

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales



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

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Israel Sánchez Osorio

Fecha de lectura: 5 de julio de 2005

Bajo la dirección del doctor:

Raúl Tapias Martín

Huelva, 2010

ISBN: 978-84-92944-97-2

D.L.: H 74-2010

**TESIS
UHU
2005
12**

UNIVERSIDAD DE HUELVA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
Departamento de Ciencias Agroforestales

TESIS DOCTORAL

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



Israel Sánchez Osorio
Huelva, marzo de 2005

UNIVERSIDAD DE HUELVA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGROFORESTALES

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 presentada por Israel Sánchez Osorio, en satisfacción de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Huelva

Autor: Israel Sánchez Osorio

Director: Raúl Tapias Martín

Huelva, marzo de 2005

Agradecimientos

Deseo expresar mi más cariñoso agradecimiento a todas aquellas personas, animales y cosas que han hecho posible la finalización de este trabajo. Entre las personas, merecen un recuerdo especial Anabel (sufridora número uno), Eva (siempre dispuesta -con perdón-), Dominique (el teteílllo calentiíito...., uy!), Gloria (la voz en mi ausencia y la llamadita de las 9.15 h.), Ascen (unas lentejitas con cervecilla). Y ahora, a caballo entre las personas y los animales, que es que son unos fieras caramba!: a Luis por su entusiasmo bichero contagioso (cuantas noches en lo oscuro, a la sombra lunera del chaparro y con la chism...la linterna en la mano), a Raúl por su perseverancia, paciencia y buenos consejos, que un doctorando es bicho impaciente y locuelo; cómo no, a Rubén, por su, por su, su, en fin, que seguro que le debo tantas que mejor lo dejo así. Al más animalillo de todos, el pequeño Juanillo (cuquito sufridor número dos). Y entre los objetos “inanimados”, la ocarina –ya casi la toco, que eso de que el ordenata se te bloquee cada cinco minutos tiene sus ventajas!-; el compasdís (mis amiguitos de Les Ogres de Barback, Têtes Raides, Malicorne, Battlefield Band y, como no, Yann Tiersen y Hexacorde), mi viejo violín (sufridor número tres); ¡ah! y la mantita para la piernas, qué caray!!.

Me gustaría dedicar también unas palabras de agradecimiento a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, sin cuyo apoyo económico no se hubieran podido plantear estos trabajos. Y en este sentido, gratitud especial para Rafael, que me brindó la oportunidad y me dio la cancha necesaria para lanzarme a este pequeño berenjenal (¡y tantas OTRI cosas que nos unen...je je).

Y a los amigüitos del Departamento de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Huelva, gente que es pa comérsela de lo buena; prefiero no citaros uno a uno, pero ten a buen seguro que estarías tú.

Y a mi familia.

Y a mis abuelos.

Índice

RESUMEN	1
CAPÍTULO I: CONTEXTO, INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	
I.1. Contexto de los trabajos	3
I.2. Introducción.....	5
I.2.1. Los coleópteros de la familia Cerambycidae asociados a encinas y alcornoques en Andalucía	5
I.2.1.1. <i>Los cerambícidos asociados a encinas y alcornoques</i>	5
I.2.1.2. <i>Cerambícidos xilófagos de encinas y alcornoques</i>	6
I.2.1.3. <i>Las posibilidades de control de cerambícidos xilófagos</i>	15
I.2.1.4. <i>Las perspectivas de control de cerambícidos xilófagos de encina y alcornoque en un contexto de Control Integrado de Plagas</i>	22
I.2.2. La aplicación de los estudios electrofisiológicos en el contexto del Control Integrado de Plagas	24
I.2.2.1. <i>Papel del olfato en el comportamiento de los insectos</i>	24
I.2.2.2. <i>Las estructurales sensoriales olfativas</i>	26
I.2.2.3. <i>Origen de las técnicas de electrofisiología aplicada</i>	30
I.2.2.4. <i>Las técnicas de electrofisiología aplicadas a cerambícidos</i>	32
I.3. Objetivos	34
I.4. Bibliografía.....	35
CAPÍTULO II: APTITUD DE <i>Cerambyx welensii</i> Y <i>Prinobius germari</i> PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA ELECTROANTENOGRÁFICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES	
II.1. Introducción: Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo para el estudio electroantenoográfico de estímulos olfativos en insectos	49
II.1.1. Estructura del dispositivo.....	49
II.1.1. Parámetros del dispositivo	50
II.1.2.1. <i>Flujo de aire hacia la antena y aplicación de estímulos</i>	50
II.1.2.2. <i>Preparación y colocación de electrodos</i>	51
II.2. Material y métodos	53
II.2.1. Dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG	53
II.2.1.1. <i>Dispositivo de aplicación de estímulos</i>	53
II.2.1.2. <i>Preparación de insectos para la captación de respuestas</i>	56
II.2.1.3. <i>Recepción y procesado de respuestas de EAG</i>	58
II.2.2. Primeras pruebas de EAG en <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> frente al (<i>E</i>)-2-hexenal, esencia de trementina y ácido acético	60
II.2.2.1. <i>Obtención de insectos adultos</i>	60
II.2.2.2. <i>Compuestos estudiados</i>	61
II.2.2.3. <i>Metodología experimental</i>	61
II.3. Resultados	62

II.3.1. Dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG	62
II.3.1.1. <i>Dispositivo de aplicación de estímulos</i>	62
II.3.1.2. <i>Grabación y procesado de respuestas electrofisiológicas</i>	65
II.3.2. Primeras pruebas de EAG en <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> frente al (E)-2-hexenal, esencia de trementina y ácido acético.....	66
II.4. Discusión	69
II.4.1. Dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG	69
II.4.2. Primeras pruebas de EAG en <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> frente al (E)-2-hexenal, esencia de trementina y ácido acético.....	71
II.5. Bibliografía	74
CAPÍTULO III: EFECTO SOBRE LA RESPUESTA DE EAG DE <i>Cerambyx welensii</i> Y <i>Prinobius germari</i> DE LAS CONDICIONES DE ESTIMULACIÓN Y LA DURACIÓN DE LA PREPARACIÓN; Y DIFERENCIAS DE RESPUESTA ENTRE SEXOS E INDIVIDUOS	
III.1. Introducción: Parámetros que condicionan el comportamiento de los insectos en las pruebas de EAG	77
III.2. Material y métodos	81
III.2.1. Efecto sobre la respuesta de EAG de la concentración y cantidad de estímulo aplicado, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación	81
III.2.1.1. <i>Insectos empleados</i>	81
III.2.1.2. <i>Metodología experimental</i>	81
III.2.1.3. <i>Análisis estadístico</i>	83
III.2.2. Diferencias de respuesta entre sexos e individuos ante el estímulo estándar disuelto en dos tipos de solvente.....	85
III.2.2.1. <i>Insectos empleados</i>	85
III.2.2.2. <i>Metodología experimental</i>	87
III.2.2.3. <i>Análisis estadístico</i>	87
III.3. Resultados	91
III.3.1. Efecto sobre la respuesta de EAG de la concentración y cantidad de estímulo aplicado, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación	91
III.3.1.1. <i>Análisis de la relación dosis-respuesta</i>	91
III.3.1.2. <i>Efecto de la cantidad de estímulo aplicado</i>	92
III.3.1.3. <i>Efecto de la frecuencia de estimulación</i>	94
III.3.1.4. <i>Efecto de la duración de la preparación</i>	98
III.3.2. Diferencias de respuesta entre sexos e individuos ante el estímulo estándar disuelto en dos tipos de solvente.....	100
III.3.2.1. <i>Efectos sobre la respuesta total de EAG de <i>C. welensii</i> del sexo, tipo de solvente y respuesta al control</i>	100
III.3.2.2. <i>Comparación entre la respuesta al control y la respuesta a la inyección en blanco; y relación entre la respuesta al control y la respuesta “bruta” media frente al estímulo estándar para <i>C. welensii</i></i>	102
III.3.2.3. <i>Variabilidad de respuestas entre individuos en <i>C. welensii</i> y los parámetros que la condicionan</i>	104
III.3.2.4. <i>Efectos sobre la respuesta total de EAG de <i>P. germari</i> del sexo, tipo de solvente y respuesta al control</i>	109

III.3.2.5. Comparación entre la respuesta al control y la respuesta a la inyección en blanco; y relación entre la respuesta al control y la respuesta “bruta” media frente al estímulo estándar en <i>P. germari</i>	111
III.3.2.6. Variabilidad de respuestas entre individuos en <i>P. germari</i> y los parámetros que la condicionan..	112
III.4. Discusión	116
III.4.1. Efecto sobre la respuesta de EAG de la concentración y cantidad del estímulo, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación	116
III.4.2. Variabilidad de respuesta entre individuos y sexo, y los factores que pueden ocasionarla	119
III.5. Bibliografía.....	123
CAPÍTULO IV: RESPUESTA DE EAG DE <i>C. WELENSII</i> Y <i>P. GERMARI</i> FRENTE A COMPUESTOS VOLÁTILES EMITIDOS POR ESPECIES ARBÓREAS HOSPEDANTES Y NO HOSPEDANTES	
IV.1. Introducción: La emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>, y la influencia de los “COVs” sobre el comportamiento de los insectos.....	127
IV.1.1. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>	127
IV.1.2. La influencia de los “COVs” sobre el comportamiento de los insectos.....	132
IV.2. Material y Métodos	136
IV.2.1. Insectos empleados	136
IV.2.2. Compuestos estudiados.....	136
IV.2.3. Metodología experimental.....	139
IV.2.3.1. Estudio de la respuesta de EAG frente a volátiles sintéticos.....	139
IV.2.3.2. Análisis de la relación dosis-respuesta.....	139
IV.2.4. Análisis estadístico	140
IV.2.4.1. Secuencia del análisis	140
IV.2.4.2. Métodos estadísticos	140
IV.3. Resultados	142
IV.3.1. Respuesta de EAG de <i>Cerambyx welensii</i> Küster y <i>Prinobius germari</i> Dejean frente a compuestos volátiles característicos de especies arbóreas hospedantes y no hospedantes.....	142
IV.3.1.1. <i>C. welensii</i>	142
IV.3.1.2. <i>P. germari</i>	149
IV.3.2. Relación dosis-respuesta de los compuestos volátiles que provocan una mayor respuesta en <i>Cerambyx welensii</i> Küster y <i>Prinobius germari</i> Dejean	155
IV.3.2.1. Aplicación a <i>C. welensii</i>	155
IV.3.2.2. Aplicación a <i>P. germari</i>	157
IV.4. Discusión.....	159
IV.4.1. Las sustancias más estimulantes para <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> , y su relación con <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>	159
IV.4.2. Una hipótesis para la selección de hospedantes por <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> a partir de estímulos olfativos	161
IV.4.3. La influencia de la variación diaria de la emisión por <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i> en la percepción olfativa de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i>	164

IV.4.4. La estimulación olfativa de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> , y los perfiles de emisión de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>	166
IV.4.5. La posibilidad de selección de ejemplares adecuados en las especies hospedantes, a partir de la orientación olfativa.....	167
IV.4.6. Implicaciones de la correlación entre las respuestas frente a distintos volátiles	169
IV.4.7. La detección por <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> de volátiles secundarios de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i> , y otros característicos de especies no hospedantes	171
IV.5. Bibliografía	175
CONCLUSIONES	181
GLOSARIO.....	183
VI.1. Glosario de términos.....	183
VI.2. Glosario de especies citadas con frecuencia	185
VI.3. Glosario de abreviaturas	185

Índice de tablas

Tabla I.1. Cerambícidos citados sobre <i>Quercus</i> en Andalucía, y otros no citados aún, pero de posible presencia.....	6
Tabla I.2. Cerambícidos xilófagos asociados a la encina en Madrid.	7
Tabla I.3. Superficie ocupada por los orificios causados por <i>Cerambyx</i> spp. y/o <i>P. germari</i> en dos rodajas de alcornoque.	13
Tabla I.4. Algunas formulaciones de naturaleza química estudiadas para el control de cerambícidos xilófagos.	16
Tabla II.1. Parámetros del dispositivo para estudio de la respuesta de EAG empleados por algunos autores.	52
Tabla II.2. Valores fijados para los parámetros del dispositivo para estudio de la respuesta de EAG relacionados con la aplicación de estímulos, así como para la captación y procesado de respuestas.	59
Tabla II.3. Estadísticos descriptivos de la respuesta neta de EAG de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> frente al (E)-2-hexenal, ácido acético y trementina en mezclas al 1:1 (v/v) con aceite de parafina.	67
Tabla III.1. Número de ejemplares de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> empleados en el estudio del efecto de la dosis y cantidad de estímulo aplicado, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación.	81
Tabla III.2. Características de los ejemplares empleados en el análisis de la variación de respuestas entre sexos e individuos en <i>C. welensii</i>	85
Tabla III.3. Características de los ejemplares empleados en el análisis de la variación de respuestas entre sexos e individuos en <i>P. germari</i> . H.	86
Tabla III.4. Diseño experimental para el estudio del efecto sobre la respuesta de EAG de <i>C. welensii</i> del sexo, tipo de solvente y respuesta al control.	88
Tabla III.5. Diseño experimental para el estudio del efecto sobre la respuesta de EAG de <i>P. germari</i> del sexo, tipo de solvente y respuesta al control.	88
Tabla III.6. Estadísticos descriptivos de la respuesta neta de <i>C. welensii</i> frente a distintas cantidades de la mezcla estimulante [(E)-2-hexenal 50% v/v en aceite de parafina o hexano].	92
Tabla III.7. Estadísticos descriptivos de la respuesta neta de <i>P. germari</i> frente a distintas cantidades de la mezcla estimulante trementina 50% v/v en aceite de parafina.	93
Tabla III.8. Respuestas netas relativas medias respecto a la primera estimulación, obtenidas a distintas frecuencias en <i>C. welensii</i> frente al compuesto estándar.	94
Tabla III.9. Estadísticos descriptivos sobre las diferencias de respuesta entre la primera estimulación y las siguientes, a distintas frecuencias, para <i>C. welensii</i>	95
Tabla III.10. Respuestas netas relativas medias respecto a la primera estimulación, obtenidas a distintas frecuencias en <i>P. germari</i> frente al compuesto estándar.	96
Tabla III.11. Estadísticos descriptivos sobre las diferencias de respuesta entre la primera estimulación y las siguientes, a distintas frecuencias, para <i>P. germari</i>	97
Tabla III.12. Estadísticos descriptivos del comportamiento de la respuesta relativa de <i>C. welensii</i> frente a (E)-2-hexenal en aceite de parafina (50% v/v) durante ocho horas.	98

Tabla III.13. Estadísticos descriptivos del comportamiento de la respuesta relativa de <i>P. germari</i> frente a la trementina en aceite de parafina (50% v/v) durante siete horas.	99
Tabla III.14. Respuestas brutas de <i>C. welensii</i> frente al control y al estímulo estándar, según sexo y tipo de solvente.	100
Tabla III.15. Respuestas medias por sexo y tipo de solvente en <i>C. welensii</i> , obtenidas a partir de las respuestas brutas medias por insecto para series de siete a nueve estimulaciones frente al compuesto estándar.	101
Tabla III.16. Pruebas de los efectos inter-sujetos de los factores sexo y tipo de solvente, así como de la respuesta a la inyección control, sobre las respuestas brutas de <i>C. welensii</i> frente al estándar.	102
Tabla III.17. Estadísticos descriptivos de la respuesta de <i>C. welensii</i> frente al control y frente a la inyección en blanco.	102
Tabla III.18. Estadísticos descriptivos para la respuesta bruta media (series de tres estimulaciones por cada insecto), así como la respuesta al control, en <i>C. welensii</i>	103
Tabla III.19. Pruebas de los efectos inter-sujetos de los factores sexo y tipo de solvente sobre la respuesta neta de EAG de <i>C. welensii</i>	104
Tabla III.20. Prueba de Kruskal-Wallis de contraste de respuestas netas medias en <i>C. welensii</i> para cada grupo de ejemplares y para el conjunto (medias por individuo obtenidas a partir de siete a nueve estimulaciones).	104
Tabla III.21. Matriz de correlaciones (R_{Pearson}) para la respuesta neta media de EAG, transformada por la función raíz cuadrada, y los 12 parámetros potencialmente influyentes en la variabilidad de respuestas entre individuos de <i>C. welensii</i>	105
Tabla III.22. Resumen de los modelos de regresión lineal para las variables significativamente correlacionadas con la respuesta de EAG de <i>C. welensii</i>	105
Tabla III.23. Resumen de la comparación de respuestas netas medias de <i>C. welensii</i> entre conglomerados de individuos definidos por las variables diámetro del capilar, amplitud de la línea base, demora en el estudio de EAG tras la captura y relación peso/ longitud.	106
Tabla III.24. Caracterización de los conglomerados de individuos de <i>C. welensii</i> formados a partir del diámetro del capilar de referencia empleado en el estudio de EAG.	106
Tabla III.25. Caracterización de los conglomerados de individuos de <i>C. welensii</i> formados a partir de la amplitud de la línea base de la preparación para estudio de EAG.	107
Tabla III.26. Caracterización de los conglomerados de individuos de <i>C. welensii</i> formados a partir del tiempo transcurrido entre su captura y el estudio de EAG.	107
Tabla III.27. Modelos de regresión lineal multivariable significativos para la respuesta de <i>C. welensii</i> , a partir de varias combinaciones de variables.	107
Tabla III.28. Contraste de respuestas netas medias correspondientes a distintos agrupamientos de individuos de <i>C. welensii</i> , definidos a partir de combinaciones de las variables diámetro del capilar, amplitud de la línea base, temperatura, peso, demora del estudio de EAG tras la captura (en días) y días de supervivencia tras el estudio de EAG.	108
Tabla III.29. Agrupamiento de los individuos de <i>C. welensii</i> en función de su respuesta neta de EAG, capturados en período de vuelo y estudiados con capilares de diámetro inferior a 170 micras en el electrodo de referencia.	109

Tabla III.30. Respuestas brutas de <i>P. germari</i> frente al control y al estímulo estándar, según sexos y tipo de solvente.....	109
Tabla III.31. Respuestas medias por sexo y tipo de solvente en <i>P. germari</i> , obtenidas a partir de las respuestas brutas medias por insecto para series de siete a nueve estimulaciones frente al compuesto estándar.....	110
Tabla III.32. Pruebas de los efectos inter-sujetos de los factores sexo y tipo de solvente, así como de la respuesta a la inyección control, sobre las respuestas brutas de <i>P. germari</i> frente al estándar.....	111
Tabla III.33. Estadísticos descriptivos de la respuesta de <i>P. germari</i> frente al control y frente a la inyección en blanco.....	111
Tabla III.34. Estadísticos descriptivos para la respuesta bruta media (series de tres estimulaciones por cada insecto), así como la respuesta al control, en <i>P. germari</i>	112
Tabla III.35. Clasificación en conglomerados de los machos de <i>P. germari</i> según su respuesta neta de EAG (series de siete a nueve estimulaciones).....	112
Tabla III.36. Matriz de correlaciones (R_{Pearson}) para la respuesta neta de EAG (transformada) y los 12 parámetros potencialmente influyentes en la variabilidad de respuestas entre individuos de <i>P. germari</i>	113
Tabla III.37. Resumen del modelo de regresión lineal entre las variables <i>Ancho</i> y respuesta de EAG de <i>P. germari</i> (transformada por la función raíz cuadrada).....	114
Tabla III.38. Caracterización de los conglomerados de individuos de <i>P. germari</i> formados a partir de la anchura del pronoto.....	114
Tabla III.39. Coeficientes del modelo de regresión lineal en <i>P. germari</i> para la respuesta de EAG frente a las variables independientes <i>Ancho</i> , <i>An_P</i> y <i>Li_bas</i>	115
Tabla III.40. Estadísticos de resumen del modelo regresión lineal en <i>P. germari</i> para la respuesta de EAG frente a las variables independientes <i>Ancho</i> , <i>An_P</i> y <i>Li_bas</i>	115
Tabla III.41. Contraste de respuestas netas medias correspondientes a distintos agrupamientos de individuos de <i>P. germari</i> , definidos a partir de combinaciones de las variables amplitud de línea base, anchura del pronoto y relación peso/anchura del pronoto.....	115
Tabla IV.1. Principales isoprenoides foliares de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>	129
Tabla IV.2. Características de las sustancias presentadas como estímulos olfativos a <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i>	137
Tabla IV.3. Estadísticos descriptivos de las respuestas brutas relativas de <i>C. welensii</i> frente al abanico de compuestos estudiado.....	142
Tabla IV.4. Pruebas de contraste de medias entre las respuestas brutas relativas de <i>C. welensii</i> frente a cada compuesto y la provocada por la inyección control.....	143
Tabla IV.5. Caracterización de los conglomerados formados con las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en <i>C. welensii</i>	145
Tabla IV.6. Conglomerados de pertenencia para las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en <i>C. welensii</i>	146
Tabla IV.7. Matriz de correlaciones ($R=R_{\text{Spearman}}$) entre compuestos que provocaron respuestas diferentes significativamente al control en <i>C. welensii</i>	147
Tabla IV.9. Estadísticos descriptivos de las respuestas brutas relativas de los machos de <i>P. germari</i> frente al abanico de compuestos estudiado.....	149

Tabla IV.10. Pruebas de contraste de medias entre la respuesta de <i>P. germari</i> frente a cada compuesto y la provocada por la inyección control.	150
Tabla IV.11. Caracterización de los conglomerados formados con las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en <i>P. germari</i>	152
Tabla IV.12. Conglomerados de pertenencia para las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en <i>P. germari</i> . Las flechas ligan la distinta ubicación de un mismo compuesto.	153
Tabla IV.13. Matriz de correlaciones ($R=R_{\text{Spearman}}$) entre los compuestos que provocaron respuestas significativamente diferentes al control en <i>P. germari</i>	154
Tabla IV.14. Concentraciones (v/v en hexano) de cineol, β -pineno, (<i>E</i>)-2-hexenal y trementina, frente a las cuales distintos porcentajes de población de <i>C. welensii</i> (50, 75 y 90%) presentan respuestas de EAG superiores al umbral de detección de 20 microvoltios.	156
Tabla IV.15. Concentraciones (v/v en hexano) de cineol, β -pineno, (<i>E</i>)-2-hexenal y trementina, frente a las cuales distintos porcentajes de población de <i>P. germari</i> (50, 75 y 90%) presentan respuestas de EAG superiores al umbral de detección de 20 microvoltios.	158
Tabla IV.16. Clasificación ordinal comparada entre las respuestas relativas de EAG de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> frente a sus principales estimulantes, y la encontrada para los mismos en <i>Phoracantha semipunctata</i> y <i>Otiobrychus sulcatus</i>	159
Tabla IV.17. Tasas superiores de emisión de isopreno y global de monoterpenos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco $\cdot\text{h}^{-1}$) para los principales hospedantes de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> (<i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>), otros hospedantes secundarios así como especies no hospedantes.	160
Tabla IV.18. Tasas de emisión comparadas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco $\cdot\text{h}^{-1}$) de α -pineno y β -pineno para diferentes especies hospedantes y no hospedantes de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i>	161
Tabla IV.19. Emisión de α -pineno y β -pineno estimada para un ejemplar de <i>Q. ilex</i> en función de su tamaño.	162
Tabla IV.20. Comparación de la vida media de algunos monoterpenos emitidos por <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i> y que provocaron respuesta de EAG en <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i>	165
Tabla IV.21. Tipo de respuesta y estructura química de las sustancias implicadas en las correlaciones significativas entre las respuestas provocadas en <i>C. welensii</i>	169
Tabla IV.22. Tipo de respuesta y estructura química de las sustancias implicadas en las correlaciones significativas entre las respuestas provocadas en <i>P. germari</i>	170
Tabla IV.23. Volátiles secundarios de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i> y/o de no hospedantes que provocan altas respuestas, o cuyas respuestas están implicadas en correlaciones significativas.	171

Índice de figuras

Figura I.1. Detalle de la pubescencia plantar de los tarsos posteriores en <i>C. cerdo</i> (a) y <i>C. welensii</i> (b).....	9
Figura I.2. Detalle de la morfología del segundo artejo de las antenas de <i>C. miles</i> , <i>C. cerdo</i> y <i>C. welensii</i>	9
Figura I.3. Macho de <i>Cerambyx welensii</i> (a) y pareja de <i>Prinobius germari</i> (b).....	10
Figura I.4. Orificios de cerambícidos presentes en rodajas de alcornoque. a) rodaja 1; b) rodaja 2.	13
Figura I.5. Histograma correspondiente a los diámetros menores de los orificios presentes en las rodajas 1 y 2.....	13
Figura I.6. Segmento de una antena mostrando diversos <i>sensilla</i> (a) e ilustración de un segmento de cutícula con varios tipos de <i>sensilla</i> (b): <i>trichodea</i> (1), <i>coeloconica</i> (2), <i>ampullacea</i> (3), <i>campaniformia</i> (4) y <i>placodea</i> (5)....	27
Figura I.7. Diagrama de un receptor olfativo (<i>sensillum</i>) típico de insectos	27
Figura I.8. Detalle de la antena de un macho de <i>P. germari</i> , mostrando dos tipos de <i>sensilla</i> : <i>chaetica</i> o <i>trichodea</i> ? (a) y <i>basiconica</i> o <i>coeloconica</i> ? (b); y las depresiones presentes a lo largo de la misma (c).	29
Figura I.9. Detalle de la antena de una hembra de <i>C. welensii</i> , mostrando la abundancia de <i>sensilla</i> abatidas- <i>basiconica</i> o <i>coeloconica</i> ?- que recubren sus artejos (a), la flecha señala <i>sensilla chaetica</i> ?; y depresiones asociadas posiblemente a las <i>sensilla</i> abatidas (b).	29
Figura I.10. Ilustración comparativa de las técnicas de EAG y SCR aplicadas a escolítidos	31
Figura II.1. Esquema de montaje del dispositivo de generación, regulación y aplicación de estímulos.	53
Figura II.2. Electroválvula conectada a pipeta Pasteur.	55
Figura II.3. Detalle de pipeta Pasteur preparada.	55
Figura II.4. Dispositivo para la preparación de insectos.....	58
Figura II.5. Colocación del electrodo de referencia.....	58
Figura II.6. A) evolución de la línea base y las respuestas de <i>C. welensii</i> frente a estimulaciones sucesivas cada 30 segundos [(E)-2-hexenal 50% en aceite de parafina]), durante un ciclo completo carga-recarga del compresor. B) fluctuación media de los caudales “principal” y “de inyección” suministrados por el compresor, a partir de tres ciclos seguidos fin de carga (T=0) <-> reinicio de carga (T=270.....	62
Figura II.7. Respuestas de <i>C. welensii</i> frente a inyecciones sucesivas con 20 µl de (E)-2-hexenal 50% (v/v) en aceite de parafina, automatizadas cada 9 segundos.....	63
Figura II.8. Respuestas del mismo ejemplar de <i>P. germari</i> frente a 20 µl de trementina al 50% (v/v) en aceite de parafina, aplicados mediante dos procedimientos: a) inyección manual de 10 ml de aire con jeringa; b) inyección automatizada (0,5 l/min durante 0,3 s; equivalentes a ≈2,5 ml). La circunferencia enmarca los valores del potencial negativo máximo (440 µV en el primer caso y 400 µV en el caso automatizado) resultante de la estimulación, así como el tiempo que tarda en ser alcanzado (milisegundos), tal y como son mostrados por la herramienta de medición del programa AutoSpike..	63
Figura II.9. Ejemplares de <i>Prinobius germari</i> (a) y <i>Phoracantha semipunctata</i> (b) preparados para la electroantenografía.	64
Figura II.10. Distintas apariencias de la línea base en una preparación de <i>P. germari</i> : a) colocación defectuosa de los electrodos; b) colocación correcta, sin emplear alfombrilla anti-estática; c) colocación correcta, empleando alfombrilla anti-estática.....	65

Figura II.11. Respuestas de EAG frente al (<i>E</i>)-2-hexenal en aceite de parafina (20 µl al 50%, v/v) y a la inyección control (fila inferior), de un macho (a) y una hembra (b) de <i>C. welensii</i> ; un macho de <i>P. germari</i> (c) y un macho de <i>P. semipunctata</i> (d).....	66
Figura II.12. Respuestas típicas de EAG de <i>C. welensii</i> frente al ácido acético (a), (<i>E</i>)-2-hexenal (b) y trementina (c).	67
Figura II.13. Respuesta de EAG de <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i> frente al (<i>E</i>)-2-hexenal, ácido acético y trementina en mezclas al 1:1 (v/v) con aceite de parafina.	68
Figura III.1. Respuestas netas de EAG de <i>C. welensii</i> para distintas concentraciones de la mezcla estimulante (20 µl de (<i>E</i>)-2-hexenal en hexano).....	91
Figura III.2. Respuestas netas de EAG de <i>P. germari</i> para distintas concentraciones de la mezcla estimulante (20 µl de trementina en hexano).....	92
Figura III.3. Variación de la respuesta neta de <i>C. welensii</i> frente a (<i>E</i>)-2-hexenal (50% v/v en aceite de parafina o hexano) aplicado en distintas cantidades.	93
Figura III.4. Variación de la respuesta neta de <i>P. germari</i> frente a trementina (50% v/v en aceite de parafina) aplicado en distintas cantidades.....	93
Figura III.5. Variación de la respuesta relativa de <i>C. welensii</i> frente a estimulaciones sucesivas a distintas frecuencias.	95
Figura III.6. Variación de la respuesta relativa de <i>P. germari</i> frente a estimulaciones sucesivas a distintas frecuencias.	97
Figura III.7. Variación de la respuesta relativa frente a (<i>E</i>)-2-hexenal en aceite de parafina (50% v/v) de <i>C. welensii</i> durante cinco horas.	98
Figura III.8. Variación de la respuesta relativa frente a la trementina en aceite de parafina (50% v/v) de <i>P. germari</i> durante cinco horas.....	99
Figura III.9. Respuestas brutas medias frente a las desviaciones típicas en machos (círculo) y hembras (triángulo) de <i>C. welensii</i>	101
Figura III.10. Dispersión de las respuestas brutas medias de <i>C. welensii</i> ante el estándar frente a las respuestas provocadas por la inyección control.	103
Figura III.11. Respuestas brutas medias frente a las desviaciones típicas en machos (círculo) y hembras (triángulo) de <i>P. germari</i>	110
Figura III.12. Dispersión de las respuestas brutas medias de machos (círculos) y hembras (triángulos) de <i>P. germari</i> ante el estándar frente a las provocadas por la inyección control, para los dos tipos de solvente.	112
Figura III.13. Variación de la repuesta de EAG de <i>C. welensii</i> (a) y <i>P. germari</i> (b) en función de las cantidades de compuesto estimulante (estándar) realmente aplicadas en cada inyección.....	117
Figura IV.1. Variación nocturna de la tasa de emisión global: a) de terpenos; b) de α pineno , β-pineno y mirceno en <i>Q. ilex</i> ; c) relación entre la emisión nocturna de terpenos y la temperatura para <i>Q. ilex</i> y <i>Q. coccifera</i>	130
Figura IV.2. Estructura química de algunas de las sustancias presentadas como estímulos olfativos a <i>C. welensii</i> y <i>P. germari</i>	138
Figura IV.3. Respuestas brutas relativas frente a (<i>E</i>)-2-hexenal de <i>C. welensii</i> para los compuestos que se distinguieron del control.....	144

Figura IV.4. Respuestas brutas relativas frente a la trementina de <i>P. germari</i> para el conjunto de los individuos, los machos y las hembras frente a los compuestos que se distinguieron del control.	151
Figura IV.5. Relación dosis-respuesta para la estimulación relativa media (\pm 95% intervalo de confianza, n=4-5) provocada en <i>Cerambyx welensii</i> por cineol, β -pineno, (<i>E</i>)-2 hexenal y trementina. Estímulo estándar: (<i>E</i>)-2 hexenal 1:1 (v/v) en hexano.....	155
Figura IV.6. Relación dosis-respuesta en <i>P. germari</i> , con intervalo de confianza al 95%, frente al cineol, α -pineno, trementina y β -pineno.....	157
Figura IV.7. Detalle de la representación logarítmica, entre las concentraciones 1:100 y 1:1, de la relación dosis-respuesta para el β -pineno y el α -pineno en <i>C. welensii</i>	163
Figura IV.8. Respuesta relativa de EAG comparada de cinco ejemplares de <i>P. germari</i> frente a (<i>E</i>)-2-hexenal y (+)- α -pineno.....	173

Resumen

La acción de los cerambícidos xilófagos, principalmente los géneros *Cerambyx* y *Prinobius*, constituye un factor desencadenante y/o agravante en el problema de la “seca” del género *Quercus* en nuestro país. A pesar de ello, se desconoce la importancia real del papel que desempeñan en el decaimiento de aquellas formaciones forestales donde la encina y el alcornoque aparecen como especies dominantes, en especial las dehesas y los alcornoques. A este desconocimiento contribuyen, en parte, los hábitos de comportamiento de estos insectos, lo que ha dificultado el planteamiento de estudios rigurosos acerca de dos aspectos interesantes y relacionados: el mecanismo de selección de hospedantes y las posibilidades de control de sus poblaciones.

La recopilación y análisis de la información sobre la incidencia y posibilidad de control de los cerambícidos xilófagos de alcornoques y encinas, así como de otros insectos con parecida actividad, se aborda en el capítulo I de esta Tesis. Dos especies con hábitos y apariencia similares -*Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean- se perfilan como los principales cerambícidos xilófagos en Andalucía Occidental. Por otro lado, se recogen variadas evidencias sobre la relevancia de la información química interespecífica (compuestos semioquímicos) en la selección de hospedantes por parte de los insectos, particularmente los cerambícidos. La electrofisiología de estímulos olfativos proporciona valiosa información sobre este tipo de interacciones insecto-planta; una de las técnicas electrofisiológicas, la electroantenografía (EAG) constituye la primera aproximación a dichos estudios.

En este contexto, los estudios desarrollados han perseguido los siguientes objetivos: a) establecer un dispositivo adecuado para el estudio electroantegráfico de estímulos olfativos para cerambícidos, y determinar la aptitud para los estudios de EAG de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean; b) estudiar los efectos de algunos factores experimentales, sobre la respuesta de EAG de las dos especies citadas; c) analizar la influencia sobre la respuesta de EAG del sexo, así como de algunas características de los individuos; y d) estudiar la respuesta de EAG de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean frente a compuestos volátiles característicos de especies arbóreas hospedantes y no hospedantes.

En el capítulo II se analiza la idoneidad del dispositivo propuesto para el estudio de la respuesta electroantegráfica de EAG en cerambícidos. Las primeras pruebas revelan la aptitud de ambas especies para estos estudios, y permiten la selección de algunos compuestos como “estímulo estándar” [(*E*)-2-hexenal para *C. welensii* y esencia de trementina para *P. germari*].

El análisis de la estimulación originada por estos compuestos permite profundizar en el conocimiento del comportamiento olfativo de estos insectos.

En el capítulo III se estudia el efecto de ciertos factores experimentales sobre la respuesta de EAG (cantidad y concentración de estímulos, frecuencia de estimulación, duración de la preparación); así como algunos aspectos vinculados con la variación de respuestas entre sexos e individuos. Entre los aspectos experimentales, destacamos que para ambas especies resultaron adecuadas mezclas estimulantes de 20 microlitros a concentraciones del 50% (v/v), resultando el hexano y el aceite de parafina válidos como solventes. Frecuencias de estimulación altas (15 segundos) resultaron adecuadas; pero en ciertos casos, como el estudio de la respuesta frente a un abanico de compuestos volátiles de capacidad estimulante desconocida o ante compuestos que provoquen respuestas superiores a dos milivoltios, se consideran más adecuadas frecuencias de un minuto. En estas condiciones, la duración de una preparación con insectos de cualquiera de las dos especies, sin merma significativa en la respuesta, resultó ser de, al menos, cinco horas.

En los dos insectos se encontraron diferencias de respuesta entre ejemplares altamente significativas. En *C. welensii* no hubo diferencias entre sexos, no pudiéndose concluir nada al respecto en *P. germari* por el bajo número de hembras estudiadas. Aspectos experimentales, como el diámetro del capilar de referencia y amplitud de la línea base, así como el estado fisiológico de los individuos, explicaron hasta en un 68% la variabilidad de respuestas entre individuos en *C. welensii*. En cambio, esta variabilidad no se pudo explicar claramente en *P. germari* a partir de parámetros experimentales, ni anatómicos ni fisiológicos.

En el capítulo IV se analiza la respuesta comparada de ambas especies frente a un abanico de 33 sustancias volátiles, sobre todo terpenoides y “volátiles de hojas verdes” (GLV, de *Green Leaf Volatiles*). Este abanico incluyó sustancias de probada emisión por las principales especies hospedantes (*Q. ilex* y *Q. suber*), y otras que podrían caracterizar especies no hospedantes. Veinte sustancias provocaron respuestas significativamente diferentes al control en *C. welensii*, de las cuales nueve provocaron respuestas altas (respuesta relativa al estándar >80%). En *P. germari*, 16 sustancias provocaron estimulaciones significativas, encontrándose respuestas altas para seis de ellas. Se encontró que las dos especies detectan claramente cuatro de las cinco sustancias emitidas en mayor cantidad por las dos principales quercíneas hospedantes; dos de ellas (α -pineno y β -pineno) con respuestas relativas elevadas, y otras dos (isómeros del mirceno y limoneno) con respuestas más discretas.

La percepción de estos compuestos, en combinación con otros considerados secundarios en las emisiones de encina, y posiblemente del alcornoque, (como el α -felandreno), podría suponer una discriminación positiva de cara a la selección de ambas fagáceas como principales hospedantes de ambos cerambícidos. Por otra parte, se analizó la relevancia de la detección de sustancias tales como el cineol, el p-cimeno, la esencia de trementina y el (E)-2-hexenal, y la posibilidad de que tal detección contribuya a una discriminación negativa de especies no hospedantes para ambas especies.

Los pielrojas de mejor olfato parece ser que eran los cheyennes y daban la presencia del rostro pálido, con viento favorable, a una milla larga de distancia. El rostro pálido olía a sudor de cuervo. Esto es importante, porque es la primera noticia de que los cuervos suden.

-Álvaro Cunqueiro-

Capítulo I

Contexto, introducción y objetivos

I.1. Contexto de los trabajos

La “seca” de los *Quercus* es uno de los problemas fitosanitarios más importantes en España, ya que compromete la estabilidad y persistencia de ecosistemas tan importantes en el ámbito mediterráneo como son las dehesas y los alcornocales (Sánchez *et al.* 2000). La hipótesis más aceptada inicialmente sobre la posible etiología del problema lo consideraba como un caso de decaimiento, producido por la interacción de una serie de factores bióticos y/o abióticos intercambiables cuya acción ordenada sobre una planta conduce al deterioro gradual de su estado fisiológico, y a menudo termina con su muerte (Manion 1991). Recientes estudios han permitido matizar más este enfoque, permitiendo atribuir en determinadas zonas (como es el caso de Andalucía) la causa del problema a ciertos factores más o menos concretos, en lugar de la hipótesis de participación conjunta considerada en un principio (Navarro *et al.* 2004).

Entre los factores que Manion estableció como participantes en la seca (de predisposición, desencadenantes y agravantes; según la terminología de Muñoz *et al.* 1996), se considera que los insectos “perforadores” podrían actuar como desencadenantes y/o agravantes. Montoya (1992) apuntó ya la posible implicación de *Cerambyx cerdo* en el decaimiento del alcornocal de Mamora (Marruecos); esta misma especie fue considerada posteriormente como factor agravante directo (Muñoz *et al.* 1996; Sánchez *et al.* 2000). En la actualidad podemos considerar que los insectos perforadores más problemáticos para el género *Quercus* en España son los cerambícidos xilófagos de los géneros *Cerambyx* y *Prinobius* (López *et al.* 2004).

El intento de establecer las causas y posibles soluciones del problema de la seca ha obligado a no despreciar ninguno de los posibles factores participantes, lo cual ha conducido al estudio de la repercusión de los cerambícidos xilófagos. Si bien se ha considerado tradicionalmente que la acción de estos insectos se restringía a ejemplares arbóreos decadentes (Romanyk y Cadahía 1992), algunas observaciones de campo en zonas de Extremadura y Andalucía Occidental hacen sospechar que la importancia de los daños podría trascender del estado de decadencia del arbolado.

En efecto, según recogen Romanyk y Cadahía (1992) y puede comprobarse fácilmente en el campo, el régimen de alimentación xilófago de este tipo de insectos causa grandes destrucciones en el leño de los árboles atacados, que facilitan roturas bajo la acción del

viento o del propio peso de las ramas. Junto a esta acción directa es interesante considerar la posible acción indirecta, ya que su actividad podría facilitar la dispersión de diversas patologías, en particular el “chancro carbonoso” debido al hongo *Biscogniauxia mediterranea* o el chancro causado por *Botryosphaeria corticola*; junto con otras especies fúngicas causantes de pudriciones del leño (*Fomes* spp.; *Stereum* spp.).

Aunque la repercusión de este tipo de insectos en la vitalidad del arbolado ha sido abordada en diversos trabajos (Moral *et al.* 1989, 1993 y 1994; Moral 1994; Morcuende y Naveiro 1993; Naveiro y Morcuende 1994), continúa sin estar bien establecida su capacidad para erigirse como factores de incidencia primaria sobre las formaciones del género *Quercus*. A ello han contribuido los hábitos de comportamiento de estos insectos, junto con su aparente preferencia por el arbolado decrepito o debilitado. De esta manera, no han sido abordados hasta la fecha estudios precisos acerca de aspectos tales como los factores que condicionan la selección de hospedantes potenciales, en particular arbolado joven y/o aparentemente sano, y las posibilidades de control de sus poblaciones.

Investigaciones recientes revelan que uno de los aspectos de mayor interés en relación con la ecología de este tipo de insectos, y que resulta de aplicación al control de poblaciones, lo constituye la orientación olfativa a partir de estímulos químicos (Ikeda *et al.* 1993; Meurer y Tavakilian 1997; Hanks *et al.* 1998; Berkov *et al.* 2000; McIntosh *et al.* 2001; Suckling *et al.* 2001; Groot y Nott 2001; Barata *et al.* 1992, 2000 y 2002; Allison *et al.* 2004). Por lo tanto, una estrategia de control integrado de poblaciones de cerambícidos con semejantes hábitos debería considerar, como un pilar básico, el estudio de la repercusión de los compuestos semioquímicos.

Esta línea abre nuevas perspectivas para una situación que se encontraba estancada: el conocimiento de las pautas que rigen la localización de ejemplares arbóreos adecuados por parte de estos insectos. Las técnicas de electrofisiología de estímulos olfativos en insectos constituyen una valiosa herramienta, ampliamente utilizada para abordar este tipo de estudios (Wibe 2004); entre ellas, la electroantenografía (EAG) resulta la técnica básica. Aunque la electroantenografía ha sido empleada con éxito tradicionalmente para la identificación de feromonas, su utilización en la identificación de volátiles de plantas que condicionen el comportamiento de los insectos, en aspectos tales como la atracción, se ha generalizado recientemente (Park *et al.* 2002).

I.2. Introducción

I.2.1. Los coleópteros de la familia Cerambycidae asociados a encinas y alcornoques en Andalucía

I.2.1.1. Los cerambícidos asociados a encinas y alcornoques

La familia Cerambycidae se incluye dentro de la superfamilia Chrysomeloidea (Coleoptera, Polyphaga) juntamente con las familias Chrysomelidae, Megalopodidae y Orsodacnidae, siendo una de las que cuenta con mayor número de especies catalogadas -más de 25.000 según Vives (2001), más de 35.000 según Hanks (1999)-. Esta familia engloba 13 subfamilias, de las que siete están representadas en la fauna íbero-balear (Prioninae, Cerambycinae, Spondylinae, Necydalinae, Lepturinae, Vesperinae y Lamiinae), comprendiendo 45 tribus, 107 géneros distintos y un total de 261 especies, entre las cuales 55 son endémicas de nuestra fauna (Vives 2001).

Una referencia esencial de cara a establecer un abanico de cerambícidos potencialmente asociables en Andalucía a *Quercus ilex* y *Quercus suber*, lo constituyen los recientes trabajos de Vives (2000). Según este autor, encontraríamos 108 especies que pueden tener como huésped potencial alguna especie del género *Quercus*. Exceptuando de tan extenso listado las especies consideradas propias de la mitad norte peninsular, éste se reduce a 41, y si nos atrevemos a descontar también las clasificadas como raras y aquellas cuya presencia sobre el género *Quercus* se considere esporádica, nos quedaríamos con unas 28 especies (de las cuales dos se considerarían más o menos restringidas a la encina, y una al alcornoque).

Las cifras especulativas mencionadas a propósito de los trabajos de Vives (2000) constituyen una aproximación; si bien, hay que tener presente que tales consideraciones pueden enmascarar la presencia real de ciertas especies. Un ejemplo claro de esta cuestión lo constituye la especie *Xylotrechus antilope* Schönherr. Este insecto es considerado por Vives bastante raro y localizado en los bosques húmedos de la mitad septentrional de la península Ibérica; en cambio, ha sido citado en Huelva (Barreda 2001) -provincia en la que lo hemos encontrado sobre ramas finas de alcornoque-, y en Cádiz sobre *Q. suber* (Verdugo y Coello 2003). Algo similar ocurre con las especies *Cerambyx scopoli* Füssly y *Cerambyx welensii* Küster.

Por otra parte, el número total de especies que se han citado, hasta la fecha, sobre *Quercus* en Andalucía asciende a 22 (Ruiz 1997; Pérez-López y Hernández-Ruiz 1998; Verdugo 2000; Verdugo y López 2001; Verdugo y Coello 2003; y Verdugo y Pérez-López 2004). La comparación entre el listado deducido a partir de Vives (2000) y el listado de especies presentes realmente, depara un número de 13 especies que no han sido citadas aún pero su presencia es posible en esta región. En la tabla I.1 se exponen de manera comparativa ambos listados; en el correspondiente a las especies cuya presencia es posible según lo recogido por Vives (2000), sólo aparecen reflejadas las que no han sido realmente citadas en Andalucía.

Tabla I.1. Cerambícidos citados sobre *Quercus* en Andalucía (Ruiz 1997; Pérez-López y Hernández-Ruiz 1998; Verdugo 2000; Verdugo y López 2001; Llinares 2002; Verdugo y Coello 2003; Verdugo y Pérez-López 2004), y otros no citados aún, pero de posible presencia (Vives 2000).

Citadas en Andalucía		Presencia posible en Andalucía*
Prioninae	Lepturinae	Cerambycinae
<i>Prionobius germari</i> (Dejean, 1835)	<i>Stenocorus meridianus</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Cerambyx cerdo</i> Linnaeus, 1758
Spondyliinae	<i>Stenocorus quercus</i> (Goeze, 1783)	<i>Gracilia minuta</i> (Fabricius, 1781)
<i>Alocerus moesiacus</i> (Frivaldsky, 1838)	<i>Grammoptera ruficornis</i> (Fabricius, 1781)	<i>Trichopherus fasciculatus</i> (Falderman, 1837)
Cerambycinae	<i>Pseudovadonia livida</i> (Fabricius, 1777)	<i>Nathrius brevipennis</i> (Mulsant, 1839)
<i>Cerambyx miles</i> Bonelli, 1823	<i>Melanoleptura scutellata</i> (Fabricius, 1781)	<i>Hylotropes bajulus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Cerambyx scopoli</i> Füssly, 1775	<i>Nustera distigma</i> (Charpentier, 1825)	<i>Xylotrechus arvicola</i> (Olivier, 1795)
<i>Cerambyx welensii</i> (Küster, 1846)	Lamiinae	<i>Plagionotus arquatus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Purpuricenus budensis</i> (Goeze, 1783)	<i>Aegomorphus varius</i> (Fabricius, 1787)	<i>Plagionotus detritus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Calchaenesthes sexmaculata</i> (Reiche, 1861)	<i>Anaesthetis testacea</i> (Fabricius, 1781)	* <i>Clytus rhamni bellieri</i> (Germar, 1817)
<i>Phymatodes testaceus</i> (Linnaeus, 1758)		* <i>Chlorophorus sartor</i> (Müller, 1766)
<i>Poecilium alni</i> (Linnaeus, 1758)		Lepturinae
<i>Poecilium lividum</i> (Rossi, 1794)		* <i>Aredolpona trisignata</i> (Fairmaire, 1852)
<i>Poecilium pusillum</i> (Fabricius, 1787)		* <i>Grammoptera ustulata</i> (Schaller, 1783)
<i>Xylotrechus antilope</i> (Schönherr, 1817)		Lamiinae
<i>Chlorophorus ruficornis</i> (Olivier, 1795)		* <i>Deroptia genei</i> (Aragona, 1830)
<i>Chlorophorus trifasciatus</i> (Fabricius, 1781)		

(*). Posible presencia como especie "relativamente frecuente", salvo las marcadas con (*), que serían "poco frecuentes o raras".

I.2.1.2. Cerambícidos xilófagos de encinas y alcornoques

Los insectos

La dieta de los cerambícidos es exclusivamente fitófaga, ya que las larvas atacan al leño de los árboles, también a los tallos secos de algunas plantas herbáceas o incluso pueden alimentarse de las raíces de diversos vegetales (Vives 2001). También sucede que las larvas se alimentan de distintos tejidos de los órganos a medida que se desarrollan. De esta manera se comporta la larva de *Cerambyx cerdo* durante los 3 ó 4 años que dura su desarrollo, alimentándose primero de la corteza viva para después penetrar hacia la albura y duramen, haciendo túneles horizontales y verticales (Nenadovic *et al.* 1999).

Es común considerar la xilofagia en sentido amplio (abarcando incluso a los tejidos corticales). Hanks (1999) mantiene que la mayor parte de xilófagos se restringen a los tejidos subcorticales, mientras que unas pocas especies comen dentro del xilema secundario. La distinta composición química a medida que se profundiza en el xilema, así como la presencia o no de celulasas en los jugos gástricos del animal, son las principales razones de la localización de las diversas especies. De esta forma las larvas que carecen de celulasas deben desarrollarse en el floema o en zonas marginales exteriores, ricas en almidón, azúcares soluble y proteínas; mientras que las que segregan estas enzimas, como es el caso del género *Cerambyx*, pueden vivir en el leño vivo o no descompuesto, y así se las encuentra en el duramen, escaso en azúcares solubles y almidón (Compte y Caminero 1982).

Las especies propiamente xilófagas se desarrollan en el leño o xilema, tanto en el duramen como en la albura según la especie en particular. Dada la escasa calidad nutritiva de estos tejidos, gran número de xilófagos estrictos poseen en sus aparatos digestivos simbioses que les ayudan a asimilar los diversos componentes del leño, además de aportar en ciertos casos nuevas sustancias sintetizadas, por ejemplo vitaminas (Compte y Caminero 1982). La calidad nutritiva de la madera muerta puede ser mejorada, también, por la proliferación de hifas fúngicas (Hanks 1999).

