,4% de variabilidad explicada). Considerando las nuevas variables resultantes del análisis factorial (*Vig*, *Apti* y *Retra*), el modelo de regresión múltiple obtenido explicó la mayor variabilidad de las respuestas de EAG (68,8%) (tabla 5).

El análisis de conglomerados a partir de las variables *Capi*, *Lg_lib* y *Lg_ret* consideradas individualizadamente (tabla 6), permitió identificar, en primer lugar, un grupo de insectos estudiados con capilares de diámetro comprendido entre 170 y 190 μm , cuya res-

puesta media resultó inferior al resto (más del 60%) (Kruskal-Wallis: $\chi^2=6,463$; $p=0,039$; seguido de Mann-Whitney aplicado a tres grupos, $U=9,5$ y $U=4$; $p<0,05$). Por otra parte, se encontró que en los ejemplares que presentaron una anchura de la línea base de la respuesta superior a 0,3 mV se originaban respuestas significativamente mayores que en el resto (~78%) (Kruskal-Wallis: $\chi^2=7,713$; $p=0,021$; seguido de Mann-Whitney aplicado a tres grupos, $U=13,5$ y $U=13$; $p<0,05$). Por último se detectó que los dos ejemplares que fueron más tardíamente sometidos al estudio de EAG presentaron una respuesta significativamente superior (más de 2,5 veces) a la de los demás (Prueba “t” de Student entre las medias de dos grupos y el valor “ $\mu_0=1.34$ ”, respuesta transformada media de los dos ejemplares del tercer grupo: $t=-9,516$ y $t=-6,741$; $p<0,001$ en los dos casos).

Considerando las tres variables definidas a partir del análisis factorial, el agrupamiento más adecuado según el método K-Medias fue el constituido por cuatro conglomerados. En estos conglomerados se encontraron respuestas medias de EAG significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, $\chi^2=13,905$; $p=0,003$; $n_1=7$, $n_2=3$, $n_3=6$ y $n_4=10$. Figura 1). Los dos conglomerados con mayor respuesta (Conglomerado 1: 1,18 mV; Conglomerado 2: 1,58 mV) quedaron integrados por insectos vigorosos, con aptitud previa media-alta y retrasos en el estudio también elevados. La respuesta absoluta para el conglomerado de insectos menos vigorosos (Conglomerado 3: 0,33 mV) resultó significativamente menor que las de los demás grupos (Mann-Whitney entre pares, $p<0,025$; $n_1=7$, $n_2=3$, $n_3=6$ y $n_4=10$).

Tabla 4. Matriz de componentes rotados. Normalización Varimax con Kaiser. Extracción por análisis de componentes principales, varianza total explicada: 82,9%. Variables tipificadas según se describió en la tabla 1

Variables	Componentes		
	1	2	3
<i>Log_seag</i>	0,911	0,076	0,068
<i>Capi</i>	0,712	-0,506	-0,085
<i>Log_scap</i>	0,683	0,191	0,597
<i>Log_lib</i>	-0,121	0,913	-0,195
<i>Rai_Vcon</i>	0,149	0,734	0,342
<i>Log_ret</i>	0,013	-0,009	0,969

Tabla 5. Modelos de regresión lineal simple y múltiple para las variables significativamente correlacionadas con la respuesta de EAG, y para las nuevas variables definidas en el análisis factorial. Sólo se recogen los modelos de regresión significativa para $\alpha=0,05$ (en el caso de *Lon_P*: $p=0,059$). Las variables se identifican según se describió en la tabla 1, excepto en el caso de Vig (=vigor), *Apti* (= aptitud previa) y *Retra* (=retraso en el estudio de EAG)