Según sea el vigor del hospedante, es frecuente denominar “xilófagas primarias” a las especies que viven a costa de árboles vivos y sanos, mientras que las “xilófagas secundarias” se desarrollan en árboles muertos o con vitalidad reducida (Compte y Caminero 1982). En la colonización por xilófagos primarios, la fase crítica sería el paso de las jóvenes larvas a través de los tejidos conductores subcorticales. El estado hídrico del árbol podría condicionar tal colonización, mediante el taponamiento de las galerías con gomas y otras exudaciones.

La mayor parte de los cerambícidos citados en la tabla I.1 pueden ser considerados xilófagos estrictos, tanto de tronco como de ramas. Las especies que son capaces de ocasionar daños mayores en estos órganos, dado el tamaño de sus larvas, son *Cerambyx cerdo*, *Cerambyx welensii*, *Prinobius germari*, *Cerambyx miles* y, en menor medida, *Cerambyx scopoli*. Algunas especies parecen ser típicas de ramas y ramillas: *Xylotrechus antilope*, *Purpuricenus budensis*, *Plagionotus arquatus*, *Chlorophorus ruficornis* y *Deroplia genei*. Por último, las especies *Clytus rhamni bellieri* y *Grammoptera ustulata* tienen actividad subcortical, mientras que *Pseudovadonia livida* se asocia a la madera en descomposición y, además, presenta hábitos micetófagos (Vives 2000). Ruiz (1997) cita la presencia en Andalucía de *Phymatodes testaceus* bajo la corteza en leñas de encina. La tabla I.2 muestra los cerambícidos xilófagos asociados a encinas según su vigor, en los alrededores de Madrid (Compte y Caminero 1982).

Tabla I.2. Cerambícidos xilófagos asociados a la encina en Madrid (Compte y Caminero 1982).

Encinas vivas	Encinas de escasa vitalidad o recién muertas	Troncos viejos muertos o cavidades de árboles vivos
<i>Cerambyx welensii</i>	<i>Pseudovadonia livida</i>	<i>Pseudovadonia livida</i>
	<i>Phymatodes testaceus</i>	<i>Aredolpona cordigera</i>
	<i>Xylotrechus arvicola</i>	<i>Aredolpona trisignata</i>
	<i>Chlorophorus ruficornis</i>	<i>Nustera distigma</i>
	<i>Cerambyx welensii</i>	<i>Stenurella melanura</i>
	<i>Corymbia fontenayi</i>	<i>Xylotrechus arvicola</i>
	<i>Aredolpona cordigera</i>	
	<i>Aredolpona trisignata</i>	
	<i>Stenurella nigra</i>	
	<i>Stenopterus rufus</i>	

Los grandes cerambícidos perforadores del leño de las encinas y alcornoques se corresponden taxonómicamente con cuatro especies diferentes. Tres de ellas pertenecen a la subfamilia *Cerambycinae*, tribu *Cerambycini*, y la cuarta pertenece a la subfamilia *Prioninae*, tribu *Prioniini*. Las especies de la tribu *Cerambycini* son: *Cerambyx cerdo* L., *C. welensii* Küster (\equiv *C. velutinus* Brull.) y *C. miles* Bonelli. El cuarto representante de la tribu en España -*C. scopoli*

Füessly- tiene un tamaño mucho menor, y ha sido citado muy recientemente en Andalucía (Verdugo y Pérez-López 2004). Las tres primeras especies, e incluso *C. scopoli*, presentan morfología y hábitos de comportamiento similares, lo que ha hecho muchas veces difícil su identificación correcta. Por otro lado, la especie *Prinobius germari* Dejean (\equiv *P. scutellaris* Germar) es la representante de la tribu *Prinobiini*. Este insecto presenta un aspecto similar - principalmente en los estados inmaduros- y una biología parecida a las anteriores especies, encontrándose con cierta frecuencia en alcornoques.

Mientras que *P. germari* se puede distinguir fácilmente de las otras especies, la distinción entre las cuatro del género *Cerambyx* plantea más dificultades. En relación con estas cuestiones, Fragoso (1985) propone el empleo de la terminalia (estructuras directamente relacionadas con la excreción, copulación y oviposición) como base para la clasificación de la familia Cerambycidae, ya que considera que tal clasificación debería reflejar en la medida de lo posible la filogenia de cada taxón. Dicha filogenia es consecuencia de la reproducción, por lo que la terminalia está más estrechamente relacionada con aquella que cualquier otro rasgo morfológico del exoesqueleto.

Es interesante mencionar, por último, que la presencia de grandes cerambícidos no es exclusiva de frondosas. Una especie emparentada con *P. germari* y que ocasiona el mismo tipo de daño en coníferas es *Ergates faber* L. (Cerambycidae; Prioninae) (Romanyk y Cadahía 1992; Notario *et al.* 1993; Vives 2000).

La problemática de la identificación

Un aspecto interesante respecto a la repercusión fitosanitaria de este grupo de insectos, es la consideración de cuáles son las principales especies implicadas en los daños sobre el arbolado. Aunque tradicionalmente se ha considerado a *Cerambyx cerdo* el principal cerambícido xilófago en estas especies arbóreas (Romanyk y Cadahía 1992; Moral 1994; Liñán 1998), la similitud apuntada anteriormente hace necesario el planteamiento de si estos insectos han sido correctamente identificados. Resaltaremos brevemente a continuación cuáles son los caracteres taxonómicos diferenciadores entre las cuatro especies del género *Cerambyx* (Bense 1995; Vives 2000):

- | |
|---|
| <p>1. Segundo artejo de las antenas casi tan largo como ancho. Ángulo sutural de los élitros claramente espinoso. Antenas de los machos mucho más largas que los élitros:</p> <p>-Élitros rugulosos chagrinados, fuertemente convexos, subcónicos hacia atrás, poco pilosos. Los dos primeros artejos de los tarsos posteriores con la pubescencia plantar separada por una línea media desnuda.<i>C. cerdo</i></p> <p>-Élitros finamente punteados, deprimidos en el disco, subparalelos, cubiertos de una pilosidad dorada y sedosa. Tan sólo el primer artejo de los tarsos posteriores con la pubescencia plantar dividida por una línea media desnuda.....<i>C. welensii</i></p> <p>2. Segundo artejo de las antenas claramente transversal. Ángulo sutural de los élitros sin espinas y redondeado. Antenas de los machos no alcanzan el ápice de los élitros, o bien lo sobrepasan levemente:</p> <p>-Antenas del macho sobrepasan el ápice elitral en dos o tres artejos. Élitros negros totalmente, sin tinte rojizo. Fémures posteriores de los machos alcanzan el ápice elitral.....<i>C. scopoli</i></p> <p>-Antenas del macho sobrepasan el ápice elitral como mucho en uno o dos artejos. Élitros con coloración castaña-rojiza. Fémures posteriores de los machos no alcanzan el ápice elitral..... <i>C. miles</i></p> |
|---|

Figura I.1. Detalle de la pubescencia plantar de los tarsos posteriores en *C. cerdo* (a) y *C. welensii* (b).

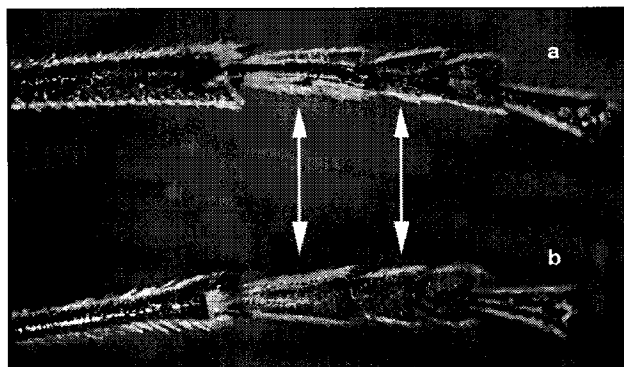
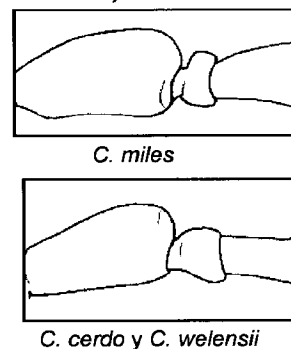


Figura I.2. Detalle de la morfología del segundo artejo de las antenas de *C. miles*, *C. cerdo* y *C. welensii* (Bense 1995).



Los caracteres diferenciadores de *C. miles* y *C. scopoli* los hacen fácilmente distinguibles de *C. cerdo* y *C. welensii*. Pero la distinción entre las dos últimas especies es más ambigua, porque la mayor parte de caracteres son susceptibles de interpretación subjetiva. A esta confusión puede contribuir, además, la variabilidad morfológica que pueden presentar estas especies. Como ejemplo, los trabajos de Starzyk y Strojny (1985) revelaron que en los machos de *C. cerdo* se podían distinguir hasta 23 tipos principales en la forma del pronoto (18 tipos en las hembras); dichos autores apuntan también que se encontró mucha variabilidad en el relieve de la superficie superior y en la forma del borde lateral del pronoto en *C. miles*.

De todos los caracteres, es precisamente el referente a la pubescencia de los tarsos posteriores (fig. I.1) el que creemos sirve para distinguir más fácilmente las dos especies conflictivas; así lo consideran también Vives (2001) y Moral (1994). Aún así, las dificultades de identificación han conducido a que algunos autores reagrupen funcionalmente las cuatro especies bajo la denominación de “grupo *Cerambyx cerdo*” (Moral *et al.* 1993; Moral 1994; Soria *et al.* 1996).

La similitud entre las especies del género *Cerambyx* entre sí, y entre éstas y *Prinobius germari* -aunque en menor medida-, así como la falta de estudios detallados, han hecho difícil atribuir a cada una de ellas su papel en la pérdida de vigor, e incluso la muerte, del arbolado de nuestros encinares y alcornocales. Las especies *C. miles* y *C. scopoli* serían las más raras de encontrar en Andalucía; la primera se circunscribe a la provincia de Cádiz (San Roque y Arcos de la Frontera (Vives 2000); mientras que *C. scopoli* se ha encontrado en la provincia de Granada (Verdugo y Pérez-López 2004). *C. welensii* se considera localizada en las zonas cálidas de la mitad septentrional de la península Ibérica -habiendo sido citada en Cádiz-; *C. cerdo* estaría, en cambio, presente por toda la península Ibérica. En cuanto a *P. germari*, se apunta que su localización coincide con el área de distribución del alcornoque, por lo cual debería resultar bastante frecuente en Andalucía Occidental. Llinares (2002) ha citado esta especie en la provincia de Córdoba, y la hemos encontrado, así mismo, en la provincia de Huelva.

Pero algunos trabajos en Extremadura arrojan resultados llamativamente distintos a lo que cabría esperar. Moral y colaboradores citan la presencia de *Cerambyx cerdo* en 1989. Años más tarde, Moral y colaboradores (1993) sólo encontraron un ejemplar de *C. cerdo* entre más de 200 individuos capturados. Después de examinar 14 ramas o troncos caídos, Naveiro y Morcuende (1994) encontraron 329 cerambícidos, de los cuales el 87% pertenecían a *C.*

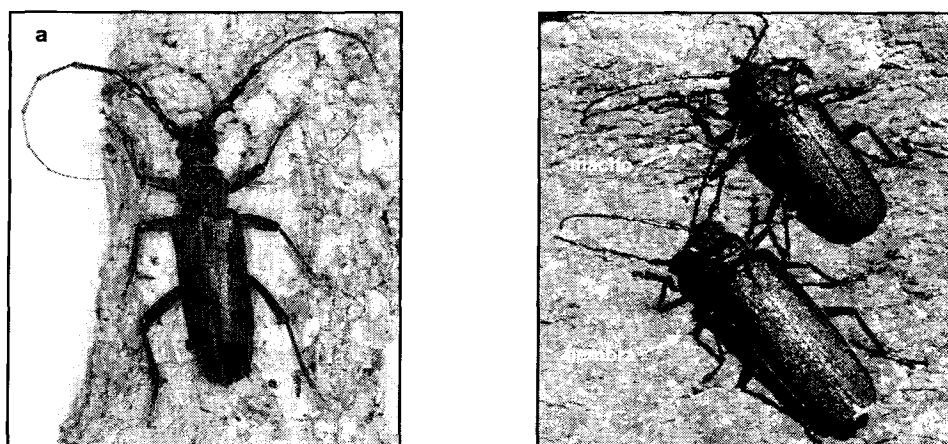
welensii y el resto a *P. germari*; y plantean la duda sobre la correcta identificación efectuada hasta el momento sobre *C. cerdo*, apuntando la posibilidad de que estas citas correspondieran realmente a *C. welensii*. Posteriores capturas mediante trampa de luz efectuadas en esta región (GEDES 1999; 2000; 2001) muestran igualmente la predominancia de *C. welensii* y *P. germari*, y la testimonial –incluso se podría decir que sospechosamente escasa– presencia de *C. cerdo*: un sólo ejemplar capturado en los tres años.

En lo que se refiere a Andalucía, los estudios de Soria y colaboradores (1996) en el Parque Natural de las Sierras Subbéticas (Córdoba) depararon indicios de la presencia (orificios) de *C. cerdo*, *C. welensii* y *P. germari* como principales cerambícidos perforadores de encina. Pero la discriminación entre las tres especies sin observar ejemplares adultos o larvas es prácticamente imposible. La identificación por nuestra parte de más de 600 adultos de *Cerambyx* spp. entre el otoño de 2001 y el otoño de 2002, procedentes de diversos puntos geográficos, principalmente de dos alcornoques en San Bartolomé de la Torre y Almonte (Huelva), pero también de diversos términos municipales extremeños (Alburquerque, Cheles, Monesterio, Jerez de los Caballeros, Coria y Mérida), reveló que todos ellos pertenecían a la especie *C. welensii*.

Por último, cabe indicar que la especie *P. germari* podría apuntar una presencia y relevancia mayor a la que se le ha otorgado hasta la fecha. En la primavera de 2001 identificamos unas 20 larvas procedentes de la campiña cordobesa, que resultaron pertenecer a esta especie. Así mismo, muestreos preliminares sobre alcornoque en el término municipal de Almonte, sobre árboles y tocones elegidos al azar, permitieron capturar algunas larvas que resultaron pertenecer a la especie mencionada; se detectaron, incluso, adultos muertos entre las grietas de la corteza en esta finca, y también en el suelo en la finca “La Jaretilla” del término municipal de Niebla. El número de ejemplares de esta especie capturados el verano de 2002 en Almonte, en la misma dehesa de alcornoque donde se hicieron las capturas de *C. welensii*, alcanzó los 200.

Aunque después de lo expuesto nuestro abanico se haya reducido prácticamente a las dos especies que parecen predominantes (*Cerambyx welensii* y *Prinobius germari*) (figura 1.3), hay una cuestión trascendente que conviene resaltar a la hora de plantear cualquier actividad que implique la captura y manipulación de ejemplares de estas especies –especialmente debido a la similitud morfológica reseñada–, y es que la especie *Cerambyx cerdo* goza de protección al amparo de diversas normativas nacionales e internacionales.

Figura 1.3. Macho de *Cerambyx welensii* (a) y pareja de *Prinobius germari* (b)



Respecto a la legislación comunitaria, dicha especie figura –tras la actualización de los anexos II y III en 1998– como “estrictamente protegida” en el anexo II del Convenio de Berna del 19 de septiembre de 1979, relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural en Europa. Respecto a este Convenio, ratificado por España el 13 de mayo de 1986, parece existir cierta polémica. España firmó el Convenio con la reserva de que las especies de invertebrados del anexo II (“estrictamente protegidas”) pasaran al anexo III (“especies protegidas”), y así queda catalogada esta especie en la legislación nacional (Romanyk y Cadahía 1992) mientras que para el Consejo de Europa pertenece al anexo II.

También queda catalogada como “especie de interés comunitario, para cuya conservación es necesario designar zonas especiales de conservación” en el anexo II de la Directiva 97/62/CE de 27 de octubre de 1997, por la que se adapta al progreso científico y técnico la directiva 92/43/CEE relativa a la Conservación de los Hábitats Naturales y de Fauna y Flora silvestres. La Directiva 97/62 (conocida como “Directiva Hábitats”) ha sido transpuesta al ordenamiento jurídico español mediante el Real Decreto 1193/1998, de 12 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 1997/1995 de 7 de diciembre, y en el que se establecen medidas para contribuir a garantizar la biodiversidad mediante la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestre. En ella la especie queda recogida en su anexo II en los mismos términos que en la Directiva 97/62. Por último, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza la considera especie vulnerable (IUCN 1996).

El estado fisiológico del arbolado y la colonización por los insectos

Conocer el estado inicial de los hospedantes de las larvas para insectos xilófagos es difícil, porque raramente se tiene la oportunidad de establecer las condiciones de la planta previamente al ataque (Hanks 1999). Por ello, como punto de partida conviene considerar que las especies implicadas son capaces de atacar a los árboles en cualquier estado de salud, y después ir perfilando el “hospedante tipo” asociado a cada una. Notario y colaboradores (1993) ya se cuestionaron el papel real de insectos xilófagos (cerambícidos y bupréstidos) en la dinámica del monte, ya que su asidua presencia en pinos con síntomas de grave deterioro y el alto nivel alcanzado por sus poblaciones se vieron acompañados por la aparición de numerosos pies adultos que morían sin presentar una causa evidente conocida, pero donde se hallaban en abundancia larvas de estos xilófagos.

El ataque de este tipo de insectos puede verse favorecido por períodos críticos para el arbolado, en los que se acusa pérdida de turgencia y marchitamiento, desequilibrios osmóticos y paralización de la secreción de savia (y oleorresinas en coníferas); todo lo cual reduce su capacidad de defensa y permite la penetración xilófagos (Chararas 1978).

El inicio de la serie de xilófagos parece íntimamente relacionado en la mayoría de ocasiones con fuertes ataques previos de orugas de diversos lepidópteros (tortrícidos, limántridos, geométridos, lasiocámpidos y noctuidos; Compte y Caminero 1982). En ocasiones puede ser otra plaga o enfermedad la que debilite al árbol (tiene especial interés en este sentido el hongo *Phytophthora cinnamomi*), facilitando la invasión de xilófagos primarios que, con la muerte del árbol o alguna de sus partes, dan lugar a la aparición de los diversos xilófagos secundarios. Moral y colaboradores (1994) concluyen que estos insectos están adquiriendo un protagonismo que no les corresponde a causa del envejecimiento al que

hemos conducido nuestras dehesas. Si esto es así debería existir alguna forma de que el insecto detecte las plantas más adecuadas para su desarrollo y evite las inadecuadas; se ha comprobado en muchos casos que en esta cuestión juega un papel primordial la información química interespecífica (Dicke *et al.* 1989; Wadhams 1992 y Pickett *et al.* 1995).

Dichas consideraciones no resultan muy halagüeñas dada la situación actual. Por un lado, la presencia de defoliadores asociados a la dehesa va a estar prácticamente garantizada. Resulta ilustrativa al respecto la serie de trabajos de Toimil (1988 a y b) y Granados y colaboradores (2001) sobre la evolución de poblaciones de lepidópteros defoliadores de encinar en el Andévalo occidental (Huelva). Los resultados de estos autores indican que tras más de una década, en la que hubo un tratamiento con insecticida y posteriormente las poblaciones evolucionaron sin intervención humana, la población de defoliadores se ha recuperado y presenta unos tamaños poblacionales muy elevados, causando importantes defoliaciones en los pies afectados. Por otro lado, la ausencia de regeneración y el envejecimiento en las dehesas es un problema fácilmente apreciable y cuya gravedad ha trascendido del ámbito forestal y agronómico, para ser denunciada por investigadores, técnicos y asociaciones conservacionistas (San Miguel 1994).

Se ha considerado que la acción de estos cerambícidos se restringe, por lo común, a ejemplares arbóreos decadentes o que presentan mal estado fisiológico (Romanyk y Cadahía 1992; El Antry 1999). Esta cuestión parece corroborada por los resultados obtenidos por distintos investigadores (Moral *et al.* 1994; Soria *et al.* 1996), que apuntan a un ataque preferencial sobre pies de gran diámetro (por encima de los 2 m de circunferencia) y, por tanto, de edad considerable, junto al hecho de que los orificios se encuentren en las zonas más dañadas, “*a menudo desprovistas de corteza y secas de las encinas afectadas*” (Soria *et al.* 1996).

Intentando relacionar el grado de ataque de estos insectos con algunos parámetros que caracterizan las dehesas, Moral y colaboradores (1993, 1994) encontraron que las dehesas sometidas a un aprovechamiento de tipo ganadero resultaban más afectadas que las sometidas a un aprovechamiento de tipo cinegético, donde la carga ganadera era nula o muy escasa y, por tanto, presentaban mayor número de pies jóvenes. Más recientemente, Naveiro y colaboradores (2002) muestran los resultados de su seguimiento en las dehesas extremeñas durante 1999-2000. Habiéndose prospectado 66 fincas, con un total de 6.557 árboles estudiados (6.099 encinas y el resto alcornoques), señalan que de los árboles que presentaban poda abusiva y heridas en tronco (10% de alcornoques y 31,3% de encinas) el 54% presentan galerías con cerambícidos (activas o viejas). Respecto a la variación del ataque con respecto a la localización altitudinal del arbolado, Moral y colaboradores (1989) encontraron un grado de ataque significativamente mayor en los árboles situados entre 250 y 450 metros que en los situados entre 450 y 700 metros.

Los daños causados sobre el arbolado

Ya ha sido comentado que el tipo de alimentación de estos insectos causa grandes destrucciones en el leño de los árboles. Estudios acerca de *C. cerdo* en el alcornoque de Mamora (Marruecos) efectuados por El Antry (1999) pusieron de manifiesto que las larvas de los dos últimos estadios, las más dañinas, llegan a perforar galerías elípticas de 60 cm de longitud por 5 cm de anchura, consumiendo una media de 10 g de madera al mes. Esta autora encontró, asimismo, que un árbol débil podía albergar una cuarentena de larvas.

Por nuestra parte, obtuvimos varias rodajas a partir de ramas caídas durante el otoño-invierno de 2001. Entre las rodajas que presentaban orificios (causados por *Cerambyx* spp. y/o *P. germari*) se escogió la que tenía la mayor superficie de leño (rodaja 1), así como la de menor superficie (rodaja 2) (figura I.4). En ellas se midió, junto con la superficie de leño, la superficie ocupada por cada orificio, así como el diámetro o lado menor de los mismos. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla I.3.

Figura I.4. Orificios de cerambícidos presentes en rodajas de alcornoque. a) rodaja 1; b) rodaja 2.

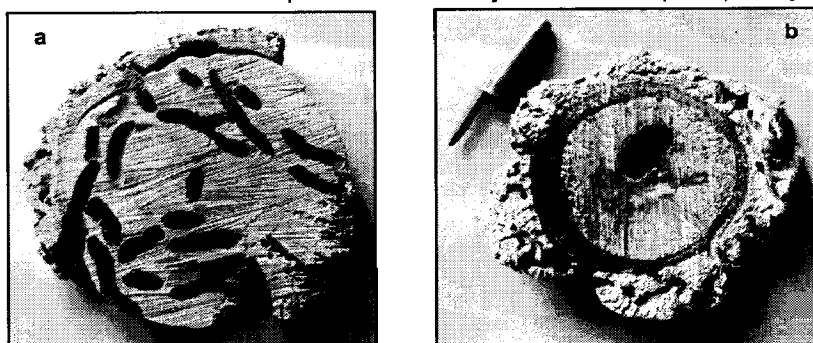
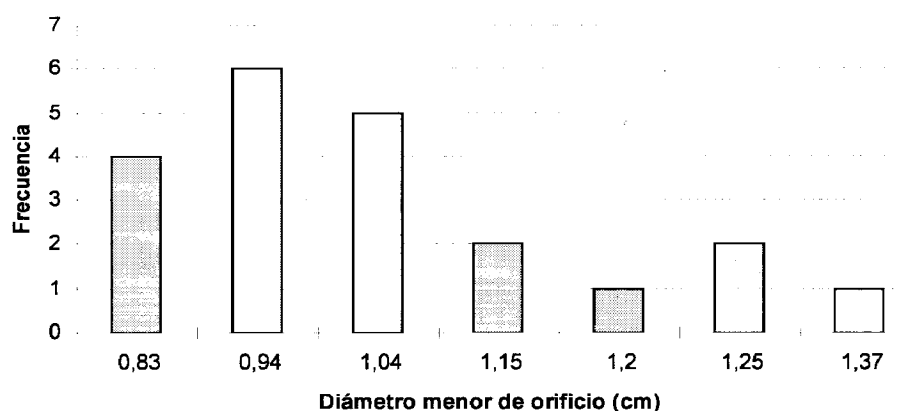


Tabla I.3. Superficie ocupada por los orificios causados por *Cerambyx* spp. y/o *P. germari* en dos rodajas de alcornoque. Sup= superficie. La columna bajo el epígrafe “%” indica porcentajes ocupados por los orificios respecto a la superficie de leño de las rodajas.

Rodaja	Sup. leño (cm ²)	Nº orificios	Sup. total orificios (cm ²)	Rango de diámetros menores (cm)	%
1	364	20	100,07	0,83 a 1,25	27,49
2	25,85	1	2,65	1,37	10,25

Destaca el hecho de que la pérdida de superficie de leño debida a las larvas en la rodaja 1 suponga casi un tercio de su sección; esta pérdida fue mayor del 10% en la rodaja 2, pero debida a la acción de una sola larva. La superficie media ocupada por orificio en la rodaja 1 fue de 5 cm² ± 2,48 (media ± DT). La comparación de este valor con la superficie del orificio encontrado en la rodaja 2 –cuya forma y tamaño consideramos bastante representativa-, refleja, tal y como se observa en la figura I.4a, que esta variación en la sección/orificio se debe en mayor medida a la presencia de galerías oblicuas respecto al eje de la rama, que a la coexistencia de larvas de distinto tamaño. El gráfico de la figura I.5 ilustra esta cuestión.

Figura I.5. Histograma correspondiente a los diámetros menores de los orificios presentes en las rodajas 1 y 2.



El elevado rango de diámetros menores medidos (0,83 a 1,37 cm) indica que todos los orificios corresponden a larvas que se encontraban en estados de desarrollo muy avanzados. Parece indicarse, en este sentido, que los orificios correspondientes a los diámetros 0,83 a 1,04 (15 orificios en total) correspondan probablemente a larvas de último estadio, o próximas al mismo. El resto de orificios corresponderían a individuos de gran tamaño. Llama la atención, pues, la ausencia de galerías correspondientes a larvas jóvenes, hecho que se ha comprobado en otras ramas perforadas por estas especies. Las observaciones de El Antry (1999), así como los datos anteriores, ponen de relieve la magnitud de los daños que este grupo de especies puede llegar a causar. Generalmente, dichos daños desembocan en roturas de los órganos aéreos, debidas al viento o por su propio peso.

Por otro lado, la convivencia en el hospedante con hongos patógenos como *Biscogniauxia mediterranea* y *Botryosphaeria corticola*, o de pudrición como los del género *Stereum*, podría tener como consecuencia que la actividad de estos insectos facilite la infección con los mismos. Moral y colaboradores (1989) ya apuntan la asociación con el hongo de pudrición, y Ragazzi y Tiberi (1998) especulan con la posibilidad de que los insectos fitófagos (cerambícidos entre ellos) puedan desempeñar un importante papel como vectores de hongos patógenos en *Quercus* spp. Los trabajos de Ostry y Anderson (1995) hacen aumentar estas sospechas, ya que mostraron la existencia de relación entre la infección de *Populus tremuloides* con ascosporas de *Hypoxyylon mammatum* y las roeduras de oviposición del cerambícido *Saperda inornata*.

Moral y colaboradores (1993, 1994) obtuvieron algunos resultados bastante elocuentes sobre la potencialidad de los daños que podrían llegar a producirse. Sobre una amplia muestra de árboles escogidos por toda la dehesa extremeña (19.998 pies agrupados en 666 estaciones elegidas al azar), el 18,38% de encinas y el 13,38% de alcornoques resultaron parasitados por *Cerambyx* spp., existiendo zonas donde el porcentaje afectado superaba el 40%.

La posibilidad de ataque sobre árboles no necesariamente decrepitos la ilustra Moral (1994), quien encontró bosquecillos “jóvenes” de alcornoque (de unos 70 años de edad) donde la frecuencia de aparición de ramas desgajadas o pies abatidos por el viento se consideraba superior a la normal. En estos pies se encontraron abundantes “taladros” de gran dimensión (20-25 mm de diámetro mayor) bien definidos, tanto en ramas relativamente jóvenes como en el tronco (casi con seguridad atribuibles a insectos del grupo *Cerambyx*). También encontró árboles jóvenes (con 15 años de edad) parasitados, en zonas muy atacadas.

Lo anterior abre unas perspectivas en cierto modo alarmantes sobre la posibilidad de dispersión de estos insectos en situaciones de plaga intensa. Esto se debe a que podría darse el caso, como apuntan Moral (1994) y Núñez (2002), de que en situaciones de altos tamaños poblacionales la capacidad de colonización de nuevos hospedantes por parte de estos insectos trascienda del estado de vigor del arbolado (como ocurre para algunos escolítidos de coníferas), de tal manera que se lleguen a producir infestaciones generalizadas de pies de todas las edades y estados fisiológicos. Observaciones efectuadas recientemente en el valle de Los Pedroches (Córdoba) han dado la voz de alarma sobre el hecho de que puedan estar produciéndose situaciones de este tipo (Navarro y Fernández 2001).

I.2.1.3. Las posibilidades de control de cerambícidos xilófagos

Medidas propuestas y estudiadas en España sobre las especies de interés

El primer aspecto destacable antes del desarrollo de este apartado, y que refleja el grado de atención que se ha prestado tradicionalmente a estas especies, es la consideración por parte de Romanyk y Cadahía (1992) de que hasta la fecha no se habían realizado estudios sobre la posibilidad de control de este tipo de xilófagos. Dicha consideración se mantiene en la edición revisada del año 2002 de la misma obra. Las propuestas encontradas en nuestra revisión son escasas, y constituyen medidas de tipo socio-político o bien selvícola (Moral *et al.* 1989 y 1994; Naveiro y Morcuende 1994), como son las siguientes:

- Rentabilizar la dehesa, favoreciendo de esa forma su equilibrio de fauna y flora.
- Investigar acerca de sus posibilidades cinegéticas, de aprovechamiento del cerdo ibérico o la extracción de productos naturales con interés médico o industrial.
- Desarrollo de un turismo científico-ecológico.
- Quema con carácter general de la madera caída que presente galerías, cuidando de finalizar esta operación antes de la época de vuelo de los insectos.
- Corta y destrucción de los muñones que quedan en el árbol tras la caída de la rama, ya que pueden albergar, incluso, más larvas que aquella.
- Buscar el rejuvenecimiento de las masas.
- Apeo y quema de los árboles viejos muy afectados.
- Equilibrar la carga ganadera y repartir los lugares de redileo.
- Podar con mesura el arbolado.

Por otra parte, el empleo de trampas de luz (Morcuende y Naveiro 1993) ofrece resultados muy limitados. Durante tres años (1990-1992) estos autores utilizaron una trampa de vanos metálicos cruzados dotada de una bombilla de 200 vatios y depósito inferior. Se conectaba diariamente a la puesta de sol y se recogían los insectos después del amanecer, permaneciendo instalada durante los meses de junio, julio y agosto (13 semanas en total). Las capturas efectuadas oscilaron entre 19 y 34 ejemplares (*C. welensii*) y entre 7 y 17 (*P. germari*). Recientemente, entre 1999 y 2001, la asociación GEDES ha empleado la misma metodología, capturando entre 6 y 24 ejemplares de *C. welensii* y 5 – 18 de *P. germari*; así mismo, indican la captura de un ejemplar de *C. cerdo*.

Tanto en uno como en otro caso la trampa era “de tipo seco”, es decir, el recipiente recolector no contenía ningún líquido, por lo que podía darse el caso de que los adultos escaparan de la misma. En este sentido, Nakamura y colaboradores (1999) estiman en un 30% las pérdidas de ejemplares de *Monochamus alternatus* por escape de trampas comerciales que no usaban líquido o algún agente letal en su receptáculo de captura. En el segundo de los casos citados la recogida de insectos de las trampas fue semanal, por lo que creemos que la posibilidad de huida de estos insectos –que son buenos voladores– debió de ser más alta que en el primero de los casos (recolección diaria).

Los individuos de la especie *C. welensii* muestran cierta tendencia a acudir hacia la luz de las linternas cuando se les obliga a levantar el vuelo, aunque este comportamiento no tiene lugar siempre. Morcuende y Naveiro (1993) apuntan algo similar, indicando que había

muchos días sin ninguna captura en sus trampas de luz ya que se observó que una ligera brisa evitaba que los adultos abandonaran los árboles (o si lo hacían resultaban incapaces de dirigirse a la trampa). Por lo que se refiere a *P. germari*, aunque Vives (2001) considera que resulta fuertemente atraído por la luz ultravioleta, hemos observado que rehuye por completo la luz de las linternas, lo cual se pudo comprobar también con los insectos guardados en el laboratorio cuando resultaban iluminados durante la noche.

Medidas estudiadas sobre otros cerambícidos xilófagos

Con otros cerambícidos xilófagos se han estudiado distintas formas de control. Presentaremos las mismas, según su naturaleza, en cuatro grupos: formulaciones de naturaleza química, formulaciones basadas en organismos entomopatógenos, métodos de captura mediante trampas cebadas con sustancias atrayentes y métodos basados en el empleo de insectos parásitos.

Formulaciones fitosanitarias de naturaleza química

Algunas de las formulaciones de naturaleza química estudiadas con cerambícidos xilófagos se resumen en la tabla I.4. La mayoría de compuestos reflejados en ella tienen actividad sistémica y por contacto (ometoato, monocrotofós, dimetoato, forato, imidacloprid y aldicarb), otros actúan por contacto y/o ingestión (los piretroides, dimilín, clorpirifós y esfenvalerato).

Tabla I.4. Algunas formulaciones de naturaleza química estudiadas para el control de cerambícidos xilófagos. E= efectividad (%).

Especie	Compuesto	E (%)	Observaciones	Referencia
<i>Anoplophora chinensi</i>	Ometoato, monocrotofós	91-100	Inyección en tronco; 5 ml/galería larvaria. Soluciones al 40%.	Dai (1994)
<i>Apriona germari</i>	Diclorvós 40%-EC.	82,5	Volátil. Varillas impregnadas e introducidas en cada galería; 300 ml por galería. Solución 1:100.	Zhao <i>et al.</i> (1994)
<i>Acalolepta mixta</i> <i>Platyomopsis pedicornis</i>	Dimetoato	-	Mezclado con aceite de petróleo al 10%.	Smith (1996)
<i>Anoplophora glabripennis</i> <i>Apriona germari</i>	Aldicarb, forato, monocrotofós	83-99 89-100	Ramas-cebo empapadas con soluciones acuosas. Más efectivo el aldicarb (sistémico) a 50 mg/ml (para <i>Apriona</i> , también el forato). 75 g/árbol de aldicarb originó efectividad del 100%.	Liang <i>et al.</i> (1997)
<i>A. glabripennis</i>	α -cipermetrina, fenpropatrina, esfenvalerato, monocrotofós	>90	El compuesto más efectivo fue α -cipermetrina.	Liang <i>et al.</i> (1997)
<i>Macropophora accentifer</i>	Imidacloprid 100-AL	94,84	Sistémico.	Machado y Raga (1999)
<i>Anoplophora glabripennis</i>	Imidacloprid	-	"Actividad sistémica potencial"..Aplicado al suelo o inyectado en el árbol.	Nowak <i>et al.</i> (2001)
<i>Monochamus alternatus</i>	Dimilín 18% + Angaosha IV	-	Mezcla de pesticidas micro-encapsulados, con efecto significativo. El dimilín por separado ofreció peor resultado.	Wang <i>et al.</i> (2000)
<i>Saperda carcharias</i>	Clorpirifós, α -cipermetrina, metilclorpirifós + cipermetrina	100	-	Barani <i>et al.</i> (2000)

Formulaciones basadas en organismos entomopatógenos

En cuanto a las formulaciones basadas en el empleo de organismos entomopatógenos, varias han sido probadas con interesantes porcentajes de éxito respecto a cerambícidos perforadores.

Por lo que se refiere a formulados a partir de hongos, los constituidos por *Beauveria bassiana* han resultado efectivos frente a larvas de *Arhopalus syriacus* (Campadelli y Sama 1993), *Monochamus alternatus* (Shimazu *et al.* 1995) y *Monochamus leuconotus* (Shoeman y Shoeman 1997). Shimazu y colaboradores (1995) dan, además, algunas indicaciones sobre la forma de aplicación más ventajosa, resultando que el empleo de pedazos de tela impregnados con el entomopatógeno resultó más efectivo que la pulverización del formulado, y más práctica que la implantación de semillas contaminadas. Otro hongo del mismo género, *Beauveria brongniartii*, mostró una eficacia del 84 al 100% frente a *Anoplophora malasiaca*, mediante la aplicación de láminas de espuma de poliuretano con 108 conidias/cm² (Kashio y Grey 1996); también resultó efectivo frente a *Psacotha hilaris* y *Apriona japonica* (Higuchi y colaboradores 1997). Por último, los formulados a partir de *Metarhizium anisopliae* obtuvieron una efectividad del 88% sobre larvas de *Macropophora accentifer* (Machado y Raga 1999).

Tsutsumi y Yamanaka (1995 y 1997) examinaron la posibilidad de infección de los adultos de *Psacotha hilaris* con el hongo *Beauveria brongniartii*, así como su transmisión mediante el apareamiento. La efectividad de la infección resultó del 30 al 100% en laboratorio, según el método empleado para favorecer la misma. Los ensayos de campo mostraron el 90% de efectividad sobre adultos a los 10 días, que decreció hasta el 57% después de 31 días. La efectividad de la transmisión entre ejemplares a través del apareamiento resultó del 100% dos horas después de la inoculación, pero decreció hasta el 40%-60% a los cinco días.

Respecto al empleo de nematodos, Xu y colaboradores (1995) emplearon la especie *Steinernema carpocapsae* (formulado Nema Gard S) frente a *Aristobia testudo*, encontrando una efectividad del 73,3-100%. Otra especie, *Heterorhabditis megidis* (Nema Gard H), ofreció una eficacia del 100% frente a *Saperda carcharias* (Barani y colaboradores 2000).

Por último, reseñamos los trabajos de Sun y colaboradores (1997). Estos autores comprobaron la actividad, sobre larvas de *Anoplophora glabripennis*, de bacterias capaces de elevar la temperatura de congelación. Encontraron que la inoculación con dichas bacterias elevó la temperatura crítica inferior de los insectos entre 5,62 y 7,04°C, dependiendo del método de inoculación empleado.

Métodos de captura mediante trampas cebadas con sustancias atrayentes

También se han podido encontrar algunos trabajos, que consideramos muy interesantes, relacionados con métodos de captura mediante trampas cebadas con sustancias atrayentes.

Trampas sencillas consistentes en un recipiente con agua y un cebo con sustancias atrayentes (metil-fenilacetato), han resultado eficaces para la captura de *Anaglyptus subfasciatus* (Nakashima *et al.* 1994), resultando los dispensadores de tipo gel hasta 4 veces más efectivos que los constituidos por una pieza de algodón. Posteriormente se encontró que la mezcla de la feromona sexual de este cerambícido con el metil-fenilacetato capturaba un número de

hembras significativamente mayor que cualquiera de las dos sustancias por separado (Nakamuta *et al.* 1997).

McIntosh y colaboradores (2001) citan a Tilden y colaboradores (1983) y Wyatt y colaboradores (1997) para comentar que para muchos perforadores de madera el estímulo químico a larga distancia es aumentado aparentemente por estímulos visuales a corta distancia procedentes de la silueta de los árboles. Por ello, compararon distintos tipos de trampas cebadas, encontrando que la más eficaz fue una con dos vanos cruzados. Por otro lado apuntan que, a pesar de su menor eficacia, las trampas de embudos múltiples son las únicas operativas en el presente, por su ligereza, por ocupar poco espacio al poder compactarse y por ser capaces de resistir fuertes vientos a la vez que representan un fuerte estímulo visual. Estos autores consiguieron la sorprendente cifra de 27.336 capturas con 50 trampas durante 15 semanas, correspondiendo el 73% de ellas a los cerambícidos *Monochamus* spp. y *Xylotrechus longitarsus* y a bupréstidos del género *Buprestis*.

De Groot y Nott (2001) encontraron una mayor efectividad en la captura de *Monochamus scutellatus* para las trampas de silueta oscura que para las de silueta clara; aunque este aspecto no fue determinante para *Monochamus notatus*. En otras especies, en cambio, las trampas con cubo y sin silueta fueron tan efectivas como las de silueta negra. Concluyen que una trampa de cubo con silueta negra está recomendada para uso general en capturas de cerambícidos xilófagos y bupréstidos. Las cifras de sus resultados son abrumadoras: más de 2.220 ejemplares de *M. scutellatus* y casi 3.000 de *M. mutator* fueron capturados en una semana con 60 trampas.

Finalmente, citaremos una interesante línea de trabajo en la cual se estudia la posibilidad de atracción mediante volátiles de plantas hospedantes en combinación con feromonas de escolítidos. Allison y colaboradores (2001) demostraron que *Monochamus clamator*, *M. notatus*, *M. obtusus* y *M. scutellatus* eran atraídos por feromonas de escolítidos de los géneros *Ips* y *Dendroctonus*, con los cuales comparten hospedantes, en combinación con volátiles procedentes de los propios árboles. En dos de las especies *M. clamator* y *M. scutellatus* la respuesta se produjo frente a la feromona, incluso en ausencia de los volátiles vegetales. De Groot y Nott (2004), en cambio, no encontraron diferencias entre la atracción producida por feromonas únicamente y la originada por el α -pineno; y tampoco encontraron evidencia de sinergismo entre este compuesto y las feromonas empleadas.

Recientemente se han obtenido los primeros resultados de la aplicación en España de esta posibilidad de captura, sobre *Monochamus galloprovincialis* (Pajares *et al.* 2004). Estos autores emplearon trampas cebadas con feromonas del género *Ips*, solas o en combinación con volátiles de origen vegetal (trementina, etanol y α -pineno). Encontraron que la feromona ipsenol resultaba atractiva para el cerambícido, y que se producían sinergismos entre dicho compuesto, el α -pineno y el etanol. Pero las mayores capturas se produjeron combinando estos dos volátiles con las cuatro feromonas estudiadas; uno de los inconvenientes encontrados resultó ser el alto número de predadores de escolítidos (*Thanasimus formicarius* y *Temnochila coerulea*) que fueron capturados por dicha trampa.

Métodos de control basados en el empleo de insectos parásitos

Respecto a los métodos de control basados en el empleo de insectos parásitos de cerambícidos xilófagos en sus distintas fases, no se han encontrado referencias concretas sobre aplicación y resultados. Sí han sido citados distintos parásitos asociados a diversos cerambícidos perforadores, pero entre nuestras especies de interés este campo ha sido poco desarrollado. Se ha citado como parásito de larvas sobre *P. germari* tan solo al himenóptero braconídeo *Ontsira longicaudis* Giraud (Vives 2000, citando a Colas 1973). Respecto al género *Cerambyx*, los primeros estadios de *C. cerdo* pueden ser atacados por los himenópteros icneumonídeos *Dolichomitus imperator* (Kriechbaumer), *Ephialtes manifestator*, *Megarhyssa gigas* Laxman, *Odontocolon appendiculatus* y *Rhimphoctona amoena* Gravenhorst, así como por *Ontsira longicaudis* y por el calcídido *Oobius rudnewi* Novicky (Vives 2000). Este último himenóptero es clasificado como Encyrtidae y considerado parásito de puestas por El Antry (1999), quien apunta que podría ser utilizado como medio de lucha biológica.

Como ejemplo de la posibilidad de aplicación de estos métodos, aunque no se considere xilófago estricto dadas sus preferencias subcorticales, citaremos el caso del cerambícido *Phoracantha semipunctata* F., para el cual sí se están estudiando experiencias de control basadas en el empleo del himenóptero encírtido *Avetianella longoi* Siscaro, parásito de puestas, según la metodología propuesta por Mansilla y colaboradores (1999).

Otras posibilidades de control

Finalizaremos este apartado mencionando otras líneas de investigación sobre posibilidades de control de cerambícidos xilófagos, distintas a las mostradas hasta ahora.

Algunos investigadores (Rohitha *et al.* 1994; Hyvernaud *et al.* 1996; Haack *et al.* 2002) están desarrollando una línea encaminada a la detección de larvas de este tipo de insectos mediante técnicas acústicas. Estas técnicas novedosas encuentran una aplicación muy interesante de cara al muestreo de estos insectos mediante métodos no destructivos.

El hecho de que las hembras de *Monochamus alternatus* usaran sus palpos maxilares y labiales para reconocer las grietas que ya contienen huevos, mientras buscan lugares para ovipositar, motivó que Anbutsu (2001) investigara la actividad repelente hacia la puesta por parte de diversos compuestos. Probaron dos tipos: por un lado, la secreción depositada por las hembras inmediatamente después de su oviposición (parecida a la jalea), por otro, los extractos metanólicos de los órganos reproductivos de las hembras. Vieron que la mayor parte de las hembras abandonaban las grietas artificiales que encontraban untadas con dicha jalea; en cambio, si las grietas no estaban untadas, la oviposición tuvo lugar la mayor parte de las veces. Por otro lado, la mayoría abandonó las grietas tratadas con extractos metanólicos de glándulas espermatecales u otras estructuras reproductivas tras su palpación, pero la oviposición se produjo en las grietas tratados sólo con metanol.

Berkov y colaboradores (2000) estudiaron la relación entre cerambícidos xilófagos brasileños y sus plantas hospedantes. Encontró que dos de las cinco especies arbóreas estudiadas (*Couratari stellata* y *Gustavia hexapetala*) albergaban muy pocos cerambícidos; ambas especies se caracterizan por su olor fétido. Analizaron los volátiles de *C. stellata* y otras dos especies muy colonizadas (*Lecythis poiteaui* y *Eschweilera coriacea*), encontrando que los compuestos sulfúricos comprendían casi el 15 % de los volátiles en *C. stellata* mientras que en

las otras dos especies eran componentes minoritarios. El compuesto sulfúrico S-metilmetionina, aislado de muestras de madera de *C. stellata*, parecía ser el mayor contribuyente al mal olor distintivo. Como conclusión planteó la hipótesis de que este tipo de olor podría actuar como repelente para la búsqueda de lugares adecuados de oviposición por parte de estos insectos.

Medidas estudiadas sobre otros insectos, que podrían ser de aplicación a cerambícidos xilófagos

Vamos a recoger bajo este epígrafe los métodos que han sido empleados sobre otros grupos de insectos al margen de los cerambícidos xilófagos estrictos, pero que creemos podrían constituir campos interesantes de investigación, dados los esperanzadores resultados obtenidos. Comentaremos brevemente algunas cuestiones acerca del empleo de extractos vegetales con actividad inhibitoria de la alimentación o de algún otro comportamiento de los insectos, así como de la nueva generación de formulados a base de compuestos minerales inertes.

En lo referente al empleo de compuestos repelentes e inhibidores de la alimentación, por el momento parece haber escasos estudios con insectos emparentados con nuestras especies de interés; en cambio sí hay bastantes trabajos interesantes con otros grupos –baste para ello consultar a Van Beek y De Groot (1986), Jermy (1990) o Morgan y Mandava (1990)-. Resulta relevante el caso de las termitas, cuyo régimen alimenticio guarda cierta similitud con los cerambícidos xilófagos. López y colaboradores (1998) comprobaron que los extractos de *Daphne gnidium*, *Chrysanthemum coronarium* y *Anagyris phoetida* provocaban la inhibición de la alimentación de termitas de la vid (*Kalotermes flavicollis*). Por otro lado, la materia activa azadiractina –procedente de la especie *Azadirachta indica*- bajo el formulado comercial Extracto de Nim, también inhibió fuertemente su alimentación, provocando además un drástico aumento de la mortalidad en la especie.

La eficacia de extractos en bruto de *Daphne gnidium* y *Anagyris phoetida* como repelentes para varios insectos, incluido el crisomélido *Leptinotarsa decemlineata*, ha sido estudiada, también, por Ocete y Pérez (1996). Estos autores encontraron que las hembras del crisomélido derivaban una parte importante de la puesta hacia especies vegetales libres de tratamiento, y apuntan que los extractos pueden tener un cierto efecto disuasorio de la oviposición. Además, las poblaciones de estos insectos en las plantas tratadas y no tratadas presentaron niveles significativamente diferentes.

Dados los problemas de toxicidad, aparición de resistencias y coste de los insecticidas convencionales, han cobrado gran impulso en los últimos años las propuestas de empleo de formulados cuyas materias activas consisten en los denominados “polvos inertes”. Golob (1997) caracteriza y tipifica muy claramente estas sustancias, entre las cuales las más representativas son las denominadas “tierras de diatomeas” (depósitos geológicos consistentes en restos fosilizados de numerosas especies de organismos marinos y de agua dulce, fundamentalmente diatomeas y otras algas) y los formulados a base de caolín (un aluminosilicato blanco no abrasivo, de finos granos).

Según Fields y Korunic (2001) se considera generalmente aceptado que el modo de acción de estos compuestos no es de naturaleza química sino física, mediante desecación, al

dañar la cutícula de los insectos por abrasión y/o por causar la remoción de su capa de ceras mediante la adsorción de las mismas (Korunic 1998). Otro modo de acción apuntado por este autor, citando a White y colaboradores (1966), es la repelencia causada por la presencia física del polvo. Los trabajos de Glenn y colaboradores (1999) y Puterka y colaboradores (2000) describen la actividad insecticida del polvo de caolín como formulado hidrofóbico, indicando que ésta se produce por varias razones: el recubrimiento originado vuelve la planta no reconocible visual o táctilmente por el insecto; además, el comportamiento de los insectos a todos los niveles, desde el desplazamiento hasta la oviposición, resulta severamente perjudicado al adherirse las partículas a su cuerpo cuando caminan sobre ellas.

Entre las importantes cualidades de estos productos destaca su muy baja toxicidad para mamíferos, encontrándose con profusión citas al respecto que recogen como dichos compuestos están admitidos por la legislación de diversos países para su uso en variados procesos industriales, desde filtros de zumos y licores, detergentes, desodorantes o filtros de piscinas, hasta aplicaciones como aditivos alimentarios -ver en especial Golob (1997) y Korunic (1998)-.

Otro aspecto interesante de los mismos es que al no depender su acción de funciones metabólicas se ha postulado que resultaría poco probable que los insectos desarrollaran resistencias a los mismos. No obstante, Korunic y Ormesher (1998) resaltan que en pruebas de laboratorio algunos insectos -por ejemplo la importante plaga de semillas *Tribolium castaneum*- pueden haber reducido su susceptibilidad tras la exposición a tierras de diatomeas durante 5-7 generaciones. Al respecto, Fields y Korunic (2001) sugieren que sería necesario emplear estrategias para prevenir la aparición y generalización de resistencias, aunque no se hayan citado aún casos de este tipo en condiciones de campo. Sin embargo, podría ser posible que los insectos desarrollaran, como respuesta a este material, un comportamiento que les hiciera evitar el contacto físico con el mismo (Golob 1997; citando a Ebeling 1971).