Modelo ^a	VARIABLES INDEPENDIENTES	N	R _{Pearson}	R ²	R ² corregida	p-valor	Durbin-Watson
1 ^b	<i>Capi</i>	26	-0,527	0,278	0,248	0,006	2,367
2 ^c	<i>Lg_lib</i>	27	0,455	0,207	0,175	0,017	1,887
3 ^d	<i>Lg_ret</i>	27	0,398	0,159	0,125	0,040	1,956
4 ^e	<i>Capi</i> + <i>Lg_ret</i>	26	0,666	0,444	0,396	0,001	2,474
5 ^f	<i>Vig</i> + <i>Apti</i> + <i>Retra</i>	26	0,829	0,688	0,645	<0,001	2,480

^a Variable dependiente: *Rai_EAGn*. ^b $Y=1,368-0,004Capi$. ^c $Y=1,232+0,614Lg_lib$. ^d $Y=0,673+0,209Lg_ret$. ^e $Y=1,189-0,004Capi+0,211Lg_ret$. ^f $Y=0,843-0,071Vig+0,175Apti+0,134Retra$.

Discusión

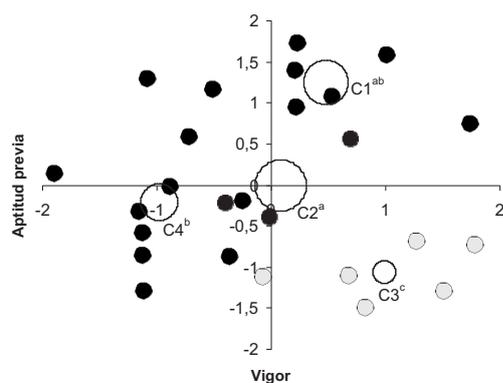
La respuesta de EAG de un insecto para un determinado compuesto es relativamente uniforme si las condiciones de estimulación no se alteran; pero puede variar entre insectos distintos y resultar afectada, además, por algunas condiciones experimentales, como la temperatura, flujo de aire o estimulaciones previas (Roelofs, 1984, Cork *et al.*, 1990). Este comportamiento en pruebas de EAG se ha citado para diversas especies, desde pulgones como *Aphis fabae* (Park y Hardie, 1998) hasta lepidópteros como *Lobesia botrana* (Struble y Arn, 1984), para la cual se han encontrado respuestas variables entre 1 y 11,4 mV (media de 3,5 mV), atribuidas a la preparación de la antena más que a sus características (Struble y Arn, 1984).

Las respuestas totales obtenidas en *C. welensii* frente al estándar (*E*)-2-hexenal (50% v/v) fueron muy variables (0,92 mV; CV=65%). Esta variabilidad de respuestas entre individuos resultó altamente significativa y puede englobar la influencia del sexo, del compuesto solvente empleado en la elaboración del estímulo estándar así como de otros factores que intervienen en la respuesta final de EAG. La respuesta media de *C. welensii* se puede considerar elevada (Barata *et al.*, 2000). Así, entre los ceraméricidos, las respuestas medias de EAG obtenidas han oscilado entre los 0,279 mV (CV= 65%) para *P. semipunctata* frente al cineol a la concentración 1:10 en aceite de parafina (Barata, 1997) y los 15,5 mV (CV=19%) de las hembras de *S. breve* frente a extractos protorácicos de machos (Liendo *et al.*, 2005). En otros coleópteros se han encontrado respuestas de magnitud

Tabla 6. Conglomerados de individuos formados a partir del diámetro del capilar de referencia (*Capi*), anchura de la línea base de la respuesta de EAG (*Lg_lib*) y tiempo transcurrido entre la captura y el estudio de EAG (*Lg_ret*). EAGn= respuesta neta media

Variable	Conglomerado	N	Centro conglomerado	Amplitud conglomerado	EAGn (mV)	
					Media	DT
<i>Capi</i> (micras)	1	7	87,14	70 a 100	0,92 ^a	0,45
	2	14	128,21	110 a 150	0,88 ^a	0,56
	3	5	185	170 a 195	0,35 ^b	0,22
<i>Lg_lib</i> (mV)	1	10	0,14	0,12-0,16	0,61	0,68
	2	9	0,23	0,18-0,28	0,66 ^a	0,29
	3	8	0,41	0,3-0,66	1,09 ^b	0,36
<i>Lg_ret</i> (días)	1	13	2,54	1-4	0,65	0,34
	2	12	11,08	6-36	0,72 ^a	0,46
	3	2	134,5	133-136	1,85 ^b	0,83

Letras distintas para la media en cada variable indican diferencias significativas al nivel 0,05.



● Conglomerado 1 ■ Conglomerado 2 ○ Conglomerado 3 □ Conglomerado 4 ◻ Centros de conglomerado

Figura 1. Agrupamiento de los individuos de *C. welensii* (método K-Medias) en función de las puntuaciones obtenidas en las tres variables definidas a partir del análisis factorial (vigor, aptitud previa y retraso del estudio). Para mayor claridad sólo se representan dos de los ejes (vigor y aptitud previa). Respecto al tercer componente, C_1 y C_2 se caracterizan por un elevado retraso en el estudio, en especial para C_1 ; C_3 presenta un retraso bajo; C_4 se caracteriza por un retraso medio. Los círculos sin trama muestran los centros y magnitudes de las respuestas absolutas medias para cada conglomerado ($C_1=1,18$ mV; $C_2=1,58$ mV; $C_3=0,33$ mV y $C_4=0,8$ mV). Superíndices en los centros indican diferencias de respuesta significativas (Kruskal-Wallis: $\chi^2=15,785$; $p=0,001$; $n_1=7$, $n_2=3$, $n_3=6$ y $n_4=10$; seguida de la prueba de Mann-Whitney por pares).

similar, como los 1,3 mV (CV=23%) del curculionido *O. sulcatus* frente al estándar (Z)-3 hexen-1-ol (1% v/v) en aceite de parafina (Van Tol y Visser, 2002) o los 1,46 mV (CV= 11%) del crisomélido *L. decemlineata* frente al (Z)-3-hexenil acetato (Dickens, 2000).

La respuesta al control fue de muy baja intensidad (media de 0,12 mV para ambos solventes), y aún menor aunque no significativamente (el 50% aproximadamente) lo fue la inyección en blanco. Tanto el hexano como el aceite de parafina han sido empleados frecuentemente como solventes en estudios de EAG, habiendo originado respuestas variables entre especies. Así, el aceite de parafina no originó respuesta medible en *P. semipunctata* (Barata *et al.*, 1992), mientras que en *A. fabae* provocó respuestas de $0,24 \pm 0,036$ mV (Park y Hardie, 1998). El hexano provocó respuestas de 0,15 mV en *Hypsipyla grandella* (Maia *et al.*, 2000), mientras que en *Dioryctria abietivorella* la respuesta resultó mucho más elevada ($1,63$ mV \pm 0,12) (Brockerhoff y Grant, 1999).

Los resultados encontrados para *C. welensii* indican, pues, una escasa relevancia de la aportación del solvente a la respuesta final de EAG en las condiciones de esti-

mulación consideradas. El tiempo permitido para la evaporación del solvente ha permitido seguramente su eliminación completa en el caso del compuesto volátil (hexano) (Brockerhoff y Grant, 1999). En esta situación, la respuesta total de EAG en *C. welensii* frente al estímulo estándar se puede considerar debida en su mayor parte (87%) a la estimulación olfativa provocada por el propio compuesto estudiado; el porcentaje restante sería debido, a partes iguales (6,5%), a la estimulación olfativa causada por el solvente y a la estimulación de receptores no olfativos (higro-térmicos y/o mecánicos, individual o conjuntamente). En otros insectos se ha sugerido ya el gran peso en la respuesta al control de otros receptores no químicos, como en el díptero *Lucilia cuprina* (Park y Cork, 1999), y se ha demostrado en *H. grandella*, donde la inyección en blanco originó, incluso, respuestas superiores al control con hexano (Maia *et al.*, 2000). El efecto significativo de la respuesta al control en el análisis de covarianza (ANCOVA), indica que tal variable puede revelar la aptitud previa de los insectos para las pruebas de EAG, aptitud que resultó desigual en *C. welensii*.