Las propuestas de aplicación de estos compuestos han estado hasta el momento prácticamente restringidas al control de plagas de cereales almacenados, donde se considera que compiten ventajosamente con los insecticidas tradicionales merced a las ventajas citadas. Pero los trabajos de Glenn y colaboradores (1999), Puterka y colaboradores (2000), y Lapointe (2000) apuntan la eficacia de los mismos en aplicaciones sobre otros tipos de fitófagos, en especial los foliares (los dos primeros autores sobre pulgones y el tercero sobre el curculiónido defoliador *Diaprepes abbreviatus*), lo cual deja abierta la posibilidad de su acción sobre fitófagos con otros hábitos.

I.2.1.4. Las perspectivas de control de cerambícidos xilófagos de encina y alcornoque en un contexto de Control Integrado de Plagas

El planteamiento clásico del Control Integrado de Plagas persigue reducir o mantener a niveles tolerables determinadas poblaciones de insectos mediante la conjugación de todas las tácticas posibles (Coulson y Witter 1990), tomando como base los principios de la ecología. Para desarrollar este planteamiento es preciso tener un conocimiento preciso de la biología de los insectos, junto con los caracteres culturales de los árboles y las condiciones de estación de su lugar de asiento. Además, es necesario establecer cuándo consideramos que la actividad de estos xilófagos se está extralimitando de su papel de “acompañantes al bien morir” del arbolado cercano a su longevidad fisiológica máxima (Moral 1994).

Las medidas de naturaleza selvícola y de ordenación encaminadas al rejuvenecimiento de la arboleda apuntadas por Naveiro y Morcuende (1994), y Moral y colaboradores (1994) son imprescindibles, pero es obvio que su planteamiento o aplicación no se llevan a cabo adecuadamente, ya que nuestras dehesas parecen seguir un camino hacia lo que San Miguel (1994) -citando a Montoya- define como “dehesa fósil”. En estas circunstancias el riesgo de aumento de poblaciones de estos insectos se incrementa y, con ello, el peligro de infestación no sólo del arbolado adulto sino también de los pies jóvenes.

Llegados a este punto, poco se sabe acerca del control de las especies de interés y muchas son las medidas con cierto potencial que podrían estudiarse. Por otro lado, aunque su biología resulta conocida en términos generales, faltan estudios detallados sobre el comportamiento de estos insectos, en especial para *Prinobius germari*, la especie menos conocida. Para plantear el estudio de posibles medidas de control en términos de control integrado, hay que resaltar algunas cuestiones importantes relacionadas con el comportamiento de estas especies, el ecosistema en que se las encuentra –en particular las dehesas- y su situación normativa:

- Son especies que presentan un dilatado período larvario, durante el cual permanecen la mayor parte del tiempo en el interior de los órganos leñosos de la planta. Los adultos parecen mostrarse resistentes, poco longevos, de aparición escalonada, hábitos nocturnos y un desconocido comportamiento alimenticio (Romanyk y Cadahía 1992; Moral 1994; Liñán 1998; Vives 2000 y 2001).
- Habitan en un ecosistema caracterizado por su complejidad ecológica y económica, que refleja la diversidad biológica y ambiental de los agrobiosistemas mediterráneos (San Miguel 1994).
- Entre los insectos implicados podría aparecer una especie protegida por la legislación nacional e internacional.

Estas consideraciones nos hacen plantearnos la conveniencia, en términos de eficacia y admisibilidad ecológica, de algunas de las medidas comentadas en párrafos anteriores de cara al control integrado de nuestras especies problemáticas.

El empleo de los insecticidas convencionales propuestos para otras especies resulta de difícil admisibilidad en estas circunstancias, ya que junto a sus distintos grados de toxicidad (entre los citados, el diclorvós es muy tóxico; Liñán 1994 y 2001) hay que considerar su riesgo

asociado de fitotoxicidad, y que prácticamente todos poseen un espectro de acción relativamente amplio, por lo que causan un efecto indiscriminado. En cuanto a su eficacia compartimos la opinión de López y colaboradores (1998), pues el principal problema del empleo de insecticidas frente a insectos con hábitos semejantes no es ya el encuentro de compuestos “blandos”, sino su aplicación práctica para que lleguen a incidir de manera efectiva sobre los mismos.

Los formulados a base de microorganismos entomopatógenos y polvos inertes carecen a priori de buena parte de los inconvenientes de los anteriores (sobre todo la toxicidad y fitotoxicidad), pero presentan el añadido del poco conocimiento acerca de los mismos en aplicaciones a insectos como los considerados; aún así, acordamos junto a El Antry (1999) que es una posibilidad a considerar. También lo es el estudio de productos repelentes e inhibidores de origen natural; en este sentido consideramos muy interesante la profundización en la línea apuntada por los recientes resultados de Anbutsu (2001), sobre la hipotética posibilidad de evitar buena parte de la oviposición en algunos insectos mediante la aplicación de productos inhibidores de la misma.

Las medidas que implican potenciar los enemigos naturales de los insectos problemáticos constituyen uno de los pilares del Control Integrado de Plagas, aunque precisamente las situaciones de plaga suelen rebasar las posibilidades de control por parte de estos organismos. La introducción de los mismos es un asunto de mucho calado, que debe ser objeto de cuidadosos estudios previos que no existen para nuestro grupo de especies, y para otras de comportamiento parecido se encuentran en desarrollo. Avances en este tema sobre el “longicornio asiático” *Anoplophora glabripennis* pueden consultarse a partir de Smith y colaboradores (2002), Leellen y colaboradores (2002), y Zhong-Qi y Smith (2002).

El planteamiento de control integrado de las poblaciones de estos insectos desde unos presupuestos de eficacia, selectividad de acción, respeto al equilibrio biológico y economía, hace necesario, pues, el estudio de nuevas medidas. Si se pudiera plantear como uno de los pilares de la estrategia de control integrado una medida basada en la atracción de estas especies, para afrontar su captura, la repelencia o la confusión específica de las mismas en el momento adecuado, estaríamos en condiciones de asegurar, al menos en un porcentaje muy alto, la selectividad de acción y el respeto al equilibrio biológico. La admisibilidad económica sería un paso a discutir posteriormente.

Coincidimos con Moral (1994) en que los métodos de atracción basados en las trampas de luz no resultan eficaces de cara a reducir tamaños poblacionales en situaciones consideradas como plaga. En cambio, podrían servir a la hora de poner de relieve la presencia de los insectos o establecer una orientación respecto a su período de vuelo.

Por lo tanto, la única manera de afrontar esta pretensión es el estudio minucioso de los parámetros que hipotéticamente puedan afectar a los desplazamientos a larga distancia de estos insectos, es decir, los relacionados con la localización de hospedantes, no hospedantes, lugares de alimentación y/o congéneres. En definitiva, el estudio de los compuestos llamados semioquímicos aplicado al Control Integrado de Plagas forestales (Pickett *et al.* 1991). La electrofisiología de estímulos olfativos es una valiosa herramienta para abordar este tipo de estudios.

I.2.2. La aplicación de los estudios electrofisiológicos en el contexto del Control Integrado de Plagas

I.2.2.1. Papel del olfato en el comportamiento de los insectos

Para la mayoría de los animales las señales químicas son a menudo más importantes que las visuales y auditivas a la hora de valorar su entorno ambiental; esto ocurre especialmente en los animales inferiores, que tienen una fuerte dependencia de los estímulos olfativos y gustativos (Schoonhoven 1990). Para los insectos la comunicación química ocupa un lugar destacado entre sus variadas formas de comunicación, principalmente entre individuos de la misma especie (Gullan y Cranston 2000). Las antenas constituyen las estructuras sensoriales periféricas involucradas en la detección de muchos importantes estímulos ambientales (Zacharuk 1985), en particular para las especies nocturnas, que tienen limitado el empleo de la vista (Gavillet 2002).

Existen diversos mensajeros químicos que orientan el comportamiento de los insectos; son los denominados semioquímicos (Law y Regnier 1971). La variedad de funciones que pueden desempeñar los semioquímicos hizo necesaria la definición de los tipos más comunes: feromonas, alomonas, kairomonas y sinomonas; y a tales efectos se consideran tradicionalmente las breves y claras definiciones dadas por Nordlund (1981), que pueden completarse a partir de Gullan y Cranston (2000) (anexo I).

Actualmente la investigación electrofisiológica y etológica sobre el papel que desempeñan los semioquímicos en los insectos está centrada en su mayor parte en dos tipos de relaciones: por un lado las que tienen lugar entre individuos de la misma especie (mediadas por feromonas), y por otro lado las que se establecen entre el insecto y su planta hospedante (mediadas por kairomonas). Según Witzgall y Frérot (1991), el estudio de la estructura de las moléculas implicadas en la comunicación química puede arrojar resultados útiles desde dos puntos de vista: biosistemático y agronómico. En el primer caso, dicha estructura, especialmente en el caso de las feromonas, puede ser tenida en cuenta para la clasificación de ciertos taxones de difícil encuadre -como los lepidópteros tortricidos de los géneros *Notocelia* y *Epiblema*-; por otro lado, es útil conocer la existencia de atrayentes que permitan el seguimiento y control de las poblaciones de insectos.

La estructura de las feromonas revela que muchos compuestos naturales, tanto procedentes de los vegetales como de los propios insectos (por ejemplo, las ceras cuticulares), han sido utilizados por los insectos como precursores para la síntesis bioquímica de una amplia gama de las mismas. Esto hace que en algunas especies dichos semioquímicos tengan semejanza con productos del reino vegetal, sobre todo terpenoides, mientras que en otras presenten estructuras sorprendentes y originales, muy diferentes a otras anteriormente conocidas en la naturaleza (Primo 1991; Gullan y Cranston 2000). En particular, considerando las estructuras químicas de las feromonas de los coleópteros, se considera a estos como los grandes químicos de la naturaleza (Primo 1991).

La sensibilidad del olfato de los insectos hacia las feromonas es algunas veces muy alta. En el caso de los machos de la mariposa de la seda (*Bombyx mori*), tal sensibilidad se debe al gran número de receptores especializados de las antenas (34.000), capaces de percibir la feromona en concentraciones muy bajas: una molécula de feromona entre 10^{17} moléculas de

aire es suficiente para excitar un impulso nervioso una vez que alcance las neuronas receptoras (Schoonhoven 1990). Este autor razona que no todos los receptores feromonales muestran el mismo grado de sensibilidad, puesto que los umbrales de quimiorrecepción varían de modo que sólo sea detectada la información relevante del medio. En este sentido una sensibilidad demasiado alta para ciertos compuestos podría resultar tan mala como una demasiado baja.

Por lo que se refiere a cerambícidos, la primera feromona sexual femenina de largo alcance conocida en esta familia es la perteneciente a *Migdolus fryanus*, plaga de las plantaciones de caña azúcar de Sudamérica, presentada por Leal y colaboradores (1994). Aunque se identificaron dos compuestos específicos de las hembras (N-(2'S)-metilbutanoil 2-metilbutilamina y N-formil L-isooleucina metil ester), las pruebas de campo con muestras sintéticas revelaron que sólo la amida resultó activa; los aminoácidos derivados de ella no incrementaron ni redujeron el número de capturas en las trampas cebadas.

Desde ese momento varios investigadores han centrado sus trabajos en la determinación de compuestos con hipotética actividad feromonal, tanto masculina como femenina, en esta familia, así como en el estudio de la respuesta de comportamiento frente a dichos compuestos y sus homólogos obtenidos sintéticamente. De esta manera pueden encontrarse al respecto varios trabajos sobre diferentes especies: *Hylotrupes bajulus* (Noldt *et al.* 1995; Fettkothe *et al.* 1995), *Anaglyptus subfasciatus* (Leal *et al.* 1995; Nakamuta *et al.* 1997), *Anoplophora chinensis* (Wang 2000), *Psacothaea bilaris* (Fukaya y Honda 1995; Fukaya *et al.* 1997; Fukusaki *et al.* 1998), *Anoplophora malasiaca* (Fukaya *et al.* 1999) y *Migdolus fryanus* (Bento *et al.* 1993).

En cuanto a los semioquímicos que involucran a organismos de especies diferentes por otras razones aparte de la alimentación (aleloquímicos), en su detección intervienen también neuronas receptoras de estructuras olfativas localizadas en la antena (Masson y Mustaparta 1990). Los volátiles de plantas son de principal importancia en la selección de huéspedes por parte de muchos insectos fitófagos. Este comportamiento está condicionado por las kairomonas propiamente dichas, pero también se ha encontrado que la inhibición o atracción hacia especies hospedantes puede estar determinada por la existencia en el medio de sustancias volátiles procedentes de especies no hospedantes, que inducirían un tipo de discriminación negativa. Este hecho ha sido demostrado para los coleópteros escolítidos de coníferas *Ips typographus*, *I. duplicatus*, *Tomicus piniperda* y *T. minor* en relación con los volátiles de corteza y hojas de las frondosas *Betula pendula*, *B. pubescens* y *Populus tremula* (Zhang y Schlyter 1999).

En relación con los coleópteros xilófagos, la atracción ejercida por el árbol hospedador hacia el insecto tiene una variada naturaleza: aparte de la naturaleza química de los principios esenciales de la savia que impregna el leño, influye la edad del árbol, la época del año, el órgano afectado (ramas delgadas, gruesas, tronco, raíz) y, muy especialmente, el estado fisiológico del árbol (Compte y Caminero 1982). En el caso particular de los cerambícidos dicha atracción puede ser motivada por distintas circunstancias, entre las que podríamos destacar la búsqueda de sustratos adecuados para la oviposición y el desarrollo de las nuevas generaciones, así como la búsqueda de recursos alimenticios por parte de los propios adultos (Hanks *et al.* 1998; Meurer y Tavakilian 1997).

Otro matiz respecto a la complejidad de acción de los compuestos aleloquímicos (sobre cerambícidos pero también sobre otros xilófagos), es el resumido por McIntosh y colaboradores (2001) a partir de los trabajos de otros autores. Según el mismo, para muchos perforadores de leño el estímulo químico a larga distancia es aumentado por estímulos visuales a corta distancia, procedentes de la silueta de los árboles. En este sentido las investigaciones de De Groot y Nott (2001) apuntan que no sólo la silueta puede tener un papel relevante en la atracción, sino que incluso el color de la misma podría ser determinante para algunas especies.

I.2.2.2. Las estructurales sensoriales olfativas

La detección de estímulos químicos puede ser llevada a cabo mediante el sentido del gusto -en el caso de sustancias de naturaleza líquida-, recibiendo entonces el término de quimiorrecepción por contacto, o mediante el olfato cuando se trata de sustancias volátiles, y entonces se habla de quimiorrecepción a distancia. Una vez detectados los estímulos mediante estructuras especializadas, las neuronas transmiten los mensajes al sistema nervioso central donde son integrados. El sistema nervioso incita y controla los comportamientos adecuados, como la posición, el movimiento, la alimentación, y los relacionados con el apareamiento y la puesta (Gullan y Cranston 2000).

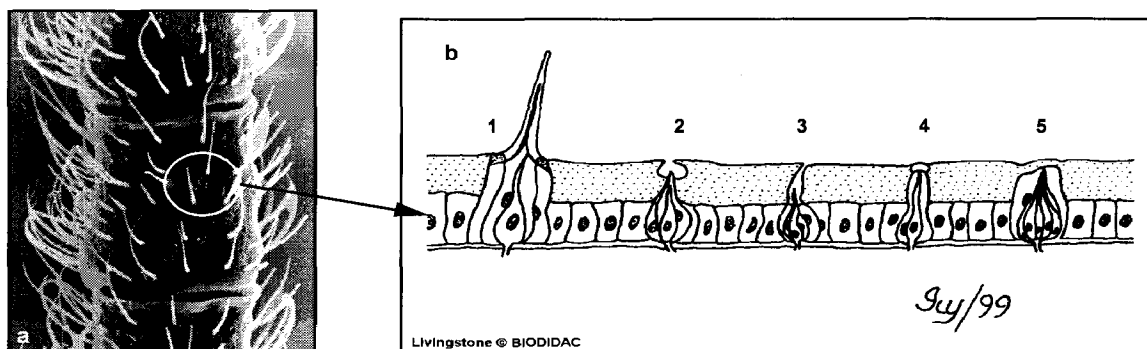
Los quimiorreceptores tienen una función doble (Schoonhoven 1990): informan al insecto sobre la calidad de ciertos compuestos químicos en su entorno, y sobre la concentración de los mismos. La percepción de la información y su posterior transmisión al cerebro difieren según el tipo de semioquímico: mientras que en el caso de las feromonas en el proceso intervienen receptores especialistas en un amplio rango de órdenes de insectos, la situación es menos clara para los volátiles de plantas, en cuya detección participan tanto receptores generalistas como especialistas (Wadhams 1992).

Este autor apuntaba, tratándose de compuestos de actividad kairomonal, que la implicación de receptores especialistas ocurriría cuando el comportamiento se ve afectado por la interacción entre kairomonas y feromonas; pero cuando las kairomonas están involucradas sólo en la localización de alimento u hospedantes, resultan ser receptores más generalistas los implicados, y la información de cada olor sería transmitida al cerebro mediante el patrón determinado de su actividad sobre un conjunto de neuronas. Al respecto, Pickett y colaboradores (1998) indican que crece la evidencia de que neuronas altamente específicas detecten compuestos característicos de ciertas plantas, incluso volátiles cuya emisión se atribuye a un gran número de plantas y que se consideran implicados en la localización de plantas huésped, como son los denominados GLV (de "*Green Leaf Volatiles*" ≡ "volátiles de hojas verdes").

Los órganos sensoriales de los insectos relacionados con la percepción de estímulos mecánicos, químicos, térmicos e, incluso, la humedad, son unas pequeñas estructuras cuticulares denominadas *sensilla* (singular: *sensillum*). Estas estructuras tienen habitualmente forma de pelo, ganchito o protuberancia corta y ocupan distinta posición respecto a la cutícula del insecto. Zacharuk (1980), Metcalf y Metcalf (1992) y Snodgrass (2002) caracterizan las *sensilla* quimiosensibles como estructuras no flexibles, con pared cuticular delgada y multiporosa (3.000 a 15.000 poros de 10-15 μm de diámetro por cada *sensillum*;

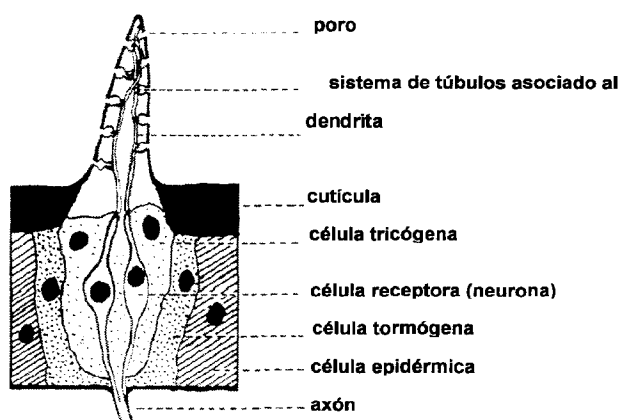
mientras que las de un solo poro apical se encargan del sentido del gusto), sistema de túbulos asociados a los poros y en cuyo interior presentan segmentos dendríticos ramificados correspondientes a varias neuronas basales. Entre las *sensilla* quimiorreceptoras más comunes citaremos las siguientes: *trichodea*, *basiconica*, *coeloconica*, *ampullacea*, *apilacodea* y *campaniformia*. Una clara definición de las mismas puede encontrarse a partir de Snodgrass (2002) (anexo I).

Figura I.6. Segmento de una antena mostrando diversos *sensilla* (a) e ilustración de un segmento de cutícula con varios tipos de *sensilla* (b): *trichodea* (1), *coeloconica* (2), *ampullacea* (3), *campaniformia* (4) y *placodea* (5). Foto (a) procede de www.syntech.nl/Research/research.html; ilustración (b) tomada de bioidiac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.html.



Como ejemplo de la ultraestructura de una *sensilla* olfativa exponemos los estudios efectuados por Kaissling y Thorson (1980) sobre los lepidópteros *Bombyx mori*, *Antheraea polyphemus* y *Antheraea pernyi*. Las *sensilla trichodea* consistían en un grupo de cuatro a seis células con un pelo cuticular de 100 micras de longitud y 3 micras de grosor en *Bombyx mori* (300 x 5 micras en *Antheraea*); la pared del pelo tenía 0,1-0,2 micras de grosor y estaba atravesada por varios miles de estructuras tubulares de alrededor de 100 angstrom de diámetro. El lumen del pelo contenía, en el género *Bombyx*, las dendritas de dos neuronas.

Figura I.7. Diagrama de un receptor olfativo (*sensillum*) típico de insectos (tomado de Metcalf y Metcalf 1992).



Los insectos poseen muchas *sensilla* olfativas dispersas sobre su cuerpo, aunque tienden a concentrarlas en las antenas. Aunque el número total de *sensilla* puede variar enormemente entre especies y según el estado de desarrollo del insecto, para ilustrar su grado de abundancia

basta con citar que cada antena de un macho del lepidóptero *Bombyx mori* tiene alrededor de 17.000 *sensilla* que responden a señales sexuales químicas específicas producidas por la hembra, que equivalen a \approx 45 millones de poros en cada macho (Gullan y Cranston 2000). Wadhams (1990) -citando a Henderson y Wadhams (1981)- recoge que la antena del coleóptero escolítido *Scolytus scolytus* tiene entre 2.000 y 3.000 *sensilla* olfativas.

En cuanto a la localización de estas estructuras en las antenas de los insectos, Zacharuk (1985) apunta que sus dos primeros artejos (escapo y pedicelo) presentan principalmente *sensilla* mecanorreceptoras, y que el mayor número de *sensilla* se encuentra en el flagelo (principalmente quimiorreceptores y termo-higroreceptores). En insectos adultos la densidad de *sensilla* tendería a ser significativamente más alta sobre los segmentos distales del flagelo que sobre los proximales. Sin embargo, esto no ocurre siempre así. Gracco y Catalá (2000) encontraron resultados distintos incluso entre géneros de la misma subfamilia. Así, el estudio de los géneros *Rhodnius* y *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) reveló que en el primero se cumplía lo mantenido por Zacharuk, mientras que en el segundo era la porción proximal la más poblada de *sensilla* y, además, el pedicelo presentaba quimiorreceptores (Catalá 1997; en Gracco y Catalá 2000).

Aproximándonos taxonómicamente a nuestras especies de estudio, Merivee y colaboradores (2002) estudiaron la morfología y ultraestructura de las antenas del coleóptero carábido *Bembidion properans*, encontrando la presencia de varias de las *sensilla* mencionadas anteriormente (*trichodea*, *basiconica*, *coeloconica* y *campaniformia*) junto a otro tipo, con forma de pelo o espina y estructura similar a las *trichodea* de pared gruesa, llamado *sensilla chaetica*, que se asocia generalmente con tareas mecanorreceptoras.

Sobre cerambícidos encontramos los trabajos de Lopes y colaboradores (2002) con *Phoracantha semipunctata*, según los cuales las antenas de estos insectos están densamente cubiertas de *sensilla chaetica*. Entremezcladas con ellas pueden encontrarse dos tipos de *sensilla basiconica* (que denominan I y II), que pueden identificarse por su tamaño, el grado de estrechamiento del ápice y, ultraestructuralmente, por el número de neuronas asociadas. Las de tipo I sólo tienen una neurona (por lo cual se les atribuiría, generalmente funciones mecanorreceptoras), mientras que las de tipo II tienen dos (por tanto se las considera implicadas en la quimiorrecepción). Ambos tipos de *sensilla basiconica* se encuentran en todos los segmentos del flagelo, pero parecen localizarse principalmente en ciertas zonas de los artejos uno a seis, así como ampliamente distribuidas sobre los artejos siete a nueve. Habida cuenta de que las antenas de los cerambícidos cuentan con 11 artejos, el patrón de distribución reseñado parece diferir en cierto modo del apuntado por Zacharuk.

A pesar de que es totalmente imposible determinar con precisión los tipos de *sensilla* que se pueden encontrar sin recurrir a la microscopía electrónica, sí se puede tener una referencia sobre su abundancia y la posible distribución a lo largo de la antena. Por tal motivo hemos observado tanto a la lupa binocular como al microscopio las antenas de dos ejemplares macho y una hembra de *P. germari* y *C. welensii*. La primera observación es que las antenas de estas especies, en comparación con las de *Phoracantha*, no poseen la abundancia de grandes *sensilla (chaetica)* que ésta presenta -cantidad que se hace patente mediante la simple observación a la lupa, a pesar del pequeño tamaño de su antena en comparación con la de *Prinobius* y *Cerambyx*-.

En *P. germari* se aprecia, sin embargo, la aparición de una zona de cierta densidad de grandes *sensilla* (de alrededor 10 micras de longitud, que podrían ser *chaetica* o *trichodea*) en la zona terminal del undécimo segmento (fig. I.8a); y después otras *sensilla* más pequeñas (alrededor de 5 micras de longitud) más o menos dispersas a lo largo de la antena (fig. I.8b). Así mismo, se aprecian “hoyuelos” o depresiones distribuidas a lo largo de la antena (fig. I.8c), en algunos de los cuales aparecen insertos *sensilla* (que podrían ser *basiconica* o *cooleoconica*). En *C. welensii*, en cambio, la antena aparece recubierta prácticamente en su totalidad por unas pequeñas *sensilla* en posición abatida sobre la misma (de menos de 5 micras de longitud; fig. I.9a), probablemente asociadas a depresiones que también se encuentran abundantemente (en cuyo caso podrían ser *basiconica* o *cooleoconica*; fig. I.9.b). En los extremos de cada segmento aparecen *sensilla* de mayor longitud (5-10 micras; tal vez *chaetica*. Figura I.9.a), y dispersas por todos los artejos se encuentran otras *sensilla* pequeñas pero en posición erecta.

Figura I.8. Detalle de la antena de un macho de *P. germari*, mostrando dos tipos de *sensilla*: *chaetica* o *trichodea*? (a) y *basiconica* o *cooleoconica*? (b); y las depresiones presentes a lo largo de la misma (c).

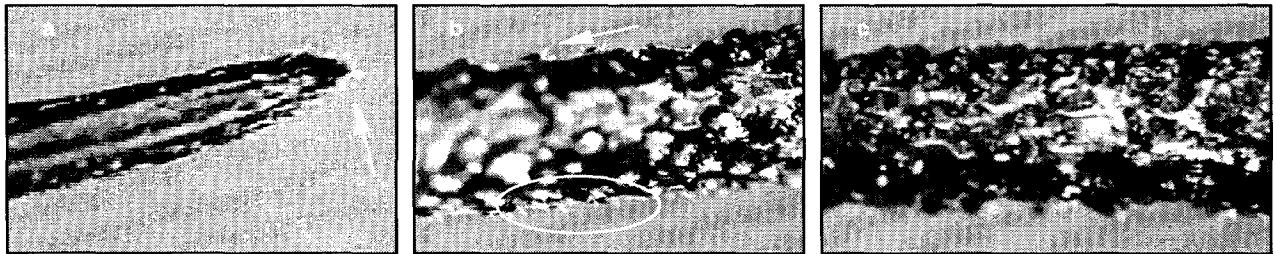
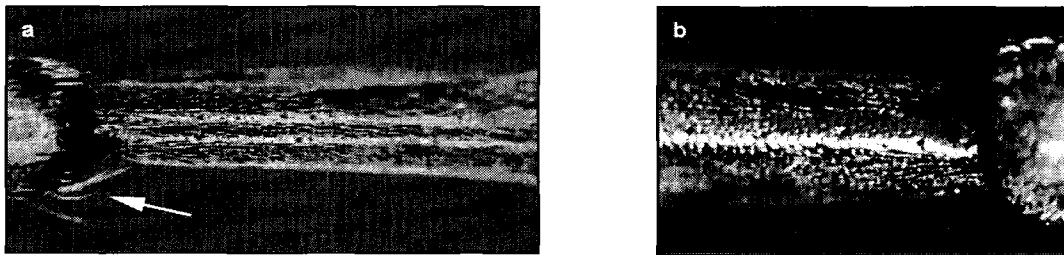


Figura I.9. Detalle de la antena de una hembra de *C. welensii*, mostrando la abundancia de *sensilla* abatidas-*basiconica* o *cooleoconica*?- que recubren sus artejos (a), la flecha señala *sensilla chaetica*?; y depresiones asociadas posiblemente a las *sensilla* abatidas (b).



I.2.2.3. Origen de las técnicas de electrofisiología aplicada

La denominación “electrofisiología” se aplica al estudio de las propiedades eléctricas del material biológico, como son los distintos tipos de células nerviosas, incluyendo los receptores sensoriales periféricos de los insectos (Gullan y Cranston 2000).

El origen de la aplicación de estudios electrofisiológicos en insectos se remonta a mediados de la década de los 50, cuando Dietrich Schneider se planteó desarrollar un test electrofisiológico para analizar la eficacia de distintas fracciones químicas procedentes de extractos de glándulas de *Bombyx mori*. Para ello pensó en registrar, en analogía con el electroretinograma, con el cual estaba familiarizado, la reacción inicial del que se sospechaba era el órgano olfativo de los insectos: la antena. Desde entonces dicha técnica ha sido utilizada para estudiar el mecanismo olfativo de los insectos, la caracterización estructural de los componentes de feromonas sexuales y atrayentes, y para medir la concentración de feromonas en campo; del mismo modo se viene aplicando al estudio del efecto atrayente o inhibidor de las kairomonas (Wadhams 1992; Malo *et al.* 2000).

El material de trabajo original de Schneider fue un estereomicroscopio, un micromanipulador, un amplificador, un osciloscopio y una cámara. La antena seccionada del macho se montaba entre dos electrodos y como estímulo se usaba el eluyente de las glándulas de las hembras. La fuente experimental de olor fue el extremo de una varilla de vidrio que había estado sumergida en el extracto de las glándulas de la hembra, un pulso de aire era dirigido después hacia la antena sobre la varilla. Comprobó de esta manera que se producía una alteración en la señal reflejada por el osciloscopio, alteración que se mantenía durante el tiempo de aplicación del estímulo. A esta respuesta eléctrica de una antena la denominó “electroantenograma (EAG)” (Schneider 1999).

En aquel momento Schneider eludió el término “olfatograma” porque no estaba seguro de si en el fenómeno estaban involucradas otras vías de estímulo, como la mecanorecepción o la termorecepción. Algunas críticas iniciales argumentaban que lo que se había obtenido no era la respuesta olfativa de un receptor biológico, sino lo comunmente denominado “potencial de electrodo”, ya que fenómenos semejantes a la inducción físico-química por un olor eran de hecho conocidos cuando electrodos de plata-cloruro entraban en contacto con una solución salina, como la hemolinfa de la antena.

Actualmente se asume que la aparición de estos potenciales de electrodo es muy probable si se emplean electrodos metálicos (como el tungsteno) para estudiar la respuesta de EAG inducida por ácidos; en cambio, si se usan electrodos capilares de plata-cloruro de plata dicha aparición se considera muy poco probable, a no ser que se estén estudiando ácidos fuertes a altas dosis (Kelling 2001).

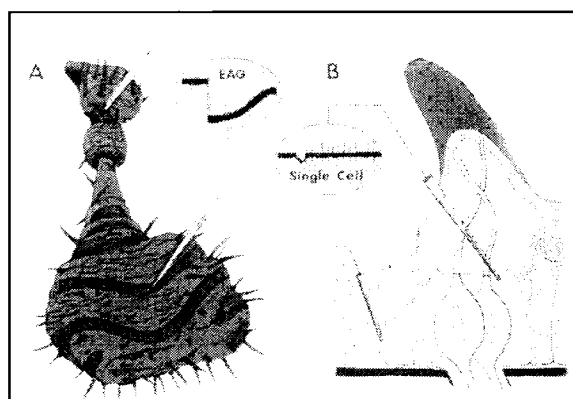
La más simple de las técnicas electrofisiológicas aplicadas es la técnica de EAG, que permite medir la respuesta global de las células receptoras de la antena frente a un estímulo (Wadhams 1992; Gullan y Cranston 2000), ya que, siguiendo a Schneider, el EAG es esencialmente la suma de muchos lentos potenciales negativos de receptores olfativos, registrados más o menos simultáneamente por un electrodo. Este planteamiento es adecuado, en general, para insectos con antenas filiformes, en las cuales las sensilla están distribuidas con relativa uniformidad; pero también se ha encontrado que la respuesta de EAG está

fuertemente influenciada por la distribución de las sensilla alrededor del electrodo registrador, lo cual ocurre en algunos áfidos (Nagai 1981, Park y Hardie 2002).

El potencial de estas lentas reacciones eléctricas en las dendritas de las células olfativas se interpretó como una despolarización de la membrana del receptor (ver especialmente Kaissling y Thorson 1980; Wadhams 1992; Lánsky 2001 y Kaissling 2002). Por otra parte, se vio que la amplitud de la respuesta estaba correlacionada con la frecuencia de los impulsos nerviosos generados, y aumentaba a medida que lo hacía la concentración del estímulo químico, hasta que se alcanzaba el nivel de saturación (Roelofs 1984; citando a Schneider 1963 y 1969).

Las técnicas de EAG que se emplean actualmente permiten registrar, según se ha comentado, la actividad eléctrica que tiene lugar en una antena completa; pero también se puede obtener la respuesta eléctrica de una de las *sensilla* de la antena individualmente, lo cual se conoce mediante las siglas SCR o SSR, abreviaturas de “*single cell recording*” (\equiv registro de una célula individual) y “*single sensillum recording*” (\equiv registro de un *sensillum* individual) respectivamente (figura I.10).

Figura I.10. Ilustración comparativa de las técnicas de EAG y SCR aplicadas a escolítidos (procede de Payne (1979), tomada de www.barkbeetles.org/spb/spbbook/Chapt2.html).



Esta técnica se aplicó por primera vez en 1962 (Wadhams 1992; citando a Boeckh 1962) y fue mejorada por Kaissling en 1974, quien desarrolló la técnica óptima de registro extracelular mediante el corte del extremo del *sensillum* y la puesta en contacto de dicha abertura con un electrodo capilar (Schneider 1999). En términos de Schoonhoven (1990), cuando un microelectrodo es implantado cerca del *sensillum*, la señal eléctrica de una neurona individual puede ser registrada, de modo que se puede obtener información acerca de la especificidad del receptor, así como sobre su sensibilidad.

La modalidad de SCR surgió debido a la necesidad de un conocimiento más profundo de los procesos receptores (Schneider 1999), así como de las propias limitaciones de la técnica de EAG. En este sentido, Cork y colaboradores (1990) apuntan que puede darse el caso de que compuestos percibidos por el insecto y que desempeñan un importante papel en su comportamiento produzcan débiles respuestas de EAG, de manera que dichos compuestos podrían pasar sin ser detectados en esta modalidad en caso de disponer de pequeñas muestras de material para el análisis. Por otro lado, la producción de respuesta de EAG por parte de un determinado compuesto no implica que este desempeñe un papel significativo en su

comportamiento: algunos compuestos podrían actuar, efectivamente, como atrayentes (induciendo una discriminación positiva), otros como repelentes (discriminación negativa), pero otros pueden no provocar respuestas de comportamiento aparentes.

En resumen, la técnica EAG proporciona información procedente de todo el espectro de receptores olfativos del insecto, aunque puede carecer de sensibilidad frente a ciertos componentes feromonales; en cambio, SCR es altamente sensible a todos los compuestos, pero no proporciona información simultánea del conjunto de receptores, o si lo consigue es de un reducido número de ellos (Wadhams 1990). Dicho autor ilustra la diferencia entre EAG y SCR citando el ejemplo del escolítido del olmo *Scolytus scolytus*, cuya feromona de agregación comprende una mezcla de metabolitos procedentes del insecto, así como de la especie vegetal hospedera. Aunque se apreció respuesta de EAG frente a los metabolitos del insecto no se observó respuesta frente al (-)- α -cubebeno, metabolito procedente del hospedante, a pesar de que se encontraron células olfativas, es decir SCR, que respondieron específicamente a este compuesto.

1.2.2.4. Las técnicas de electrofisiología aplicadas a cerambycidos

Aunque desde su aparición estas técnicas han sido aplicadas a numerosas especies de insectos, la mayor parte de las referencias que se pueden encontrar están relacionadas con lepidópteros. Por lo que se desprende de Wadhams (1992) creemos que esto puede ser debido, principalmente, a que han sido aplicadas al estudio de las feromonas sexuales, cuya presencia está muy generalizada en este orden. En los coleópteros, en cambio, este tipo de semioquímicos no es tan abundante, y los trabajos encontrados son menos numerosos y se refieren más a feromonas de agregación y kairomonas. Por lo que se refiere a insectos de la familia Cerambycidae existen pocos estudios electrofisiológicos y, de estos, la mayor parte se centran en compuestos de actividad kairomonal, tratando algún caso específico sobre feromonas sexuales.

Barata y colaboradores (1992) han llevado a cabo algunos de los trabajos más interesantes a nuestro juicio en esta familia, tanto por la complejidad de los mismos como por los resultados obtenidos. Emplearon electrodos de tungsteno para registrar la respuesta de EAG del perforador *Phoracantha semipunctata* frente a volátiles liberados por cortezas, nudos, hojas y frutos de *Eucalyptus globulus*. Encontraron distintas respuestas frente a los monoterpenos: alta sensibilidad frente al α -pineno y respuestas moderadas frente al canfeno a las dosis más altas probadas. Otros monoterpenos, como el ρ -cimeno y el terpinoleno, no produjeron respuesta medible.

Puesto que los adultos de los perforadores *Anaglyptus subfasciatus* y *Demonax transilis* visitan con asiduidad las flores de las mismas especies, Ikeda y colaboradores (1993) estudiaron la respuesta de EAG de estos insectos frente a 14 compuestos esenciales relacionados tradicionalmente con ellas. El acetato de bencilo y el linalol resultaron ser dos de los compuestos más estimulantes para ambas. Pero los posteriores estudios de comportamiento revelaron que sólo el acetato de bencilo mostró una atracción efectiva en campo para los dos insectos.

Barata y colaboradores (2000) extrajeron los volátiles de las hojas de varias especies, tanto hospedantes como no hospedantes, y probaron la respuesta de EAG de *Phoracantha*

semipunctata frente a los diversos componentes de la mezcla, identificando simultáneamente cada uno mediante diversas técnicas analíticas. Tras la comparación entre la respuesta de los volátiles presentes en hospedantes y no hospedantes, concluyeron que los compuestos α -cubebeno y (*E*)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno podrían ser candidatos como potenciales inhibidores de la selección de huéspedes adecuados y, por tanto, deberían ser mejor estudiados ante la perspectiva de su empleo potencial en el contexto del control integrado de dicho insecto.

Suckling y colaboradores (2001) midieron la respuesta de *Arhopalus tristis* -cerambícido que causa episodios importantes de plaga en Nueva Zelanda sobre el género *Pinus*, particularmente en aquellos pies dañados por el fuego- frente a distintos monoterpenos volátiles presentes en *Pinus radiata*. Aunque encontraron las mayores respuestas frente al terpineol, los compuestos (*E*)-2-hexen-1-ol y (*E*)-2-hexenal, denominados habitualmente GLV (de “*Green Leaf Volatiles*”), también provocaron altas respuestas. Finalmente citan que, generalmente, con los machos se encontraban respuestas de EAG más altas que con las hembras, aunque hubo una alta correlación entre las respuestas de ambos sexos.

Barata y colaboradores (2002) profundizaron en el estudio de la manera en que resulta codificada por las neuronas de *Phoracantha semipunctata* la información sobre mezclas de olores procedentes de hospedantes y no hospedantes, mediante la técnica de SCR acoplada a la cromatografía gaseosa. Sus resultados mostraron respuestas selectivas de neuronas receptoras olfativas individuales frente a uno o varios (la mayoría de ellas frente a uno o dos) compuestos químicos estructuralmente relacionados, presentes en las mezclas complejas liberadas por este tipo de plantas. También comprobaron que la técnica SCR reveló respuestas específicas de neuronas ante volátiles que no indujeron respuesta de EAG en sus estudios previos (Barata *et al.* 2000) usando el mismo tipo de muestras.

Zhang y colaboradores (2000 y 2002) emplearon la técnica de EAG acoplada a la cromatografía gaseosa, para encontrar dos compuestos volátiles específicos procedentes de machos de *Anoplophora glabripennis*: 4-(*n*-heptiloxi)butanal y 4-(*n*-heptiloxil)butan-1-ol. Consideran que estas estructuras son inusuales y no han sido encontradas en insectos con anterioridad. Las muestras sintéticas excitaron la misma respuesta para ambos sexos y la misma excitación en los estudios preliminares de túnel de viento; sin embargo, en los trabajos de campo llevados a cabo en 1999 en China no se verificó ningún tipo de actividad atractiva por parte de dichas sustancias.

I.3. Objetivos

El objetivo general de los trabajos que se exponen en la presente Tesis Doctoral, es caracterizar, por medio de la electroantenografía, el comportamiento olfativo de *Cerambyx welensii* y *Prinobius germari* frente a compuestos volátiles cuya presencia se considera típica en la emisión de sus principales especies hospedantes (*Q. ilex* y *Q. suber*), en especies no hospedantes o bien son comunes a ambos tipos de plantas. Para alcanzar el objetivo general es necesario alcanzar una serie de objetivos específicos, que se enumeran a continuación:

- 1) Establecer un dispositivo adecuado para el estudio electroantegráfico (EAG) de estímulos olfativos para cerambícidos, y valorar la aptitud para este tipo de estudios de *C. welensii* y *P. germari*. En relación con la consecución de este objetivo, es necesario:
 - Determinar la posible influencia sobre la señal eléctrica inducida en la preparación para estudio de EAG, de los siguientes aspectos de la puesta en práctica del dispositivo: a) la fluctuación de los caudales aplicados, b) la captación de dicha señal eléctrica.
 - Seleccionar un compuesto adecuado para su empleo como estímulo estándar en cada especie, a partir de las primeras respuestas generadas por tres sustancias candidatas: (*E*)-2-hexenal, ácido acético y esencia de trementina.
- 2) Estudiar el efecto sobre la respuesta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* de ciertos factores experimentales, como la concentración y cantidad de los estímulos aplicados, la frecuencia de estimulación y la duración de una preparación para estudio de la respuesta en un insecto.
- 3) Analizar la posible existencia de variabilidad en las respuestas de EAG entre sexos e individuos, y estudiar la incidencia de algunos factores (experimentales, anatómicos y fisiológicos) que podrían influir en la variabilidad de respuesta entre ejemplares.
- 4) Estudiar la respuesta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* frente a compuestos volátiles sintéticos, característicos de encinas y alcornoques así como de otras especies arbóreas. Como puntos relevantes a alcanzar en dicho estudio, se plantea:
 - Estimar la precisión con la cual son percibidos algunos de los compuesto más estimulantes olfativamente.
 - Interpretar la importancia de la estimulación olfativa en la selección de hospedantes por parte de estos dos cerambícidos; y discutir el papel desempeñado en dicha selección por las sustancias cuya percepción sugiera una discriminación positiva y las que puedan inducir discriminación negativa.

I.4. Bibliografía

- Allison, J.D.; Borden, J.; McIntosh, R.; De Groot, P.; Gries, R. (2001). Kairomonal response by four *Monochamus* species (Coleoptera: Cerambycidae) to bark beetle pheromones. *Journal of Chemical Ecology* 27 (6):1151-1161.
- Anbutsu, H. (2001). Oviposition deterrent by female reproductive gland secretion in Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *Journal of Chemical Ecology* 27 (6):1091-1104.
- Arn, H.; Städler, E. M.; Rauscher, S. (1975). The electroantennographic detector -a selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. *Z. Naturforsch* 30: 722-725.
- Barani, A.; Vezzadini, S.; Ferrari, M.; Vai, N.; Mazzini, F.; Scaravelli, P. (2000). Protection from *Saperda carcharias*, xylophagous on poplar. *Informatore Agrario* 56 (20): 69-73.
- 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. No publicado.
- 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. En: Menken, S. B. J.; Visr, H.; Harrewijn, P. (eds.). *Proceedings of the 8th International Symposium on Insects-Plant Relationships*. Kluwer Academic, Dordrecht. pp.: 133-135.
- Barata, E.; Mustaparta, H.; Pickett, J.; Wadhams, L.; Araujo, J. (2002). Encoding of host and non-host plant odours by receptor neurons in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. Volume 188, Number 2: 121 – 133.
- 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, No. 8: 1877-1895.
- Barreda, J.M. (2001). Cerambícidos nuevos e interesantes para Andalucía y España (Coleoptera. Cerambycidae). *Boletín de la Sociedad Andaluza de Entomología* 2: 29-31.
- Bense, U. (1995). *Longhorn Beetles, Illustrated Key to the Cerambycidae and Vesperidae of Europa*. Margraf Verlag; Neikersheim. 512 pp.
- Bento, J. M. S.; Dellalucia, T. M. C.; Frighetto, R. T. S. (1993). Male response to natural sex pheromone of *Migdolus Fryanus* westwood (Coleoptera, Cerambycidae) females as affected by daily climatic factors. *Journal of Chemical Ecology* vol 19 (10): 2347-2351.
- Berkov, A.; Meurergrimes, B.; Purzycki, K. (2000). Do *Lecythidaceae* specialists (Coleoptera, Cerambycidae) shun fetid tree species. *Biotropica* 32 (3): 440-451.

- BOE (1986). Ratificación del Convenio relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural en Europa, hecho en Berna el 19 de septiembre de 1979. BOE 1 de octubre de 1986.
- BOE (1997). Convenio relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural en Europa, hecho en Berna el 19 de septiembre de 1970. BOE de 1 de octubre de 1986 y de 7 de junio y 5 de diciembre de 1988. Relación de especies del Anejo I. BOE nº 121, de 21.05.97).
- BOE (1998). Real Decreto 1193/1998, de 12 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 1997/1995 de 7 de diciembre, y en el que se Establecen Medidas para Contribuir a Garantizar la Biodiversidad Mediante la Conservación de los Hábitat Naturales y de la Fauna y Flora Silvestre. BOE núm. 151, de 25 de junio de 1998.
- Boeckh, J. (1962). Electrophysiologische untersuchungen an einzelnen Geruchs-Rezeptoren auf den antennen des Totengräbers (Necrophorus: Coleoptera). *Z. Vergleich. Physiol* 46: 212-248.
- Campadelli, G.; Sama, G. (1993). *Arhopalus syriacus* Reitter (Coleoptera: Cerambycidae). *Informatore Fitopatologico* 43: 7-8.
- Catalá, S. (1997). Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a comparative study over five genera. *Int. J. Insect Morphol. Embryio* 26: 67-73.
- Colas, G. (1973). Le *Prinobius scutellaris* (Col. Cerambycidae). *L'Entomologiste* 29 (4-5): 139-143.
- Compte, A.; Caminero, M. (1982). Las comunidades de coleópteros xilófagos de las encinas de los alrededores de Madrid. *Graellsia*, tomo 38, pp.: 201-217.
- Coracini, M.; Bengtsson, M.; Reckziegel, A.; Löfquist, J.; Francke, W.; Vilela, E.; Eiras, A.; Kovalski, A.; Witzgall, P. (2001). Identification of a four-component sex pheromone blend in *Bonagota cranaodes* (Lepidoptera: tortricidae). *J. Econ. Entomol* 94 (4): 911-914.
- Cork, A.; Beever, P. S.; Gough, A. J.; Hall, D. R. (1990). Gas chromatography linked to electroantennography: a versatile technique for identifying insect semiochemicals. En: McCaffery, A. R.; Wilson, I. D. (eds.). *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones*. Plenum Press, New York. 271-280.
- Coulson, R. y Witter, J. (1990). *Entomología Fforestal. Ecología y Control*. Limusa. Méjico D. F. 751 pp.
- Crook, D. y Mordue, A. (1999). Olfactory responses and sensilla morphology of the blackcurrant leaf midge *Dasineura tetensi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 37-50.
- Chararas, C. (1978). La presión osmótica de las especies forestales y sus relaciones con los insectos xilófagos. *Ecología de Pesson*. Mundi-Prensa. 207-227.
- Dai, J. (1994). Experiment of injecting pesticide in worm channels to controllarva of *Anoplophora chinensis*. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology* 14 (6): 44-45.
- De Groot, 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.