Aunque la respuesta media de los machos superó en más del 61% a la de las hembras, tal variación no resultó significativa. Entre los cerambícidos estudiados mediante esta técnica, las diferencias de respuesta entre sexos varían con la especie, y cabe suponer que también podría influir el tipo de compuesto (como ocurre para las feromonas sexuales). En *P. semipunctata* no se han encontrado diferencias entre sexos para un amplio abanico de sustancias (Barata, 1997), y tampoco se han encontrado en *S. breve* frente a compuestos volátiles de ramas de la planta del cacao (Liendo *et al.*, 2005). Por el contrario, los machos de *Arhopalus tristis* mostraron respuestas de EAG más altas que las hembras frente a diversos monoterpenos y compuestos GLV (Suckling *et al.*, 2001). En otros coleópteros, González *et al.* (1994) no encontraron diferencias entre sexos en el escolítido *Phloeotribus scarabaeoides* frente al etileno o al ácido acético, mientras que Reinecke *et al.* (2005) sí las encontraron en el escarabeido *Melolontha melolontha* frente a compuestos GLV.

Entre las variables experimentales, anatómicas y fisiológicas estudiadas, se encontró que las anatómicas no influyeron sobre la variabilidad de respuestas entre individuos. En cambio la respuesta final de EAG estaría condicionada en más del 68% por la aptitud previa del insecto, por su estado fisiológico y por algunas condiciones experimentales. Así, diámetros superiores a 170 micras en punta fina en el capilar del electrodo de refe-

rencia podrían afectar el contacto eléctrico con la antena, alterando la respuesta real del insecto. La fluctuación en la anchura de la línea base y su relación con la respuesta al estímulo estándar puede deberse a la colocación de los electrodos, pero también a la diferente aptitud de los insectos en el momento de las pruebas (como lo sugiere la correlación entre la anchura de la línea base y la respuesta al control).

En cuanto al estado fisiológico de los insectos, el grado de influencia que presentó la variable *Lg_seag* (que puede considerarse como reflejo de la vitalidad del individuo en el momento de realizarse el estudio) apunta la relación entre la respuesta de EAG y el vigor de los ejemplares. Los resultados del análisis de conglomerados para las variables definidas a partir del análisis factorial (vigor, retraso en el estudio y aptitud previa), muestran una interesante relación entre la vitalidad del insecto y su aptitud previa para estudios de EAG. Aptitudes bajas provocarían respuestas de poca intensidad con independencia del vigor del insecto; pero en individuos con aptitud media-alta, la vitalidad del insecto se muestra como un factor determinante de su respuesta de EAG.

La aptitud previa se ha revelado como un aspecto muy influyente en insectos como el cerambícido *Hylotrupes bajulus*, el escarabeido *M. melolontha* o el lepidóptero *Lobesia botrana* (Weisbecker et al., 2004; Reinecke et al., 2005; Struble y Arn, 1984). Por el contrario, no ocurrió lo mismo en el curculiónido *Rhynchophorus ferrugineus*, ya que no se encontraron diferencias de respuesta entre adultos capturados en campo (Avand-Faghhih, 2004). La influencia del estado de desarrollo o del vigor de los insectos (expresada por medio de su edad) sobre la respuesta olfativa ha sido sugerida ya para otros cerambícidos (*P. semipunctata*, Barata y Araújo, 2001; *Monochamus* spp., Allison et al., 2004).