- De Groot, P.; Nott, R. (2004). Response of the whitespotted sawyer beetle, *Monochamus s. scutellatus*, and associated woodborers to pheromone of some *Ips* and *Dendroctonus* bark beetles. *Journal of Applied Entomology* 483-487.
- Den Otter, J. C.; Saini, R. K. (1985). Pheromone perception in the tse tse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Entomol Exp. Appl.* 39: 155-161.
- DOCE (1997). Directiva 97/62/CE, de 27 de octubre, por la que se Adapta al Progreso Científico y Técnico la Directiva 92/43/CEE, relativa a la Conservación de los Hábitats Naturales y de la Fauna y Flora Silvestres. DOCE nº L 305, de 08.11.97.
- DOCE (1998). Decisión 98/746/CE, del Consejo de Europa, de 21 de diciembre de 1998, relativa a la aprobación en nombre de la Comunidad de la modificación de los Anexos II y III del Convenio de Berna relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural de Europa. DOCE nº L 358, de 21.12.98).
- Ebeling, W. (1977). Sorptive dust for pest control. *Annual Review of Entomology* 16: 123-158.
- El Antry, S. (1999). Biologie et dégâts de *Cerambyx cerdo mirbecki* Lucas (Coléoptère, Cerambycidae) en subéraie de la Mamora (Maroc). *Integrated Protection in Oak Forests IOBC. Bulletin* 22 (3) pp.: 59-64.
- Federación Española de Criadores de Ganado Autóctono Extensivo de la Dehesa (GEDES) (1999). Memoria anual. Sin publicar.
- Federación Española de Criadores de Ganado Autóctono Extensivo de la Dehesa (GEDES) (2000). Memoria anual. Sin publicar.
- Federación Española de Criadores de Ganado Autóctono Extensivo de la Dehesa (GEDES) (2001). Memoria anual. Sin publicar.
- Fettköther, R.; Dettner, K.; Schröder, F.; Meyer, H.; Francke, W.; Noldt, U. (1995). The male pheromone of the old house borer *Hylotrupes bajulus* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae): identification and female response. *Experientia* 51: 270-277.
- Fields, P.; Korunic, L. (2001). Diatoms industrial use: diatomaceous earth as an insecticide. *Eureka: Diatoms-Nature's Gems*. [en línea]. hjs. geol. uib. no/diatoms/industry/de-web.shtml. Última consulta, enero 2005.
- Fragoso, S. A. (1985). The terminalia as a basis for the classification of Cerambycidae (Coleoptera) subfamilies part I. Terminology and genital morphology of *Cerambyx cerdo* L. *Revista Brasileira de Entomologia* 29(1). 125-134.
- Fukaya, M.; Akino, T.; Yasuda, T.; Tatsuki, S.; Wakamura, S. (1999). Mating sequence and evidence for synergistic component in female contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). *Entomological Science* 2 (2): 183-187.
- Fukaya, M.; Honda, H. (1995). Reproductive biology of the Yellow Spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae) II. Evidence for two female pheromone components with different functions. *App. Entomol. Zool.* 30 (3): 467-470.
- Fukaya, M.; Wakamura, S.; Yasuda, T.; Senda, S.; Omata, T.; Fukusaki, E. (1997). Sex pheromonal activity of geometric and optical isomers of synthetic contact pheromone to

- males of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology* 32(4): 654-656.
- Fukusaki, E.; Satoda, S.; Yuasa, H.; Senda, S.; Omata, T.; Fukaya, M.; Wakamura, S. (1998). Synthesis of the four possible stereoisomers of 21-methyl-8-pentatriacontene, the female contact sex pheromone of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85 (1): 120-121.
- Gavillet, B. (2002). *Molecular basis of insect olfaction*. [en línea]. www. pheromone. ekol. lu. se/projbruno. html. Última consulta, diciembre 2004.
- Glenn, D.; Puterka, G.; van der Zwet, R.; Byers, R.; Feldhake, C. (1999). Hydrophobic particle films: a new paradigm for suppression of arthropod pest and plant diseases. *J. Econ. Entomol* 92: 759-771.
- Golob, P. (1997). Current status and future perspectives for inert dusts for control of stored product insects. *J. Stored Prod. Res.* 33: 69-79.
- 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.
- Gracco, M.; Catalá, S. (2000). Inter-specific and developmental differences on the array of antennal chemoreceptors in four species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 95 (1): 67-74.
- Granados, C.; Ramírez, D.; Sánchez, I.; López, G.; Vázquez, E. (2001). Defoliadores de encinar en el andévalo occidental de la provincia de Huelva. Comparación entre dos situaciones puntuales: el periodo 1985-1988 y el año 2000. *III Congreso Forestal Español. Montes para la sociedad del nuevo milenio*. Junta de Andalucía. Tomo IV: 59-64.
- Gullan, P. J.; Cranston, P. S. (2000). *The insects. An outline of Entomology*. Blackwell Science. 470 pp.
- Hanks, L.; Millar, J.; Paine, T. (1998). Dispersal of the eucalyptus longhorned borer (Coleoptera: Cerambycidae) in urban landscapes. *Environmental Entomology* 27 (6): 1418-1424.
- Hanks, L. M. (1999). Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 483-505.
- Hanks, L. M.; Paine, T. D.; Millar, J. G. (1993). Host species preferences and larval performance in the wood-boring beetle *Phoracantha semipunctata* F. *Oecologia* 95: 22-29.
- Henderson, N. C.; Wadhams, L. J. (1981). The morphology of the antennal club of *Scolytus scolytus* (F) (Coleoptera: Scolytidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 92: 477-487.
- Hernández, J. M. (1994). Ciclo biológico de algunas especies de Cerambycidae en condiciones de laboratorio (Coleoptera). *Boletín de la Sociedad Española de Entomología* 18:1-2: 15-20.
- Higuchi, T.; Saika, T.; Senda, S.; Mizobata, T.; Kawata, Y.; Nagai, J. (1997). Development of biorational pest control formulation against longicorn beetles using a fungus, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (3): 236-243.

- Hyvernaud, M.; Wiest, F.; Serment, M.; Angulo, M.; Winkel, O. (1996). Make ready of a detection system for insect attack by acoustical method. *International Research Group on Wood Preservation. 27° Annual Meeting, Guadeloupe, France, 19-24 May. N° IRG-WP-96-10183.* 8 pp.
- 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.
- Ilango, K. (2000). Morphological characteristics of the antennal flagellum and its *sensilla chaetica* with character displacement in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti *sensu lato* (Diptera: Psychodidae). *J. Biosci.* 25 (2): 163-172.
- IUCN. (1996). *1996 IUCN Red List of Threatened Animals*. Baillie, J. & Groombridge, B. (eds.), IUCN, Gland, Switzerland. 368 pp.
- Jermey, T. (1990). Prospects of antifeedant approach to pest control. A critical review. *J. Chem. Ecol.* 16: 3151-3166.
- Kaissling, K. E. (2002). Model of perireceptor and receptor events in olfactory sensilla. *ESITO-VI: European Symposium for Insect Taste and Olfaction. Comunicación personal.* Recurso en red: www.esito-symp-org/.
- Kaissling, K. E.; Thorson, J. (1980). Insect olfactory sensilla: structural, chemical and electrical aspects of the functional organization. En: Satelle, D. B.; Hall, L. M.; Hildebrand, J. G. (eds.). *Receptors for neurotransmitters, hormones and pheromones in insects*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York. pp.: 261-282.
- Kashio, T.; Grey, G. (1996). Microbial control of the white spotted longicorn beetle *Anoplophora malasiaca* by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* in citrus orchards in Japan. *Biological Pest Control in Systems of Integrated Pest Management. Proceedings of the International Symposium on "The use of Biological Control Agents under Integrated Pest Management"*. 106-112.
- Kelling, F. J. (2001). *Olfaction in Houseflies: Morphology and Electrophysiology*. Recurso en red. www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/. 144 pp.
- Korunic, Z. (1998). Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *J. Stored Prod. Res.* 34: 87-97.
- Korunic, Z.; Ormesher, P. (1998). Evaluation and standardized testing of diatomaceous earth. En: Jin, Z.; Li, L. (eds.). *Proceedings 7th Int. Working Conf. Stored Products Protection, Beijing*. En prensa.
- Lánsky, P. (2001). Receptor heterogeneity and its effect on sensitivity and coding range in olfactory sensory neurons. *Bulletin of Mathematical Biology* 63: 885-908.
- Lapointe, S. (2000). Particle film deters oviposition by *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 93 (5): 1459-1463.
- Law, J. H.; Regnier, F. W. (1971). Pheromones. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 533.
- Leal, W. S.; Bento, J. M. S.; Vilela, E. F.; Dellalucia, T. M. C. (1994). Female sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus Fryanus* Westwood N-(2's)-Methylbutanoyl 2-Methylbutylamine. *Experientia* 50 (9): 853-856.

- Leal, W. S.; Shi, X. W.; Nakamuta, K.; Ono, M.; Meinwald, J. (1995). Structure, stereochemistry, and thermal isomerization of the male sex pheromone of the longhorn beetle *Anaglyptus subfasciatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (4): 1038-1042.
- Leellen, F.; Keena, M.; Cate, J.; McManus, M.; Higgs, M.; Hanks, L. (2002). Infectivity of rhabditoid nematodes to the asian longhorn beetle. *Asian Longhorned Beetle Biocontrol Research. Recurso en red.* www.uvm.edu/albeetle/research/biocontrol.html.
- Liang, C.; Li, G. H.; Li, G. W.; Gao, R. (1997). Toxicity analysis of ten pesticides on controlling *Anoplophora glabripennis*. *Forest Research* 10 (3): 325-327.
- Liang, C.; Li, G. H.; Li, G. W.; Gao, R.; Zhao, Z.; Sun, J. (1997). Study on the use of systemic and pyrethroid insecticides to control *Anoplophora glabripennis* and *Apriona germarii*. *Forest Research* 10 (2): 189-193.
- Liñán de, C. (2001). *Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*. Ediciones Agrotécnicas, S.L (17ª ed.). 670 pp.
- Liñán de, C. (1994). *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Ediciones Agrotécnicas, S. L., Madrid. 567 pp.
- Liñán de, C. (coordinador)(1998). *Entomología Agroforestal*. Ediciones Agrotécnicas SL., Madrid. 1. 309 pp.
- Llinares, A. (2002). Primeras citas de algunos cerambícidos (Insecta, Coleoptera, Cerambycidae) para la provincia de Córdoba. *Boletín de la Sociedad Anadaluzá de Entomología* 4: 34-37.
- Lopes, O.; Barata, E. N.; Mustaparta, H.; Araújo, J. (2002). Fine structure of antennal sensilla basiconica and their detection of plant volatiles in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* Fabricius (Coleoptera: Cerambycidae). *Arthropod Structure & Development*. En prensa. [en línea]. www.elsevier.com/locate/asd. Última consulta, diciembre 2004.
- López; Ocete, R.; Chi, D.; Darvas, B.; Coll, J. (1998). Efecto inhibitorio de la alimentación de diversos extractos botánicos sobre *Kaloterme flavicollis* Fabr. (Isoptera: Kalotermitidae). *Bol. San. Veg. Plagas*. 24 (1): 11-22.
- Machado, L.; Raga, A. (1999). Efficacy of chemical and biological insecticides against the citrus trunk borer *Macropophora accentifer*. *Revista de Agricultura Piracicaba* 74 (2): 229-234.
- Maia, B. H.; De Paula, J.; Sant'Ana, J.; (2000). Essential oils of *Toona* and *Cedrela* species (Meliaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 11 (6): 629-639.
- Mało, E.; Renou, M.; Guerrero, A. (2000). Analytical studies of *Spodoptera littoralis* sex pheromone components by electroantennography and coupled gas chromatography-electroantennographic detection. *Talanta* 52: 525-532.
- Manion, P. D. (1991). *Tree Disease Concepts*. Prentice-Hall Ed., Londres. 402 pp.
- Mansilla, P.; Pérez, R.; Ruiz, F.; Salinero, C. (1999). *Avetianella longoi* Siscaro, parásito de huevos de *Phoracantha semipunctata* F. : primera cita de su presencia en España y bases para la puesta en práctica del control biológico del xilófago. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 25 (4): 515-522.

- 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.
- Merivee, E.; Ploomi, A.; Rahi, M.; Bresciani, J.; Ravn, H.; Luik, A.; Sammelselg, V. (2002). Antennal sensilla of the ground beetle *Bembidion properans* Steph. (Coleoptera, Carabidae). *Micron* 33: 429-440.
- 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.
- Montoya, J. M. (1992). Mortandad de quercíneas: la perspectiva selvícola y los antecedentes climáticos. La cuestión de *Hypoxyylon mediterraneum* en el alcornoque de Mamora (Marruecos). *Ecología* 6: 123-130.
- Moral del, J. (1994). *Cerambyx* spp., historia de una plaga de las dehesas extremeñas. *Phytoma-España*. 60: 18-24.
- Moral del, J.; Casado, D.; Gallego, M.; Rey, J. M. (1994). Presencia de insectos parásitos del grupo *Cerambyx cerdo* en la dehesa extremeña. *Phytoma-España* 59: 44-52.
- Moral del, J.; Gallego, M.; Nuñez; Chiva, V. (1989). *Cerambyx cerdo* L, un coleóptero parásito de los *Quercus* spp. de las dehesas extremeñas. *Phytoma-España* 10: 58-63.
- Moral del, J.; Casado, D.; Gallego, M. (1993). Crecimiento de las poblaciones de insectos del grupo *Cerambyx cerdo* en la dehesa arbolada extremeña. *Congreso Forestal Español, Lourizán. Ponencias y comunicaciones*, tomo III, 293-295.
- Morcuende, A.; Naveiro, F. (1993). Capturas de cerambícidos con trampa de luminosa en una dehesa extremeña durante 1990, 1991 y 1992. *Phytoma-España* 48: 53-56.
- Morgan, E. D.; Mandava, N. B. (1990). *Handbook of Natural Pesticides, volume VI: Insect Attractants and Repellents*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 249 pp.
- 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.
- Nagai, T. (1981). Electroantennogram response gradient on the antenna of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.* 27: 889-894.
- Nakamura, K.; Soné, K.; Ookuma, H. (1999). Modification of a commercial attraction trap for live trapping of *Monochamus alternatus* (Hope) adults (Coleoptera: Cerambycidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 43: 55-59.
- Nakamuta, K.; Leal, W. S.; Nakashima, T.; Tokoro, M.; Ono, M.; Nakanishi, M. (1997). Increase of trap catches by a combination of male sex pheromone and floral attractant in

- longhorn beetle, *Anaglyptus subfasciatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Chemical Ecology* 23 (6): 1635-1640.
- Nakashima, T.; Nakamura, K.; Makihara, H.; Ohya, E.; Nakanishi, M.; Ikeda, T. (1994). Field response of *Anaglyptus subfasciatus* Pic (Coleoptera: Cerambycidae) to benzyl acetate and structurally related esters. *Applied Entomology and Zoology* 29 (3): 421-425.
- 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.
- Navarro, R.M.; Fernández, P. (2001). Evaluation de dégats produits par le déperissement du chêne-liege en Andalusie. *Selviculture of cedar (Cedrus atlantica End. M.) and cork oak (Quercus suber L.)*. IUFRO.
- Naveiro, F.; Morcuende, A. (1994). Observaciones sobre los cerambícidos de las quercíneas en la provincia de Cáceres. *Phytoma-España* 60: 49-52.
- Naveiro, F.; Del Pozo, J.D.; Morcuende, A.; González, M.A.; Cienfuegos, B. (2002). Prospección fitosaniaria del arbolado de las dehesas en Extremadura. En: Varios autores: *Memoria de la XIX Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines*. Santander, 19-21 de noviembre de 2002. Gobierno de Cantabria -Direc. Gral. de Montes y Conservación de la Naturaleza; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación-Subdirección General de Sanidad Vegetal. pp.: 165-169. No publicado.
- Nenadovic, V.; Prolic, Z.; Lazarevic, J.; Al Arid, L.; Ivanovic, J. (1999). Royal jelly as a food additive and its possible bioestimulating effects. *Acta Veterinaria (Beograd)* 49, N°. 2-3, 105-116.
- Noldt, U.; Fettkothe, R.; Dettner, K. (1995). Structure of the sex pheromone-producing prothoracic glands of the male old house borer, *Hylotrupes-Bajulus* (L) (Coleoptera, Cerambycidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* vol 24 (2): 223-234.
- Noldt, U.; Fettkothe, R.; Schroder, F.; Meyer, H.; Dettner, K.; Francke, W.; Konig, W. A. (1995). Sex pheromone of the male house longhorn beetle *Hylotrupes bajulus* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae). *International Research Group on Wood Preservation. 26th Annual Meeting, Helsingor, Denmark, 11-16 June*. 15 pp.
- Nordlund, D. A. (1981). Semiochemicals: a review of the terminology. En: Nordlung, D. A.; Jones, R. L.; Lewis, W. J. (eds.). *Semiochemicals: their role in pest control*. John Wiley & Sons, New York. Chap. 2.
- Notario, A. (1978). *Desarrollo de una Dieta Definida para Cría Individual de Insectos Lignícolas, con Especial Atención a Coleoptera*. INIA. Ministerio de Agricultura. Serie Tesis Doctorales número 7, Madrid. 95 pp.
- Notario, A.; Baragaño, J. R.; Castresana, L. (1993). Estudio de cerambícidos xilófagos de *Pinus sylvestris* L. utilizando dietas artificiales. *Ecología* 7: 499-502.

- Nowak, D.; Pasek, J.; Sequeira, R.; Crane, D.; Mastro, V. (2001). Potential effect of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) on urban trees in the United States. *J. Econ. Entomol.* 94 (1): 116-122.
- Núñez, L. (2002). El banyarriquer. L'insecte perforador que ataca als alzinars. *Quaderns de natura*. Conselleria de Medi Ambient. Govern de les Illes Balears. nº 14, 19 pp.
- Ocete, R.; Pérez, M. A. (1996). Efectos de la aplicación de extractos de *Daphne gnidium* L. y *Anagyris foetida* L. sobre diversos grupos taxonómicos. *Bol. San. Veg. Plagas* 22 (1): 45-56.
- Ostry, M. E.; Anderson, N. A. (1995). Infection of *Populus tremuloides* by *Hyposyloxylon mammatum* ascospores through *Saperda inornata* galls. *Canadian Journal of Forest Research* 25 (5): 813-816.
- Pajares, J.A.; Ibeas, F.; Díez, J.J.; Gallego, D. (2004). Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *Journal of Applied Entomology* 633-638.
- Park, K. C.; Cork, A. (1999). Electrophysiological response of antennal receptor neurons in female Australian sheep blowflies, *Lucilia cuprina*, to host odours. *Journal of Insect Physiology* 45: 85-91.
- Park, K. C.; Hardie, J. (1998). An improved aphid electroantennogram. *Journal of Insect Physiology* 44 (10): 919-928.
- Payne, T.L. (1979). Pheromone and host odor perception in bark beetles. En: Narahashi, T. (ed.): *Neurotoxicology of insecticides and pheromones*. Plenum, New York.
- Pérez-López, F.J.; Hernández-Ruiz, J.A. (1998). Nuevos datos para el conocimiento de la cerambícido-fauna de la provincia de Granada (Coleoptera: Cerambycidae). *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 22 (3-4): 249-251.
- 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.
- Pickett, J. A.; Wadhams, L. J. Woodcock, C. M. (1998). Insect supersense: mate and host location by insects as model systems for exploiting olfactory interactions. *Biochemist* : 8-13.
- Primo, E. (1991). *Ecología Química. Nuevos métodos de lucha contra insectos*. Banco de Crédito y Ahorro. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 191 pp.
- Puterka, G.; Glenn, D.; Sekutowisky, D; Unruh, T.; Jones, S. (2000). Progress toward liquid formulations of particle films for insects and disease control in pear. *Environ. Entomol.* 29: 329-339.
- Ragazzi, A.; Tiberi, R. (1998). Ruolo degli insetti fitofagi e dei patogeni fungini nel deperimento delle querce in Italia. *Monti e Boschi* 49 (6): 25-28.
- Roelofs, W. L. (1984). Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. En: Hummel, H.; Miller, T. A. (eds.). *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 131-159.
- Rohitha, B.; Calvert, P.; Hill, R.; Popay, A. (1994). An acoustic technique for recording lemon tree borer activity in the laboratory. *Proceedings of the 47° New Zealand Plant protection*

- Conference, Waitangi Hotes, New Zealand, 9-11 august, 1994. New Zealand Plant Protection Society; Rotorua; New Zealand. 359-361.
- Romanyk, N.; Cadahía, D. (coordinadores) (1992). *Plagas de Insectos en las Masas Forestales Españolas*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Icona. Colección técnica. Segunda edición. 342 pp.
- Romanyk, N.; Cadahía, D. (coordinadores) (2002). *Plagas de Insectos en las Masas Forestales Españolas*. Nueva edición revisada. Mundi-Prensa. 342 pp.
- Ruiz, J. (1997). Presencia de *Phymatodes testaceus* (Linnaeus, 1758) en Andalucía (Coleoptera: Cerambycidae). *Zoologica Baetica* 8: 243-244.
- San Miguel, A. (1994). *La Dehesa Española. Origen, Tipología, Características y Gestión*. Fundación Conde del Valle de Salazar. ETSI Montes, Madrid. 96 pp.
- Sánchez, M. E.; Navarro, R. M.; Trapero, A. Fernández, P. (2000). La "seca" de encinas y alcornoques: una visión histórica. *Montes* 62: 29-39.
- Schneider, D. (1963). Electrophysiological investigation of insect olfaction. En: Zotterman, Y. (ed.). *Olfaction and Taste, I*. Pergamon Presss, Oxford.
- Schneider, D. (1969). Insect olfaction: deciphering system for chemical messages. *Science*. 163: 1031-1037.
- Schneider, D. (1999). Insect pheromone research: some history and 45 years of personal recollections. *International organisation for biological controll of noxioux animals and plants*. West Palaearctic Regional Section Bulletin 22: 10 pp.
- Schoonhoven, L. (1990). Insects in a chemical word. En: Morgan, E. D.; Mandava, N. B. (eds.). *Handbook of Natural Pesticides, volume VI: Insect Attractants and Repellents*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1-22.
- Sen, A.; Mitchell, B. K. (2001). Olfaction in the colorado potato beetle: ultrastructure of antennal sensilla in *Leptinotarsa* sp. *J. Biosci* 26 (2): 233-246.
- Shoeman, P.; Pasques, B. (1993). Chemicals tested against the white coffee stemborer. *Inligtingsbulletin* 252: 16-18.
- Shoeman, P.; Shoeman, M. (1997). Fungus could be used to control white coffee stem borer. *Neltropika Bulletin* 296: 36-42.
- Smith, E. (1996). Control of longicornes beetles in mango trees. *Agnote Darwin* 695: 2pp.
- Smith, M.; Zhong-Qi, Y.; Hérard, F.; Fuester, R.; Bauer, L.; Solter, L.; Keena, M. y D'Amico, V. (2002). Biological control of *Anoplophora glabripennis* Motsch. : a synthesis of current research programs. *Asian Longhorned Beetle Biocontrol Research. Recurso en red.* www. uvm. edu/albeetle/research/biocontrol. html.
- Snodgrass. R. (2002). *Principles of Insect Morphology. Chapter XVII: The Sense Organs*. [en línea]. www.ag. arizona. edu/classes/ento415/snodgrass/snod17. html. Última consulta, enero 2005.

- Soria, F. J.; Villagrán, M.; Cárdenas, A. M. (1996). Distribución e incidencia de los principales perforadores de la encina en el Parque Natural de las Sierras Subbéticas (Córdoba, España). *Zoologica Baetica* 7: 33-43.
- Starzyk, J. R.; Strojny, W. (1985). Morphological variability of adults of the great capricorn beetle *Cerambyx cerdo* L. (Coleoptera: Cerambycidae). *Polskie Pismo Entomologiczne* 55 (3): 491-504.
- Struble, D.; Arn, H. (1984). Combined gas chromatography and electroantennogram recording of insect olfactory response. En: Hummel, H.; Miller, T. A. (eds.). *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 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.
- Sun F.; Xing. W.; Zhang, Y.; Gao, R. (1997). Preliminary study on the effect of INA bacteria in killing larva *Anoplohora glabripennis* through freezing-induction. *Forest Research* 10 (1): 96-99.
- Syntech(1998). *Electroantennography: a practical introduction*. Syntech, Hilversum, The Netherlands. 13 pp.
- Tarumingkeng, R.; Coppel, H.; Matsumura, F. (1976). Morphology and ultrastructure of the antennal chemoreceptors and mechanoreceptors of worker *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Cell. Tis. Res.* 173: 173-178.
- Tilden, P.; Bedard, W.; Lindahl, K.; Wood, D. (1983). Trapping *Dendroctonus brevicornis*. Changes in attractant release rate, dispersion of attractant and silhouette. *Journal of Chemical Ecology* 9: 311-321.
- Toimil, F. (1988a). Algunos lepidópteros defoliadores de la encina (*Q. ilex* L.) y alcornoque (*Q. suber* L.), en la provincia de Huelva. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. Madrid. 13 (2): 331-346.
- Toimil, F. (1988b). *Principales Insectos Defoliadores de la Encina en la Provincia de Huelva*. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Servicio de protección de los vegetales. Madrid. 7: 45 pp.
- Tsutsumi, T.; Yamanaka, M. (1995). Sexual transmission of entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* GSES, between yellow spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* adults by mating behaviour. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 39 (3): 267-269.
- Tsutsumi, T.; Yamanaka, M. (1997). Infection by entomogenous fungus, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch GSES, of adults of yellow spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* Pascoe by dispersin conidia from non-wovwn fabric sheet containing fungus. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 41 (1): 45-49.
- Van Beek, T. A.; De Groot, A. (1986). Terpenoid antifeedants, part I. An overview of terpenoid antifeedants of natural origin. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 105: 513-527.

- Verdugo, A. (2000). Contribución al conocimiento de los cerambícidos de Andalucía. I. (Insecta: Coleoptera: Cerambycidae). *Boletín de la Sociedad Entomológica Cordobesa* 11: 25-35.
- Verdugo, A.; Coello, P. (2003). Contribución al conocimiento de los cerambícidos de Andalucía. III. *Phymatodellus rufipes* (Fabricius, 1777): Nueva especie andaluza y datos interesantes para otras seis (Coleoptera, Cerambycidae). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 32: 105-107.
- Verdugo, A.; López, M.A. (2001). Contribución al conocimiento de los cerambícidos de Andalucía. II. (Insecta; Coleoptera; Cerambycidae). *Boletín de la Sociedad Andaluza de Entomología* 1: 27-33.
- Verdugo, A.; Pérez-López, F.J. (2004). Contribución al conocimiento de los cerambícidos de Andalucía (España) IV. (Coleoptera: Cerambycidae). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 35: 211-217.
- Viedma, C.; Notario, A.; Baragaño, J. R.; Rodero, M.; Iglesias, C. (1983). Cría artificial de coleópteros lignícolas. *Rev. R. Acad. Cien. Exactas Fis. Nat. Madrid*. 78 (4): 767-772.
- Vives, E. (2000). En: Ramos, M. A. et al. (eds.). *Coleoptera, Cerambycidae. Fauna Ibérica*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSI, Madrid. Vol. 12. 716 pp., 5h. lám.
- Vives, E. (2001). *Atlas fotográfico de los Cerambícidos Íbero-Baleares*. Argania Ed., Barcelona. 285 pp.
- Wadhams, L. J. (1992). The perception of semiochemicals. En: Crampton, J. M. y Eggleston (eds.). *Insect Molecular Science. Proceedings, 16th Symposium of the Royal Entomological Society London. Imperial College London, september 1991*. Academic Press, London. 152-162.
- Wadhams, L. J. (1990). The use of coupled gas chromatography: electrophysiological techniques in the identification of insect pheromones. En: McCaffery, A. R.; Wilson, I. D. (eds.). *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones*. Plenum Press, New York. pp.: 289-298.
- Wang, C.; Dong, G.; Cheng, J.; Zhou, Y.; Nie, W. (2000). The use of dimilin III microcapsules mixed with other kinds of pesticide microcapsules for the control of adult *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Scientia Silvae Sinicae* 36 (1): 76-80.
- Wang, Q. (2000). Evidence for a contact female sex pheromone in *Anoplophora chinensis* (Forster) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae). *Journal of Chemical Ecology* 26 (8):1877-1895.
- 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.
- White, G.; Berndt, W.; Schesser, J.; Fifield, C. (1966). Evaluation of four inert dust for the protection of stored wheat in Kansas from insect attack. *USDA, Agricultural Research Service, ARS*. 51 (8): 21 pp.
- White, P. R.; Birch, M. C. (1987). Female sex pheromone of the common furniture beetle *Anobium punctatum* (Coleoptera: Anobiidae): extraction, identification and bioassays. *J. Chem. Ecol.* 13: 1695-1706.

- 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.
- Wibe, A. (2004). How the choice of method influence on the results in electrophysiological studies of insect olfaction. *Journal of Insect Physiology* 50: 497-503.
- Wyatt, T.; Vastiau, K.; Birch, M. (1997). Orientation of flying male *Anobium punctatum* (Coleoptera: Anobiidae) to sex pheromone: separating effects of visual stimuli and physical barriers to wind. *Physiological Entomology* 22: 191-196.
- Xu, J.; Han, R.; Liu, X.; Cao, L.; Yang, P. (1995). The application of codling moth nematode against the larvae of the lichi longicorn beetle. *Acta Phytopylacica Sinica* 22 (1): 12-16.
- Zacharuk, R. (1980). Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Ann. Rev. Entomol* 25: 27-47.
- Zacharuk, R. (1985). Antennae and sensilla. En: Gilbert, L.; Kerhut, G. (eds.). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford. 6: 1-70.
- Zhang, A.; Oliver, J.; Aldrich, J. (2000). Asian longhorned beetle pheromone study. *17th ISCE Annual Meeting, Poços de Caldas, Minas Gerais (Brazil); 15-19th August, 2000. Presentación oral*. [en línea]. www.chemecol.org/meetings/brazil/talks/oral1.htm. Última consulta, enero 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]. www.vv.slu.se/fs/zhang/sjfr_qhz.htm. Última consulta, enero 2005.
- Zhao, K.; Zhou, Y.; Zhu, H.; Xu, K.; Sun, H. (1994). Study on the control of the mulberry borer (*Apriona germari*) using a fumigating rod. *Plant Protection* 20 (1): 10-11.
- Zhong-Qi, Y. y Smith, M. (2002). Investigations of natural enemies for biocontrol of *Anoplophora glabripennis* (Motsch.). *Asian Longhorned Beetle Biocontrol Research*. Recurso en red. www.uvm.edu/albeetle/research/biocontrol.html.

Este "Amor y Psique" no es bueno, es malo, contiene demasiada bergamota y demasiado romero, y le falta esencia de rosas.

-Patrick Süskind-

Capítulo II

Aptitud de *Cerambyx welensii* y *Prinobius germari* para el estudio de la respuesta electroantenográfica de compuestos volátiles

II.1. Introducción: Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo para el estudio electroantenográfico de estímulos olfativos en insectos

II.1.1. Estructura del dispositivo

Muchas son las referencias que pueden ser consultadas respecto a la constitución de un dispositivo para estudio de respuestas de EAG. No obstante, a nuestro juicio resultan especialmente interesantes algunas de las consideradas ya clásicas en esta disciplina, como Roelofs (1984), Struble y Arn (1984), y Cork y colaboradores (1990). En esencia el montaje tiene una estructura sencilla, consistiendo en una fuente de estímulos, un sistema de captación de la respuesta mediante electrodos aplicados al insecto y su posterior envío a un osciloscopio o un ordenador, y un instrumento registrador capaz de amplificar, filtrar y procesar la señal eléctrica inducida.

La fuente de estímulos suele consistir en un mecanismo capaz de proporcionar una corriente continua de aire, en la cual se inyecta una determinada disolución de los compuestos químicos cuya actividad se quiere estudiar. Dicha corriente de aire portadora del hipotético estímulo se aplica directamente a la antena del insecto.

La captación de la respuesta se lleva a cabo mediante una pareja de electrodos: uno denominado registrador o diferencial, y otro denominado indiferente o de referencia, fabricados a partir de diversos materiales. El electrodo registrador suele estar conectado a una sonda, que envía la señal al instrumento registrador. Este electrodo se coloca mediante varias técnicas en la antena del insecto, usualmente en el extremo, mientras que el de referencia puede ser colocado en distintas partes de su cuerpo, según el tamaño del individuo, el tipo de antena o la idoneidad de la respuesta encontrada.

Según Syntech (1998) la señal eléctrica asociada a la respuesta de EAG está caracterizada por su bajo potencial (décimas de milivoltio a pocas decenas de milivoltio) y la alta resistencia de las antenas (del orden de varios megaohmios). Esto ha motivado que la principal dificultad de este tipo de dispositivos sea precisamente la captación de dicha señal, su amplificación y su filtrado para evitar las numerosas interferencias que pueden distorsionarla o camuflarla.

II.1.1. Parámetros del dispositivo

II.1.2.1. Flujo de aire hacia la antena y aplicación de estímulos

Los parámetros asociados a esta parte del dispositivo, así como algunos aspectos relevantes implicados en la estimulación de los insectos son los siguientes: a) caudal principal dirigido hacia el insecto; b) caudal de inyección aplicado sobre el caudal principal; c) tipo de boquilla de salida del caudal principal; y d) preparación y aplicación de estímulos.

Existe divergencia respecto al caudal que debe constituir el flujo principal, así como sobre si lo más adecuado es un flujo continuo o uno intermitente. Según Cork y colaboradores (1990) el flujo constante resulta útil para algunos insectos cuya respuesta de EAG tiende a incrementarse ante cambios en el flujo de aire, de modo que la contribución a la respuesta de EAG debida a mecanorreceptores podría enmascarar la respuesta originada por los quimiorreceptores. En cambio, el inconveniente de un flujo continuo podría ser la eventual desecación excesiva de la antena, que repercutiría negativamente en la duración de la preparación en un estado óptimo.

Los caudales principales que han utilizado distintos investigadores son de lo más diversos: entre los más bajos encontrados figuran los 0,25 l/min de nitrógeno empleados por Cork y colaboradores (1990), o los 0,1-0,2 l/min de Malo y colaboradores (2000); los más elevados resultaron ser el empleado por Barata y colaboradores (1992) (4,8 l/min) y los 9 l/min de Den Otter y Saini (1985). Los caudales de inyección han sido aplicados frecuentemente de forma manual, mediante el accionamiento de una jeringa de entre 3 y 5 ml de capacidad; otra variante es el empleo de un dispositivo para la inyección automatizada. En este caso, los caudales de inyección empleados oscilan entre los 0,18 l/min de Den Otter y Saini (1985), y los 0,6 de Park y Hardie (1998).

El caudal de inyección desemboca en el flujo principal después de atravesar la mezcla estimulante. La preparación de los estímulos es un proceso bastante estandarizado y que suele resultar independiente del tipo de compuesto manejado. En todos los casos se trata de aplicar una pequeña cantidad de una disolución determinada del compuesto sobre una tira de papel de filtro, e introducir ésta dentro de una pipeta Pasteur desechable. La pipeta así rellena se considera cargada con el estímulo, y se puede conectar directamente al dispositivo de inyección (jeringa o electroválvula) e introducir su punta en el flujo principal. La inyección sobre el caudal principal puede efectuarse en distintas posiciones en relación a su distancia a la salida del mismo, que en general oscila entre 2,5 cm (Roelofs 1984) y 1,5 m (Barata *et al.* 1992).

En cuanto a la boquilla de salida del caudal principal, lo más frecuente es una boquilla de vidrio cilíndrica de unos 5 a 15 mm de diámetro (Malo *et al.* 2000; Park y Hardie 1998); pero también se han propuesto otros tipos, como los de forma ensanchada y plana (Nagai 1981). La boquilla se coloca cerca de la antena del insecto en la mayor parte de los casos, a unos 2 o 3 cm.

II.1.2.2. Preparación y colocación de electrodos

Para captar la señal eléctrica provocada por un estímulo pueden ser empleados tanto electrodos metálicos como electrodos capilares de vidrio; estos últimos van dotados de un filamento de plata y llenos de solución salina. En general se pueden utilizar tanto unos como otros indistintamente, excepto en el caso en el que los compuestos a estudiar sean ácidos fuertes. En esta circunstancia no se aconseja emplear electrodos metálicos, ya que la interacción del ácido con el metal podría generar un potencial, denominado “potencial de electrodo”, que enmascare o falsifique la respuesta de los quimiorreceptores (Kelling 2001).

Las soluciones más frecuentemente empleadas para llenar los capilares de vidrio son las de cloruro potásico y las soluciones de Ringer: las primeras están constituida por cloruro potásico a distintas concentraciones -al 0,1% (González *et al.* 1994), 0,5 M (Park y Cork 1999) ó 0,1 N (Syntech 1998)-; las denominadas soluciones de Ringer están elaboradas mediante la combinación de diversas sales, son más complejas y pretenden aproximarse a la constitución de la hemolinfa del insecto (ver especialmente Kaissling y Thorson 1980). Se usan con profusión tanto las de un tipo como las de otro, pero nuestra experiencia nos indica que las soluciones de Ringer son más difíciles de elaborar y conllevan el riesgo de contaminación con hongos, incluso guardadas en el refrigerador, ya que incorporan glucosa. Las de KCl, en cambio, se elaboran muy fácilmente y se conservan sin problemas.

Los dos fundamentos en que se basa la colocación de los electrodos para el registro de la respuesta de EAG son los siguientes: por un lado, tal como se resume en Syntech (1998) y puede verse claramente expuesto en Kelling (2001), se considera que en la antena existe una distribución de cargas de modo que la base está cargada positivamente y el extremo lo está negativamente; por otro lado, la respuesta de EAG refleja la diferencia de potencial entre el electrodo registrador y el electrodo de referencia (Roelofs 1984).

Nagai (1981) estudió el efecto del desplazamiento del electrodo registrador desde la zona basal de la antena -donde estaba colocado el electrodo de referencia- hacia su extremo, sobre la respuesta de EAG. Con los electrodos en semejante disposición (registrador en posición distal respecto al de referencia), registró la respuesta de EAG como una fluctuación negativa, y encontró una relación casi lineal entre la respuesta y la longitud de la antena. Indicó, así mismo, que todas las *sensilla* situadas entre los electrodos registrador y de referencia, capaces de responder al estímulo, pueden estar involucradas en la respuesta final.

De esta manera, la disposición tradicionalmente adoptada para los electrodos es aquella en que el registrador está situado cerca del extremo distal del flagelo de la antena, mientras que el de referencia se coloca cerca de su base, o bien en cualquier otra parte del cuerpo del insecto.

La tabla II.1 recoge algunos de los parámetros comentados, y el valor que para ellos han establecido algunos autores.

Tabla II.1. Parámetros del dispositivo para estudio de la respuesta de EAG empleados por algunos autores. Q.= caudal (litros/minuto); Cant.= cantidad de disolución (microlitros); Dur.= duración de inyección (segundos); (J)= inyección manual (mililitros); (*)= caudal en metros/segundo; la referencia no especifica la sección del conducto.

Especie	Autor	Q. principal	Q. inyección	Cant.	Dur.
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Nagai (1981)	0,3*	0,3*	20	0,3-1
<i>Lepidoptera</i>	Roelofs (1984)	1*	1*	10	(J)
<i>Glossina morsitans</i>	Den Otter y Saini (1985)	9	0,18	5-20	<2
<i>Anobium punctatum</i>	White y Birch (1987)	1	1	10	1
<i>Anaglyptus subfasciatus</i> <i>Demonax transilis</i>	Ikeda et al. (1993)	0,3	2 (J)	11	(J)
<i>Phoracantha semipunctata</i>	Barata (1997)	4,8	3 (J)	25	(J)
<i>Aphis fabae</i>	Park y Hardie (1998)	1,8	0,6	25	2
<i>Spodoptera littoralis</i>	Malo et al. (2000)	0,1-0,2	-	10	0,4
<i>Musca domestica</i>	Kelling (2001)	0,6	0,6	25	2

Con el desarrollo del presente capítulo se pretende proponer un dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG en insectos, en particular en especies con dimensiones medias a grandes, como *Cerambyx welensii*, *Prinobius germari*. Se analizarán, así mismo, algunas circunstancias asociadas a la preparación de los insectos, colocación de los electrodos y forma de aplicación de estímulos (automatizada o manual); junto a otros relacionados con la puesta en práctica del dispositivo, como son los siguientes: a) influencia de la fluctuación de los caudales aplicados a la antena sobre la estabilidad de la línea base y/o sobre la respuesta de EAG; y b) repercusión de algunos parámetros fijados en relación a la captación de la señal eléctrica inducida, sobre el registro de la misma. Por último, se compararán las primeras respuestas de *C. welensii* y *P. germari* frente a tres sustancias candidatas a ser consideradas como estímulo estándar: (E)-2-hexenal, ácido acético y esencia de trementina; y se analizará la aptitud de las mismas para desempeñar tal función.

II.2. Material y métodos

II.2.1. Dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG

II.2.1.1. Dispositivo de aplicación de estímulos

Material

La relación de equipamiento y materiales que conforman las distintas partes del dispositivo de generación, conducción, regulación y aplicación de la corriente de aire es la siguiente:

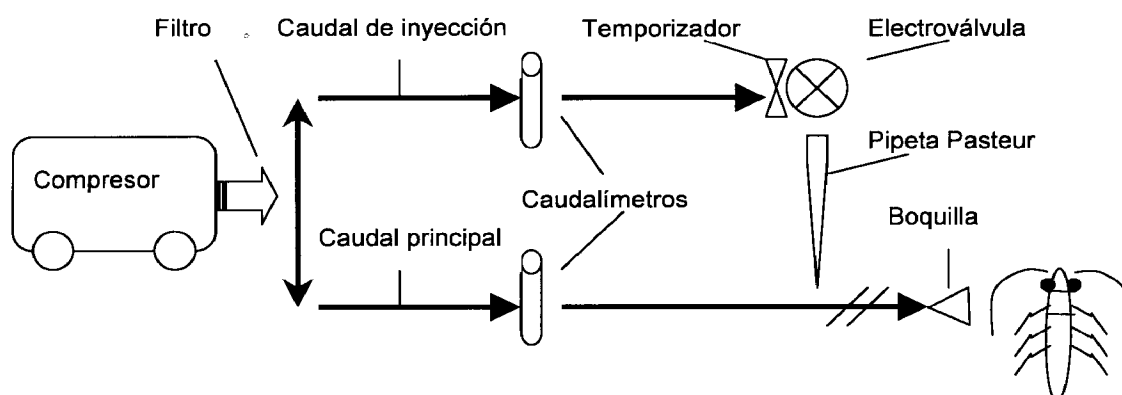
- Compresor Compair-Brisa, con depósito de 24 l, presión máxima de 8 bares y manómetro regulador de presión de salida.
- Tubo de poliamida de 3 m de longitud, 8 mm de diámetro externo y 6 mm de diámetro interno.
- Filtro Wilkerson F08-C2-SK00; elemento filtrante de polietileno sinterizado con poros de 5 micras de diámetro.
- Caudalímetro Tecfluid de acero inoxidable con máximo de 6,6 l/min, con tornillo regulador.
- Tubo flexible de polivinilo de 3 m de longitud, 6 mm de diámetro externo y 4 mm de diámetro interno.
- Boquilla difusora Windjet 727-RY-15, de 4,8 cm de anchura. Con 16 orificios de salida de 1,5 mm de diámetro cada uno.

El sistema de inyección de estímulos consta de los siguientes elementos:

- Caudalímetro Tecfluid de acero inoxidable con máximo de 0,83 l/min, con tornillo regulador.
- Temporizador asimétrico Disibeint PTFA 230 192, con capacidad de selección de tiempos mínimos de actividad y reposo de 0,1 segundos.
- Electroválvula Lucifer, 121-M13/8980, con alimentación a 220 V.
- Adaptador de CA/CC, con selector de tensión con mínimo de 3 V.
- Jeringa de PVC de 50 ml.

El diagrama de montaje de todos estos elementos se esquematiza en la figura II.1:

Figura II.1. Esquema de montaje del dispositivo de generación, regulación y aplicación de estímulos.



Los materiales empleados para la elaboración y presentación de los estímulos fueron los siguientes:

- Pipetas Pasteur de vidrio desechables, de 7 cm de longitud, 6,5 mm de diámetro en cabeza y 2,5 mm de diámetro en punta fina.
- Pipeta automática Digipette-Naita 66622120, de 2 a 20 microlitros, con exactitud de $\pm 2,5\%$ en 20 microlitros.
- Pipeta automática Digipette-Naita 66632310, de 100 a 1000 microlitros, con exactitud de $\pm 0,8\%$ en 1000 microlitros.
- Papel de filtro Whatman nº1.

Métodos

Generación, regulación y aplicación de la corriente de aire

La generación de un flujo continuo de aire corrió a cargo del compresor eléctrico. Dicho aparato se cargaba hasta su presión máxima al inicio de cada sesión, permaneciendo después encendido de modo que pudiera recargarse automáticamente a medida que liberaba el aire. La liberación del aire comprimido se reguló mediante un manómetro de salida, de modo que ésta se efectuara a una presión de dos bares. Según puede observarse en la figura II.1, el flujo de aire liberado se bifurcaba en dos conductos por medio de una válvula en “T”, que posibilitaba la regulación simultánea del caudal de cada uno de ellos mediante sendos caudalímetros. Uno de los conductos constituye el denominado habitualmente “caudal o flujo principal”, mientras que el otro lo denominaremos “caudal de inyección”.

El flujo principal se dirigió directamente hacia el insecto, ajustando el caudalímetro correspondiente a un caudal próximo al empleado por Barata y colaboradores (1992), dada la cercanía taxonómica entre el tipo de insecto con el que trabajaron (*Phoracantha semipunctata*) y nuestras especies de interés. De este modo fue seleccionado un caudal principal continuo de 4,1 l/min.

En cuanto a la salida del flujo de aire, dado que nuestros insectos poseen unas antenas de muy variable y gran longitud -que puede oscilar entre menos de 4 cm para los ejemplares más pequeños de *P. germari* y rondar los 10 cm para los machos más grandes de *C. welensii*-, se estimó que la aplicación más conveniente sería mediante un difusor ancho y plano, boquilla Windjet, a la manera empleada por Nagai (1981), que abarcara toda o gran parte de la longitud de la antena.

Preparación de estímulos

Esta es, junto con la colocación de los electrodos, una de las cuestiones más delicadas asociadas a un dispositivo para el estudio de respuestas olfativas, ya que es necesario encontrar uno o varios compuestos que originen una señal lo suficientemente buena como para poder concretar posteriores cuestiones metodológicas importantes de cara a este tipo de trabajos, como son la frecuencia óptima de estimulaciones, la duración funcional de la preparación del insecto, la cantidad ideal de estímulo aplicado y la relación dosis-respuesta.

A la hora de preparar los estímulos hemos optado por el modo convencional, aplicando una pequeña cantidad de disolución del compuesto sobre una tira de papel de filtro, e introduciendo esta dentro de una pipeta Pasteur desechable. La pipeta así rellena se considera

cargada con el estímulo, y se puede conectar directamente al dispositivo de inyección e introducir su punta en el flujo principal.

Las sustancias cuya actividad estimulante se pretende estudiar se mezclan con un solvente (generalmente hexano o aceite de parafina), a dosis variables. La cantidad de mezcla estimulante empleada por nosotros fue de 20 microlitros, aplicados en una tira de 50 x 5 mm de papel Whatman nº1 (similar a la empleada por Barata *et al.* 1992 y Park y Hardie 1998). Como inyección control se emplean pipetas Pasteur conteniendo una tira similar de papel Whatman nº1, cargada únicamente con el solvente (lo que denominamos “inyección control” propiamente) o sin ningún tipo de compuesto añadido (denominándose entonces “inyección en blanco”).

Inyección de estímulos

Es precisamente sobre el caudal principal donde son aplicadas las sustancias cuya capacidad estimulante se quiere probar. De este modo, cuando la corriente principal llega hasta la antena del insecto es portadora del compuesto químico estudiado. Esta aplicación se efectúa mediante la inyección de un caudal determinado de aire sobre dicho flujo, el “caudal de inyección”, una vez que este ha sido forzado a pasar a través de la pipeta Pasteur cargada con el compuesto químico.

Nosotros hemos probado dos procedimientos: uno manual, empleando una jeringa y otro automatizado mediante un sistema eléctrico de inyección. Para este último se pueden encontrar en el mercado diversos dispositivos, algunos específicamente desarrollados para la electrofisiología de insectos, pero decidimos implementar dicha automatización a partir de elementos más sencillos, más fáciles de encontrar y de coste económico considerablemente menor. Nuestro dispositivo es simple: consta de una electroválvula provista de un temporizador.

La electroválvula va situada al extremo del ramal que porta el “caudal de inyección”, y hace las veces de jeringa; el temporizador es asimétrico, por lo cual permite seleccionar la duración de apertura de la electroválvula (es decir, la duración de la estimulación) así como la frecuencia entre aperturas de la misma (o lo que es lo mismo, el tiempo de reposo entre estimulaciones consecutivas). La precisión del temporizador es tal que se pueden conseguir temporizaciones mínimas de alrededor de 0,1 segundos en funcionamiento o en paro.

Figura II.2. Electroválvula conectada a pipeta Pasteur.

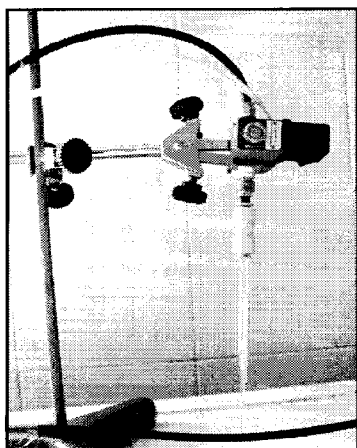
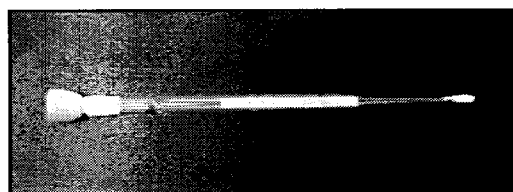


Figura II.3. Detalle de pipeta Pasteur preparada.



La inyección del estímulo sobre el caudal principal se efectuó a 2,5 m de su desembocadura sobre la antena, tanto cuando se efectuó manualmente como cuando fue automática. En uno u otro caso se hizo pasar el caudal de inyección a través de una pipeta Pasteur, cuya punta fina estaba inserta en un orificio de unos 2,5 mm de diámetro practicado directamente sobre el ramal principal. En la inyección manual se aplicaron instantáneamente mediante la jeringa 10 ml de aire. En el caso automatizado, la electroválvula se encargó de permitir o impedir el paso del aire desde el conducto inyector a la pipeta; el caudal empleado en este caso fue de 0,5 l/min, valor similar al empleado por otros autores.

Por último, es necesario establecer la duración de la estimulación (en caso de inyección automatizada) así como la frecuencia con que se lleva a cabo la misma. La duración establecida fue de 0,3 segundos (Syntech 1998); y respecto a la frecuencia, se probó con distintos valores entre 3 y 15 segundos.

II.2.1.2. Preparación de insectos para la captación de respuestas

Material

Los materiales y productos empleados tanto para la sujeción del insecto como para la preparación e implantación de electrodos han sido los siguientes:

- Lupa binocular Leika GZ 6.
- Fuente de luz fría Intralux 4000, de 92,5 w.
- Caja de madera de 10 x 15 x 4 cm.
- Dos pletinas metálicas curvadas, tipo abrazadera, de 1 cm de ancho.
- Pletina plástica curvada de 0,5 cm de ancho.
- Dos piezas prismáticas de goma, de 2 x 10 x 1 cm.
- Alambre de cobre de 0,1 mm de diámetro.
- Una pieza de cuero flexible de 5 x 3 cm.
- Alfiler entomológico de calibre 01.
- Pinzas metálicas.
- Mechero Bunsen.
- Capilares de vidrio de 0,5 mm de diámetro interno y 1,5 mm de diámetro externo.
- Alambre de plata, de 0,4 mm de diámetro.
- Báscula Explorer Ohaus, con precisión de 0,001 g.
- Cloruro potásico cristalizado.
- Polivinilpirrolidona en polvo.
- Agua destilada.
- Matraz de vidrio de 250 cc.
- Viales de plástico de 1,5 ml.
- Pinzas de madera.
- Micromanipulador Kühnert, capaz de reducir los movimientos en 1:10.
- Micromanipulador Siskiyou, con precisión de 10 micras.

Métodos

Sujeción del insecto

Las especies sobre las que se han centrado los trabajos se caracterizan por su gran tamaño, generalmente 4-5 cm de longitud y entre 1-1,5 cm de ancho, y su gran fuerza; de modo que esto supone una ventaja a la hora de su manipulación, pero dificulta su sujeción. Para llevar a cabo la misma hemos empleado una caja de madera a la que se atornillaron dos pletinas metálicas tipo abrazadera. El insecto se envolvía en una pieza rectangular de cuero y era sujetado mediante las pletinas. La cabeza se inmovilizó mediante una pequeña pieza curva de plástico, que se podía atornillar también a la caja. Las antenas, por último, se fijaron a una pieza rectangular de goma ajustada a la caja de madera, mediante finos alambres de cobre a la manera propuesta por Cork y colaboradores (1990), y Park y Hardie (1998).

Elaboración de los electrodos

En las pruebas efectuadas hemos empleado microelectrodos capilares con filamento de plata. Estos microelectrodos fueron fabricados a partir de capilares o micropipetas comerciales de vidrio, de 7 cm de longitud, 1,5 mm de diámetro externo y 0,5 mm de diámetro interno. Los capilares se calentaban cuidadosamente a la llama de un mechero Bunsen, y se estiraban manualmente. Mediante este procedimiento se pueden conseguir sin dificultad capilares con un diámetro en punta fina de alrededor de 10 micras, aunque lo usual fue trabajar con grosores de entre 70 y 100 micras. Este tamaño se consideraba suficiente en comparación con el grosor de las antenas de los insectos estudiados.

Dicho capilar se llena con una solución salina que sea capaz de permitir la continuidad eléctrica entre la hemolinfa de la antena y las conexiones terminales de la unidad de registro de la respuesta (Cork *et al.* 1990), lo cual constituye un aspecto importante en la elaboración de los electrodos. Se decidió emplear una solución 0,1 N de cloruro potásico (Syntech 1998), la cual penetraba en los capilares por capilaridad, hasta llenar los 1,5 cm extremos del microelectrodo. Para reducir la evaporación de la solución, se añadió a la misma el compuesto polivinilpirrolidona, en la proporción de un 3% en peso.

Colocación de los electrodos

En nuestras pruebas el electrodo registrador se colocó de dos maneras distintas: inserto en el extremo del décimo segmento, tras seccionar el segmento restante; o bien recubriendo el extremo intacto del undécimo segmento, de modo que aproximadamente su mitad apical quedara “enfundada” dentro del capilar. Aunque se obtuvo respuesta por los dos procedimientos, finalmente se optó por estudiar las respuestas obtenidas sin dañar el extremo de la antena.

El electrodo de referencia se insertó en la base de la antena, concretamente en la membrana intersegmental entre el escapo y el pedicelo (figura II.5). La manipulación de los electrodos para su colocación se efectuó con la ayuda de una fuente de luz fría, una lupa binocular y dos micromanipuladores (figura II.4). Uno de los manipuladores permitía mayor precisión de movimientos, empleándose para la colocación del electrodo de referencia,

mediante el otro se realizaban movimientos menos finos, pero que resultaban suficientes para colocar el electrodo registrador en cualquiera de las variantes propuestas.

Figura II.4. Dispositivo para la preparación de insectos.

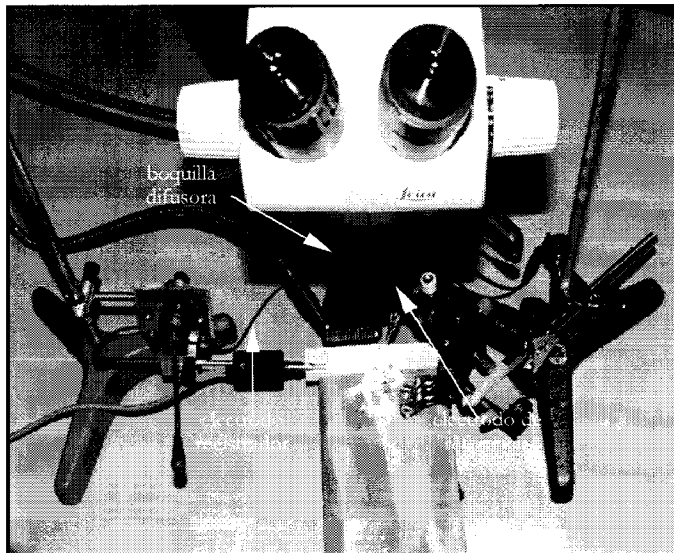
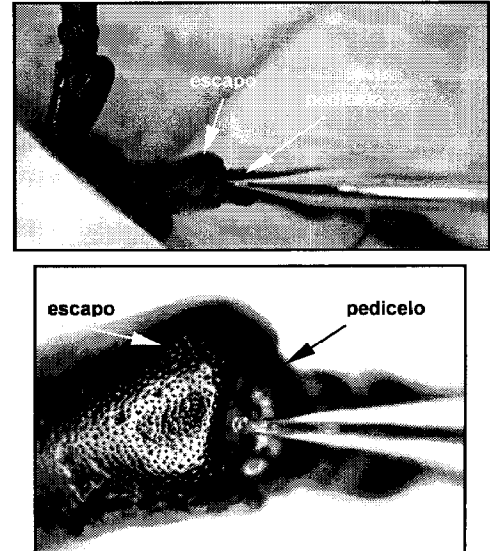


Figura II.5. Colocación del electrodo de referencia.



II.2.1.3. Recepción y procesado de respuestas de EAG

Material

La grabación y procesado de la señal eléctrica se efectuó mediante los siguientes elementos:

- Sonda registradora universal PRS-1 de Syntech, provista de amplificador de 10x.
- Sonda de acero inoxidable para electrodos de referencia, con cable de conexión a tierra.
- Porta electrodos de acero inoxidable, para capilares de 1,5 mm de diámetro.
- Sistema de adquisición de datos multicanal USB-IDAC de Syntech, con conexión a puerto USB.
- Programa Autospike-32 de Syntech, para la grabación y análisis de señales eléctricas.
- Ordenador personal con sistema operativo Windows 98.
- Base reductora de electricidad estática Anti-Static; $10^7 < R \leq 10^{10}$.

Métodos

Finalmente, el cometido de este sistema es la recepción y análisis de la respuesta olfativa del insecto ante determinados compuestos. Puesto que dicha respuesta se refleja en forma de señal eléctrica, es imprescindible que los impulsos sean transmitidos desde la hemolinfa de la antena del insecto hasta el terminal activo de la sonda registradora. Este contacto eléctrico tiene lugar a través de la solución salina de los electrodos capilares, y se hace efectivo gracias a un alambre de plata en contacto con dichas terminales e introducido en el capilar relleno con la solución. En nuestro caso, a las sondas "registradora" y "de referencia" se conectaron sendos alambres de plata de entre 4 y 5 cm de longitud y 0,4 mm de diámetro, que una vez

insertos en el capilar quedaban bañados por la solución en aproximadamente 1,5 cm desde su extremo.

El sistema USB-IDAC empleado se encarga de amplificar, filtrar y digitalizar la señal eléctrica procedente del insecto, de modo que la pantalla del ordenador refleja la misma como si se tratara de un osciloscopio. Cuando se conectan los electrodos al insecto, se produce una pequeña señal oscilatoria que es reflejada por el osciloscopio: la denominada “línea base”, que en realidad se puede considerar como el “ruido de fondo” de la preparación. De este modo, el sistema de recepción de la señal permite apreciar instantáneamente el potencial de oscilación de la línea base, así como cualquier tipo de fluctuación que pueda tener lugar en la misma. El software utilizado permite filtrar la señal mediante dos tipos de filtro: uno para alta frecuencia y otro para baja frecuencia. El primero permite la selección de tres valores: 20 Hz, 3 kHz y 20 kHz; el segundo permite seleccionar un gran número de valores, entre el más bajo (denominado “DC”) y los 200 Hz. Posteriormente a la adquisición de la señal, puede realizarse un segundo filtrado para ambos tipos de frecuencia.

Los valores manejados para los filtros fueron de 0,1 Hz y “DC” para el filtro de baja frecuencia y en torno a 20 Hz para el de alta frecuencia (Syntech 1998). En cuanto a la capacidad de muestreo del sistema, el máximo es de más de 95.000 muestras por segundo cuando sólo se usa uno de los cuatro canales de grabación de que dispone. En nuestro caso se ha probado con rangos de muestreo que oscilaron entre las 400 y las 15.000 muestras por segundo.

En la tabla II.2 resumimos los principales parámetros fijados, finalmente, en relación con la aplicación de estímulos y la captación y procesado de respuestas.

Tabla II.2. Valores fijados para los parámetros del dispositivo para estudio de la respuesta de EAG relacionados con la aplicación de estímulos, así como para la captación y procesado de respuestas.

- Caudal principal: 4,1 l/min.
- Caudal de inyección: 0,5 l/min.
- Duración de la inyección automatizada: 0,3 segundos.
- Volumen de aire aplicado mediante inyección manual: 10 mililitros.
- Filtro de baja frecuencia: 0,1 Hz.
- Filtro de alta frecuencia: 20 Hz.
- Intensidad de muestreo: 400 muestras por segundo.

El dispositivo configurado de esta manera se ha empleado para obtener las primeras respuestas de EAG de *C. welensii* y *P. germari*.

II.2.2. Primeras pruebas de EAG en *C. welensii* y *P. germari* frente al (E)-2-hexenal, esencia de trementina y ácido acético

II.2.2.1. Obtención de insectos adultos

Los adultos pertenecientes a las dos especies de cara a este trabajo: *C. welensii* y *P. germari*, presentan hábitos crepusculares y nocturnos (Romanyk y Cadahía 1992; Vives 2000). A partir de lo anterior y confiando en las grandes dimensiones de estos insectos, unos 25-65 mm de longitud, se planteó como método de captura la búsqueda directa de los mismos durante el momento del día en que se encontraban activos.

Los períodos de vuelo citados para estas especies por Vives (2000 y 2001) son los siguientes: desde mayo hasta agosto para *C. welensii* (con máximo en junio y julio); y de junio a mediados de agosto para *P. germari* (con máximo en julio). De esta manera, las primeras tentativas de captura se efectuaron durante el verano de 2001, iniciándose en la primera semana de julio y terminando a mediados de agosto; los años 2002 comenzaron a finales de mayo y terminaron a finales de agosto.

Todos los ejemplares proceden de la misma zona: una dehesa de alcornoque en el término municipal de Almonte (Huelva). La metodología piloto de búsqueda y captura se estableció en las primeras visitas, donde se efectuaron observaciones del tipo siguiente:

- Fecha y hora de la captura.
- Aspecto exterior del arbolado frecuentado más asiduamente por estos insectos.
- Tipo de galerías y oquedades que los insectos parecían preferir a la hora de guarecerse.
- Momento aproximado del día en que los insectos abandonaban sus refugios y salían al exterior, haciéndose visibles.
- Manera de forzar la salida de los insectos de sus galerías de forma rápida.
- Respuesta de los insectos a la iluminación directa.

A partir de estas observaciones se decidió efectuar la búsqueda en la franja horaria entre las 21.00 horas y las 1.00 horas; en alguna ocasión se comenzó el recorrido de la dehesa antes de la hora reseñada, iniciándose la visita a partir de las 20.00 horas. En las visitas se recorría la dehesa con una linterna, tal como propuso Moral (1994), sin dirección preestablecida y observando el arbolado existente.

Durante las horas de visita se podían detectar fácilmente los insectos dado su tamaño, o bien indirectamente porque sus antenas sobresalían al exterior de las galerías. Una vez detectados los insectos se retiraba la luz para evitar su huida, y se capturaban sencillamente a mano o con ayuda de una pértiga. Los que se encontraban en los orificios podían ser sacados con cierta facilidad con la ayuda de un tallo de gramínea.

Una vez capturados, los ejemplares de ambas especies se mantuvieron en el laboratorio en recipientes individuales de plástico perforado de 15 cm de diámetro y 8 cm de fondo, en los que se colocaba un pedazo de corcho que les proporcionara cobijo. Las condiciones de temperatura y humedad fueron las ambientales. A cada ejemplar se le proporcionó un

pequeño recipiente relleno de algodón, en el que se depositaba agua azucarada (4%). Se observó que esta mezcla era aceptada por *C. welensii*, pero no en apariencia por *P. germari*.

Aunque se probó con varios ejemplares (un total de 15 individuos de *P. germari* y seis de *C. welensii*), aquellos para los cuales se logró efectuar una preparación adecuada y registrar las primeras respuestas fueron los siguientes:

- *P. germari*: once ejemplares, todos machos.
- *C. welensii*: cuatro ejemplares (tres machos y una hembra), pero sólo a un ejemplar de cada sexo se les aplicó la serie completa de los tres compuestos estudiados.

Según se ha dicho, los ejemplares de *C. welensii* y *P. germari* se capturaron en campo durante el período de vuelo, excepto uno de los machos de *C. welensii*, que se capturó antes de su emergencia en el término municipal de Monesterio (Badajoz). Se empleó, además, como comparación, un ejemplar macho de *Phoracantha semipunctata*. Dicho individuo procedía de las generaciones de reciente emergencia obtenidas en los laboratorios del Centro de Investigación y Tecnología del Grupo Empresarial ENCE.

II.2.2.2. Compuestos estudiados

Los compuestos probados fueron los siguientes:

- (*E*)-2-hexenal (pureza del 98%; Sigma-Aldrich).
- Esencia de trementina (pureza 99,5%; Panreac).
- Ácido acético (pureza > 99,5%; Fluka).

Para cada uno de los compuestos se prepararon disoluciones al 50% en aceite de parafina. Cada inyección estimulante consistió en la aplicación sobre una tira de papel de filtro (50 x 5 mm) de los 20 microlitros de la mezcla descrita. Las tiras de papel impregnadas se introdujeron, una vez transcurrido un tiempo de ≈ 2 minutos, en pipetas Pasteur de vidrio; posteriormente, las pipetas fueron selladas con tapones de goma hasta el momento de su empleo.

II.2.2.3. Metodología experimental

Cada serie de inyecciones se inició con una “inyección control” constituida por 20 microlitros de aceite de parafina, que se aplicó de la misma manera que los otros compuestos. A continuación se inyectaron los tres compuestos, en orden establecido al azar y espaciados 15 segundos. Se efectuaron tres réplicas por insecto para las series así descritas, con un espaciamiento aproximado de cinco minutos entre series.

II.3. Resultados

II.3.1. Dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG

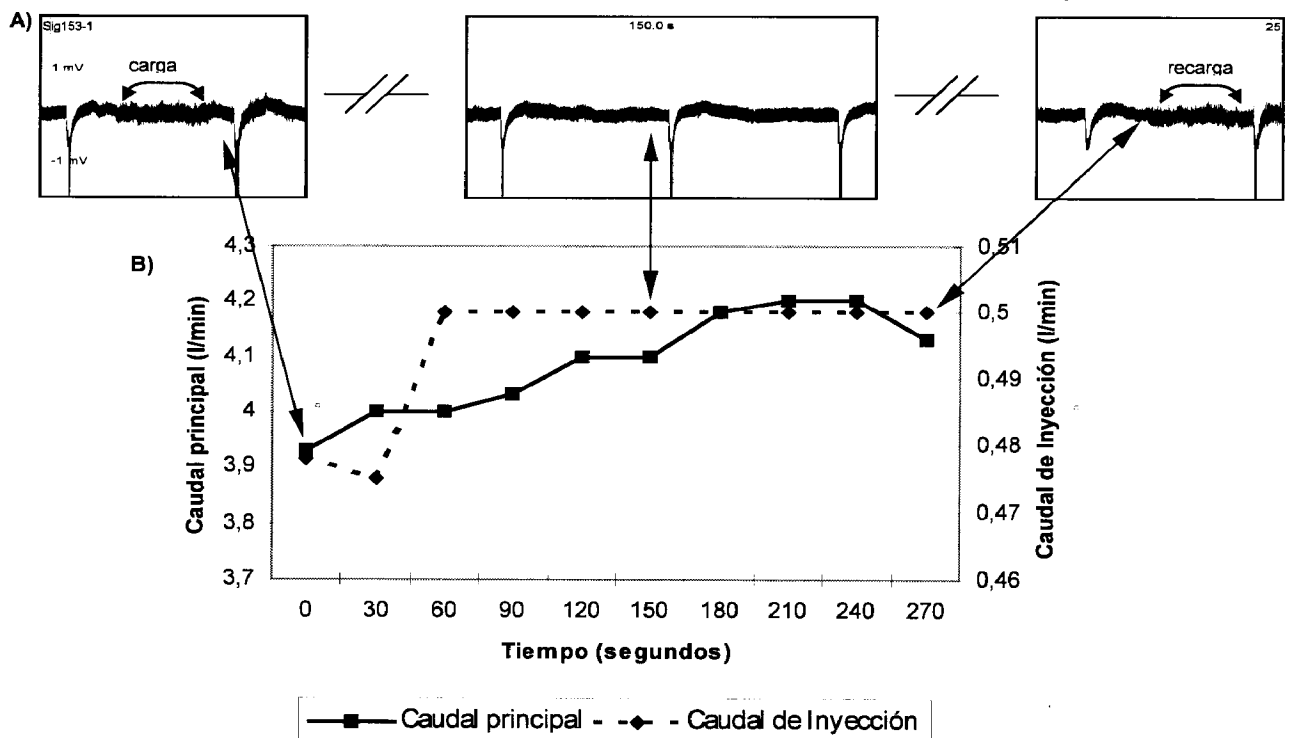
II.3.1.1. Dispositivo de aplicación de estímulos

Influencia de la generación, regulación y aplicación de la corriente de aire sobre la respuesta de EAG

El flujo establecido, de tipo continuo, no ha ocasionado aparentemente problemas de desecación excesiva de la antena. En general, de las antenas de los insectos que respondieron frente a un estímulo fluía hemolinfa tras retirar el electrodo de referencia al final de la sesión de trabajo; dicha duración osciló entre una hora y media y seis horas.

Aunque el dispositivo propuesto para la generación y regulación de la corriente de aire manifestó un comportamiento generalmente “estable”, se encontró un pequeño inconveniente asociado al arranque y parada del motor. Este consistió en que el caudal de aire suministrado por el compresor no se mantuvo constante en el valor seleccionado mediante el caudalímetro, sino que experimentó cierta fluctuación entre el momento en que el compresor terminaba de cargar su depósito y el momento en que reiniciaba de nuevo la carga. La fluctuación media del caudal observada cada 30 segundos tras efectuar tres ciclos seguidos “fin de carga-reinicio de carga”, en las condiciones normales de aplicación de un compuesto (Q. principal =4,1 l/min; Q. de inyección =0,5 l/min; pipeta conectada en situación de trabajo), se expone en la figura II.6B.

Figura II.6. A) evolución de la línea base y las respuestas de *C. welensii* frente a estimulaciones sucesivas cada 30 segundos [(E)-2-hexenal 50% en aceite de parafina]), durante un ciclo completo carga-recarga del compresor. B) fluctuación media de los caudales “principal” y “de inyección” suministrados por el compresor, a partir de tres ciclos seguidos fin de carga (T=0) <-> reinicio de carga (T=270). Presión de salida: 2 bares; temperatura: 25,5°C.



El caudal principal osciló de forma homogénea ($\pm 2,4 \%$ respecto a los 4,1 l/min prefijados) durante el ciclo de descarga del compresor. El caudal de inyección se mantuvo constante, y en el valor prefijado, a partir de los 60 segundos y hasta el final del ciclo; antes de ese momento se produjo una variación máxima del 6 %, durante 30 segundos, respecto a los 0,5 l/min preestablecidos. En la figura II.6A se aprecia que durante la carga del compresor, que se prolongaba durante un tiempo de ≈ 25 segundos, la línea base puede ofrecer una apariencia más irregular; si bien esto no ocurrió siempre. Un inconveniente asociado a este hecho es que, en algunas ocasiones, dicha carga afectó al normal funcionamiento de la unidad de adquisición de datos, invalidando los registros realizados.

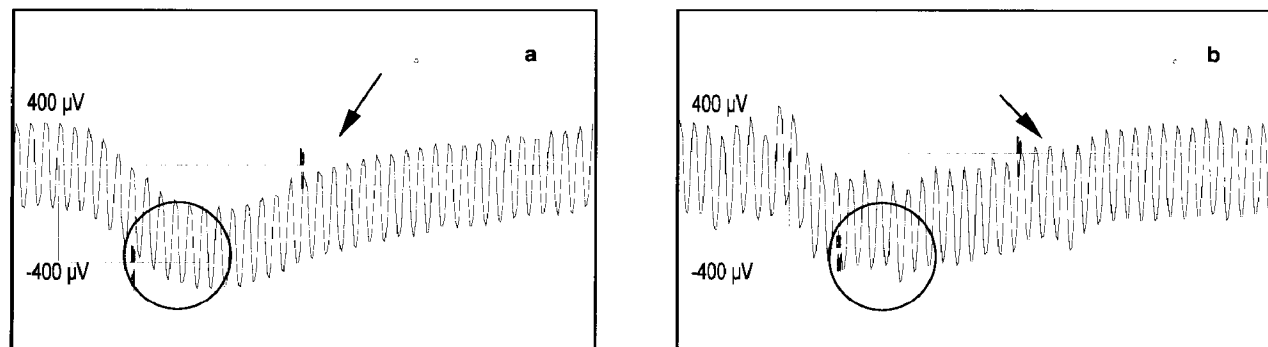
Inyección de estímulos

La inyección automatizada proporcionó la posibilidad de repetir las condiciones de la estimulación en ensayos sucesivos (figura II.7), ya que se puede fijar tanto la duración de la misma como su frecuencia. Además, la automatización añade comodidad a la aplicación de estímulos, ya que basta con conectar fácilmente la pipeta cargada a la electroválvula (mediante una válvula de conexión automática) e insertarla en el caudal principal. Pero la inyección manual depara resultados totalmente comparables (figura II.8), aunque resulta algo más incómoda. La distancia de inyección escogida (2,5 m) evitó cualquier posible interferencia eléctrica por parte de la electroválvula o el temporizador, y sólomente ocasionó un retraso en la aparición de la respuesta de menos de 0,5 segundos, con los caudales de trabajo manejados.

Figura II.7. Respuestas de *C. welensii* frente a inyecciones sucesivas con 20 μ l de (*E*)-2-hexenal 50% (v/v) en aceite de parafina, automatizadas cada 9 segundos.



Figura II.8. Respuestas del mismo ejemplar de *P. gemari* frente a 20 μ l de trementina al 50% (v/v) en aceite de parafina, aplicados mediante dos procedimientos: a) inyección manual de 10 ml de aire con jeringa; b) inyección automatizada (0,5 l/min durante 0,3 s; equivalentes a $\approx 2,5$ ml). La circunferencia enmarca los valores del potencial negativo máximo (440 μ V en el primer caso y 400 μ V en el caso automatizado) resultante de la estimulación, así como el tiempo que tarda en ser alcanzado (milisegundos), tal y como son mostrados por la herramienta de medición del programa AutoSpike. Las flechas indican el tiempo de retorno a la situación de reposo, medido con la misma herramienta.



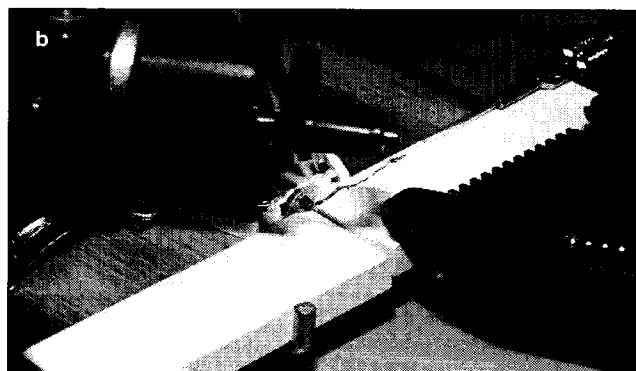
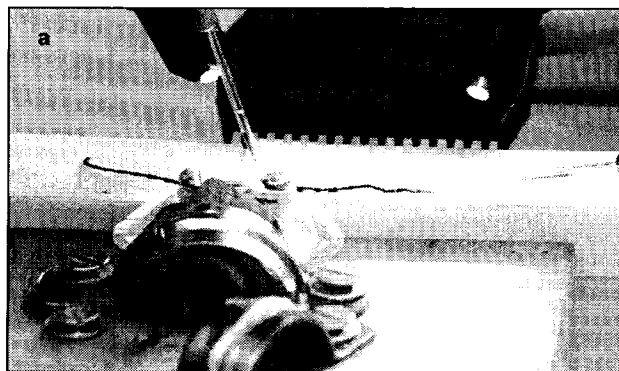
Sujeción del insecto y colocación de electrodos

Mediante el método de sujeción propuesto, el tiempo empleado en sujetar completamente un insecto para la electroantenografía rondó los 10-15 minutos, tras los cuales los ejemplares permanecieron inmóviles durante todo el tiempo que duraba la sesión (por lo común varias horas). Después de cada sesión de trabajo los insectos se devolvían al recipiente donde se habían mantenido tras su captura, no pareciendo acusar ningún tipo de daño importante.

En cuanto al llenado de los capilares, la adición de polivinilpirrolidona (PVP) para evitar la formación de precipitados cristalinos de KCl por evaporación de la solución salina propuesta (KCl 0,1 N), resultó adecuada cuando los electrodos se introducían en la antena. En cambio, en la variante en que el electrodo registrador recubría la antena, y dado su grosor en estos insectos, la evaporación se producía con cierta rapidez (en algunos casos en menos de una hora), lo cual constituyó un inconveniente.

Para la colocación del electrodo de referencia se podía perforar la cutícula con un alfiler entomológico fino, o bien emplear el propio capilar de vidrio. En *C. welensii* la propia presión con el capilar lo introducía fácilmente en la antena, mientras que en *P. germari*, la disposición de su cutícula dificultó esta forma de proceder y aconsejó la perforación previa con un alfiler entomológico. La manipulación de los electrodos para su colocación, con la ayuda de una fuente de luz fría, una lupa binocular y dos micromanipuladores resultó suficientemente precisa. En este proceso se invirtió un tiempo oscilante entre los 20 y los 30 minutos. De este modo, el tiempo total dedicado a la preparación de un insecto osciló entre los 30 y los 45 minutos.

Figura II.9. Ejemplares de *Prinobius germari* (a) y *Phoracantha semipunctata* (b) preparados para la electroantenografía.

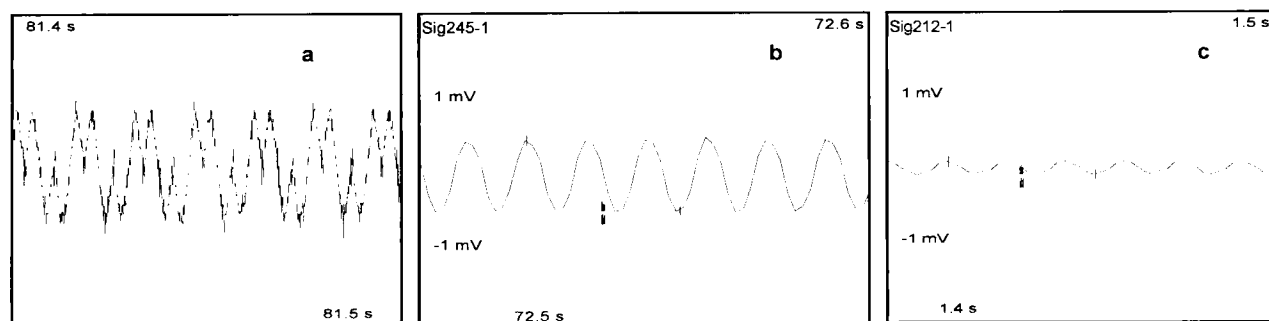


II.3.1.2. Grabación y procesado de respuestas electrofisiológicas

La unidad USB-IDAC muestra a través de la pantalla del ordenador la señal procedente del insecto a tiempo real, lo cual permitió comprobar que la selección de valores de filtración que se alejaban de los 0,1 Hz o “DC” para baja frecuencia y 20Hz para el filtro de alta, recomendados para señales de muy baja frecuencia como las que habitualmente proceden de las pruebas de EAG (Syntech 1998), ocasionaban el aumento rápido del ruido de fondo. Por otro lado, el empleo de valores de muestreo altos (más de 9.000 muestras por segundo) no pareció mejorar el aspecto de la línea base, y en cambio aumentó considerablemente el tamaño de los archivos de almacenamiento generados. Esto puede llegar a causar problemas de funcionamiento del ordenador en largas sesiones de trabajo, por lo cual resultan más recomendables rangos de muestreo de 1.000 a 9.000 muestras por segundo, siendo los de alrededor de 1.000 muestras por segundo plenamente satisfactorios.

Es deseable que el potencial de oscilación de la línea base resulte lo más bajo posible, para que no enmascare la fluctuación en la misma debido a la respuesta frente a posibles estímulos. Los valores encontrados en nuestras experiencias con *P. germari* y *C. welensii* en las condiciones de trabajo (filtros de 0,1Hz y 20Hz) han oscilado entre $\approx 0,9$ mV sin el empleo de base reductora de electricidad estática, y en torno a los 0,16 mV en caso de utilizar dicha base; si bien estos valores variaron con cada preparación. La posición del mecanismo inyector respecto a la sonda (2,5 m) no introdujo ningún tipo de interferencia debido a su funcionamiento, de modo que consideramos que la línea base obtenida en estas condiciones se debe a la colocación de los electrodos en el insecto. Hay que recordar, no obstante, que la carga del compresor sí podía llegar a modificar ligeramente la apariencia de la línea base.

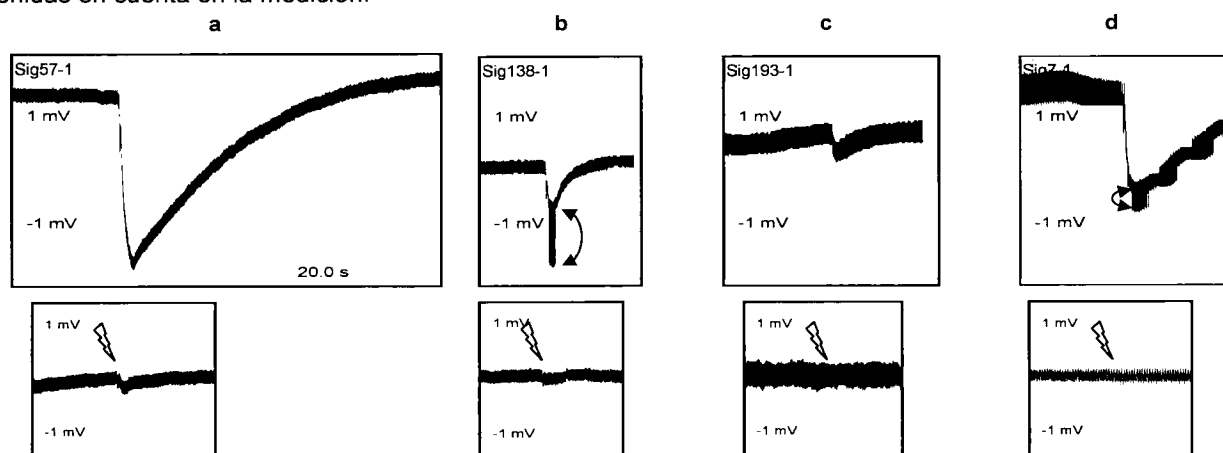
Figura II.10. Distintas apariencias de la línea base en una preparación de *P. germari*: a) colocación defectuosa de los electrodos; b) colocación correcta, sin emplear alfombrilla anti-estática; c) colocación correcta, empleando alfombrilla anti-estática. Configuración normal de trabajo: filtros de 0,1 Hz y 20 Hz para baja y alta frecuencia respectivamente.



II.3.2. Primeras pruebas de EAG en *C. welensii* y *P. germari* frente al (*E*)-2-hexenal, esencia de trementina y ácido acético

Los insectos con los que se efectuaron las primeras preparaciones parecían activos; sin embargo, en los seis primeros intentos (cuatro ejemplares de *Prinobius* y dos de *Cerambyx*) no se consiguió establecer contacto eléctrico adecuado con la antena. Se comprobó que estos insectos presentaban un alto grado de desecación en la antena, lo cual se evidenciaba por la ausencia de hemolinfa al perforar su membrana y/o al retirar el electrodo. Los posteriores intentos se realizaron con ejemplares que mostraban una vitalidad aparentemente mayor que los primeros insectos. En estos casos sí se lograron preparaciones adecuadas, encontrándose respuestas de EAG para ambas especies frente a los tres compuestos probados. La figura II.11 refleja la comparación entre la forma y magnitud de algunas de las respuestas encontradas en *C. welensii*, *P. germari* y *P. semipunctata* frente al (*E*)-2-hexenal disuelto en aceite de parafina.

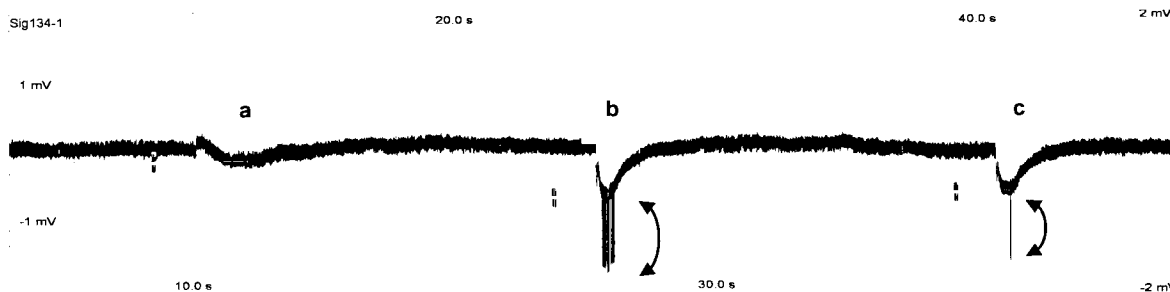
Figura II.11. Respuestas de EAG frente al (*E*)-2-hexenal en aceite de parafina (20 μ l al 50%, v/v) y a la inyección control (fila inferior), de un macho (a) y una hembra (b) de *C. welensii*; un macho de *P. germari* (c) y un macho de *P. semipunctata* (d). La flecha en las figuras b y d indica anomalías en la recepción de la respuesta, que no son tenidas en cuenta en la medición.



Las respuestas de EAG encontradas tienen, siguiendo los términos de Park y colaboradores (2002), la forma típica sinusoidal, originada por una rápida despolarización seguida de una recuperación más lenta hasta el nivel de base. La despolarización ocurrió, por lo general, en un tiempo de 0,3 a 0,6 segundos; hubo casos (figura II.8b) en que bajó de 0,2 segundos, mientras que en otros (como la respuesta superior de la figura II.11a) se acercó a los 0,9 segundos. Se aprecia que las respuestas a la inyección control son prácticamente inapreciables, salvo en el caso del macho de *C. welensii*. La recuperación de la señal varió según la intensidad de la misma: para el macho de *C. welensii* se alcanzó en unos 14 segundos; para la hembra de esta especie, así como para el macho de *P. germari*, se precisaron sólo 4,5 segundos; finalmente, para *P. semipunctata* fueron necesarios ≈ 7 segundos.

La forma de la señal provocada por la trementina resultó similar a la del (*E*)-2-hexenal (figura II.12). En cambio, para el ácido acético la respuesta presentó distinta forma, produciéndose la caída de potencial de forma más suave y encontrándose, incluso, una leve oscilación positiva al comienzo de la respuesta.

Figura II.12. 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.



La figura anterior muestra, además, la estabilidad y magnitud de la línea base, así como la aparente recuperación adecuada de la antena tras cada inyección a la frecuencia empleada (aquí 15 segundos), incluso después de alcanzarse intensidades considerables [más de 0,7 mV para el (*E*)-2-hexenal].

La tabla II.3 y la figura II.13 reflejan las respuestas medias netas obtenidas para *C. welensii* y *P. germari*, frente a los tres compuestos probados.

Tabla II.3. Estadísticos descriptivos de la respuesta neta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* frente al (*E*)-2-hexenal, ácido acético y trementina en mezclas al 1:1 (v/v) con aceite de parafina. M= media; DT= desviación típica.

Especie	Sexo	N	(<i>E</i>)-2-hexenal		Ácido acético		Trementina		Parafina	
			M (mV)	DT (mV)	M (mV)	DT (mV)	M (mV)	DT (mV)	M (mV)	DT (mV)
<i>P. germari</i>	Macho	11	0,11	0,06	0,09	0,07	0,21	0,11	0,02	0,02
<i>C. welensii</i> *	Macho	1	0,72	0	0,12	0	0,46	0,03	0,17	0,18
	Hembra	1	0,59	0,14	0,14	0,05	0,51	0,04	0,06	0

(*) La media y desviación típica para cada compuesto corresponden a las tres repeticiones efectuadas sobre cada ejemplar.

Para *P. germari*, la mayor respuesta se obtuvo frente a la trementina, alcanzándose un valor medio (0,21 mV) cercano al doble del obtenido para las otras dos sustancias. Esta respuesta resultó, en cambio, muy baja en comparación con la provocada en *C. welensii* (0,59 a 0,72 mV, según el sexo) por su mayor estimulante, el (*E*)-2-hexenal. En esta especie, las respuestas frente a la trementina y ácido acético fueron también mayores a las encontradas en *P. germari*, donde las intensidades resultaron ser \approx 41 al 46% (para la trementina) y 64 al 75% (ácido acético) de las encontradas en *C. welensii*.

Por el contrario, se encontró que un ejemplar de *C. welensii* respondió ante el (*E*)-2-hexenal al 50% (v/v) en aceite de parafina alcanzando 2,98 mV. El ejemplar de *P. semipunctata* al que se aplicó este mismo tipo de estímulo respondió con 1,6 mV (figura II.10).

II.4. Discusión

II.4.1. Dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG

El dispositivo propuesto para el estudio de la respuesta electroantenográfica de estímulos olfativos ha permitido demostrar que las especies *C. welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean son capaces de responder frente a ciertos estímulos olfativos, en particular (*E*)-2-hexenal, ácido acético y esencia de trementina. Si bien los dos primeros ya han originado respuestas en otros insectos de posición taxonómica muy distinta (Wadhams 1992; González *et al.* 1994; Suckling *et al.* 2001; Barata *et al.* 2000), la esencia de trementina como tal no ha sido probada, hasta donde tenemos conocimiento, como estimulante en estudios de EAG. La aptitud mostrada por ambos insectos permite iniciar los trabajos de investigación de cara al estudio de la repercusión de los estímulos olfativos en el comportamiento de ambos cerambícidos.

El primer aspecto de cara al planteamiento de trabajos en esta línea lo constituye la posibilidad de obtención de ejemplares en cantidad adecuada. A pesar de que la cría en laboratorio de insectos de este tipo está profusamente documentada (Notario 1978; Viedma *et al.* 1983; Notario y Castresana 1985; Notario *et al.* 1993; Hernández *et al.* 1994), nuestros intentos no han obtenido frutos satisfactorios. En cambio, la captura directa en campo resulta un método sencillo y rápido para obtener un número suficiente de ejemplares. No obstante, esta práctica presenta dos inconvenientes: 1) se desconoce el momento de la emergencia de los insectos y, con ello, el estado fisiológico de los mismos; 2) hay momentos (a partir de mediados de agosto) en que resulta difícil llegar a encontrar una decena de ejemplares con un esfuerzo razonable, lo cual puede perjudicar la experimentación en laboratorio.

En cuanto a las características del dispositivo, el caudal principal escogido por nosotros (4,1 l/min) se puede considerar medio-alto, comparado con los 0,25 l/min de nitrógeno empleados por Cork y colaboradores (1990) y los 9 l/min de Den Otter y Saini (1985). El comportamiento de las respuestas, así como el estado de los insectos, tras las primeras pruebas de EAG, no hacen temer la aparición de problemas con la hipotética desecación de la antena asociada a la aplicación de flujos continuos. No obstante, este aspecto será analizado con más detalle en el siguiente capítulo, cuando se estudie el comportamiento de una preparación durante varias horas de trabajo.

La variación del caudal principal a partir del valor prefijado (4,1 l/min) fue pequeña (<3%) y homogéneamente distribuida durante los casi cinco minutos de descarga del compresor, no repercutió en la respuesta del insecto, ya que la línea base se mantuvo estable mientras no era aplicado ningún estímulo (ver fig. II.8). Por otro lado, una fluctuación excesiva en el caudal de inyección podría afectar a la cantidad de volátiles arrastrados tras su paso por la pipeta Pasteur, y con ello a la presencia de los mismos en el flujo incidente sobre la antena. La baja variación hallada en nuestro caso (disminución $\leq 6\%$) y la brevedad del tiempo en que se produce respecto al ciclo total del compresor, hacen prácticamente despreciable una hipotética alteración de la respuesta del insecto, ya sea debida al cambio en la cantidad de estímulo que llega a la antena o a la actividad de mecanorreceptores. Esta última actividad debería ponerse de manifiesto, caso de producirse, durante la inyección control. En todo caso, el riesgo de que la carga del compresor afecte al normal funcionamiento de la

unidad de adquisición de datos, hace recomendable evitar las estimulaciones durante el corto período de tiempo que dura la misma.

La boquilla Windjet empleada por nosotros para aplicar el flujo de aire sobre la antena del insecto, siguió la propuesta de Nagai (1981), consiguiéndose una cortina de aire “plana” y uniforme de unos 5 cm de anchura y 3 mm de alto. Esta forma de aplicación resultó suficiente para cubrir la totalidad de la antena en los ejemplares de tamaño medio, y buena parte de la misma en los más grandes; resultando más adecuada que la manera tradicional consistente en una boquilla cilíndrica de vidrio (Malo *et al.* 2000; Park y Hardie 1998).

Respecto a la forma de inyección de estímulos, para estudios sistemáticos y a frecuencias altas, resulta muy útil el dispositivo automatizado. En cambio, para espaciamientos de las inyecciones superiores a un minuto, creemos más versátil la inyección manual mediante jeringa. El caudal elegido para la inyección mediante el procedimiento automatizado (0,5 l/min) fue similar al aplicado por otros autores (Coracini *et al.* 2001; Park y Hardie 1998; Kelling 2001), y presenta un valor medio entre los 0,18 l/min de Den Otter y Saini (1985) y los 2 l/min de Roelofs (1984). Una y otra forma de inyección deparan resultados comparables. La inyección manual ha sido recomendada por autores clásicos en esta disciplina, como Roelofs (1984), quien sostiene, además, que ligeras variaciones en la velocidad a la cual es accionado el émbolo de la jeringa, así como en la cantidad de aire impulsado, no son críticas de cara a la amplitud de la respuesta resultante. La cantidad inyectada en nuestro caso (10 ml) es alta comparada con los 1-3 ml que se han empleado en otros trabajos (Roelofs (1984; Barata *et al.* 1992; Ikeda *et al.* 1993).

La cantidad de disolución empleada (20 μ l) es cercana a los 25 μ l empleados por diversos autores (Barata 1997; Park y Hardie 1998; Van Tol y Visscr 2002), y puede ser considerada alta. Dicha cantidad supera los 3 μ l de Barata y colaboradores (2002) o los 10 μ l de White y Birch (1987) y Park y colaboradores (2002), pero está muy por debajo de los 50 μ l empleados por Weibbecker y colaboradores (1997). Se escogió una cantidad deliberadamente alta, que permitiera la captación de la respuesta por pequeña que ésta pudiera resultar.

El punto de inyección escogido, relativamente alejado de la antena (2,5 m), no supuso ningún inconveniente, sino que evitó cualquier posible interferencia eléctrica por parte de la electroválvula o el temporizador. Únicamente ocasionó un retraso en la aparición de la respuesta de menos de 0,5 segundos, con los caudales de trabajo manejados. Barata y colaboradores (1992) aplicaron los estímulos a 1,5 metros de la preparación, indicando igualmente la ausencia de inconvenientes salvo el leve retraso entre la inyección del estímulo y la aparición de la respuesta.

Se considera que la duración adecuada de una estimulación oscila entre 0,3 y 0,5 segundos (Syntech 1998), suficiente para provocar la mayor variación de potencial. Mayores duraciones no producen señales más altas, pero pueden ocasionar la adaptación rápida de la antena y, con ello, su pérdida de sensibilidad. En nuestro caso consideramos que la duración escogida para la inyección automatizada (0,3 segundos) resultó suficiente para verificar la existencia de respuesta de EAG.

En cuanto a la frecuencia entre estimulaciones sucesivas, en esta ocasión no ha resultado un factor preocupante para nosotros, ya que pretendíamos comprobar la idoneidad del dispositivo y metodología propuestos para detectar la respuesta de los insectos, y no tanto

caracterizar la misma. Aún así, los resultados muestran que la frecuencia de 15 segundos puede resultar insuficiente, en algunos casos, para que la línea base retorne a su posición inicial. Este riesgo podría presentarse con respuestas elevadas (próximas o superiores a 3 mV), tal y como se ha observado para un macho de *C. welensii* frente a la inyección de 20 µl de (E)-2-hexenal al 50% (v/v) en aceite de parafina.

La colocación del electrodo de referencia inserto en la membrana intersegmental entre el escape y el pedicelo basales de la antena, y el registrador recubriendo aproximadamente el tercio distal intacto del undécimo segmento, proporcionó líneas bases estables con un ruido de fondo de alrededor de 0,2 mV empleando base anti-estática. Este nivel de ruido resulta aceptable comparado con los resultados de Park y Hardie (1998) y Dolzer (2002). Según estos autores niveles próximos a 0,1 mV se pueden considerar como bajos, mientras que valores próximos a 0,5 mV resultan relativamente altos. Un inconveniente, derivado de la colocación exacta del electrodo registrador, es la evaporación de la solución salina. Para paliar este problema se emplea polivinilpirrolidona en la cantidad del 1-5% de la solución salina empleada; nosotros añadimos el 3%, de modo que podría resultar útil para reducir tal evaporación aumentar dicha cantidad hasta el 5%.

En relación con lo anterior parece jugar un papel importante, al margen de la adecuada colocación de los electrodos, el estado fisiológico de los ejemplares estudiados. En los ejemplares envejecidos, el estado y/o la cantidad de hemolinfa en las antenas pueden no ser adecuados, por lo que el contacto eléctrico se verá probablemente dificultado o impedido. La corta longevidad de los individuos de estas especies sugiere que este problema puede llegar a ser importante, por lo que resulta aconsejable llevar a cabo los ensayos de EAG tan pronto como se inicie el período de vuelo.

II.4.2. Primeras pruebas de EAG en *C. welensii* y *P. germari* frente al (E)-2-hexenal, esencia de trementina y ácido acético

Los tres compuestos estudiados: (E)-2-hexenal, trementina y ácido acético, han originado respuestas olfativas en *C. welensii* y *P. germari* a las dosis probadas. Mientras que para *Cermbyx* el compuesto más estimulante fue el (E)-2-hexenal (respuesta neta media de 0,65 mV entre los dos ejemplares), para *Prinobius* fue la esencia de trementina (neta media de 0,21 mV). Sin embargo, en *C. welensii* se ha encontrado que puede haber ejemplares cuya respuesta supere ampliamente estos valores, acercándose a los 3 mV.

La forma de la señal de EAG encontrada en los dos cerambícidos sigue el patrón general que se ha presentado en otras especies: rápida despolarización que se traduce en una caída del potencial (potencial negativo) registrado entre los dos electrodos, seguida de una recuperación más lenta hasta alcanzar el nivel base. La posible aparición de potenciales positivos ante estimulaciones con ácidos fuertes a dosis elevadas (como ocurre en la figura II.12a), ha sido citada ya en otras especies (Kelling 2001); atribuyéndose tal fenómeno a la interacción electroquímica del ácido con el electrodo y no a una respuesta fisiológica.

El tiempo requerido, generalmente, para la despolarización en *P. germari* y *C. welensii* (0,3 a 0,6 segundos), resulta comparable a los 0,5 segundos encontrados por Cork y colaboradores (1990). Por otro lado, el tiempo de recuperación del nivel de base puede variar según el tipo de compuesto y el sexo (Thiéry y Marion-Poll 1998); el intervalo encontrado en nuestro

trabajo (4,5 a 14 segundos) es del orden de magnitud del encontrado por estos autores, pero resulta superior a los 2,5 segundos citados por Cork y colaboradores (1990).

Para estimar la calidad de la respuesta hallada mediante la metodología propuesta, la referencia de *P. semipunctata* resulta muy útil. Barata y colaboradores (1992) encontraron, para todos los compuestos estudiados con este insecto aplicando inyecciones de 25 μ l, que la dosis 1:1 en aceite de parafina produjo las respuestas más altas. Como orientación, indicar que para esta dosis obtuvieron respuestas netas de 0,71 mV para el canfeno y 0,49 mV para el α -pineno, pero estos valores se reducían bastante a dosis menores; así, a 1:100 obtuvo 0,14 mV para el canfeno y 0,21 mV para α -pineno. En trabajos posteriores, estos autores establecieron como clasificación orientativa de las respuestas de EAG la siguiente: pequeña (\leq 0,3 mV); media (0,3-0,5 mV); grande (\geq de 0,5 mV) (Barata *et al.* 2000). En este sentido, Struble y Arn (1984) consideraron respuestas próximas a 0,7 mV como fuertes.

Park y Hardie (1998) encontraron amplitudes medias de respuesta de *Aphis fabae* de 1,2 mV frente a 25 μ l de (E)-2-hexenal al 1% en aceite de parafina. Otro resultado con cerambícidos que puede servir de referencia es el de Ikeda y colaboradores (1993), en cuyos trabajos el compuesto que reflejó la mayor respuesta simultánea en las especies *Anaglyptus subfasciatus* y *Demonax transilis* fue el bencil acetato. Tal compuesto originó, aplicando 11 μ l al 10% en hexano, valores de 1,6 mV en los machos y 0,3 mV en las hembras de *D. transilis*; mientras en *A. subfasciatus* provocó fluctuaciones de 1 mV en las hembras y 0,3 mV en los machos. Los valores anteriores sugieren que la respuesta encontrada en *C. welensii* cabe ser considerada alta, y es posible que puedan encontrarse registros medios mayores, habida cuenta de la alta respuesta encontrada en un ejemplar (2,96 mV). La de *Prinobius*, en cambio, se estima como baja, aunque parece ser del orden de los valores que se pueden encontrar en otros cerambícidos para determinados compuestos.

Aunque Roelofs (1984) recomendaba emplear como estímulo estándar aquel que provocara respuestas medias de entre 1 y 2 mV, cuando se trabaja con cerambícidos estos valores no parecen resultar fáciles de alcanzar. Consideramos, pues, que para *C. welensii* el (E)-2-hexenal puede resultar adecuado como estímulo estándar. En *P. germari* la decisión es más arriesgada; no obstante, siguiendo la línea de razonamiento de Syntech (1998), según la cual puede ser empleado como estándar cualquier compuesto que provoque una respuesta aceptable, podríamos decidir en primer término el empleo de la trementina como estímulo estándar.

Por último, las causas por las que no se encontró ningún tipo de respuesta en los demás insectos pueden ser de dos tipos: puede que no se lograra un contacto eléctrico adecuado con la antena del insecto, o bien puede que el estado fisiológico del mismo no fuera el adecuado; también podrían haberse dado las dos cuestiones simultáneamente.

El contacto eléctrico puede entorpecerse por muchas razones: alguna partícula obstaculiza el flujo de hemolinfa dentro de los electrodos, pérdida del contacto entre la solución salina y el filamento de plata de alguno de los electrodos, movimiento de un insecto mal fijado, que descoloca algún electrodo, o simplemente que alguno o ambos estaban mal colocados. En varios insectos en los cuales no se encontró respuesta medible (cuatro ejemplares de *P. germari* y dos de *C. welensii*), se pudo apreciar que la preparación de la antena para la colocación de los electrodos no ocasionaba flujo de hemolinfa, o este era escaso. Esta

circunstancia hizo pensar que tales insectos estaban próximos a su longevidad fisiológica máxima, por lo cual el estado de la antena podría no ser el adecuado para la transmisión del estímulo recibido.