La influencia de la vitalidad y la época de captura de los insectos para *C. welensii* es razonable si se consideran dos aspectos de la biología de esta especie: 1) la dilatada época de letargo que atraviesan los adultos –unos 9 meses- (Vives, 2000), y 2) la breve época de vuelo general –unos 2 meses-, durante la cual deben desarrollar una gran actividad que implica también un rápido deterioro (López et al., 2004). Las características de *C. welensii*, en especial su gran tamaño y las pautas de su comportamiento poblacional (López-Pantoja et al., 2008), unido a los problemas para seleccionar material leñoso colonizado, dificultan la obtención de adultos en condiciones controladas. Se debe recurrir, pues,

al empleo de ejemplares capturados en campo para acometer los estudios de EAG, aunque de esta forma se desconoce en gran medida su estado fisiológico, un factor que influye en la respuesta de EAG.

Para paliar el efecto de la variabilidad intraespecífica en respuestas de EAG, suelen referirse las respuestas obtenidas respecto a la provocada por un estímulo estándar (Roelofs, 1984; Jyothi et al., 2002; Van Tol y Visser, 2002; Reinecke et al., 2005). Dado que es inevitable trabajar con ejemplares de *C. welensii* capturados en campo, resulta de gran utilidad el empleo de un estímulo estándar. Aunque cuando se trabaja en estas condiciones puede aumentar el riesgo de “fatiga” de la antena (Brockhoff y Grant, 1999), no parece que tal saturación pueda ocurrir en *C. welensii*, a juzgar por el comportamiento de su respuesta de EAG bajo condiciones de estimulación intensa (Sánchez et al., 2004; Sánchez-Osorio et al., 2007).

Los resultados obtenidos confirman la aptitud de *C. welensii* para pruebas electroantenográficas apuntada en otros trabajos (Sánchez-Osorio et al., 2006 y 2007). Este cerambícido ha proporcionado respuestas de EAG elevadas frente a estimulaciones con (*E*)-2-hexenal, sin que el tipo de solvente empleado (hexano y aceite de parafina) haya tenido una contribución relevante. Sí se sugiere, en cambio, la elevada contribución de receptores no olfativos (en un 50%) a la respuesta frente al control. La respuesta de EAG de *C. welensii* ha exhibido una gran variabilidad intraespecífica, que puede englobar posibles influencias en la repuesta de otros factores (por ejemplo el sexo). Más del 68% de la variabilidad de respuestas se puede explicar a partir del diámetro del capilar del electrodo de referencia empleado y la amplitud de la línea base, así como por el estado fisiológico del individuo. Dadas las características de esta especie, resulta inevitable emplear ejemplares obtenidos en campo para pruebas de laboratorio. Por lo tanto hay que prestar especial atención a la variabilidad inducida por el origen de los individuos, que se puede reflejar tanto en estudios electrofisiológicos como, presumiblemente, en bioensayos de comportamiento.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, cuyo soporte económico ha posibilitado el desarrollo de los trabajos expuestos. Así mismo, manifiestan su más sin-

cero agradecimiento al doctor Didier Rochat (Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles), por la lectura crítica del documento.