II.5. Bibliografía

- Arn, H.; Städler, E. M.; Rauscher, S. (1975). The electroantennographic detector -a selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. *Z. Naturforsch* 30: 722-725.
- 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. No publicado.
- 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. En: Menken, S. B. J.; Visr, H.; Harrewijn, P. (eds.). *Proceedings of the 8th International Symposium on Insects-Plant Relationships*. Kluwer Academic, Dordrecht. pp.: 133-135.
- Barata, E.; Mustaparta, H.; Pickett, J.; Wadhams, L.; Araujo, J. (2002). Encoding of host and non-host plant odours by receptor neurones in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. Volume 188, Number 2: 121 – 133.
- 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, No. 8: 1877-1895.
- Cork, A.; Beevor, P. S.; Gough, A. J.; Hall, D. R. (1990). Gas chromatography linked to electroantennography: a versatile technique for identifying insect semiochemicals. En: McCaffery, A. R.; Wilson, I. D. (eds.). *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones*. Plenum Press, New York. 271-280.
- Den Otter, J. C.; Saini, R. K. (1985). Pheromone perception in the tse tse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Entomol Exp. Appl.* 39: 155-161.
- Dolzer, J. (2002). *Mechanism of modulation and adaptation in pheromone-sensitive of the hawkmoth Manduca sexta*. [en línea]. archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2002/0185. Última consulta, enero 2005.
- 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.
- 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.
- Kaissling, K. E.; Thorson, J. (1980). Insect olfactory sensilla: structural, chemical and electrical aspects of the functional organization. En: Satelle, D. B.; Hall, L. M.; Hildebrand,

- J. G. (eds.). *Receptors for neurotransmitters, hormones and pheromones in insects*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York. pp.: 261-282.
- Kelling, F. J. (2001). *Olfaction in Houseflies: Morphology and Electrophysiology*. [en línea]. www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/. 144 pp. Última consulta, enero 2005.
- Malo, E.; Renou, M.; Guerrero, A. (2000). Analytical studies of *Spodoptera littoralis* sex pheromone components by electroantennography and coupled gas chromatography-electroantennographic detection. *Talanta* 52: 525-532.
- Moral del, J. (1994). *Cerambyx* spp., historia de una plaga de las dehesas extremeñas. *Phytoma-España*. 60: 18-24.
- Nagai, T. (1981). Electroantennogram response gradient on the antenna of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.* 27: 889-894.
- Notario, A. (1978). *Desarrollo de una dieta definida para cría individual de insectos lignícolas, con especial atención a coleoptera*. INIA. Ministerio de Agricultura. Serie Tesis Doctorales número 7, Madrid. 95 pp.
- Notario, A.; Castresana, L. (1985). *Dietas artificiales en Insecta. Un compendio de referencias 1980-1984*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. INIA, Madrid. 37 pp.
- Notario, A.; Baragaño, J. R.; Castresana, L. (1993). Estudio de cerambícidos xilófagos de *Pinus sylvestris* L. utilizando dietas artificiales. *Ecología* 7: 499-502.
- Park, K. C.; Hardie, J. (1998). An improved aphid electroantennogram. *Journal of Insect Physiology* 44 (10): 919-928.
- Park, K. C.; Cork, A. (1999). Electrophysiological response of antennal receptor neurons in female australian sheep blowflies, *Lucilia cuprina*, to host odours. *Journal of Insect Physiology* 45: 85-91.
- 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.
- Roelofs, W. L. (1984). Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. En: Hummel, H.; Miller, T. A. (eds.). *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 131-159.
- Romanyk, N.; Cadahía, D. (coordinadores) (1992). *Plagas de Insectos en las Masas Forestales Españolas*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Icona. Colección técnica. Segunda edición. 342 pp.
- Struble, D.; Arn, H. (1984). Combined gas chromatography and electroantennogram recording of insect olfactory response. En: Hummel, H.; Miller, T. A. (eds.). *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 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.
- Viedma, C.; Notario, A.; Baragaño, J. R.; Rodero, M.; Iglesias, C. (1983). Cría artificial de coleópteros lignícolas. *Rev. R. Acad. Cien. Exactas Fis. Nat. Madrid*. 78 (4): 767-772.
- Vives, E. (2000). En: Ramos, M. A. *et al.* (eds.). *Coleoptera, Cerambycidae. Fauna Ibérica*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSI, Madrid. Vol. 12. 716 pp., 5h. lám.
- Vives, E. (2001). *Atlas fotográfico de los Cerambycidos Íbero-Baleares*. Argania Ed., Barcelona. 285 pp.
- Wadhams, L. J. (1992). The perception of semiochemicals. En: Crampton, J. M. y Eggleston (eds.). *Insect Molecular Science. Proceedings, 16th Symposium of the Royal Entomological Society London. Imperial College London, september 1991*. Academic Press, London. 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.
- White, P. R.; Birch, M. C. (1987). Female sex pheromone of the common furniture beetle *Anobium punctatum* (Coleoptera: Anobiidae): extraction, identification and bioassays. *J. Chem. Ecol.* 13: 1695-1706.

El olor de las flores y el perfume de las muchachas se mezclaban íntimamente, y Chick se sentía como una abeja en su colmena.

-Boris Vian-

Capítulo III

Efecto sobre la respuesta de EAG de *Cerambyx welensii* y *Prinobius germari* de las condiciones de estimulación y la duración de la preparación; y diferencias de respuesta entre sexos e individuos

III.1. Introducción: Parámetros que condicionan el comportamiento de los insectos en las pruebas de EAG

El comportamiento de los insectos en las preparaciones para las pruebas de EAG puede verse afectado por factores de variada naturaleza. Algunos tienen que ver con aspectos experimentales como los descritos en el capítulo II, por ejemplo el caudal y grado de humedad del aire que llega a la antena, así como su forma de aplicación, o la elaboración y colocación de los electrodos. Otras variables dependen de las condiciones en que se efectúa la aplicación de los estímulos (frecuencia, duración, dosis y cantidad de la mezcla estimulante aplicada). También pueden influir las condiciones ambientales durante la sesión (temperatura y humedad), además del propio estado fisiológico de los individuos. Todos estos factores ejercen una gran influencia sobre un aspecto importante en relación con este tipo de trabajos: la duración de la preparación para estudio de EAG.

Un aspecto previo al análisis de dicho comportamiento lo constituye la selección del compuesto estándar a partir del cual se realice el estudio; este compuesto debe ser aplicado en las mismas condiciones a todos los ejemplares. Las pruebas preliminares efectuadas en el capítulo II permitieron seleccionar un compuesto para cada especie que tuviera este carácter: (*E*)-2-hexenal para *C. welensii* y esencia de trementina para *P. germari*. El compuesto estándar se emplea también en estudios posteriores, cuando el objetivo sea analizar la respuesta frente a conjuntos más o menos amplios de sustancias, ya que en este caso cada respuesta obtenida se suele “normalizar”, expresándola como valor relativo respecto a la provocada por el estándar.

Entre los cerambícidos estudiados con técnicas de EAG se han empleado como estándar diversos compuestos: (*E*)-2-hexenal y 1,8-cineol en hexano para *Phoracantha semipunctata* (Barata 1997); linalol y linalil acetato disueltos en n-hexano con *Anaglyptus subfasciatus* (Ikeda *et al.* 1993); α -pineno en hexano para *Arhopalus tristis* (Suckling *et al.* 2001). Otros tipos de estándares encontrados en coleópteros son la solución acuosa de ácido acético para el escolítido del olivo *Phloeotribus scarabaeoides* (González *et al.* 1994), o la solución de (*Z*)-3-hexen-1-ol en aceite de parafina empleada por Weibbecker y colaboradores (1997) con el

crisomélido *Leptinotarsa decemlineata* y por Van Tol y Visser (2002) con el curculiónido *Otiobryncbus sulcatus*. Ya en otros órdenes de insectos, destacar el empleo de (*E*)-2-hexenal disuelto en aceite de parafina con el áfido *Aphis fabae* (Park y Hardie 1998).

Respecto al empleo de estándares es interesante recoger la opinión de Brockerhoff y Grant (1999). Estos autores sostienen que es habitual que la antena se fatigue cuando es estimulada repetidamente, y que el recurso de la normalización frente a un estándar podría aumentar la fatiga hacia los compuestos relacionados con el mismo (si es que resultan estimuladas las mismas neuronas receptoras). Por ello, proponen otro método de normalización cuando se quiera analizar la respuesta frente a un grupo de sustancias distintas. Consiste en utilizar estándares independientes y escogidos al azar para cada serie de compuestos estudiados, inyectando los mismos al inicio y al final de la serie para determinar la caída de EAG de la preparación durante el estudio; tras ello se ajustaría la respuesta de los demás compuestos y, por último, cada respuesta corregida se expresaría como valor relativo (%) respecto a la respuesta más alta encontrada en cada insecto.

Una vez escogido el compuesto estándar se analiza el efecto individualizado de algunas de las variables influyentes en la respuesta de EAG. Las variables que se analizan habitualmente son las siguientes: a) dosis del compuesto en relación al solvente empleado, b) cantidad de disolución empleada, c) frecuencia de la estimulación, y d) duración de la preparación. Las tres primeras variables están ligadas de tal manera que resulta inevitable fijar unas condiciones iniciales para las mismas a partir de pruebas preliminares y, a continuación, analizar el efecto de la variación de cada una.

La comparación de la respuesta frente a distintas dosis de un determinado compuesto permite obtener varias conclusiones: la dosis mínima estimulante, la dosis que provoca la respuesta máxima o bien un valor que se pueda considerar aceptable (por ejemplo, ≈ 1 mV), o aquella que provoca la saturación de la antena. Las dosis estudiadas habitualmente van desde la proporción 1:10.000 hasta 1:1 (v/v). La cantidad de disolución empleada está relacionada con lo anterior; sin embargo, lo habitual es establecer una cantidad de disolución fija, que en general oscila entre 3 y 25 microlitros (Barata *et al* 1992; Barata *et al*. 2002), y variar la dosis del compuesto en la disolución.

La calidad de la respuesta suele estar relacionada con la frecuencia y duración de la estimulación (Syntech 1998), pero al contrario que para la frecuencia, el efecto de la duración no se suele analizar, sino que se fija de antemano. Duraciones de estimulación inferiores a 1 segundo resultan suficientes, considerándose adecuado estimular durante 1-2 segundos sólo en caso de que se quiera estudiar la forma de la señal (Syntech 1998); en cambio, abundan los trabajos en los que la duración de la señal alcanza y rebasa un segundo. Por otra parte, frecuencias de estimulación altas impiden que la antena se recupere entre un estímulo y otro, por lo que no se puede valorar la respuesta encontrada en estos casos para estimulaciones sucesivas; en este sentido lo habitual es analizar la respuesta para un abanico que va desde las frecuencias más altas (decenas de segundos) hasta las más bajas (varios minutos).

Entre las frecuencias de estimulación empleadas en diversos estudios, los 30 segundos de Ikeda y colaboradores (1993) figuran entre las cifras más bajas. La frecuencia de 1 minuto ha sido ampliamente utilizada (Maia *et al*. 2000; Zhang *et al*. 2000; Kelling 2001); y también son usuales tiempos de espera de 2 minutos entre estimulaciones sucesivas (Nagai 1981; Park y

Hardie 1998; Park y Cork 1999). Struble y Arn (1984) emplearon frecuencias de 3 minutos; este valor, y frecuencias más bajas, resultan ya de empleo poco común.

El conocimiento de la duración en condiciones aptas de la preparación de un insecto para la sesión de EAG resulta particularmente importante, debido a lo prolongado de algunas sesiones de trabajo. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se estudia la respuesta provocada por grupos numerosos de compuestos o cuando, sin ser este número demasiado elevado, existen indicios de que las especies estudiadas puedan responder con altos valores, que obliguen a disminuir la frecuencia de estimulación y, con ello, prolongar la sesión de trabajo. Por otro lado, las pruebas de CG-EAD (cromatografía de gases acoplada a la electroantenografía) pueden llegar a exigir el empleo de una preparación durante varias horas.

Se considera que, en general, las preparaciones para estudio de EAG a partir de insectos vivos y/o empleando estímulos a bajas concentraciones (cantidad de estímulo incidente sobre la antena del orden de 1-2 nanogramos) permiten el trabajo con una preparación durante un tiempo de 4-8 horas, es decir, una jornada completa de trabajo, sin deterioro significativo de la misma (Struble y Arn 1984; Cork *et al.* 1990). Esto se ha comprobado en diversas especies, entre las que podemos citar el áfido *Aphis fabae*, para el cual se consiguieron duraciones de 8 horas para preparaciones con insectos completos (Park y Hardie 1998). Por el contrario, la duración de la preparación con antenas escindidas varía según la especie, habiéndose citado casos con duraciones inferiores a las 2 horas (*Leptinotarsa decemlineata*, Weisbecker *et al.* 1997; *Aphis fabae*, Park y Hardie 1998) mientras que en otros se alcanzan varias horas (*Lobesia bostrana*, Arn *et al.* 1975; *Hylotrupes bajulus*, Weisbecker *et al.* 2004).

Otras variables influyentes sobre la respuesta de EAG, entre ellas las relacionadas con el estado fisiológico de los individuos, no suelen ser objeto de estudio por lo general. Esto es debido a que se intenta homogeneizar su efecto, planteando condiciones experimentales que resulten comparables para distintos individuos. No obstante resulta interesante, a este respecto, el trabajo de Dickens (2000) sobre la influencia del estado de desarrollo del crisomélido *Leptinotarsa decemlineata* en la respuesta de EAG frente a volátiles de su especie hospedante. En dicho trabajo se encontró una relación entre la respuesta de EAG frente a este tipo de volátiles y la madurez sexual, tal y como se conoce que ocurre con las feromonas.

En este sentido, resulta interesante la reflexión de Van Tol y Visser (2002). Estos autores sugieren la existencia de diferencias de sensibilidad en los receptores de ejemplares de *Otiorhynchus sulcatus* procedentes de distintas poblaciones. Sin embargo, indican que el bajo número de insectos estudiados en cada población aconseja interpretar con cautela este resultado, ya que las condiciones de los individuos testados en las pruebas de EAG pueden influir sobre los efectos originados sobre la respuesta por otras variables analizadas. Para el cerambícido *Hylotrupes bajulus*, se encontró que cada antena presentaba una sensibilidad “única” para los volátiles emitidos por la madera de los pinos (Weisbecker *et al.* 2004) y, además; esta sensibilidad cambiaba en el transcurso del tiempo.

La diferencia de respuestas entre sexos es una cuestión que muestra gran variabilidad según la especie estudiada. Para *Phoracantha semipunctata* no se han encontrado diferencias significativas entre las respuestas de EAG inducidas en ambos sexos, por los componentes de mezclas de volátiles de hospedantes y no hospedantes (Barata *et al.* 2000). En cambio, Ikeda y colaboradores (1993) sí encontraron grandes diferencias entre machos y hembras de

Anaglyptus subfasciatus y *Demonax transilis* frente a volátiles de flores que ambos cerambícidos visitan con frecuencia: las respuestas mayores las ofrecían las hembras de la primera especie y los machos de *Demonax transilis*. Suckling y colaboradores (2001) citan que, generalmente, en los machos de *Arhopalus tristis* se encontraban respuestas de EAG más altas que en las hembras, aunque ambas respuestas estaban altamente correlacionadas. Zhang y colaboradores (2000 y 2002) encontraron que las muestras sintéticas correspondientes a dos volátiles específicos procedentes de los machos de *Anoplophora glabripennis*, excitaron la misma respuesta para ambos sexos en dicha especie.

En el presente capítulo se analizará la influencia sobre la respuesta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* de parámetros experimentales implicados en las sesiones de trabajo, así como de las características de los insectos. Para ello se han abordado dos líneas de análisis complementarias. Por un lado, se ha estudiado el efecto sobre la respuesta de EAG de la concentración y cantidad de los estímulos aplicados, así como de la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación de un ejemplar para las pruebas de EAG. Por otra parte, se analizó el efecto en las respuestas ante el estímulo estándar del sexo y los individuos, así como la posibilidad de que el tipo de solvente empleado en la elaboración del estímulo estándar pueda condicionar la respuesta frente al mismo. Se ha estudiado, así mismo, la incidencia de algunos factores que podrían influir en la variación de respuesta entre ejemplares.

La segunda línea de análisis resulta especialmente interesante por dos motivos: en primer lugar debido al método empleado para la obtención de individuos, que podría tener como consecuencia unas condiciones desiguales entre los mismos para las pruebas de EAG: por otro lado, el análisis de la respuesta frente a la inyección control puede servir para indicar si en la misma intervienen otros tipos de receptores aparte de los receptores olfativos (receptores higro-térmicos y/o mecánicos).

III.2. Material y métodos

Todos los análisis descritos a lo largo del presente capítulo se realizaron empleando el dispositivo para estudio de la respuesta de EAG propuesto en el capítulo II. Los parámetros establecidos son los mismos que se fijaron en las pruebas preliminares, y fueron resumidos en la tabla II.2.

III.2.1. Efecto sobre la respuesta de EAG de la concentración y cantidad de estímulo aplicado, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación

III.2.1.1. Insectos empleados

Los ejemplares correspondientes a las dos especies se capturaron durante el período de vuelo en la misma zona (dehesa de Almonte, Huelva), con excepción de dos ejemplares de *C. welensii*, que fueron capturados antes de su avivamiento en el término municipal de Monesterio (Badajoz). Estos dos ejemplares (un macho y una hembra) se emplearon en el análisis del efecto de la duración de la preparación; el macho se empleó, además, en la prueba del efecto de la frecuencia de estimulación. El número de insectos de cada especie empleados en cada una de las pruebas se resume en la siguiente tabla:

Tabla III.1. Número de ejemplares de *C. welensii* y *P. germari* empleados en el estudio del efecto de la dosis y cantidad de estímulo aplicado, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación.

Análisis	Especie	
	<i>C. welensii</i>	<i>P. germari</i>
Relación dosis-respuesta	4	5
Efecto de la cantidad de estímulo aplicado	6	9
Efecto de la frecuencia de estimulación	5-12, excepcionalmente 2-3	6-7
Efecto de la duración de la preparación	8	9

III.2.1.2. Metodología experimental

Análisis de la relación dosis-respuesta

Para cada estándar [(*E*)-2-hexenal y trementina] se prepararon cinco disoluciones en hexano (1:10.000 hasta 1:1 v/v). Para cada una de estas dosis se cargaron tres pipetas Pasteur, mediante la aplicación de 20 microlitros de la mezcla a sus correspondientes tiras de papel de filtro, permitiéndose la evaporación del solvente durante un tiempo aproximado de 5 minutos antes de sellar las pipetas a la espera de su empleo. De esta manera, se realizaron tres inyecciones consecutivas para cada dosis, estableciendo un orden creciente de concentraciones. La frecuencia de estimulación para una misma dosis fue de 1 minuto, dejando un tiempo de entre 2 y 5 minutos entre series correspondientes a dosis distintas. Para cada insecto, la sesión se inició con una inyección control compuesta exclusivamente por hexano (20 microlitros, permitiéndose su evaporación de la misma manera que para la mezcla estimulante), continuándose con la aplicación de las distintas series según se ha descrito.

Efecto de la cantidad de estímulo aplicado

Las cantidades de disolución contrastadas fueron las siguientes: 5 microlitros, 10 microlitros, 15 microlitros y 20 microlitros. 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 contenía exclusivamente el solvente empleado en cada caso, aplicado en cantidades de 5 a 20 microlitros, según la serie estudiada. En la preparación de las inyecciones se permitió, en todo caso, la evaporación del solvente durante unos 5 minutos antes de proceder al sellado de las pipetas.

A cada ejemplar le fueron aplicadas tres estimulaciones consecutivas para cada una de las cantidades citadas. Precediendo a la serie correspondiente a cada cantidad se aplicó una inyección control de solvente, elaborada según se describió en el párrafo anterior. 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.

Efecto de la frecuencia de estimulación

Se estudiaron las siguientes frecuencias de estimulación: 7,5 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto y 10 minutos. A cada insecto le fue aplicada una serie de 7 u 8 estimulaciones consecutivas -según se tratara de *P. germari* o *C. welensii*-, para cada una de las frecuencias estudiadas. Cada estimulación se efectuó a partir de una pipeta Pasteur cargada 20 μ l del estímulo estándar al 50% (v/v) en el solvente (parafina en las frecuencias inferiores a 1 minuto, y hexano para las frecuencias de 1 y 10 minutos). Al inicio de cada serie se aplicó una inyección control con 20 μ l del solvente empleado en cada caso. El tiempo transcurrido entre la aplicación de la mezcla -o el solvente únicamente- y el sellado de las pipetas resultó, en todo caso, de \approx 5 minutos.

En las dos especies, los ejemplares empleados en las series de 1 y 10 minutos fueron distintos a los empleados en las demás series. Indicaremos, por último, que en el caso de la especie *C. welensii*, las respuestas medias correspondientes a cada estimulación en alguna de las frecuencias estudiadas se obtuvieron, de forma excepcional, con un reducido número de réplicas (dos o tres insectos), ya que por lo común se dispuso de las respuestas de 5 a 12 ejemplares.

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, 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. La amplitud de EAG fue medida para cada estimulación, restando cualquier posible respuesta de la inyección control.

III.2.1.3. Análisis estadístico

En todos los casos se empleó el paquete estadístico SPSS 11.5[©], para un nivel de significación $\alpha=0,05$. Cuando se consideró necesario, la identificación de datos aberrantes se efectuó a partir del método de Grubbs (que se puede consultar en 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 $\alpha=0,05$.

El hecho de contar generalmente con muestras pequeñas, recomendó analizar el cumplimiento del requisito de normalidad en la distribución de las variables estudiadas 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.

Análisis de la relación dosis-respuesta

A cada respuesta obtenida se le restó la contribución de la inyección control. Posteriormente, cada respuesta neta se estandarizó expresándola como valor relativo (en tanto por uno) respecto a la media de las tres respuestas netas obtenidas frente a la dosis 1:1. La comparación de medias entre las respuestas relativas provocadas por cada concentración se efectuó, en el caso de comparaciones respecto a la dosis 1:1, mediante la prueba “t” de Student para una muestra, fijando el valor de contraste $\mu=1$; entre las demás concentraciones se empleó el procedimiento ANOVA seguido de la comparación múltiple de Games-Howell o bien la prueba de Wilcoxon (según resultara asumible o no el requisito de normalidad).

Efecto de la cantidad de estímulo aplicado

Las variables analizadas fueron las *respuestas netas medias* por insecto y cantidad aplicada, que se obtuvieron restando a cada respuesta el valor debido a la inyección control. Estas respuestas netas se expresaron como valor relativo respecto a la respuesta provocada por la cantidad mayor (20 microlitros). El cumplimiento del requisito de esfericidad de la matriz de varianzas-covarianzas de las diferencias entre pares, para el factor *cantidad de aplicación*, se verificó mediante la prueba de Mauchly. En las comparaciones con la respuesta obtenida para la cantidad de 20 microlitros se empleó la prueba “t”, fijando el valor de contraste $\mu=1$.

Efecto de la frecuencia de estimulación

A cada respuesta obtenida se le restó la respuesta provocada por la inyección control de su correspondiente serie. Acto seguido se estandarizó cada una de las respuestas netas con respecto al valor encontrado en la primera estimulación de su serie; las respuestas quedaron, de este modo, expresadas como valores relativos en tanto por uno respecto a dicha estimulación. La comparación de medias se efectuó entre cada estimulación y la primera, por lo tanto se empleó en todos los casos la prueba “t” para una muestra frente al valor de contraste $\mu=1$; $\alpha=0,05$.

Efecto de la duración de la preparación

El análisis estadístico se efectuó mediante el procedimiento “MLG medidas repetidas”, estableciendo como factor el *tiempo en horas*. Como respuesta media horaria de cada insecto se consideró la media de las respuestas netas correspondientes a las tres inyecciones realizadas. A efectos del análisis estadístico, se consideró como variable ilustrativa de la respuesta para cada hora la *respuesta media estandarizada*, expresada como valor relativo en tanto por uno respecto al valor correspondiente a la primera hora. Para comparar cada promedio horario con la respuesta inicial (hora “cero”) se empleó la prueba “t” frente al valor de contraste $\mu=1$; $\alpha=0,05$.

III.2.2. Diferencias de respuesta entre sexos e individuos ante el estímulo estándar disuelto en dos tipos de solvente

III.2.2.1. Insectos empleados

Cerambyx welensii Küster

Se ha trabajado con un número total de 27 insectos, de los cuales 25 se capturaron en campo (término municipal de Almonte, Huelva) durante el período de vuelo y dos se capturaron antes del avivamiento (término municipal de Monesterio, Badajoz). La respuesta de EAG de la mayor parte de los ejemplares (19) se estudió empleando hexano como solvente en la disolución estimulante, por lo cual quedaron etiquetados como “grupo H”; con los ocho individuos restantes se empleó como solvente aceite de parafina, por lo que se denominaron “grupo P”. La denominación establecida para ambos grupos de individuos se ha empleado a lo largo del desarrollo del presente apartado.

Tabla III.2. Características de los ejemplares empleados en el análisis de la variación de respuestas entre sexos e individuos en *C. welensii*. H=hembras; M=macho; Pa=aceite de parafina; He=hexano; Long.=longitud (cm); L-Ant.= longitud de antena (cm); Peso= peso en el momento del estudio electroantenográfico (gramos).

Ejemplar	Sexo	Solvente	Captura	Fecha EAG	Muerte	Long.	L-Ant.	Ancho	Peso
Cw18	H	Pa	27-may-03	15-jun-03	22-jul-03
Cw23	H	Pa	06-jun-03	18-jun-03	03-jul-03
Cw6h	H	Pa	31-ene-03	14-jun-03	22-jul-03	.	.	.	4
Cw37	H	Pa	01-jul-03	03-jul-03	09-jul-03
Cw19	M	Pa	16-jun-03	23-jun-03	02-jul-03
Cw34	M	Pa	16-jun-03	25-jun-03	02-jul-03
Cw7m	M	Pa	31-ene-03	17-jun-03	01-jul-03	.	.	.	3,02
Cw36	M	Pa	01-jul-03	02-jul-03	09-jul-03
Cw3h	H	He	01-jun-04	02-jun-04	30-jun-04	.	.	.	3,68
Cw7h	H	He	01-jun-04	04-jun-04	12-jul-04	.	.	.	3,17
Cw5h	H	He	01-jun-04	08-jun-04	14-jul-04	.	.	.	3,2
Cw9	H	He	01-jun-04	07-jun-04	21-jul-04	5	3,69	0,93	3,97
Cw8	H	He	01-jun-04	03-jun-04	22-jul-04	4,81	3,43	0,95	3,73
Cw1	H	He	01-jun-04	09-jun-04	22-jun-04	.	.	.	2,57
Cw2h	H	He	01-jun-04	09-jun-04	22-jun-04	4,82	3,57	0,89	2,7
Cw6hbis	H	He	01-jun-04	09-jun-04	25-jun-04	.	.	.	2,42
Cw22	H	He	14-jul-04	17-jul-04	31-jul-04	5,06	3,72	0,97	2,98
Cw21	H	He	14-jul-04	16-jul-04	31-jul-04	4,5	3,24	0,81	2,5
Cw3m	M	He	01-jun-04	03-jun-04	15-jun-04	.	.	.	2,21
Cw4	M	He	01-jun-04	08-jun-04	19-jun-04	.	.	.	2,53
Cw5m	M	He	01-jun-04	05-jun-04	19-jun-04	.	.	.	2,12
Cw6m	M	He	01-jun-04	07-jun-04	06-jul-04	.	.	.	2,51
Cw2m	M	He	01-jun-04	04-jun-04	21-jul-04	.	.	.	2,55
Cw10m	M	He	08-jun-04	14-jul-04	21-jul-04	4,48	7,28	0,84	2,12
Cw41	M	He	14-jul-04	16-jul-04	22-jul-04	4,07	5,27	0,77	2,21
Cw43	M	He	14-jul-04	18-jul-04	22-jul-04	4,91	7,37	1,25	2,9
Cw42	M	He	14-jul-04	18-jul-04	26-jul-04	4,54	6,92	0,86	3,03

***Prinobius germari* Dejean**

La totalidad de los 32 ejemplares que se analizaron fueron capturados en campo durante el período de vuelo, en el término municipal de Almonte (Huelva). Al igual que se estableció para *C. welensii*, en esta ocasión se clasificó el conjunto de individuos en dos grupos, en función del compuesto empleado como solvente en la disolución estimulante. El “grupo H” (hexano como solvente) contó con 19 individuos, mientras que el “grupo P” (el solvente utilizado fue aceite de parafina) lo integraban 13 ejemplares. El inconveniente que se presentó en el estudio de esta especie fue la dificultad de capturar hembras, de manera que sólo se estudiaron dos ejemplares en el grupo H y ninguno en el grupo P.

Tabla III.3. Características de los ejemplares empleados en el análisis de la variación de respuestas entre sexos e individuos en *P. germari*. H=hembras; M=macho; Pa=aceite de parafina; He=hexano; Long.=longitud (cm); L-Ant.= longitud de antena (cm); Peso= peso en el momento del estudio electroantenográfico (gramos).

Ejemplar	Sexo	Solvente	Captura	Fecha-EAG	Muerte	Long.	L-Ant.	Ancho	Peso
Pg40	M	Pa	14-jul-03	23-jul-03	30-jul-03
Pg42	M	Pa	14-jul-03	28-jul-03	01-ago-03	.	.	.	0,45
Pg48	M	Pa	24-jul-03	30-jul-03	08-ago-03	.	.	.	0,77
Pg51	M	Pa	24-jul-03	31-jul-03	05-ago-03	.	.	.	0,6
Pg53	M	Pa	24-jul-03	01-ago-03	08-ago-03	.	.	.	1,67
Pg50	M	Pa	24-jul-03	04-ago-03	06-ago-03	.	.	.	0,71
Pg58	M	Pa	24-jul-03	05-ago-03	06-ago-03	.	.	.	0,72
Pg63	M	Pa	04-ago-03	09-ago-03	11-ago-03	.	.	.	1,43
Pg62	M	Pa	04-ago-03	07-ago-03	16-ago-03	.	.	.	2,05
Pg65	M	Pa	04-ago-03	10-ago-03	12-ago-03	.	.	.	0,63
Pg64	M	Pa	04-ago-03	08-ago-03	09-ago-03	.	.	.	0,77
Pg52	M	Pa	24-jul-03	10-ago-03	11-ago-03	.	.	.	0,73
Pg69	M	Pa	10-ago-03	11-ago-03	11-ago-03	.	.	.	0,69
Pg11	M	He	14-jul-04	22-jul-04	09-ago-04	3,72	3,05	0,97	1,45
Pg12	M	He	14-jul-04	21-jul-04	05-ago-04	4,22	3,3	1,2	1,69
Pg16	M	He	14-jul-04	20-jul-04	08-ago-04	3,58	2,71	0,95	1,34
Pg26	M	He	26-jul-04	30-jul-04	07-ago-04	.	.	.	0,89
Pg27	M	He	26-jul-04	29-jul-04	07-ago-04	3,79	3,1	0,85	1,04
Pg50bis	M	He	11-ago-04	13-ago-04	17-ago-04	3,93	3,15	1,02	0,95
Pg42bis	M	He	05-ago-04	07-ago-04	17-ago-04	.	.	.	1,92
Pg51bis	M	He	11-ago-04	13-ago-04	22-ago-04	3,22	2,68	0,77	0,94
Pg54	M	He	11-ago-04	13-ago-04	24-ago-04	4,22	3,2	1,02	1,3
Pg55	M	He	11-ago-04	13-ago-04	14-ago-04	3,62	2,99	0,94	0,83
Pg59	M	He	13-ago-04	14-ago-04	17-ago-04	4,09	3,18	1	1,02
Pg45	M	He	05-ago-04	08-ago-04	16-ago-04	3,67	2,56	0,9	1,02
Pg53bis	M	He	11-ago-04	12-ago-04	27-ago-04	4,04	3,11	1,01	1,6
Pg43	M	He	05-ago-04	07-ago-04	10-ago-04	3,47	2,84	0,89	0,69
Pg8	M	He	14-jul-04	21-jul-04	31-jul-04	.	.	.	1,46
Pg4h	H	He	26-jul-04	27-jul-04	28-jul-04	2,9	2,1	0,64	0,45
Pg2h	H	He	14-jul-04	19-jul-04	21-jul-04	3,88	3,03	0,87	1,25
Pg60	M	He	13-ago-04	14-ago-04	17-ago-04	3,57	2,96	0,91	0,76
Pg4m	M	He	14-jul-04	23-jul-04	05-ago-04	.	.	.	1,45

III.2.2.2. Metodología experimental

La disolución estimulante empleada consistió en 20 microlitros del compuesto estándar al 50% (v/v) en cada uno de los dos solventes citados; dicha mezcla se denominará en adelante *estímulo estándar*. En *C. welensii* el estándar fue el (E)-2-hexenal, mientras que en *P. germari* el estándar fue la esencia de trementina.

La inyección control empleada (variable denominada $V_{control}$) consistió en una pipeta Pasteur cargada con 20 microlitros del compuesto usado como solvente en cada caso; como contraste de la respuesta frente a esta inyección control se registró la respuesta frente a una inyección en blanco (variable denominada V_{seco}), consistente en una pipeta Pasteur provista de papel Whatman sin impregnar con ninguna sustancia. En todos los casos la aplicación del estímulo se efectuó manualmente inyectando sobre el caudal principal a través de la pipeta un volumen de aire de 10 mililitros, mediante una jeringa de plástico. Tras la aplicación de la mezcla en el papel de filtro, se dejó evaporar el solvente durante un tiempo aproximado de 5 minutos.

Por lo general, para cada insecto se consideraron las respuestas netas medias (variable EAG_n), obtenidas a partir de una serie de tres estimulaciones a frecuencias de 15 segundos ó 1 minuto, tras restarles la respuesta provocada por la inyección control. En los análisis sobre la variabilidad de respuestas por sexos, tipo de solvente e individuos se aumentó el tamaño de las series, hasta obtener un conjunto de 7 a 9 estimulaciones. En este caso, para los insectos del grupo *P* las estimulaciones se efectuaron por tríos espaciados una hora (tres tandas) y precedidos por una inyección control; la frecuencia en cada trío fue de 15 segundos. Cada ejemplar del grupo *H* fue estimulado, en cambio, en una sola tanda, en la cual se aplicaron todas las estimulaciones a frecuencias de 1 minuto; cada serie se inició con la inyección control.

III.2.2.3. Análisis estadístico

Secuencia del análisis

La secuencia seguida para el análisis de los datos fue la siguiente:

- 1- Análisis de los efectos de las variables Tipo de solvente, Sexo y $V_{control}$ sobre la respuesta “bruta” frente al estímulo estándar. Como variables descriptivas de la respuesta de EAG se consideró la respuesta bruta media para la serie de siete a nueve estimulaciones (transformada según la raíz cuadrada en *C. welensii* → “ $Rai_{EAGbruta}$ ”; y según la función logaritmo decimal en *P. germari* → “ $Log_{EAGbruta}$ ”), junto con la *desviación típica*. Como se desconocía el comportamiento inicial de cada ejemplar para las pruebas de EAG, se introdujo el parámetro “respuesta a la inyección control” (variable $V_{control}$, que en el caso de *C. welensii* se transformó mediante la función logaritmo decimal → Rai_{vcon}) como covariable en el procedimiento de contraste empleado (Modelo Lineal General); de este modo se intentó subsanar la hipotética falta de homogeneidad en la aptitud de los individuos, ajustando las respuestas observadas mediante dicha variable auxiliar (García 1998). Para *C. welensii* se emplearon ocho ejemplares pertenecientes a cada grupo, habiendo igual número de machos que de hembras. El modelo experimental

seguido corresponde a un diseño factorial con dos factores y una covariable, que responde al siguiente esquema:

Tabla III.4. Diseño experimental para el estudio del efecto sobre la respuesta de EAG de *C. welensii* del sexo, tipo de solvente y respuesta al control. Entre paréntesis figura el número de ejemplares empleado.

Sexo	Solvente	Covariable
Hembras (8)	Parafina (4)	Vcontrol (4)
	Hexano (4)	Vcontrol (4)
Machos (8)	Parafina (4)	Vcontrol (4)
	Hexano (4)	Vcontrol (4)

En *P. germari* se analizaron 18 ejemplares: 10 para el grupo *P* y ocho para el grupo *H* (de los cuales dos eran hembras). El modelo experimental seguido corresponde a un diseño factorial desequilibrado, con dos factores y una covariable; su esquema es el siguiente:

Tabla III.5. Diseño experimental para el estudio del efecto sobre la respuesta de EAG de *P. germari* del sexo, tipo de solvente y respuesta al control. Entre paréntesis figura el número de ejemplares empleado.

Sexo	Solvente	Covariable
Hembras (2)	Hexano (2)	vcontrol (2)
Machos (16)	Parafina (10)	vcontrol (10)
	Hexano (6)	vcontrol (6)

- 2- Comparación entre la respuesta al control y la respuesta a la inyección en blanco; y relación entre la respuesta al control y la respuesta “bruta” media frente al estímulo estándar. En *C. welensii* se emplearon 27 ejemplares pertenecientes a los dos grupos; para la comparación $V_{control} <> V_{seco}$ se emplearon 19 insectos, todos pertenecientes al grupo *H*. En *P. germari* se emplearon 32 ejemplares pertenecientes a los dos grupos, todos ellos capturados en época de vuelo.
- 3- Estudio de la diferencia de respuestas entre individuos, y los parámetros que la condicionan. Para analizar la variabilidad entre individuos se emplearon las respuestas netas para series de siete a nueve estimulaciones por insecto (variable EAG_{neta} ; empleándose ocho ejemplares del grupo *P* y ocho del grupo *H* para *C. welensii*; y diez ejemplares del grupo *P* y ocho del grupo *H* para *P. germari*). El estudio de los parámetros influyentes sobre tal variabilidad se realizó considerando las respuestas netas medias por insecto a partir de tres estimulaciones (EAG_n ; en los ejemplares para los cuales se disponía de series de siete a nueve inyecciones, se escogieron siempre las tres primeras), y su transformada mediante la función raíz cuadrado (Rai_{EAG_n}); además, se midieron algunos parámetros que podrían explicar tal variabilidad. Estos parámetros se pueden caracterizar del modo siguiente:

- Parámetros relacionados, a priori, con las condiciones experimentales: temperatura del laboratorio al inicio de la sesión de EAG (*Temp*); diámetro en punta fina del capilar del electrodo de referencia, transformada por la función logaritmo decimal en *P. germari* (*Capi* → *Lg_capi*); y amplitud de la línea base de la respuesta de EAG, transformada por la función logaritmo decimal en *C. welensii* (*Li_bas* → "*Lg_lib*"). La última variable se incluyó al considerar que dicha amplitud puede reflejar en qué medida la preparación del insecto para el estudio de EAG resultó adecuada.
- Parámetros anatómicos del insecto: longitud medida entre las mandíbulas y el ápice elitral (*Longit*); longitud total de la antena derecha (transformada por la función logaritmo decimal en *C. welensii*: *Lg_ant*, y por la función exponencial cuadrática en *P. germari*: *C_ant*) y ancho del pronoto en la zona próxima al mesonoto (*Ancho*).
- Parámetros que buscan la aproximación al estado fisiológico del insecto en el momento del estudio de EAG: peso en el momento de EAG (*Peso*); días de supervivencia tras la captura, transformada por la función logaritmo decimal (*Lg_scap*); días de supervivencia tras la prueba de EAG, transformada por la función logaritmo decimal (*Lg_seag*); días de retraso en el estudio de EAG tras la captura del insecto, transformada por la función logaritmo decimal (*Lg_ret*); relación peso/longitud (*Lon_P*) y relación peso/ancho pronoto (*An_P*).

A partir de la matriz de correlaciones entre todas las variables presentadas en el punto 3 se escogieron aquellas cuya correlación con la respuesta (*Rai_EAGn*) resultó significativa, y se analizó la capacidad de cada una para clasificar los individuos en grupos homogéneos, entre los que se pudieran encontrar diferencias de respuesta significativas. Posteriormente se realizó un Análisis de Regresión Múltiple, tanto a partir de estas variables como del total de las 12 presentadas anteriormente, analizando después igualmente la posibilidad de efectuar agrupamientos de individuos a partir de combinaciones de variables pertenecientes a modelos de regresión significativos. Este análisis se efectuó a partir de 21 a 27 ejemplares para *C. welensii* y 30 a 32 para *P. germari*, siempre que no existieran datos perdidos para algunas de las variables.

Las combinaciones para el análisis de agrupamientos se establecieron a partir de las variables que presentaban bondad aparente para el agrupamiento de datos, según la prueba ANOVA del procedimiento Análisis de Conglomerados de K-medias. Las combinaciones analizadas fueron, a grandes rasgos, las siguientes: 1) las variables del modelo de regresión consideradas conjuntamente; 2) combinadas según su naturaleza (experimentales, fisiológicas o anatómicas) y buscando el menor número capaz de originar agrupamientos significativamente distintos. En cada caso se analizó un número de conglomerados de entre dos y cuatro, escogiéndose el agrupamiento final según la orientación dada por los procedimientos de conglomeración empleados y evitando en lo posible la formación de grupos con menos de tres integrantes.

Métodos estadísticos

La identificación de datos aberrantes para las distintas series de datos se efectuó a partir del método de Grubbs, tomando como valor crítico el tabulado para la serie determinada por el parámetro $(d'_{\text{máx}})_{1-\alpha/2}$ y el nivel de significación $\alpha=0,05$.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete SPSS 11.5[©] para una significación del 5%. Debido a que se disponía en la mayoría de casos de muestras pequeñas, la normalidad se analizó a partir de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors, y Shapiro-Wilk, considerándose cumplido tal requisito únicamente cuando ambas pruebas aceptaban la hipótesis nula. En las variables para las cuales se disponía de más de 30 datos, la normalidad se estimó también mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov sin corregir su significación. La homocedasticidad se comprobó mediante la prueba de Levene. La prueba de Rachas se utilizó para analizar la aleatoriedad de los datos.

En caso de asumirse los requisitos de normalidad y homocedasticidad, los contrastes de hipótesis entre medias se efectuaron por medio de los procedimientos ANOVA de un factor, ANCOVA de dos factores y una covariable (mediante el procedimiento Modelo Lineal General Univariante), y prueba “t” de Student. Las pruebas de Kruskal-Wallis, Mann Whitney o Wilcoxon se emplearon cuando dichos requisitos se incumplían.

Para analizar el posible efecto de algunos parámetros sobre la variabilidad de respuestas entre individuos se empleó el procedimiento Análisis de Regresión Lineal, tanto Simple como Múltiple. En nuestro caso el objetivo considerado fue descriptivo y no predictivo, de modo que a la hora de elegir el modelo más adecuado se buscó, dentro de los márgenes de significatividad del mismo, ganar en capacidad y claridad decriptiva aún asumiendo ciertos riesgos (como, por ejemplo, la disminución del valor R^2 al buscar el modelo que incluyera el menor número de variables).

La detección de valores atípicos en el planteamiento de modelos de regresión se efectuó calculando la Distancia de Mahalanobis, y comparando el valor hallado con el tabulado para la distribución $\chi^2_{0,05,v}$ (donde v es el número de grados de libertad, en este caso igual al número de variables independientes del modelo). La estimación de la influencia de las observaciones sobre el modelo se realizó calculando el Valor de Influencia Centrado, considerando como referencia el valor dado por la expresión siguiente: $2 * (K+1)/N$ (donde K = número de variables independientes y N = tamaño muestral de cálculo).

Los análisis posteriores al establecimiento del modelo de regresión se efectuaron mediante algunas de las pruebas de contraste de hipótesis sobre las medias ya descritas, y con la ayuda de los procedimientos de análisis de conglomerados. La bondad de las variables consideradas como medio de agrupamiento de los datos se analizó con ayuda del estadístico “F”, proporcionado por la tabla ANOVA del procedimiento Análisis de Conglomerados de K-medias. Dicho estadístico se aplicó a las variables analizadas una vez estandarizadas respecto al valor medio de la serie (en caso de ser más de una las variables analizadas conjuntamente). El establecimiento de los conglomerados definitivos se llevó a cabo comparando las soluciones arrojadas por los métodos jerárquicos de Ward y Centroides (estimando la similitud mediante la distancia euclídea al cuadrado), y el no jerárquico Análisis de Conglomerados de K-medias.

III.3. Resultados

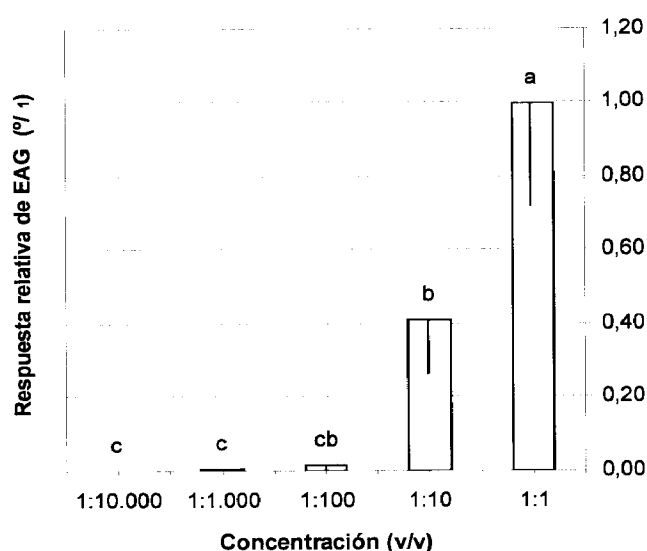
III.3.1. Efecto sobre la respuesta de EAG de la concentración y cantidad de estímulo aplicado, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación

III.3.1.1. Análisis de la relación dosis-respuesta

Aplicación a *C. welensii*

La figura III.1 muestra la evolución de las respuestas netas relativas medias de EAG para las distintas disoluciones del estímulo estándar.

Figura III.1. Respuestas netas de EAG de *C. welensii* para distintas concentraciones de la mezcla estimulante (20 μ l de (*E*)-2-hexenal en hexano). La línea vertical en el extremo de la barra muestra la magnitud del intervalo de confianza al 95%. Letras distintas indican diferencias significativas.

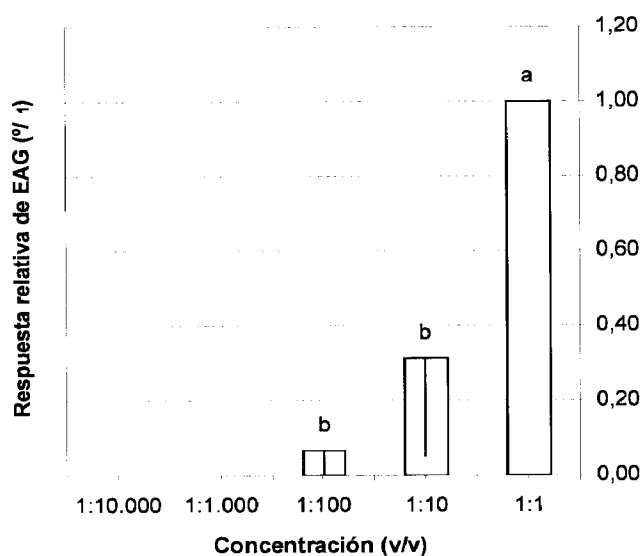


Se aprecia una fuerte dependencia dosis-respuesta. A las dosis de 1:10.000, 1:1.000 y 1:100, las respuestas son muy bajas. El aumento de la respuesta entre la dosis 1:100 y 1:1 se produjo sin que se mostrara saturación de la antena. La respuesta frente a la dosis 1:1 fue significativamente mayor que el resto (prueba "t": $\mu=1$; $p<0,01$; $n=4$); en cambio, las respuestas provocadas por las concentraciones 1:10 y 1:100 no se pueden considerar significativamente distintas, si bien el valor de probabilidad es muy bajo (ANOVA seguido de Games-Howell: $p=0,051$; $n_{1:10}=n_{1:100}=4$), y tampoco resultan distinguibles las respuestas provocadas por las tres concentraciones menores (Wilcoxon: $p>0,05$; $n=4$ en cada caso).

Aplicación a *P. germari*

También para esta especie se encuentra una fuerte dependencia dosis-respuesta. En este caso no se produjo respuesta medible a las concentraciones 1:10.000 y 1:1.000, tampoco se encontró saturación de la antena entre las dosis 1:100 y 1:1. La respuesta relativa frente a esta concentración superó significativamente a la obtenida para las demás (prueba “t”: $\mu=1$; $p<0,01$; $n=5$); pero las respuestas provocadas por las concentraciones 1:10 y 1:100 no fueron significativamente distintas (Wilcoxon: $p=0,068$; $n_{1:10}=n_{1:100}=5$).

Figura III.2. Respuestas netas de EAG de *P. germari* para distintas concentraciones de la mezcla estimulante (20 μ l de trementina en hexano). La línea vertical en el extremo de cada barra muestra la magnitud del intervalo de confianza al 95%. Letras distintas indican diferencias significativas.



III.3.1.2. Efecto de la cantidad de estímulo aplicado

Aplicación a *C. welensii*

La tabla III.6 y la figura III.3 reflejan las respuestas netas relativas medias correspondientes a cada una de las cantidades de disolución aplicadas.

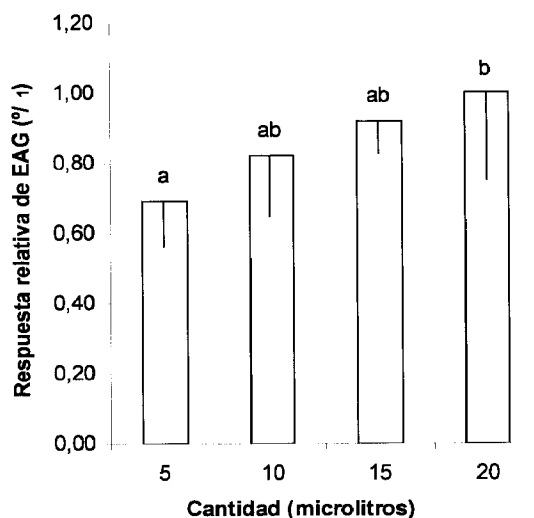
Tabla III.6 Estadísticos descriptivos de la respuesta neta de *C. welensii* frente a distintas cantidades de la mezcla estimulante [(E)-2-hexenal 50% v/v en aceite de parafina o hexano].

Cantidad (microlitros)	N	Media (%/1)	Desv.típ. (%/1)	Mínimo	Máximo
5	6	0,69*	0,16	0,49	0,94
10	6	0,82	0,22	0,45	1,1
15	5	0,92	0,11	0,76	1,07
20	6	1,00	0,00	1,00	1,00

(*). Diferencia significativa respecto a la respuesta obtenida con 20 microlitros, al nivel 0,05.

La intensidad media de las respuestas aumentó con el aumento de la cantidad de disolución empleada, pero el incremento sólo resultó significativo entre las respuestas para 5 y 20 microlitros (prueba “t”: $\mu=1$; $p < 0,05$; $n_5=6$).

Figura III.3. Variación de la respuesta neta de *C. welensii* frente a (*E*)-2-hexenal (50% v/v en aceite de parafina o hexano) aplicado en distintas cantidades. La línea vertical muestra la magnitud del intervalo de confianza al 95%. Letras distintas indican diferencias significativas al nivel 0,05.



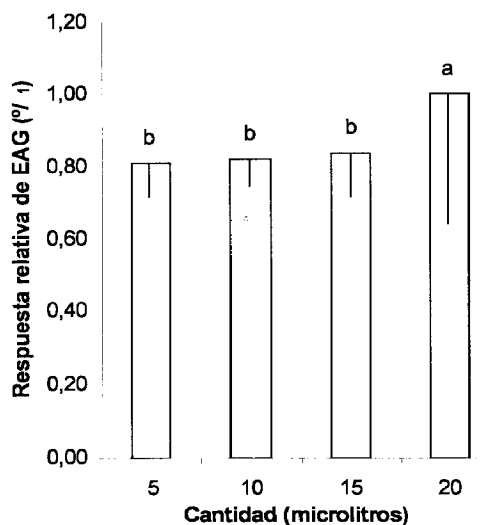
Aplicación a *P. germari*

La tabla III.7 y la figura III.4 reflejan las respuestas netas relativas medias correspondientes a cada una de las cantidades de disolución de estímulo aplicadas.

Tabla III.7. Estadísticos descriptivos de la respuesta neta de *P. germari* frente a distintas cantidades de la mezcla estimulante trementina 50% v/v en aceite de parafina.

Cantidad (microlitros)	N	Media (%)	Desv.tip. (%)	Mínimo	Máximo
5	9	0,81	0,15	0,55	0,97
10	9	0,82	0,11	0,64	0,94
15	9	0,83	0,18	0,55	1,08
20	9	1,00	0,00	1,00	1,00

Figura III.4. Variación de la respuesta neta de *P. germari* frente a trementina (50% v/v en aceite de parafina) aplicado en distintas cantidades. La línea vertical muestra la magnitud del intervalo de confianza al 95%. Letras distintas indican diferencias significativas al nivel 0,05.



La intensidad media de las respuestas aumentó con el aumento de la cantidad de disolución empleada. Este incremento fue bajo y no significativo para las cantidades de 5, 10 y 15 microlitros, pero la media para 20 microlitros sí resultó significativamente mayor que las demás (prueba “t” para $\mu=1$: $p<0,03$; $n=9$).

III.3.1.3. Efecto de la frecuencia de estimulación

Aplicación a *C. welensii*

La tabla III.8 recoge los valores medios de las respuestas relativas correspondientes a cada estimulación y frecuencia. La evolución de estas respuestas se ilustra en la figura III.5.

Tabla III.8. Respuestas netas relativas medias respecto a la primera estimulación, obtenidas a distintas frecuencias en *C. welensii* frente al compuesto estándar.

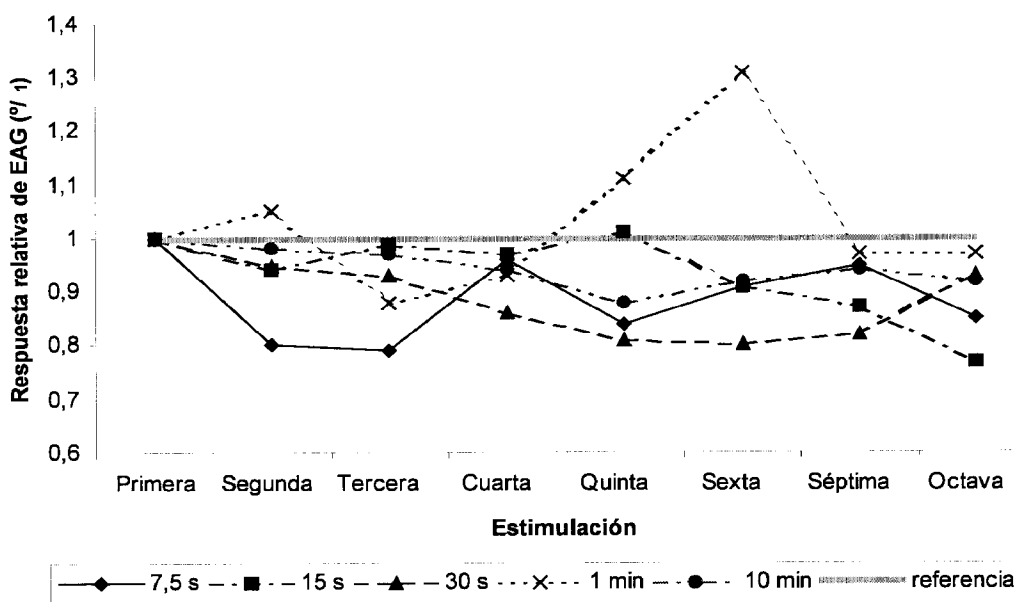
Frecuencia	Estimulación	N	Media (%/1)	Desv.típ. (%/1)	Frecuencia	Estimulación	N	Media (%/1)	Desv.típ. (%/1)
7,5 s	Primera	5	1,00	0,00	1 min	Primera	7	1,00	0,00
	Segunda	5	0,80*	0,12		Segunda	7	1,05	0,36
	Tercera	5	0,79*	0,16		Tercera	7	0,88	0,29
	Cuarta	4	0,96	0,06		Cuarta	6	0,93	0,26
	Quinta	4	0,84*	0,07		Quinta	7	1,11	0,28
	Sexta	4	0,91*	0,02		Sexta	7	1,31	0,36
	Séptima	4	0,95	0,08		Séptima	6	0,97	0,37
	Octava	4	0,85*	0,07		Octava	7	1,03	0,31
15 s	Primera	5	1,00	0,00	10 min	Primera	12	1,00	0,00
	Segunda	5	0,94	0,10		Segunda	12	0,98	0,33
	Tercera	5	0,99	0,21		Tercera	12	0,97	0,25
	Cuarta	5	0,97	0,09		Cuarta	12	0,94	0,24
	Quinta	4	1,01	0,22		Quinta	12	0,88	0,29
	Sexta	3	0,91	0,09		Sexta	12	0,92	0,25
	Séptima	3	0,87	0,12		Séptima	12	0,94	0,33
	Octava	2	0,77	0,05		Octava	10	0,92	0,28
30 s	Primera	5	1,00	0,00					
	Segunda	5	0,95	0,13					
	Tercera	5	0,93	0,08					
	Cuarta	5	0,86	0,14					
	Quinta	5	0,81	0,16					
	Sexta	5	0,80*	0,12					
	Séptima	4	0,82	0,22					
	Octava	2	0,93	0,03					

(*). Indica diferencia significativa respecto a la primera estimulación, al nivel 0,05.

Para la frecuencia de 7,5 segundos la intensidad media de la respuesta se reduce en la segunda estimulación y para todas las restantes; todas las diferencias son significativas, salvo las encontradas para las estimulaciones cuarta y séptima. Para 15 segundos, las variaciones no son significativas en ningún caso; se aprecia, incluso, una estimulación –la quinta– en la cual la media supera ligeramente a la primera. La reducción de la intensidad de la respuesta con espaciamientos de 30 segundos sigue el mismo patrón que para la frecuencia de 7,5 segundos, pero sólo hay, en esta ocasión, un caso en el cual la reducción es significativa (la sexta estimulación).

Empleando frecuencias de estimulación de 1 y 10 minutos no se ha encontrado ninguna diferencia significativa frente a la primera estimulación ($p > 0,05$). Para espaciamientos de un minuto se encontraron cuatro casos –segunda, quinta, sexta y octava estimulaciones– en los que la respuesta relativa superó a la primera, mientras que empleando frecuencias de 10 minutos se encontraron respuestas relativas que fueron siempre inferiores a la primera estimulación.

Figura III.5. Variación de la respuesta relativa de *C. welensii* frente a estimulaciones sucesivas a distintas frecuencias.



Los estadísticos descriptivos de la tabla III.9 reflejan las diferencias de respuesta entre la primera estimulación y las siguientes. Las diferencias medias más bajas se obtuvieron para la frecuencia de un minuto, pero en cambio las desviaciones fueron las mayores; en las frecuencias de 7,5 y 30 segundos se produjeron las mayores diferencias medias. Para la frecuencia de 10 minutos se encontraron diferencias de tipo medio y desviaciones bajas; en la frecuencia de 15 segundos se produjo un comportamiento similar, pero la desviación fue algo mayor. La máxima diferencia, para las respuestas que superaron a la primera estimulación, se encontró en la sexta aplicación de la frecuencia de un minuto; entre las respuestas inferiores a la primera inyección, la diferencia máxima correspondió a la octava aplicación de la frecuencia de 15 segundos.

Tabla III.9. Estadísticos descriptivos sobre las diferencias de respuesta entre la primera estimulación y las siguientes, a distintas frecuencias, para *C. welensii*.

Frecuencia	N	Media (%/1)	Desv. típ. (%/1)	Mínimo	Máximo
7,5 s	8	0,11	0,08	0,00	0,21
15 s	8	0,07	0,08	-0,01	0,23
30 s	8	0,11	0,07	0,00	0,20
1 min	8	-0,03	0,13	-0,31	0,12
10 min	8	0,06	0,04	0,00	0,12

Aplicación a *P. germari*

La descripción de las respuestas relativas medias para cada frecuencia y estimulación se muestra en la tabla III.10 y se ilustra en la figura III.6.

Tabla III.10. Respuestas netas relativas medias respecto a la primera estimulación, obtenidas a distintas frecuencias en *P. germari* frente al compuesto estándar.

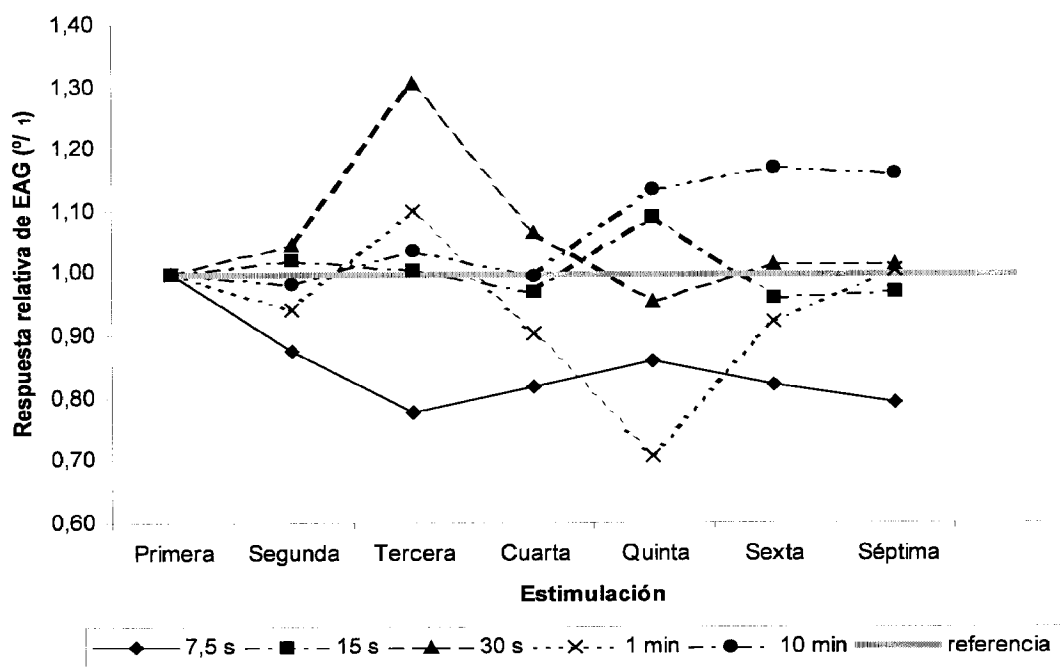
Frecuencia	Estimulación	N	Media (%)	Desv.típ. (%)	Frecuencia	Estimulación	N	Media (%)	Desv.típ. (%)
7,5 s	Primera	7	1	0	1 min	Primera	6	1,00	0,00
	Segunda	7	0,88	0,30		Segunda	6	0,94	0,31
	Tercera	7	0,78 *	0,12		Tercera	6	1,10	0,35
	Cuarta	7	0,82	0,26		Cuarta	6	0,91	0,25
	Quinta	7	0,86	0,22		Quinta	5	0,71	0,25
	Sexta	6	0,82	0,22		Sexta	5	0,92	0,38
	Séptima	6	0,79	0,32		Séptima	6	1,00	0,33
15 s	Primera	7	1,00	0,00	10 min	Primera	7	1,00	0,00
	Segunda	7	1,02	0,23		Segunda	7	0,98	0,22
	Tercera	6	1,00	0,16		Tercera	7	1,04	0,15
	Cuarta	7	0,97	0,23		Cuarta	7	0,99	0,27
	Quinta	7	1,09	0,30		Quinta	7	1,13	0,17
	Sexta	7	0,96	0,26		Sexta	7	1,17	0,27
	Séptima	7	0,97	0,10		Séptima	6	1,16	0,32
30 s	Primera	7	1,00	0,00					
	Segunda	7	1,05	0,29					
	Tercera	7	1,30	0,57					
	Cuarta	7	1,06	0,28					
	Quinta	7	0,96	0,20					
	Sexta	7	1,01	0,15					
	Séptima	7	1,01	0,17					

(*). Indica diferencia significativa respecto a la primera estimulación, al nivel 0,05.

La intensidad media de la respuesta se reduce para la frecuencia de 7,5 segundos en todas las estimulaciones a partir de la segunda, pero sólo significativamente en la tercera ($p=0,003$; $n=6$). Para 15 segundos, en la mitad de los casos la respuesta neta normalizada media superó el valor de la primera estimulación, aunque para esta frecuencia ninguna de las diferencias fue significativa al nivel 5%. Las diferencias encontradas empleando frecuencias de 30 segundos tampoco fueron significativas, siendo los valores hallados mayores al de la primera estimulación en general, salvo en un caso (quinta estimulación).

El empleo de frecuencias de estimulación de 1 y 10 minutos no deparó ninguna diferencia significativa frente a la primera estimulación. Para espaciamentos de un minuto abundaron más los casos en que la respuesta neta relativa media fue inferior a la primera estimulación, mientras que con frecuencias de 10 minutos sólo se encontraron dos casos con valores inferiores a la primera estimulación (segunda y cuarta estimulaciones)

Figura III.6. Variación de la respuesta relativa de *P. gemari* frente a estimulaciones sucesivas a distintas frecuencias.



En la tabla III.11 se muestra el comportamiento de las diferencias entre cada estimulación y la primera. La frecuencia de 15 segundos proporcionó las menores diferencias, tanto en valores medios como respecto a las desviaciones; las mayores diferencias se hallaron en la frecuencia de 7,5 segundos. El resto de frecuencias arrojaron diferencias de tipo medio y desviaciones mayores que las dos frecuencias anteriores; la mayor desviación se halló en la frecuencia de un minuto. Entre las estimulaciones cuya respuesta superó el valor encontrado en la primera aplicación, el mayor valor (30% superior) se encontró en la tercera inyección de la frecuencia de 30 segundos; para las estimulaciones de respuesta inferior a la primera, el mayor valor (29% menor) se encontró en la quinta inyección de la frecuencia de un minuto.

Tabla III.11. Estadísticos descriptivos sobre las diferencias de respuesta entre la primera estimulación y las siguientes, a distintas frecuencias, para *P. gemari*.

Frecuencia	N	Media (%)	Desv. típ. (%)	Mínimo	Máximo
7,5 s	7	0,15	0,07	0,00	0,22
15 s	7	0,00	0,04	-0,09	0,04
30 s	7	-0,06	0,11	-0,30	0,04
1 min	7	0,06	0,12	-0,10	0,29
10 min	7	-0,07	0,08	-0,17	0,02

III.3.1.4. Efecto de la duración de la preparación

Aplicación a *C. welensii*

El comportamiento de las preparaciones durante el período de tiempo considerado se resume en la tabla III.12.

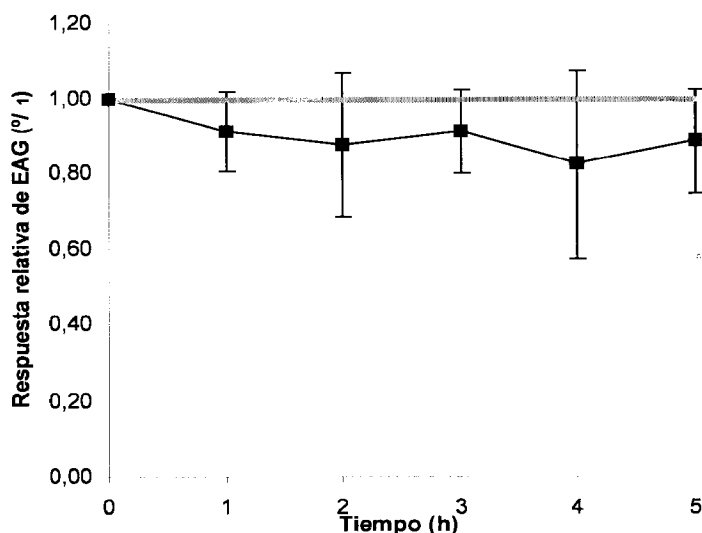
Tabla III.12. Estadísticos descriptivos del comportamiento de la respuesta relativa de *C. welensii* frente a (*E*)-2-hexenal en aceite de parafina (50% v/v) durante ocho horas.

Tiempo (h)	N	Media (%)	Desv. típica (%)	Mínimo	Máximo
0	8	1,00	0,00	1,00	1,00
1	8	0,91	0,11	0,74	1,10
2	8	0,88	0,19	0,48	1,07
3	7	0,91	0,11	0,76	1,07
4	6	0,82	0,25	0,45	1,07
5	6	0,89	0,14	0,71	1,05
6*	1	0,55	0,16	0,42	0,73
7*	1	0,71	0,28	0,55	1,03
8*	1	0,93	0,15	0,79	1,09

(*). Estadísticos correspondientes a tres estimulaciones por hora.

Se aprecia que las respuestas medias disminuyeron con el paso del tiempo, pero dicho efecto no se puede considerar significativo (prueba “t” para $\mu=1$: $p>0,05$; $n=6-8$). La variación de respuestas resultó fluctuante con el transcurso de las horas (figura III.7), tanto para los valores medios como para las desviaciones típicas; pero la merma de respuesta al cabo de cinco horas resultó baja (11%). Todas las preparaciones continuaron produciendo respuestas durante más de cinco horas, llegando a alcanzarse en alguna de ellas las ocho horas. El factor limitante resultó ser, en todos los casos, la desecación de la solución salina en el electrodo registrador.

Figura III.7. Variación de la respuesta relativa frente a (*E*)-2-hexenal en aceite de parafina (50% v/v) de *C. welensii* durante cinco horas (medias \pm desviación típica).



Aplicación a *P. germari*

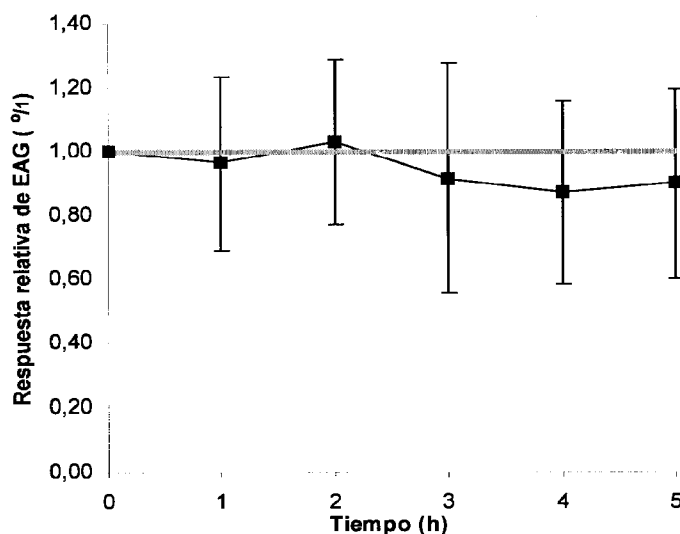
Los estadísticos descriptivos del comportamiento de las preparaciones durante el período de tiempo considerado se resumen en la tabla III.13.

Tabla III.13. Estadísticos descriptivos del comportamiento de la respuesta relativa de *P. germari* frente a la trementina en aceite de parafina (50% v/v) durante siete horas.

Tiempo (h)	N	Media (%)	Desv. típica (%)	Mínimo	Máximo
0	9	1,00	0,00	1,00	1,00
1	9	0,96	0,27	0,43	1,48
2	9	1,03	0,26	0,73	1,58
3	9	0,91	0,36	0,22	1,48
4	9	0,87	0,29	0,46	1,40
5	9	0,90	0,30	0,46	1,32
6	4	0,81	0,38	0,33	1,08
7*	1	0,90	0,07	0,81	0,97

Las respuestas tendieron a disminuir de forma general, aunque las diferencias encontradas a lo largo de la sesión no resultaron significativas (prueba “t” para $\mu=1$: $p>0,05$). En esta especie se produjo una fluctuación para los valores medios similar a la encontrada en *C. welensii*, aunque las desviaciones típicas (figura III.8) resultaron mayores. La merma de respuesta al cabo de cinco horas resultó parecida a la encontrada en *C. welensii* (10%). En cuatro de las preparaciones se registró respuesta al cabo de una hora más, no encontrándose tampoco diferencias significativas con respecto a la respuesta normalizada de la primera hora. (prueba “t” para $\mu=1$: $p=0,401$). Por último, indicar que una de las preparaciones arrojó, al cabo de siete horas, respuestas comparables a las encontradas durante las seis horas anteriores.

Figura III.8. Variación de la respuesta relativa frente a la trementina en aceite de parafina (50% v/v) de *P. germari* durante cinco horas (medias \pm desviación típica).



III.3.2. Diferencias de respuesta entre sexos e individuos ante el estímulo estándar disuelto en dos tipos de solvente

III.3.2.1. Efectos sobre la respuesta total de EAG de *C. welensii* del sexo, tipo de solvente y respuesta al control

La tabla III. 14 refleja las series de respuestas totales obtenidas por 16 insectos frente al estímulo estándar elaborado con los dos tipos de solvente, así como frente a la inyección control. Se puede apreciar que el rango de respuestas es bastante dispar, variando la media 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 $0,31$ mV frente al control. Pero el conjunto de respuestas de cada individuo resulta homogéneo. En este sentido, las desviaciones en cada serie tienden a aumentar cuanto mayor intensidad presentan las respuestas, existiendo correlación significativa ($R_{\text{Pearson}}=0,599$; $p=0,014$; $n=16$) (fig. III.9). En esta figura se aprecia que el punto más alejado de la tendencia general es el correspondiente al ejemplar Cw36; sin embargo, no se puede considerar dicho dato atípico para esta relación¹. Sí lo es, en cambio, el dato correspondiente al ejemplar CW7m, el cual, además, está influyendo demasiado sobre la tendencia mostrada para tal relación².

Tabla III.14. Respuestas brutas de *C. welensii* frente al control y al estímulo estándar, según sexo y tipo de solvente. EAGbruta= media; S= sexo; Sol= solvente; Vcontrol= respuesta frente a la inyección control; DT= desviación típica; CV= coeficiente de variación.

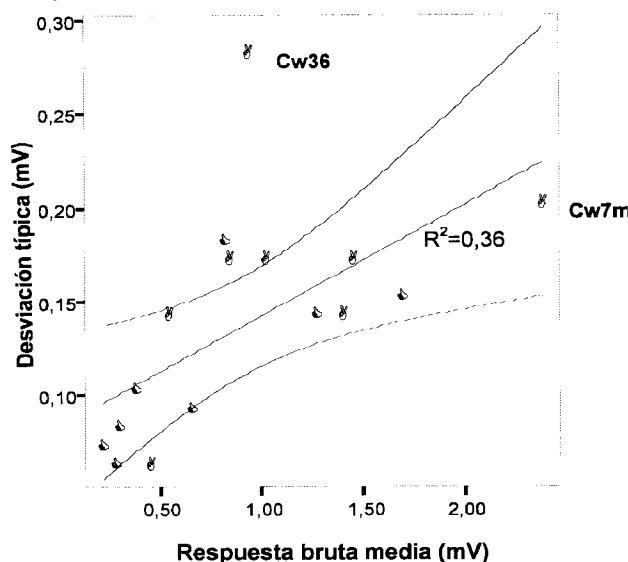
Ejemplar	S	Sol	Vcontrol (mV)	Respuesta bruta frente a (E)-2-hexenal (50% v/v) (mV)									EAGbruta (mV)	DT (mV)	CV (%)
				1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª			
Cw18	H	Pa	0,31*	1,78	1,64	1,74	1,82	1,64	1,82	1,46	1,84	1,46	1,69	0,15	8,88
Cw23	H	Pa	0,01*	0,36	0,32	0,32	0,36	0,34	0,38	0,28	0,24	0,14	0,30	0,08	26,67
Cw6h	H	Pa	0,16*	1,54	1,32	1,24	1,28	1,10	1,10	1,39	1,23	1,27	1,27	0,14	11,02
Cw37	H	Pa	0,06*	0,68	0,76	0,50	0,66	0,61	0,58	0,8	0,66	0,66	0,66	0,09	13,64
Cw19	M	Pa	0,09*	1,54	1,60	1,66	1,28	1,34	1,34	1,40	1,66	1,20	1,45	0,17	11,72
Cw34	M	Pa	0,05*	0,50	0,50	0,4	0,48	0,32	0,46	0,48	0,46	0,42	0,45	0,06	13,33
Cw7m	M	Pa	0,17*	2,62	2,32	2,32	2,36	2,52	2,16	2,30	2,70	2,08	2,38	0,20	8,40
Cw36	M	Pa	0,12*	1,18	1,18	1,18	1,10	1,00	0,80	0,52	0,56	-	0,94	0,28	29,79
Cw7 h	H	He	0,02	0,28	0,44	0,26	0,32	0,30	0,48	0,52	0,44	-	0,38	0,10	26,32
Cw5h	H	He	0	0,24	0,18	0,16	0,30	0,16	0,32	0,3	0,16	0,16	0,22	0,07	31,82
Cw9	H	He	0,08	0,72	0,76	0,64	0,64	0,94	1,18	0,74	0,76	0,96	0,82	0,18	21,95
Cw8	H	He	0,08	0,30	0,28	0,2	0,20	0,34	0,30	0,36	-	-	0,28	0,06	21,43
Cw4	M	He	0,22	1,12	1,60	1,42	1,46	1,40	1,32	1,48	1,38	-	1,40	0,14	10,00
Cw5m	M	He	0,26	0,92	0,94	1,00	0,88	1,00	1,38	1,08	0,82	1,18	1,02	0,17	16,67
Cw6m	M	He	0,12	0,76	0,50	0,54	0,67	0,62	0,58	0,34	0,46	0,38	0,54	0,14	25,93
Cw2m	M	He	0,2	0,80	1,10	0,78	0,88	0,98	1,02	0,64	0,78	0,62	0,84	0,17	20,24

(*). Indica valor medio a partir de tres respuestas.

¹ Los valores calculados para la Distancia de Mahalanobis (DM) y Valor de Influencia Centrado (VIC) son ambos muy próximos a cero, y en todo caso inferiores a los valores de referencia para el conjunto de datos (3,84 y 0,25; para DM y VIC respectivamente), por lo que no es señalado como posible dato atípico.

² Los valores presentados para los parámetros DM y VIC fueron 5,96 y 0,37 respectivamente, superiores a los valores de referencia citados anteriormente, lo cual indica que podría ser considerado un dato atípico. El resultado para el VIC indica una alta influencia de dicho dato sobre la tendencia mostrada para el conjunto de individuos.

Figura III.9. Respuestas brutas medias frente a las desviaciones típicas en machos (círculo) y hembras (triángulo) de *C. welensii*. Se incluye recta de regresión lineal con intervalo de predicción al 95%.



La tabla III.15 muestra las respuestas según el sexo y el solvente empleado. Para todos los casos se aprecian desviaciones típicas elevadas en la respuesta sin transformar, encontrándose los valores extremos para en los machos (el menor, 0,36 mV, para el grupo H; el mayor, 0,82 mV, para el grupo P). Las respuestas medias de los machos fueron similares en los dos tipos de solvente, pero las hembras del grupo P registraron valores superiores al doble de las del grupo H, lo cual sugería una posible interacción entre el sexo y el tipo de control

Tabla III.15. Respuestas medias por sexo y tipo de solvente en *C. welensii*, obtenidas a partir de las respuestas brutas medias por insecto para series de siete a nueve estimulaciones frente al compuesto estándar. M= media; DT= desviación típica.

Sexo	Solvente	N	EAGbruta	
			M (mV)	DT (mV)
Machos	Parafina	4	1,30	0,82
	Hexano	4	0,95	0,36
	Total	8	1,13	0,62
Hembras	Parafina	4	0,98	0,62
	Hexano	4	0,43	0,27
	Total	8	0,70	0,53
Total	Parafina	8	1,14	0,70
	Hexano	8	0,69	0,60
	Total	16	0,92	0,60

El contraste de medias mediante el Modelo Lineal General Univariante (tabla III.16) no encontró efecto significativo para dicha interacción ni tampoco para el sexo, pero sí para el tipo de solvente, aunque con un nivel de significación relativamente bajo ($p=0,046$). El efecto de la covariable *Rai_vcon* resultó muy significativo, lo que puede reforzar la consideración inicial sobre la aptitud desigual entre los individuos de cara a las pruebas de EAG.

Tabla III.16. Pruebas de los efectos inter-sujetos de los factores sexo y tipo de solvente, así como de la respuesta a la inyección control, sobre las respuestas brutas de *C. welensii* frente al estándar. Se consideran las respuestas brutas transformadas por la función raíz cuadrada, tanto para el estándar como para el control.

Variable dependiente: *Rai_EAGbruta*

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,070	4	0,267	8,204	0,003
Intersección	0,244	1	0,244	7,470	0,019
<i>Rai_vcon</i>	0,601	1	0,601	18,433	0,001**
<i>Sexo</i>	0,001	1	0,001	0,025	0,877
<i>Solvente</i>	0,166	1	0,166	5,081	0,046*
<i>Sexo * solvente</i>	0,059	1	0,059	1,815	0,205
Error	0,359	11	0,033		
Total	14,640	16			
Total corregida	1,429	15			

Modelo Lineal General. $R^2 = 0,749$ (R^2 corregida = 0,658).

(*). Indica efecto significativo al nivel 0,05.

(**). Indica efecto muy significativo al nivel 0,01.

Al considerar como variable dependiente la respuesta al control (*Rai_vcon*), ningún efecto resultó significativo ($p=0,068$; $p=0,845$ y $p=0,060$ para los efectos debidos a *Sexo*, *Solvente* y *Sexo*Solvente* respectivamente).

III.3.2.2. Comparación entre la respuesta al control y la respuesta a la inyección en blanco; y relación entre la respuesta al control y la respuesta “bruta” media frente al estímulo estándar para *C. welensii*

El efecto significativo del solvente sobre la respuesta de EAG aconsejó examinar con detalle esta relación. En primer lugar, la tabla III.17 muestra los estadísticos descriptivos para las inyecciones control con los dos tipos de solvente (*Vcontrol*) y la inyección en blanco (*Vseco*) para los 19 insectos del grupo H. Las tres respuestas medias fueron bajas, no resultando significativamente diferentes las provocadas por los dos solventes (prueba “t”: $p=0,384$, $n_p=8$ y $n_h=19$); en cambio, la diferencia de respuesta entre el control en blanco y el control con solvente entre los insectos del grupo H sí fue significativa (prueba “t”: $p=0,012$, $n=19$). Se aprecia también que la contribución real del compuesto solvente a la respuesta al control viene a oscilar entre el 40 y el 50% de la misma (según se trate del hexano o la parafina, respectivamente).

Tabla III.17. Estadísticos descriptivos de la respuesta de *C. welensii* frente al control y frente a la inyección en blanco.

Variable	Solvente	Grupo	N	Media (mV)	Desv. típ. (mV)	Error típico	Mínimo	Máximo
<i>Vseco</i>	-	H	19	0,06	0,08	0,02	0,00	0,34
<i>Vcontrol</i>	parafina	P	8	0,12	0,09	0,03	0,01	0,31
	hexano	H	19	0,10	0,09	0,02	0,00	0,32

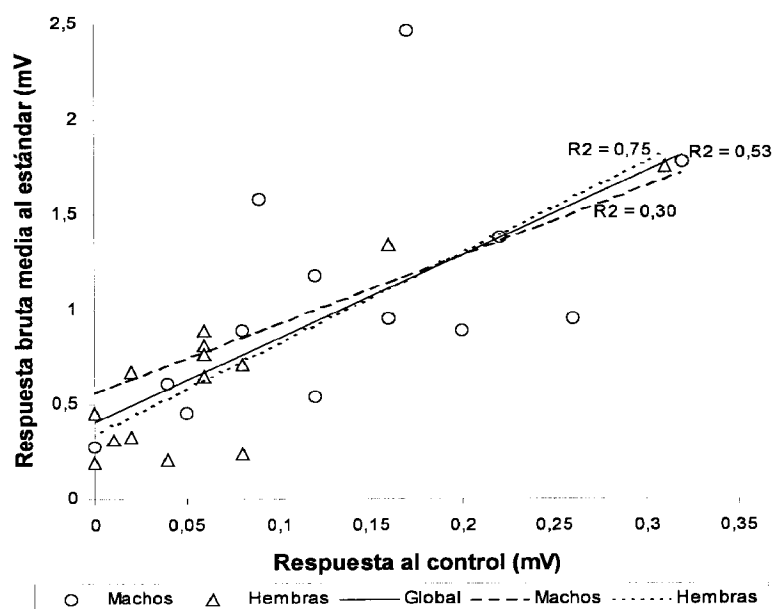
La no existencia de diferencias significativas entre las respuestas provocadas por los dos tipos de solvente, permite la reunión de las respuestas correspondientes a los ejemplares de los dos grupos. A partir de esta muestra ampliada (27 ejemplares), se analizó la relación entre la respuesta bruta frente al estándar y la respuesta al control (tabla III.18). La respuesta a la inyección control provoca valores bajos (la media supuso un 11,6% de la intensidad alcanzada por la respuesta bruta media al estándar), pero el rango de valores alcanzados resultó relativamente amplio (CV= 90%, frente al 65% obtenido para la respuesta al estándar).

Tabla III.18. Estadísticos descriptivos para la respuesta bruta media (series de tres estimulaciones por cada insecto), así como la respuesta al control, en *C. welensii*. CV= coeficiente de variación.

Variable	N	Media (mV)	Desv. típ. (mV)	CV (%)	Mínimo	Máximo
<i>Vcontrol</i>	27	0,10	0,09	90	0,00	0,32
<i>EAGb</i>	27	0,86	0,56	65	0,19	2,46

Esta amplitud en los valores puede apreciarse mejor en la figura III.10, donde se ilustra además una tendencia similar para ambos sexos. La correlación para el global de los datos fue altamente significativa ($R_{\text{Pearson}}=0,77$ para las variables transformadas por la función raíz cuadrada: $p=0,000$; $n=27$).

Figura III.10. Dispersión de las respuestas brutas medias de *C. welensii* ante el estándar frente a las respuestas provocadas por la inyección control.



En estas circunstancias, la prueba de efectos intersujetos con la misma muestra de 27 individuos, empleando esta vez las respuestas netas medias a partir de tres estimulaciones y excluyendo la covariable *Vcontrol* (tabla III.19), arroja resultados parecidos a los obtenidos anteriormente: el único efecto significativo ($p=0,024$) sería el del tipo de solvente.

Tabla III.19. Pruebas de los efectos inter-sujetos de los factores sexo y tipo de solvente sobre la respuesta neta de EAG de *C. welensii*. Se consideran respuestas netas transformadas por la función raíz cuadrada, y series de tres estimulaciones por insecto.

Variable dependiente: *Rai_EAGn*

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	0,614	3	0,205	3,307	0,038
Intercept	17,721	1	17,721	286,590	0,000
Sexo	0,209	1	0,209	3,381	0,079
Solvente	0,360	1	0,360	5,829	0,024*
Sexo * solvente	0,001	1	0,001	0,012	0,913
Error	1,422	23	0,062		
Total	20,750	27			
Total corregida	2,036	26			

Modelo Lineal General. $R^2 = 0,301$ (R^2 corregida = 0,210).

(*). Indica efecto significativo al nivel 0,05.

III.3.2.3. Variabilidad de respuestas entre individuos en *C. welensii* y los parámetros que la condicionan

Los resultados obtenidos hasta el momento revelan algunos puntos contradictorios, en particular en relación con la influencia del sexo y del tipo de solvente sobre la respuesta de EAG, y la desigual capacidad inicial para las pruebas que parecen mostrar los insectos. De esta manera, resulta interesante analizar la posibilidad de que la variabilidad de respuestas entre sujetos pueda distorsionar los efectos del sexo o el solvente.

A partir de estas consideraciones, la prueba de Kruskal-Wallis (tabla III.20) aplicada a las series de siete a nueve respuestas netas dentro de cada grupo (parafina y hexano) así como para el conjunto de individuos, puso de relieve diferencias altamente significativas entre ejemplares en todos los casos ($p < 0,001$).

Tabla III.20. Prueba de Kruskal-Wallis de contraste de respuestas netas medias en *C. welensii* para cada grupo de ejemplares y para el conjunto (medias por individuo obtenidas a partir de siete a nueve estimulaciones).

Variable: *EAGneta*

	Grupo P	Grupo H	Global
Chi-cuadrado	64	57,075	125,900
gl	7	7	15
N	8	8	16
Sig. asintót.	0,000	0,000	0,000

La tabla III.21 refleja las correlaciones entre la respuesta neta media de EAG a partir de tres inyecciones (variable *Rai_EAGn*) y los 12 parámetros considerados inicialmente por su potencial vinculación con esta variabilidad.

Tabla III.21. Matriz de correlaciones (R_{Pearson}) para la respuesta neta media de EAG, transformada por la función raíz cuadrada, y los 12 parámetros potencialmente influyentes en la variabilidad de respuestas entre individuos de *C. welensii*. Las siglas identifican las variables tal y como se describió en el apartado III.2.2.3. La parte inferior de la tabla refleja el número de datos empleados en cada correlación.

	Rai_EAGn	Lg_lib	Temp	Capi	Lg_ret	Lg_scap	Lg_seag	Peso	Longit	Lg_ant	Ancho	Lon_P	An_P
Rai_EAGn	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_lib	0,455**	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp	0,125	-0,110	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capi	-0,527**	-0,513**	0,124	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_ret	0,398*	-0,139	-0,076	-0,05	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_scap	0,203	-0,008	0,028	0,266	0,537**	1	-	-	-	-	-	-	-
Lg_seag	-0,162	-0,046	-0,176	0,454*	0,112	0,649***	1	-	-	-	-	-	-
Peso	-0,102	0,119	0,005	-0,13	0,131	0,388*	0,596**	1	-	-	-	-	-
Longit	-0,133	0,270	-0,616*	-0,242	0,052	0,190	0,442	0,682*	1	-	-	-	-
Lg_ant	0,129	0,135	0,540	-0,238	0,439	-0,249	-0,776**	-0,401	-0,325	1	-	-	-
Ancho	-0,121	0,217	-0,264	-0,562	-0,042	0,025	-0,161	0,347	0,653*	0,252	1	-	-
Lon_P	0,648*	-0,289	0,301	-0,215	0,459	-0,178	-0,718*	-0,957***	-0,489	0,383	-0,231	1	-
An_P	-0,513	0,250	-0,252	0,500	-0,282	0,293	0,880**	0,829**	0,296	-0,554	-0,234	-0,866**	1
Rai_EAGn	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_lib	27	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp	22	22	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capi	26	26	21	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_ret	27	27	22	26	27	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_scap	27	27	22	26	27	27	-	-	-	-	-	-	-
Lg_seag	27	27	22	26	27	27	27	-	-	-	-	-	-
Peso	21	21	20	21	21	21	21	21	-	-	-	-	-
Longit	9	9	9	9	9	9	9	9	9	-	-	-	-
Lg_ant	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	-	-	-
Ancho	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	-	-
Lon_P	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	-
An_P	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9

(*). Indica correlación significativa al nivel 0,05.

(**). Indica correlación muy significativa al nivel 0,01.

(***). Indica correlación significativa al nivel 0,001.

Las correlaciones con la variable *Rai_EAGn* sólo resultaron significativas para las variables *Capi*, *Lon_P*, *Lg_lib* y *Lg_ret*, siendo negativa para la primera y positivas para las demás. Las ecuaciones de las regresiones lineales que expresan cada una de estas relaciones se muestran en la tabla III.22

Tabla III.22. Resumen de los modelos de regresión lineal para las variables significativamente correlacionadas con la respuesta de EAG de *C. welensii*.

Variables	R	R ²	R ² corregida	Modelo (a)	Significación	Durbin-Watson
<i>Rai_EAGn</i> <> <i>Capi</i>	0,527	0,278	0,248	$Y=1,368-0,004X$	0,006	2,367
<i>Rai_EAGn</i> <> <i>Lg_lib</i>	0,455	0,207	0,175	$Y=1,232+0,614X$	0,017	1,887
<i>Rai_EAGn</i> <> <i>Lg_ret</i>	0,398	0,159	0,125	$Y=0,673+0,209X$	0,040	1,956
<i>Rai_EAGn</i> <> <i>Lon_P</i>	0,648	0,420	0,337	$Y=0,043+0,419X$	0,059	2,845

a. Variable dependiente: *Rai_EAGn*.

Tres de los modelos son capaces de explicar significativamente al nivel 5% parte de la variabilidad de la respuesta; el cuarto (respuesta <> relación peso/longitud) lo haría para un nivel de significación del 10%. De los cuatro modelos es precisamente éste último el que contemplaría una mayor variación corregida de la respuesta (33,7%).

La tabla III.23 resume los resultados de las pruebas de comparación de respuestas netas medias entre grupos obtenidos clasificando los datos a partir de cada una de estas cuatro variables. En ella se incluye la significación para el número de conglomerados más adecuado a la muestra; en caso de existir varias opciones dicho valor corresponde al agrupamiento cuyas diferencias de medias llevaron asociada la significación más pequeña.

Tabla III.23. Resumen de la comparación de respuestas netas medias de *C. welensii* entre conglomerados de individuos definidos por las variables diámetro del capilar, amplitud de la línea base, demora en el estudio de EAG tras la captura y relación peso/ longitud.

Variables de clasificación	N	N grupos	Ejemplares por grupo	Significación	Comparación de medias
<i>Capi</i>	26	3	7-14-5	0,039*	Kruskal-Wallis
<i>Lg_lib</i>	27	3	10-9-8	0,021*	Kruskal-Wallis
<i>Lg_ret</i> (a)	27	3	13-12-2	0,000***	Prueba "t"
<i>Lon_P</i>	9	2	6-3	0,095	Mann-Whitney

(*). Indica diferencia significativa al nivel 0,05.

(***). Indica diferencia altamente significativa al nivel 0,05.

(a). Prueba "t" de contraste de las medias de los dos primeros grupos frente al valor "1,34" (media del grupo 3).

Sólo entre los grupos formados a partir de las variables *Capi*, *Lg_lib* y *Lg_ret* se encontraron respuestas medias significativamente distintas ($\alpha=0,05$). Respecto al diámetro del capilar de referencia (tabla III.24), las diferencias (disminución del 60 al 62%) se hallaron entre el grupo 3 y los grupos 1 y 2 (ANOVA seguido de prueba GT2 de Hochberg: $p<0,05$), cuyos diámetros medios presentaban los valores más distantes.

Tabla III. 24. Caracterización de los conglomerados de individuos de *C. welensii* formados a partir del diámetro del capilar de referencia empleado en el estudio de EAG.

Conglomerado	N	Diámetro de capilar (micras)		EAGn (mV)	
		Centro conglomerado	Amplitud conglomerado	Media	Desv. típ.
1	7	87,14	70 a 100	0,92a	0,45
2	14	128,21	110 a 150	0,88a	0,56
3	5	185,00	170 a 195	0,35b	0,22

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

El agrupamiento a partir de la amplitud de la línea base permitió detectar un grupo de insectos para los cuales el valor de este parámetro superaba los 0,3 mV, y cuya respuesta media era significativamente mayor (alrededor de un 78%) que el resto.

Tabla III.25. Caracterización de los conglomerados de individuos de *C. welensii* formados a partir de la amplitud de la línea base de la preparación para estudio de EAG.

Conglomerado	N	Amplitud de línea base (mV)		EAGn (mV)	
		Centro conglomerado	Amplitud conglomerado	Media	Desv. típ.
1	10	0,14	0,12-0,16	0,61a	0,68
2	9	0,23	0,18-0,28	0,66a	0,29
3	8	0,41	0,3-0,66	1,09b	0,36

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

Por último, los resultados en relación con el agrupamiento según la tardanza en efectuar el estudio de EAG (tabla III.26) pueden ser algo engañosos. Los dos ejemplares considerados distintos siguiendo este criterio (Cw7m y Cw6h de la tabla III.2, cuya respuesta media superó más de 2,5 veces la de los demás) presentaron una demora en su estudio considerable -más de cuatro meses- ya que fueron capturados en época de letargo. De esta manera, los resultados apuntan hacia que la “deseable mayor tardanza” hay que entenderla en la medida en que sea debida a la captura de los ejemplares antes de su avivamiento.

Tabla III.26. Caracterización de los conglomerados de individuos de *C. welensii* formados a partir del tiempo transcurrido entre su captura y el estudio de EAG.

Conglomerado	N	Tardanza en realizar EAG (días)		EAGn (mV)	
		Centro conglomerado	Amplitud conglomerado	Media	Desv. típ.
1	13	2,54	1-4	0,65a	0,34
2	12	11,08	6-36	0,72a	0,46
3	2	134,50	133-136	1,85b	0,83

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

El análisis de regresión a partir del enfoque multivariable se resume en la tabla III.27. En ella se incluyen los siguientes modelos: 1) las cuatro variables correlacionadas significativamente con la respuesta de EAG; 2) tres de las variables anteriores, las cuales proporcionaron regresiones individuales significativas (tabla III.22); 3) el mejor de los modelos derivados del empleo de las 12 variables iniciales.

Tabla III.27. Modelos de regresión lineal multivariable significativos para la respuesta de *C. welensii*, a partir de varias combinaciones de variables.

Modelo	Variables independientes (a)	R	R ²	R ² corregida	Significación	Durbin-Watson
1	<i>Capi+Lg_lib+Lg_ret+Lon_P</i>	0,869	0,755	0,509	0,151	3,205
2b	<i>Capi+Lg_lib+Lg_ret</i>	0,734	0,539	0,470	0,001	2,352
3c	<i>Capi+ Lg_ret+Peso+Temp+Lg_seag</i>	0,826	0,683	0,570	0,004	1,676

a. Variable dependiente: *Rai_EAGn*.

b. $Y=1,290-0,002Capi+0,242Lg_ret+0,483Lg_lib$.

c. $Y=0,139-0,008Capi+0,206Lg_ret-0,345Peso+0,064Temp+0,657Lg_seag$.

De las cuatro variables correlacionadas significativamente con la respuesta de EAG, sólo tres (*Capi*, *Lg_lib* y *Lg_ret*) proporcionan un modelo de regresión múltiple significativo; pero el mejor de los modelos obtenidos considerando inicialmente las 12 variables resulta más complejo que el anterior, y explica una mayor variabilidad de la respuesta (entre el 57% y el 68%). Es de resaltar que la presencia en el modelo 3 de la variable *Lg_lib* suponía un ligero incremento de la variabilidad explicada ($R^2=0,728$; $R^2_{\text{corregida}}=0,602$), pero la significación asociada al contraste de hipótesis respecto al coeficiente de regresión parcial para dicha variable ($t= 1,461$; $p=0,168$) recomendaba su exclusión. Por otra parte, el efecto de la variable *Lon_P* queda en gran medida suplido por la variable *Peso* (ambas están fuertemente correlacionadas: $R_{\text{Pearson}}= -0,957$; $\alpha= 0,1\%$; $n=9$).

Al igual que se hizo con las variables *Capi*, *Lg_lib*, *Lg_ret* y *Lon_P* individualizadamente, se analizó la posibilidad de que distintas combinaciones de variables incluidas en los dos modelos significativos anteriores proporcionaran agrupamientos de individuos cuyas respuestas medias fueran diferentes. La tabla III.28 resume los resultados de las pruebas de comparación de respuestas netas medias entre grupos.

Tabla III.28. Contraste de respuestas netas medias correspondientes a distintos agrupamientos de individuos de *C. welensii*, definidos a partir de combinaciones de las variables diámetro del capilar, amplitud de la línea base, temperatura, peso, demora del estudio de EAG tras la captura (en días) y días de supervivencia tras el estudio de EAG.

Combinación de variables	N	N grupos	Ejemplares por grupo	Significación	Comparación de medias (a)
<i>Capi</i> + <i>Lg_ret</i> + <i>Lg_lib</i>	26	4	3-7-5-11	0,058	Kruskal-Wallis
<i>Capi</i> + <i>Temp</i> + <i>Peso</i> + <i>Lg_seag</i> + <i>Lg_ret</i>	20	3	4-11-5	0,101	Anova
<i>Capi</i> + <i>Temp</i>	21	3	4-12-5	0,062	Anova
<i>Peso</i> + <i>Lg_seag</i> + <i>Lg_ret</i>	21	3	5-3-13	0,031*	Kruskal-Wallis
<i>Peso</i> + <i>Lg_seag</i> + <i>Lg_ret</i> + <i>Capi</i>	21	4	10-4-4-3	0,02*	Kruskal-Wallis
<i>Lg_Seag</i> + <i>Capi</i>	26	4	10-6-6-4	0,023*	Kruskal-Wallis

(*). Indica diferencia significativa al nivel 0,05.

(a). Respuesta de EAG expresada mediante su transformada por la función raíz cuadrada.

Los grupos de variables integrantes de los dos modelos significativos anteriores no consiguen agrupamientos de individuos con respuestas significativamente distintas. Tampoco sucede para las dos variables experimentales del modelo 3 (*Capi* y *Temp*); pero sí ocurre con las fisiológicas (*Peso*, *Lg_seag* y *Lg_ret*). En cuanto a las combinaciones entre variables de distinta naturaleza, la variable *Capi* unida a las fisiológicas proporcionó agrupamientos con respuestas medias significativamente distintas. Por último, la combinación con menor número de variables y con resultados significativos (sin considerar las variables *Capi* y *Log_retr* individualizadamente, ya analizadas con anterioridad) fue: *Log_seag* + *Capi*.