Referencias bibliográficas

- ALLISON J., BORDEN J., SEYBOLD J., 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14:123 - 150.
- AVAND-FAGHIH A., 2004. Identification et application agromique de synergistes végétaux de la phéromone du charançon *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) 1790. Ph. D. Dissertation, Institut National Agronomique Paris-Grignon; Institut National de la Recherche Agronomique, 171 p.
- 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., ARAÚJO J., 2001. Olfactory orientation responses of the eucalyptus woodborer *Phoracantha semipunctata* to host plants in a wind tunnel. *Physiol. Entomol.* 26: 26-37.
- 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. *J. Chem. Ecol.* 26: 1877-1895.
- BROCKERHOFF E., GRANT G., 1999. Correction for differences in volatility among olfactory stimuli and effect on EAG responses of *Dioryctria abietivorella* to plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 25: 1353-1368.
- CORK A., BEEVOR P.S., GOUGH A.J., HALL D.R., 1990. Gas chromatography linked to electroantennography: a versatile technique for identifying insect semiochemicals, p.271-280. En: *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones*. Plenum Press, New York.
- 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 p.
- DICKENS J., 2000. Sexual maturation and temporal variation of neural responses in adult colorado potato beetles to volatiles emitted by potato plants. *J. Chem. Ecol.* 26: 1265-1279.
- FAN J., KANG L., SUN J., 2007. Role of host volatiles in mate location by the japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Environ. Entomol.* 36: 58-63.
- GARCÍA A., 1998. *Estadística aplicada: conceptos básicos*. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, 405 p.
- GARCÍA A., 2002. *Métodos Avanzados de Estadística Aplicada: Metodos Robustos y de Remuestreo*. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, 264 p.
- 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. *Physiol. Entomol.* 19: 301-306.
- GULLAN P. J., CRANSTON P. S., 2000. *The insects. An outline of Entomology*. Blackwell Science. 470 pp.
- HALL D.R., CORK A., PHYTHIAN S.J., CHITTAMURU S., JAYARAMA B.K., VENKATESHA M.G. SREEDHARA K., VINOD KUMAR P.K., SEETHARAMA H.G., NAIDU R., 2006. Identification of components of male-produced pheromone of coffee white stemborer, *Xylotrechus quadripes*. *J. Chem. Ecol.* 32: 195-219.
- 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. *J. Jpn. For. Soc.* 75: 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. Entomol.* 126: 175-181.
- LIENDO C., MORILLO F, SÁNCHEZ P, MUÑOZ W, GUERRA J, CABRERA A, HERNÁNDEZ J.V., 2005. Olfactory behavior and electroantennographic responses of the cocoa beetle, *Steirastoma breve* (Coleoptera: Cerambycidae). *Florida Entomol.* 88: 117-122.
- LÓPEZ G., DOMÍNGUEZ L., SÁNCHEZ I., TAPIAS R., CREMADES D., PARAMIO A., ALESSO S.P., 2004. Population ecology of xylophagous beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in mediterranean *Quercus* forest (southwest of Iberian Peninsula). Incidencia on oak trees health (*Quercus ilex* L. spp ballota and *Quercus suber* L.). En: *Ecology, Conservation and Management of Mediterranean Climate Ecosystems*. *Proceedings 10th MEDECOS Conference*, Rhodes, Greece, April 25-May 1; 8 pp.

- LÓPEZ-PANTOJA G., DOMÍNGUEZ L., SÁNCHEZ-OSORIO I., 2008. Mark-recapture estimates of the survival and recapture rates of *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera, Cerambycidae) in a cork oak dehesa in Huelva (Spain). *Cent. Eur. J. Biol.* • 3: • 431–441.
- MAIA B.H., DE PAULA J., SANT'ANA J., FERNANDES J.B., VIEIRA P.C., COSTA M., OHASHI O., SILVA J.N., 2000. Essential oils of *Toona* and *Cedrela* species (Meliaceae): taxonomic and ecological implications. *J. Braz. Chem. Soc.* 11: 629-639.
- NAGAI T., 1981. Electroantennogram response gradient on the antenna of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.* 27: 889-894.
- 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.
- PARK K.C., CORK A., 1999. Electrophysiological response of antennal receptor neurons in female Australian sheep blowflies *Lucilia cuprina* to host odours. *J. Insect Physiol.* 45: 85-91.
- PARK K.C., HARDIE J., 1998. An improved aphid electroantennogram. *J. Insect Physiol.* 44: 919-928.
- PARK K., OCHIENG S., ZHU J., BAKER T., 2002. Odor discrimination using insect electroantennogram responses from an insect antennal array. *Chem. Senses* 27: 343-352.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM ("R-2.6.1"), 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- REINECKE A., RUTHER J., HILKER M., 2005. Electrophysiological and behavioural responses of *Melolontha melolontha* to saturated and unsaturated aliphatic alcohols. *Entomol. Exp. Appl.*: 115: 33-40.
- ROELOFS W. L., 1984. Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. En: *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 131-159.
- ROUSSEEUW P., CROUX C., y otros autores, 2009. Robustbase: Basic Robust Statistics versión 0.4-5. Disponible en <http://lib.stat.cmu.edu/R/CRAN/> [Última consulta: enero de 2009].
- SÁNCHEZ-OSORIO I., 2005. Orientación olfativa de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean, principales cerambícidos xilófagos de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota*) y alcornoque (*Quercus suber* L.), para la localización de hospedantes. Tesis Doctoral, Universidad de Huelva, 185 p.
- 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 10th MEDCOS Conference*, Rhodes, Greece, April 25-May 1; 8 pp.
- SÁNCHEZ-OSORIO I., TAPIAS R., DOMÍNGUEZ L., LÓPEZ G., 2005. Cerambícidos xilófagos de encina y alcornoque en Andalucía: algunas notas sobre la identificación de especies del "grupo *Cerambyx*", sus daños al arbolado y las posibilidades de control de sus poblaciones. En: *Actas del 4º Congreso Forestal Español*. Zaragoza, 26 al 30 de septiembre de 2005. Sociedad Española de Ciencias Forestales. Departamento de Medio Ambiente, Gobierno de Aragón.
- SÁNCHEZ-OSORIO I., TAPIAS R., LÓPEZ G., DOMÍNGUEZ L., 2006. Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo para el estudio electroantennográfico de estímulos olfativos en cerambícidos. *Bol. San.Veg. Plagas* 32: 109-120.
- SÁNCHEZ-OSORIO I., TAPIAS R., DOMÍNGUEZ L., LÓPEZ G., 2007. Caracterización de la respuesta electroantennográfica de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean (Coleoptera: Cerambycidae). *Invest. Agrar.: Sist. Recur. For.* 16: 95-106.
- SCHNEIDER D., 1969. Insect olfaction: deciphering system for chemical messages. *Science* 163: 1031-1037.
- STRUBLE D., ARN H., 1984. Combined gas chromatography and electroantennogram recording of insect olfactory response, p. 161-178. En: *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York.
- SUCKLING D., GIBB A., DALY J., CHEN X., BROCKERHOFF E., 2001. Behavioral and electrophysiological responses of *Arhopalus tristis* to burnt pine and other stimuli. *J. Chem. Ecol.* 27: 1091-1104.
- SYNTECH, 1998. *Electroantennography: a practical introduction*. Syntech, Hilversum, The Netherlands. 13 pp.
- VAN TOL R., VISSER J., 2002. Olfactory antennal responses of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* to plant volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 102: 49-64.
- VIVES E., 2000. Coleoptera Cerambycidae. En: Ramos M.A., et al. (eds.), *Fauna Ibérica Vol. 12*, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid.
- VRKOCOVA P., VALTEROVA I., VRKOC J., KOUTEK B., 2000. Volatiles released from oak, a host tree for the bark beetle *Scolytus intricatus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 933-947.
- WADHAMS L. J., 1992. The perception of semiochemicals. En: *Insect Molecular Science. Proceedings, 16th Sympo-*

- sium of the Royal Entomological Society London. Imperial College London, september 1991. Academic Press, London. 152-162.
- WEISBECKER B., HOLIGHAUS G., SCHÜTZ S., 2004. Gas chromatography with mass spectrometric and electroantennographic detection: analysis of wood odorants by direct coupling of insect olfaction and mass spectrometry. *J. Chrom. A* 1056: 209-216.
- WILCOX R. R. (2005). Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing. 2nd Edition. San Diego, CA: Academic Press. Disponible en <http://www-rcf.usc.edu/~rwilcox/Rallfun-v9> [Última consulta: enero de 2009].
- 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.