Por último, resaltar que la repetición de los contrastes de medias de la tabla III.28, una vez desechadas las observaciones para los insectos integrantes del grupo 3 según la variable *Capi* (cinco ejemplares), así como los capturados en época de letargo (dos ejemplares), deparó esta vez diferencias significativas sólo para el agrupamiento a partir de las variables fisiológicas *Peso* + *Lg_seag* + *Log_ret* (prueba “t” para dos grupos: $p=0,045$; $n_1= 9$, $n_2=5$). Para este conjunto de insectos resultante se estableció una clasificación orientativa según la intensidad de su respuesta neta. La tabla III.29 recoge los valores centrales (en milivoltios) de cada conglomerado para el agrupamiento más adecuado.

Tabla III.29. Agrupamiento de los individuos de *C. welensii* en función de su respuesta neta de EAG, capturados en período de vuelo y estudiados con capilares de diámetro inferior a 170 micras en el electrodo de referencia.

	Conglomerado		
	1	2	3
EAGn (mV)	1,39	0,33	0,73
N	4	5	11

III.3.2.4. Efectos sobre la respuesta total de EAG de *P. germari* del sexo, tipo de solvente y respuesta al control

En la tabla III.30 se recogen las respuestas brutas de cada serie de estimulaciones obtenidas a partir de los 18 insectos empleados.

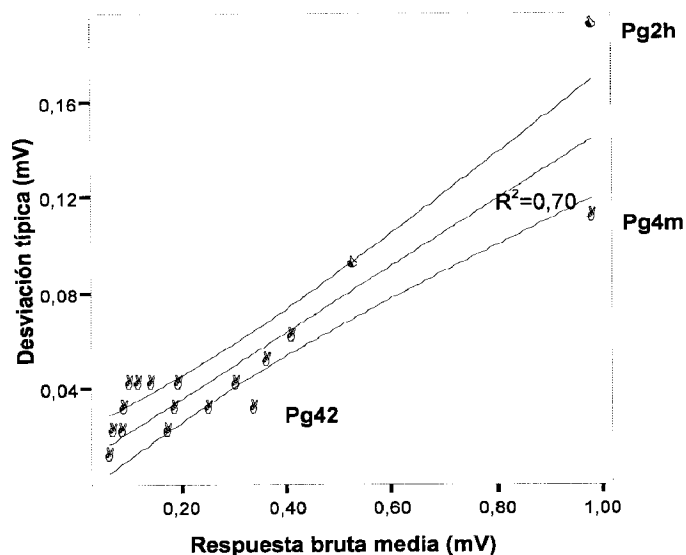
Tabla III.30. Respuestas brutas de *P. germari* frente al control y al estímulo estándar, según sexos y tipo de solvente. EAGbruta= media; S= sexo; Sol= solvente; Vcont.= respuesta frente a la inyección control; DT= desviación típica; CV= coeficiente de variación.

Ejemplar	S	Sol	Vcont. (mV)	Respuesta bruta frente a la trementina (50% v/v) (mV)									EAGbruta (mV)	DT (mV)	CV (%)
				1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª			
Pg40	M	Pa	0,05*	0,46	0,36	0,38	0,38	0,30	0,34	0,32	-	-	0,36	0,05	13,89
Pg42	M	Pa	0,02*	0,38	0,34	0,34	0,31	0,37	0,35	0,32	0,30	0,34	0,34	0,03	8,82
Pg48	M	Pa	0,05*	0,12	0,16	0,14	0,08	0,08	0,08	0,10	0,18	0,14	0,12	0,04	33,33
Pg51	M	Pa	0,09*	0,48	0,50	0,46	0,42	0,36	0,42	0,36	0,36	0,34	0,41	0,06	14,63
Pg53	M	Pa	0,04*	0,12	0,18	0,20	0,16	0,18	0,20	0,16	0,18	0,18	0,17	0,02	11,76
Pg50	M	Pa	0,04*	0,30	0,24	0,24	0,24	0,22	0,30	0,24	0,24	0,24	0,25	0,03	12,00
Pg58	M	Pa	0,02*	0,34	0,28	0,30	0,28	0,30	0,34	0,28	0,38	0,24	0,30	0,04	13,33
Pg63	M	Pa	0,00*	0,12	0,06	0,08	0,10	0,09	0,07	0,09	0,09	0,08	0,09	0,02	22,22
Pg62	M	Pa	0,03*	0,14	0,12	0,10	0,08	0,14	0,16	0,16	0,20	0,20	0,14	0,04	28,57
Pg65	M	Pa	0,02*	0,09	0,07	0,08	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07	0,07	0,07	0,01	14,29
Pg11	M	He	0,00	0,10	0,10	0,10	0,08	0,04	0,06	0,10	0,13	0,12	0,09	0,03	33,33
Pg12	M	He	0,00	0,06	0,06	0,10	0,08	0,04	0,08	0,08	0,06	0,08	0,07	0,02	28,57
Pg16	M	He	0,00	0,16	0,22	0,22	0,14	0,16	0,20	0,22	0,20	0,18	0,19	0,03	15,79
Pg4m	M	He	0,04	0,92	1,06	1,06	1,04	1,06	0,96	0,78	-	-	0,98	0,11	11,22
Pg26	M	He	0,00	0,28	0,22	0,22	0,20	0,14	0,18	0,20	0,14	0,18	0,20	0,04	20,00
Pg27	M	He	0,00	0,18	0,08	0,14	0,12	0,08	0,08	0,10	0,06	0,06	0,10	0,04	40,00
Pg2h	H	He	0,04	0,70	0,80	0,88	1,00	0,90	1,08	1,24	1,20	-	0,98	0,19	19,39
Pg4h	H	He	0,00	0,3	0,56	0,58	0,55	0,58	0,52	0,54	0,58	-	0,53	0,09	16,98

Además de la homogeneidad de respuestas en un mismo insecto, destaca la disparidad de respuestas entre individuos ($0,07\text{mV} \pm 0,01$ hasta $0,98 \pm 0,19$. Media \pm DT). La relación entre la respuesta media de cada insecto y la desviación típica para cada serie se ilustra en la figura III.11, donde se aprecia correlación significativa entre ambas variables ($R_{\text{Pearson}} = 0,839$; $p > 0,001$; $n = 18$). Los ejemplares Pg42, Pg2h y Pg4m son los más alejados de los límites del intervalo de confianza, pero únicamente los datos correspondientes a los ejemplares Pg2h y Pg4m podrían ser considerados atípicos y, además, muy influyentes sobre la regresión³.

³ Valores de referencia para la Distancia de Mahalanobis (DM) y Valor de Influencia Centrado (VIC) en este conjunto de datos: DM= 3,84 y VIC= 0,22. Para el ejemplar Pg42, los valores calculados fueron: DM= 0,02 y VIC=0. Para los ejemplares Pg2h y Pg4m se obtuvieron los mismos valores: DM= 5,93 y VIC= 0,35.

Figura III.11. Respuestas brutas medias frente a las desviaciones típicas en machos (círculo) y hembras (triángulo) de *P. germari*. Se incluye la recta de regresión lineal con intervalo de confianza al 95%.



La tabla III.31 recoge los principales estadísticos descriptivos del comportamiento según sexos y tipo de solvente. La respuesta media de los machos es muy similar para los dos tipos de solvente: $0,26 \text{ mV} \pm 0,33$ y $0,23 \text{ mV} \pm 0,12$ (media \pm DT) para hexano y parafina respectivamente. La comparación entre sexos debe considerarse con cautela, debido al escaso número de datos correspondientes a hembras. Aunque la media para éstas ($0,76 \text{ mV}$) resultó aproximadamente tres veces superior a la obtenida por los machos de cualquiera de los dos grupos, las diferencias fueron significativas sólo para el grupo P (Mann-Whitney: $p_p=0,03$ y $n_p=10$ machos + 2 hembras; $p_H=0,143$ y $n_H=6$ machos + 2 hembras).

Tabla III.31. Respuestas medias por sexo y tipo de solvente en *P. germari*, obtenidas a partir de las respuestas brutas medias por insecto para series de siete a nueve estimulaciones frente al compuesto estándar. M=media; DT= desviación típica.

Sexo	Solvente	N	EAGbruta	
			M (mV)	DT (mV)
Machos	Parafina	10	0,23	0,12
	Hexano	6	0,26	0,33
	Total	16	0,24	0,22
Hembras	Hexano	2	0,76	0,32
	Parafina	10	0,23	0,12
Total	Hexano	8	0,36	0,33
	Total	18	0,28	0,24

La tabla III.32 muestra los efectos sobre la respuesta bruta del factor tipo de solvente y la covariable $V_{control}$; no se incluye en este caso el factor sexo, por escaso número de datos para las hembras. El efecto del tipo de solvente no es significativo, pero sí resulta muy significativo el de la covariable. Al considerar como variable dependiente la respuesta al control ($V_{control}$) y como único factor el tipo de solvente, el efecto de éste también resultó significativo ($p=0,025$).

Tabla III.32. Pruebas de los efectos inter-sujetos de los factores sexo y tipo de solvente, así como de la respuesta a la inyección control, sobre las respuestas brutas de *P. germari* frente al estándar. Se consideran las respuestas brutas al estándar transformadas por la función logaritmo decimal (Log_{EAGb}).

Variable dependiente: *Log_EAGbruta*

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	0,783	2	0,391	4,656	0,027
Intersección	6,549	1	6,549	77,898	0,000
<i>Solvente</i>	0,372	1	0,372	4,421	0,053
<i>Vcontrol</i>	0,750	1	0,750	8,923	0,009**
Error	1,261	15	0,084		
Total	10,365	18			
Total corregida	2,044	17			

Modelo Lineal General. $R^2 = ,383$ (R^2 corregida =0,301).

(**). Efecto muy significativo al nivel 0,01.

III.3.2.5. Comparación entre la respuesta al control y la respuesta a la inyección en blanco; y relación entre la respuesta al control y la respuesta “bruta” media frente al estímulo estándar en *P. germari*

A partir de la tabla III.33 se puede comparar la respuesta frente a los dos tipos de inyección control y la provocada por la inyección en blanco. Se aprecia que las respuestas son muy bajas en todo caso. Tanto para la variable *Vcontrol* como para *Vseco* se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos definidos por el tipo de solvente (Mann-Whitney: $p=0,005$ con $n=31$ para *Vseco*; y $p=0,003$ con $n=32$ para *Vcontrol*). En cambio, las respuestas al control y a la inyección en blanco fueron muy similares en los dos grupos (Wilcoxon: $p=0,414$ y $n=19$; $p=0,301$ y $n=12$; para el grupo *H* y grupo *P* respectivamente).

Tabla III.33. Estadísticos descriptivos de la respuesta de *P. germari* frente al control y frente a la inyección en blanco.

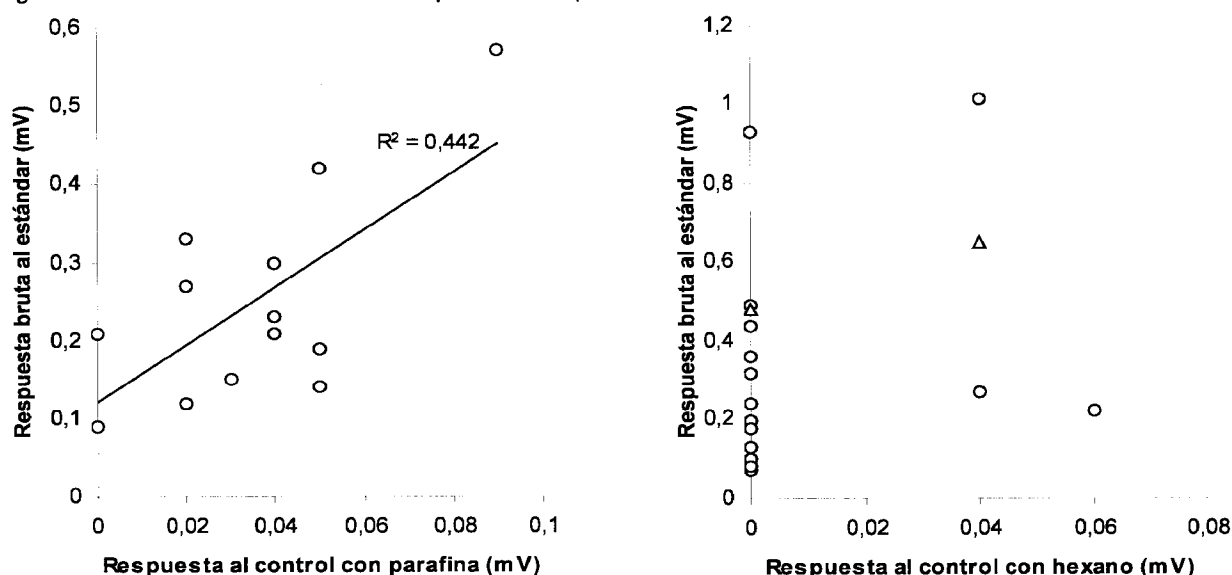
Variable	Solvente	Grupo	N	Media (mV)	Desv. típ. (mV)	Mínimo	Máximo
<i>Vcontrol</i>	Hexano	H	19	0,01	0,02	0,00	0,06
	Parafina	P	13	0,03	0,02	0,00	0,09
<i>Vseco</i>	-	H	19	0,01	0,03	0,00	0,12
	-	P	12	0,04	0,03	0,00	0,10

La relación entre la respuesta bruta y la respuesta a los dos controles se ilustra en la tabla III.34 y en las figuras III.12. En el grupo *P* la intensidad de la respuesta al control representa un 12% de la alcanzada por la respuesta al estímulo estándar; en el grupo *H*, en cambio, no llega al 3%. En las figuras se muestra una correlación clara en el grupo *P*, que además es significativa ($R_{\text{Pearson}} = 0,665$: $p=0,013$; $n=13$), pero en el grupo *H* no se puede establecer una vinculación parecida ($R_{\text{Spearman}} = 0,417$: $p=0,156$; $n=19$).

Tabla III.34. Estadísticos descriptivos para la respuesta bruta media (series de tres estimulaciones por cada insecto), así como la respuesta al control, en *P. germari*.

Variable	Solvente	N	Media (mV)	Desv. Típ. (mV)	Mínimo	Máximo
EAGb	Parafina	13	0,25	0,13	0,09	0,57
	Hexano	19	0,35	0,28	0,07	1,01
	Total	32	0,30			0,23
Vcontrol	Parafina	13	0,03			0,02
	Hexano	19	0,01			0,02
	Total	32	0,02			0,02

Figura III.12. Dispersión de las respuestas brutas medias de machos (círculos) y hembras (triángulos) de *P.germari* ante el estándar frente a las provocadas por la inyección control, para los dos tipos de solvente.



III.3.2.6. Variabilidad de respuestas entre individuos en *P. germari* y los parámetros que la condicionan

La prueba de Kruskal-Wallis entre los machos (medias a partir de siete a nueve estimulaciones por insecto) reveló diferencias altamente significativas entre individuos ($p < 0,001$; $n = 16$). Esta variabilidad puede enmascarar el carácter real de la variabilidad entre sexos, al igual que ocurrió para *C. welensii*; tanto más cuanto en esta ocasión sólo se disponía de la respuesta de dos hembras. Para profundizar más en esta cuestión se intentó disgregar el conjunto global de machos en conglomerados cuyos integrantes presentasen respuestas medias similares (tabla III.35).

Tabla III.35. Clasificación en conglomerados de los machos de *P. germari* según su respuesta neta de EAG (series de siete a nueve estimulaciones). Se indican los casos en que existieron diferente a la respuesta neta media de las dos hembras. (**) indica diferencia significativa al nivel 0,01 frente al valor "0,73mV".

Conglomerado	N	EAGneta (mV)	Desv. típ. (mV)	Error típ. de la media
1	5	0,17**	0,04	0,02
2	4	0,31**	0,02	0,01
3	6	0,07**	0,02	0,01
4	1	0,98		

Para nuestros propósitos se decidió mantener la clasificación en cuatro grupos, de modo que los valores centrales de los grupos 1-3 cubrían un rango muy representativo de la generalidad de respuestas encontradas, mientras que el único integrante del grupo 4 reflejaba la posibilidad, aparentemente excepcional, de que haya grupos de machos con altas respuestas de EAG. La prueba “t” ($\alpha = 0,01$) puso de relieve que las respuestas medias de tres de los conglomerados permanecen muy significativamente por debajo de la respuesta media de las dos hembras. El integrante del conglomerado cuatro presentó, en cambio, una respuesta superior a la de las hembras, aunque no se pueda afirmar la significatividad de la diferencia. La matriz de correlaciones entre los parámetros considerados como candidatos a explicar la variabilidad de respuestas entre individuos, se muestra en la tabla III.36.

Tabla III.36. Matriz de correlaciones (R_{Pearson}) para la respuesta neta de EAG (transformada) y los 12 parámetros potencialmente influyentes en la variabilidad de respuestas entre individuos de *P. germari*. Variables nombradas según se describió en el apartado III.2.2.3. La parte inferior muestra el número de datos.

	Rai_EAGn	Li_bas	Temp	Lg_capi	Peso	Lg_ret	Lg_seag	Lg_scap	Longit	C_ant	Ancho	Lon_P	An_P
Rai_EAGn	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Li_bas	-0,214	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp	-0,118	0,259	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_capi	0,015	-0,444**	0,125	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peso	-0,196	-0,416*	-0,199	0,389*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_ret	-0,206	-0,086	0,329	0,103	-0,004	1	-	-	-	-	-	-	-
Lg_seag	-0,104	-0,201	-0,071	0,273	0,621***	-0,082	1	-	-	-	-	-	-
Lg_scap	-0,017	-0,330*	0,279	0,411**	0,278	0,514**	0,493**	1	-	-	-	-	-
Longit	-0,424	-0,411	-0,482*	0,018	0,725**	0,219	0,176	-0,139	1	-	-	-	-
C_ant	-0,350	-0,555*	-0,419	-0,141	0,613**	0,198	0,038	-0,296	0,898***	1	-	-	-
Ancho	-0,529*	-0,399	-0,387	0,042	0,732	0,326	0,248	-0,080	0,878***	0,825***	1	-	-
Lon_P	0,392	0,624**	0,504*	-0,074	-0,939	-0,622**	-0,593**	-0,286	-0,648**	-0,570*	-0,641**	1	-
An_P	0,326	0,603**	0,456*	-0,148	-0,912***	-0,597**	-0,630**	-0,394	-0,578*	-0,472*	-0,482*	0,969***	1
Rai_EAGn	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Li_bas	32	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp	22	22	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_capi	32	32	22	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peso	31	31	22	31	31	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg_ret	32	32	22	32	31	32	-	-	-	-	-	-	-
Lg_seag	31	31	22	31	30	31	31	-	-	-	-	-	-
Lg_scap	32	32	22	32	31	32	31	32	-	-	-	-	-
Longit	15	15	15	15	15	15	15	15	15	-	-	-	-
C_ant	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	-	-	-
Ancho	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	-	-
Lon_P	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	-
An_P	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

(*) Indica correlación significativa al nivel 0,05 // (**) Indica correlación muy significativa al nivel 0,01 // (***) Indica correlación significativa al nivel 0,001.

En esta tabla se observan correlaciones bajas, en general, entre las distintas variables y la respuesta de EAG, y no significativas excepto para la variable *Ancho*. Esta variable presentó, además, la correlación más fuerte con la respuesta de EAG (-0,529). La ecuación de la recta que expresa la relación entre ambas variables se expone en la tabla III.37, donde se muestra que la anchura del pronoto de los insectos puede explicar significativamente un 22,4% de la variabilidad de las respuestas de EAG.

Tabla III.37. Resumen del modelo de regresión lineal entre las variables *Ancho* y respuesta de EAG de *P. germari* (transformada por la función raíz cuadrada).

Variables	R	R ²	R ² corregida	Modelo (a)	Significación	Durbin-Watson
<i>Rai_EAGn</i> <> <i>Ancho</i>	0,529	0,279	0,224	$Y=1,306-0,840X$	0,04	0,980

(a). Variable dependiente: *Rai_EAGn*.

El intento de clasificar los individuos a partir de esta variable no dio resultados satisfactorios. Sobre una muestra de 15 insectos, los procedimientos de conglomeración establecieron como opciones más adecuadas dos tipos de agrupamiento: formación de 3 ó 4 grupos. La tabla III.38 resume las características de los mismos.

Tabla III.38. Caracterización de los conglomerados de individuos de *P. germari* formados a partir de la anchura del pronoto.

Opción	Conglomerado	N	Anchura del pronoto (cm)		EAG neta (mV)	
			Centro conglomerado	Amplitud conglomerado	Media	Desv. típica
4 conglomerados	1	1	0,64	-	0,48a	-
	2	6	0,86	0,77-0,91	0,46ba	0,30
	3	7	0,99	0,94-1,02	0,20b	0,10
	4	1	1,20	-	0,07c	-
3 conglomerados	1	2	0,70	0,64-0,77	0,4a	0,01
	2	12	0,94	0,85-1,02	0,31a	0,25
	3	1	1,20	-	0,07b	-

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

Esta tabla refleja la dificultad para establecer grupos a partir de esta variable, dado que estos tienden a ser dispares en cuanto a su tamaño y siempre queda alguno integrado por uno o dos ejemplares. Entre los grupos más numerosos de la opción de cuatro conglomerados (grupos 2 y 3), las respuestas no variaron significativamente (prueba “t”: $p=0,055$; $\alpha=0,05$); en la opción de tres grupos, la respuesta media del integrado por 12 individuos no se consideró significativamente distinta de la media del conglomerado 1, integrado sólo por dos insectos (Mann-Whitney: $p=0,198$; $\alpha=0,05$).

Considerando la totalidad de las variables como punto de partida, el modelo de regresión múltiple final que explicó significativamente la mayor proporción de variabilidad de respuestas quedó integrado por el siguiente grupo: *Ancho*, *An_P* y *Li_bas* (tablas III.39 y III.40). Hay que hacer notar que la orientación descriptiva con la cual se emplea este procedimiento hace que hayamos decidido asumir ciertos riesgos manteniendo en el modelo final la variable *An_P*, cuya significación asociada al contraste de hipótesis sobre su coeficiente de regresión parcial (“t”=2,016; $p=0,069$) aconsejaría la exclusión de la misma para una significación del 5%.

Tabla III.39. Coeficientes del modelo de regresión lineal en *P. germari* para la respuesta de EAG frente a las variables independientes *Ancho*, *An_P* y *Li_bas*.

Modelo	Variable	B	Error típ.	t	Significación	Correlación parcial	Tolerancia	FIV
1	(Constante)	1,149	0,380	3,024	0,012			
	<i>Li_bas</i>	-0,653	0,204	-3,201	0,008	-0,694	0,621	1,610
	<i>Ancho</i>	-0,862	0,310	-2,779	0,018	-0,642	0,749	1,335
	<i>An_P</i>	0,375	0,186	2,016	0,069	0,519	0,567	1,764

Variable dependiente: *Rai_EAGn*.

Tabla III.40. Estadísticos de resumen del modelo regresión lineal en *P. germari* para la respuesta de EAG frente a las variables independientes *Ancho*, *An_P* y *Li_bas*.

Modelo	R	R ²	R ² corregida	Significación	Durbin-Watson
1a	0,794	0,630	0,530	0,010	1,421

Variables predictoras: (Constante), *An_P*, *Ancho*, *Li_bas*.

Variable dependiente: *Rai_EAGn*.

a. $Y = 1,149 - 0,653Li - 0,862AnP + 0,375Ancho$

El modelo anterior indica que entre un 53% y un 63% de la variabilidad de las respuestas de EAG se puede explicar mediante una combinación lineal de tres variables de distinta naturaleza: en primer lugar, una que a priori fue considerada como “experimental” (*Li_bas*); por otro lado, una variable anatómica (*Ancho* de pronoto); y por último, la variable *An_P*, que proporciona una orientación sobre la hidratación del insecto en el momento de estudio de EAG. En la tabla III.41 se resumen los resultados de las pruebas de comparación de respuestas netas medias entre grupos obtenidos mediante distintas combinaciones de estas variables. Según se aprecia, ninguna de las combinaciones es capaz de originar grupos homogéneos de individuos cuyas respuestas medias difieran significativamente.

Tabla III.41. Contraste de respuestas netas medias correspondientes a distintos agrupamientos de individuos de *P. germari*, definidos a partir de combinaciones de las variables amplitud de línea base, anchura del pronoto y relación peso/ancho del pronoto.

Combinación de variables	N	N grupos	Ejemplares por grupo	Significación	Comparación de medias
<i>Li_bas</i> + <i>Ancho</i> + <i>An_P</i>	15	2	6-9	0,403	prueba "t"
<i>Ancho</i> + <i>An_P</i>	15	2	5-10	0,238	prueba "t"
<i>An_P</i>	15	2	10-5	0,238	prueba "t"
<i>Li_bas</i>	32	4	8-5-5-14	0,182	Kruskal-Wallis

III.4. Discusión

La respuesta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* resulta influida por varios factores experimentales, como la dosis y cantidad de estímulo aplicado, y la frecuencia de estimulación. 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. La respuesta se ve condicionada, así mismo, por las características del propio insecto. Este condicionamiento puede deberse tanto a las propias diferencias de respuesta olfativa inherentes a distintos individuos (Roelofs 1984), como a las inducidas por el estado de vigor de los insectos. Este aspecto resulta de gran interés en casos como el que nos ocupa, en los cuales los ejemplares son capturados en campo durante el período de vuelo. En los dos siguientes apartados analizaremos el efecto de cada uno de estos factores.

III.4.1. Efecto sobre la respuesta de EAG de la concentración y cantidad del estímulo, la frecuencia de estimulación y la duración de la preparación

Las dos especies han mostrado un comportamiento típico en la relación dosis-respuesta, sobre todo *C. welensii*, que mostró respuestas de mayor intensidad. La variación en las respuestas halladas, expresada en porcentaje como intervalo de confianza al 95%, fue para *C. welensii* de $\approx 15\%$ para dosis 1:10, e inferior al 29% a dosis mucho más elevadas (1:1). Para *P. germari* la variación resultó más elevada (cercana al 25% para 1:10 y superior al 52% para la dosis 1:1). Van Tol y Visser (2002) encontraron que para el curculiónido *Otiorynchus 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).

Así pues, si se busca homogeneidad de respuestas, la dosis más adecuada sería la proporción 1:10 (aunque en *P. germari* sería de esperar aún una variación importante). Pero el hecho de que las respuestas frente a dosis 1:1 resulten significativamente mayores que las halladas para 1:10, 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.

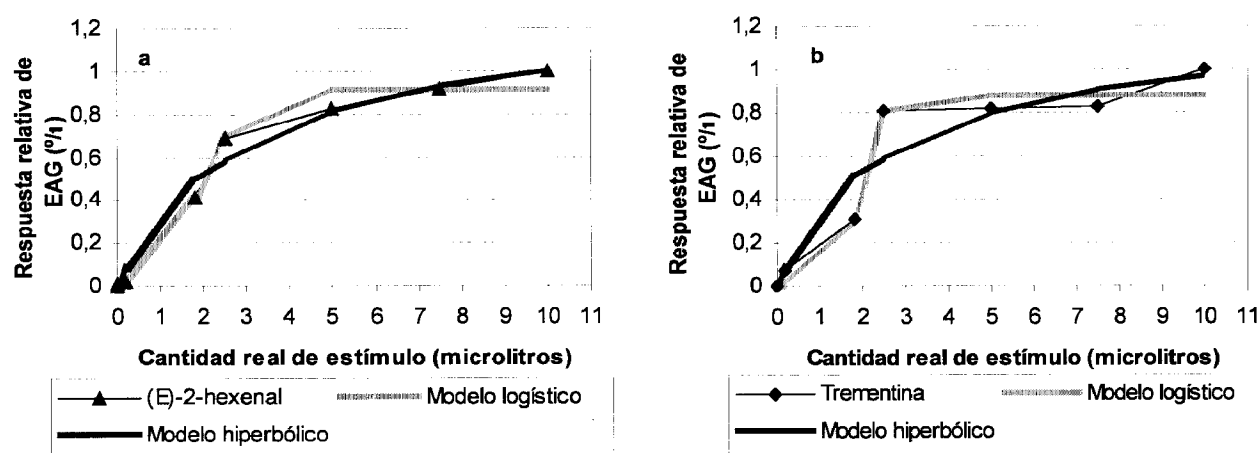
La concentración aconsejable (1:1) es superior a la empleada para otros cerambícidos, como *Anaglyptus subfasciatus* y *Demonax transilis* (estándar linalol a dosis 1:10 en hexano; Ikeda *et al.* 1993); *Phoracantha semipunctata* (10^3 ppm en hexano, empleando como estándar (*E*)-2-hexenal; Barata *et al.* 2000); *Arhopalus tristis* (α -pineno al 10% en aceite de parafina; Suckling *et al.* 2001). En otros insectos, como el curculiónido *Otiorynchus sulcatus*, se prepararon disoluciones al 1% de (*Z*)-3-hexen-1-ol en aceite de parafina, mientras que Park y Hardie (1998) usaron mezclas de (*E*)-2-hexenal al 1% en el mismo solvente para el áfido *Aphis fabae*.

En cuanto a la cantidad de disolución estimulante, si se desea obtener valores altos que permitan apreciar las respuestas frente a los compuestos poco estimulantes, la opción más conveniente es emplear 20 microlitros. Por otro lado, la diferencia escasa y no significativa entre la estimulación con 20 y 15 microlitros (8% en *C. welensii* y $<17\%$ en *P. germari*) hace que no resulten preocupantes las ligeras variaciones en la toma de muestras según la precisión de

la pipeteadora automática (la empleada por nosotros ofrecía, no obstante, una exactitud de 0,5 μl en 20 μl). La cantidad recomendable, y que 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).

Los valores obtenidos a partir del estudio de los efectos de la concentración y de la cantidad de aplicación, permiten elaborar una gráfica orientativa, a escala real, de la evolución de la respuesta relativa de EAG según la cantidad de compuesto estimulante (estándar) realmente aplicada en cada inyección (figura III.13).

Figura III.13. Variación de la repuesta de EAG de *C. welensii* (a) y *P. germani* (b) en función de las cantidades de compuesto estimulante (estándar) realmente aplicadas en cada inyección. Se reflejan los valores relativos respecto a la respuesta provocada por 20 μl de disolución 1:1 (v/v) del estímulo estándar para cada especie (equivalente a 10 μl reales del compuesto estimulante), 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. germani*) e hiperbólico ($Y = a \cdot X/(b+X)$; $R^2 = 0,984$ para *C. welensii*, y $R^2 = 0,930$ para *P. germani*).



Estas gráficas ofrecen una referencia interesante sobre el comportamiento de las respuestas en el rango de concentraciones 1:10 <> 1:1 (1,82 a 10 μl reales de compuesto estimulante). Para ambas especies, el aumento de la respuesta a partir de la cantidad de 2,5 μl (1,25:10) es mucho más suave que el encontrado para cantidades inferiores, continuando el incremento hasta la cantidad de 10 μl (1:1). Aunque no tenemos datos de respuesta frente a cantidades superiores, es probable, y así lo apuntan los modelos no lineales, que la concentración 1:1 se encuentre próxima a la dosis de saturación de la antena en las dos especies (el nivel de respuesta relativa al 1:1 estaría al 76% de la intensidad máxima en *C. welensii* y al $\approx 81\%$ en *P. germani*, según el modelo hiperbólico). De ser extrapolable este comportamiento a otras sustancias, podría tener consecuencias relevantes si se considera que, en general, los compuestos volátiles suelen presentar diferentes volatilidades, lo cual puede influir sobre la respuestas de EAG.

En estas circunstancias, el empleo de la máxima concentración (1:1) y la mayor de las cantidades de mezcla estimulante (20 μl) podrían ayudar a reducir el efecto de la variación de la volatilidad de las sustancias que se estudien. Para ello habría que asumir que tal variación condiciona la presencia real de cada compuesto en el flujo de aire incidente en la antena, y que esta influencia resultara “equivalente” a la que se produciría suponiendo la misma volatilidad para los distintos compuestos pero aplicándolos a diferentes concentraciones en la

mezcla estimulante. En esta situación, diferencias de volatilidad “equivalentes” a una reducción de la dosis en el rango 1:1 a 2,5:10 (10 a 5 µl realmente aplicados de cada sustancia) originarían, presumiblemente, una reducción máxima de ≈20% en la respuesta de EAG de las dos especies.

Este razonamiento es particularmente aplicable a *C. welensii*, ya que el compuesto estándar empleado [(E)-2-hexenal] resulta uno de los de mayor volatilidad. En cambio, el comportamiento reflejado en la figura III.13b para *P. germari*, empleando como estándar la trementina, deja incógnitas sobre lo que ocurriría con dosis superiores a 1:1 o, lo que es lo mismo, con sustancias de volatilidad mayor que aquella.

Tanto *C. welensii* como *P. germari* muestran una elevada capacidad de recuperación de la antena, ya que frecuencias de estimulación altas (15 segundos) no ocasionan variaciones de respuesta significativas entre inyecciones consecutivas. En la especie *P. germari*, las intensidades que se alcanzan indican que dicha frecuencia puede ser, además, adecuada de cara a la comparación de respuestas medias entre individuos. Para otras especies se han propuesto frecuencias de estimulación similares a las reseñadas: entre los cerambícidos, Barata (1997) permitió un reposo entre estímulos de 5 a 10 minutos para *P. semipunctata*; para *Arhopalus tristis*, *Demonax transilis* y *Anaglyptus subfasciatus*, la frecuencia fue de 30 segundos (Ikeda *et al.* 1993; Suckling *et al.* 2001). Dickens (2000) empleó frecuencias de 2-3 minutos para el crisomélido *Leptinotarsa decemlineata*, que resultaron similares a las empleadas por Brockerhoff y Grant (1999) con el lepidóptero *Dioryctria abietivorella*.

Hay que destacar que, en el caso de *C. welensii*, se ha encontrado que una frecuencia de 15 segundos puede ocasionar problemas de saturación ante respuestas que sobrepasen los 2 mV. En tales situaciones resultaría más adecuado el empleo de frecuencias más bajas y estables (entre 1 y 10 minutos) para analizar la variación intraespecífica. Si lo que se desea es, en cambio, estudiar la respuesta frente a grupos numerosos de sustancias de estimulación desconocida, la frecuencia de 1 minuto resulta especialmente indicada para las dos especies, debido a la limitación del tiempo útil de trabajo con estos insectos.

Cada preparación de EAG para las especies *C. welensii* y *P. germari* 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. germari* 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 la abertura extrema del mismo, lo cual permite su rellenado rápido por capilaridad.

Esta duración de la preparación es comparable a la obtenida por Barata y colaboradores (2000) para *P. semipunctata* (seis horas) y muy por encima de las 1-2 horas de duración de la preparación para *Leptinotarsa decemlineata* a partir de antenas escindidas (Weibbecker *et al.* 1997). De esta manera, 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).

III.4.2. Variabilidad de respuesta entre individuos y sexo, y los factores que pueden ocasionarla

Para las dos especies se ha encontrado variación altamente significativa de las respuestas entre individuos. El efecto mostrado por la respuesta al control (covariable $V_{control}$) sobre la respuesta de EAG sugiere la existencia de cierta heterogeneidad entre los ejemplares en cuanto a su aptitud para este tipo de estudios. Las respuestas obtenidas en los dos insectos fueron muy variables. En *P. germari*, frente a la esencia de trementina, las estimulaciones brutas oscilaron entre $0,07 \text{ mV} \pm 0,01$ y $0,98 \pm 0,19$ (media de $0,28 \text{ mV} \pm 0,24$; $n=18$); mientras que en *C. welensii*, empleando como estándar el (E)-2-hexenal, la respuesta varió entre $0,22 \text{ mV} \pm 0,07$ y $2,38 \text{ mV} \pm 0,2$ (media de $0,92 \text{ mV} \pm 0,60$; $n=16$). Estas fluctuaciones pueden enmascarar el carácter real de las diferencias entre sexos o por tipo de solvente.

La respuesta media de *P. germari* resulta baja, pero se han encontrado intensidades semejantes en otras especies. En *P. semipunctata*, por ejemplo, se empleó como estándar el cineol a la dosis 1:10 en aceite de parafina, que originó respuestas brutas de $279 \mu\text{V} \pm 181$ (media \pm intervalo de confianza al 95%) (Barata 1997). En *C. welensii*, por el contrario, la respuesta media se puede considerar elevada, y su desviación superior a la encontrada en otras especies. Así, en el cerambícido *Arhopalus tristis* la fluctuación respecto a la respuesta media frente al compuesto más activo [(+)- α -pineno] fue $\approx 16\%$ (Suckling *et al.* 2001); en el curculiónido *Otiorhynchus sulcatus*, la respuesta absoluta frente al estándar (Z)-3 hexen-1-ol al 1% (v/v) en aceite de parafina fue de $1,3 \text{ mV} \pm 0,3$ (media \pm intervalo de confianza al 95%) (Van Tol y Visser 2002); mientras que el crisomélido *Leptinotarsa decemlineata* respondió con $1,46 \text{ mV} \pm 0,16$ (media \pm DT) frente al (Z)-3-hexenil acetato (obteniendo tales valores a partir de un elevado número de insectos: $n=33$) (Dickens 2000).

Roelofs (1984) apuntaba ya que la respuesta absoluta de EAG, en milivoltios, varía entre antenas y, posiblemente, puede ser afectada por otros factores como la temperatura, flujo de aire o las respuestas frente a estimulaciones previas. Sin embargo, indica que las amplitudes de respuesta relativas a estándares particulares pueden ser muy reproducibles en réplicas con gran número de antenas; en nuestro caso, la relación lineal encontrada entre la respuesta bruta al estándar y la respuesta al control sugiere esta misma idea. Este comportamiento se ha citado para diversas especies, desde pulgones como *Aphis fabae* (Park y Hardie 1998) hasta lepidópteros como *Lobesia bostrana* (Struble y Arn 1984). Para este lepidóptero se encontró también una fuerte variación de respuestas, que oscilaron entre 1 y 11,4 mV con una media de 3,5 mV, que fue atribuida a la preparación de la antena más que a las propias características de las mismas.

En cuanto al tipo de solvente empleado en la elaboración de las mezclas estimulantes, su efecto no resultó significativo en *P. germari*, pero sí en *C. welensii*; aunque para ambas especies se dieron situaciones singulares. En *P. germari* hubo cierta disparidad para la vinculación *respuesta al control* \leftrightarrow *respuesta bruta al estándar*, según el solvente empleado: mientras que en el grupo P las respuestas brutas frente al estándar y al control se correlacionaron, no ocurrió lo mismo en el grupo H. Además, la respuesta al control en el primer grupo supuso un 12% de la originada por el estándar, siendo de apenas el 3% en el caso del hexano. En *C. welensii* ocurrió que, aunque el efecto del tipo de solvente sobre la respuesta bruta al estándar fue significativo, no hubo diferencias significativas entre las respuestas a los controles elaborados

con cada uno de los solventes; estas respuestas fueron, además, de muy baja intensidad ($0,1 \text{ mV} \pm 0,09$ en los dos casos; media \pm DT).

En el caso de *P. germari*, la disparidad pudo estar motivada por la precisión de las mediciones asociada a la baja intensidad de las respuestas provocadas por los controles. La precisión del software empleado (20 microvoltios) puede hacer que, para el rango de valores de las respuestas al control (0,01 a 0,03 mV) el más mínimo error de medida haga oscilar la media hasta valores tales que induzcan dicha variabilidad. Por otra parte, para *C. welensii*, es la propia variabilidad de respuestas entre individuos la que podría ocasionar singularidades como la encontrada en relación con la respuesta al control.

La relación entre las respuestas provocadas por las sustancias solventes (aceite de parafina y hexano) y la encontrada frente a la inyección sin ningún tipo de sustancia añadida (“inyección en blanco”), resulta muy interesante. Dicha relación indica la contribución a la respuesta al control por parte de receptores no químicos (higro-térmicos y/o mecánicos, ya sea actuando individualizadamente o de manera conjunta) y, en definitiva, la aportación de este tipo de receptores a la respuesta final de EAG, para el dispositivo y parámetros de aplicación de estímulos empleados. Así, la respuesta al control en *P. germari* se puede considerar debida en su totalidad a receptores no químicos, resultando también elevada (50 al 60% de la respuesta al control) la aportación de estos receptores para *C. welensii*.

Teóricamente, el hexano es un solvente que, por su alta volatilidad, puede contribuir potencialmente a la respuesta de EAG del insecto, mientras que con el aceite de parafina sucede todo lo contrario. Barata y colaboradores (1992) no encontraron respuesta medible de *P. semipunctata* frente al control de parafina; en cambio, este solvente provocó respuestas de $\approx 0,13 \text{ mV}$ en *Otiorynchus sulcatus* (Van Tol y Visser 2002), $0,16 \text{ mV} \pm 0,07$ en *Dioryctria abietivorella* (Brockerhoff y Grant 1999) y $0,24 \pm 0,036 \text{ mV}$ en *Aphis fabae* (Park y Hardie 1998). La respuesta de EAG frente al control de hexano en *Hypsipyla grandella* fue de $0,15 \text{ mV}$ (Maia *et al.* 2000); mientras que en *Dioryctria abietivorella* resultó mucho más elevada ($1,63 \text{ mV} \pm 0,12$) (Brockerhoff y Grant 1999).

Estos resultados confirman la idea esbozada sobre la escasa relevancia, para *C. welensii* y *P. germari*, de la aportación del solvente a la respuesta final de EAG (en las condiciones de estimulación consideradas). El probable mayor peso en la respuesta al control de otros receptores no químicos ha sido sugerido ya para insectos como el díptero *Lucilia cuprina* (Park y Cork 1999); y se ha demostrado en *Hypsipyla grandella*, donde la inyección “en blanco” originó, incluso, respuestas superiores al control con hexano, tanto en machos como en hembras (Maia *et al.* 2000). En nuestro caso, probablemente haya influido también en esta circunstancia el tiempo permitido para la evaporación del solvente (alrededor de cinco minutos) antes del sellado de las pipetas Pasteur, tiempo en el cual el hexano se habría evaporado por completo (Brockerhoff y Grant 1999).

En cuanto a la variación de las respuestas por sexos frente al estándar (*E*)-2-hexenal, no existieron diferencias significativas para las mismas en *C. welensii*, si bien la respuesta media de los machos superó en más del 61% a la de las hembras. En *P. germari* no se puede establecer ninguna generalización, dado el escaso número de hembras disponibles; en principio, se apunta una respuesta significativamente más intensa para las hembras frente al estándar trementina, encontrándose que el registro bruto medio de 16 machos representó poco más

del 31,5% del valor medio alcanzado por las dos hembras estudiadas ($0,76\text{mV} \pm 0,32$; media \pm DT). Pero al ampliar la muestra hasta 30 machos, se encontraron dos ejemplares cuya respuesta superaba ampliamente los registros de la dos hembras, llegando a superar valores netos de $0,9\text{ mV}$; no obstante, la respuesta media continuó siendo inferior.

Entre los cerambícidos estudiados mediante este tipo de técnicas, el carácter de la respuesta entre sexos varía con la especie, y cabe suponer con cierta lógica que también puede influir el tipo de compuesto estudiado. Hay cerambícidos, como *P. semipunctata*, para los cuales no se han encontrado diferencias de respuesta entre sexos para un amplio abanico de sustancias (Barata 1997). En cambio, las respuestas de las hembras de *Anaglyptus subfasciatus* superaron a las de los machos, mientras que en *Demonax transilis* ocurrió exactamente lo contrario (Ikeda *et al.* 1993). En otros órdenes de insectos, González y colaboradores (1994) no encontraron diferencias de respuesta entre sexos en el escolítido *Phloeotribus scarabaeoides* frente al etileno ni al ácido acético; Ômura y colaboradores (2000) tampoco las encontraron para ninguno de los 13 compuestos presentados a los lepidópteros *Kanisca canace* y *Vanessa indica*.

Respecto a las causas que pueden explicar la variabilidad de respuesta entre individuos, para *P. germari* no se ha podido establecer una explicación clara a partir del conjunto de parámetros estudiado. No obstante, han quedado remarcadas algunas pautas que podrían guardar relación con la misma: el estado de hidratación de los individuos, su tamaño (reflejado por la anchura del pronoto y mostrando correlación negativa) y la amplitud de la línea base. La variabilidad encontrada en *C. welensii* no es influida por variables anatómicas; en cambio, las variables experimentales (fundamentalmente el diámetro del capilar del electrodo de referencia y la amplitud de la línea base), así como el estado fisiológico del individuo en relación a la fecha de estudio, sí parecen condicionar bastante (hasta un 68%) tal variabilidad.

Por lo que se refiere a las variables experimentales, dado que los capilares se fabricaron manualmente, no se puede garantizar la homogeneidad de los mismos en cuanto a su diámetro salvo por eliminación de algunos; en este sentido, los resultados obtenidos con *C. welensii* recomiendan desechar aquellos con diámetro superior a 170 micras, ya que parecen enmascarar, disminuyéndola, la respuesta real del insecto ante un estímulo dado. Por otra parte, la relación entre la amplitud de la línea base y la respuesta al estándar resulta más difícil de interpretar, ya que la fluctuación en dicha amplitud puede deberse a la colocación de los electrodos, pero también a la aptitud de los insectos en el momento de las pruebas de EAG.

La respuesta de EAG es también dependiente en cierto grado de la temperatura y la humedad, incluso en algunos casos del estado fisiológico del insecto (Syntech 1998). Sin embargo, son pocos los trabajos en los que se ha estudiado la influencia de factores experimentales en la respuesta de EAG, y aún menos los centrados sobre el estado de vigor de los individuos. En general se intentan mantener, según recomienda Roelofs (1984), unas condiciones experimentales lo más homogéneas posibles para distintas sesiones de EAG, de manera que se elimine la fuente de variación que supondrían algunos de los factores experimentales. Esta cuestión, por lo que se refiere a los insectos, se ha enfocado generalmente empleando ejemplares criados en condiciones controladas, de manera que se pueda conocer la edad y el grado de desarrollo de cada individuo estudiado.

En la especie *C. welensii*, los resultados apuntan como probable la existencia a priori de diferencias entre la capacidad de respuesta de insectos capturados en época de letargo y los capturados en época de vuelo ($1,85 \text{ mV} \pm 0,83$ para $n=2$; y $0,68 \text{ mV} \pm 0,39$ para $n=25$, respectivamente; media \pm DT). Otros factores, como el peso en el momento de estudio y la supervivencia del individuo tras la prueba de EAG, también indican de manera indirecta la existencia de relación entre la respuesta obtenida y el vigor de los insectos. La influencia de la vitalidad y la época de captura de los insectos en la variabilidad intraespecífica parece razonable si se consideran dos aspectos de la biología de esta especie: 1) la dilatada época de letargo que atraviesan y 2) la breve época de vuelo general, durante la cual deben desarrollar una gran actividad que implica también un rápido deterioro.

Allison y colaboradores (2004) indican que las respuestas de los cerambícidos frente a volátiles influyentes en el comportamiento y procedentes de especies hospedantes, pueden estar condicionadas por el grado de desarrollo de los insectos; así lo han sugerido sus propios resultados, así como los de otros autores, con *Monochamus* spp. Una idea semejante la plantearon los resultados obtenidos con *P. semipunctata* por Barata y Araújo (2001). La influencia que ejercen la edad y la madurez sexual de los insectos sobre la respuesta de EAG frente a volátiles de plantas, ha sido observada también en otros grupos de insectos, como ocurre con el crisomélido *Leptinotarsa decemlineata* (Dickens 2000).

El intento de cría en laboratorio de larvas de estos dos cerambícidos mediante dieta semisintética no resultó fructífero; y la recolección de ramas supuestamente infestadas para obtener insectos en el momento de su emergencia planteaba grandes problemas de disponibilidad de espacio. De este modo, se optó por su captura directa en campo durante el período de vuelo, pero ello introducía un factor de variación difícil de controlar, que tras los resultados obtenidos puede ser determinante en la variabilidad intraespecífica: el estado fisiológico de los insectos.

Por lo tanto, los resultados recomiendan, de cara a los estudios electrofisiológicos con *C. welensii* y *P. germari*, la conveniencia de intentar paliar el efecto distorsionante de la variabilidad de respuestas entre individuos. Un remedio ampliamente utilizado en los trabajos de EAG con insectos, consiste simplemente en estandarizar toda respuesta que se desee estudiar respecto a la provocada por un estímulo estándar. Sin embargo, esta práctica conlleva el riesgo, según Brockerhoff y Grant (1999), de aumentar la “fatiga” de la antena.

De esta manera, el estudio de la evolución de las respuestas –y en definitiva, la aptitud de la preparación– bajo el efecto de variables experimentales como las estudiadas a lo largo del presente capítulo (dosis y cantidad de estímulo, frecuencia de estimulación), cobra especial relevancia. En nuestro caso, los resultados obtenidos aseguran que el riesgo señalado por Brockerhoff y Grant (1999) no es de temer para las dos especies estudiadas, incluso en condiciones de experimentación relativamente intensas, como son el empleo de cantidades de mezcla estimulante de $20 \mu\text{l}$ a elevada concentración (1:1), y frecuencias de estimulación de entre 15 segundos y 1 minuto.

III.5. Bibliografía

- Allison, J.; Borden, J.; Seybold, J. (2004). A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14:123 - 150.
- Arn, H.; Städler, E. M.; Rauscher, S. (1975). The electroantennographic detector -a selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. *Z. Naturforsch* 30: 722-725.
- 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. No publicado.
- Barata, E.N.; Araújo, J. (2001). Olfactory orientation responses of the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* to host plants in a wind tunnel. *Physiological Entomology* 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. En: Menken, S. B. J.; Visr, H.; Harrewijn, P. (eds.). *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, No. 8: 1877-1895.
- Barata, E.; Mustaparta, H.; Pickett, J.; Wadhams, L.; Araujo, J. (2002). Encoding of host and non-host plant odours by receptor neurones in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. Volume 188, Number 2: 121 - 133.
- 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.
- Brockerhoff, E.; Grant, G. (1999). Correction for differences in volatility among olfactory stimuli and effect on EAG responses of *Dioryctria abietivorella* to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* Vol. 25, Nº 6: 1353-1368.
- Dagnelie, P. (1998). *Statistique théorique et appliquée. Tome 2: inférence statistique à une et à deux dimensions*. Bibliothèque des Universités. De Boeck Université. 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 (5): 1265-1279.
- García, A. (1998). *Estadística aplicada: conceptos básicos*. Universidad Nacional de Educación a Distancia. 405 pp.

- 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.
- Hanks, L.; Millar, J.; Paine, T. (1998). Dispersal of the eucalyptus longhorned borer (Coleoptera: Cerambycidae) in urban landscapes. *Environmental Entomology* 27 (6): 1418-1424.
- Hanks, L. M. (1999). Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 483-505.
- Hanks, L. M.; Paine, T. D.; Millar, J. G. (1993). Host species preferences and larval performance in the wood-boring beetle *Phoracantha semipunctata* F. *Oecologia* 95: 22-29.
- 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.
- 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 (6): 629-639
- Ômura, H.; Honda, K. y Hayashi, N. (2000). Identification of feeding attractants in oak sap for adults of two nymphalid butterflies, *Kaniska canace* and *Vanessa indica*. *Physiological Entomology* 25 (3), 281-287.
- Park, K. C.; Hardie, J. (1998). An improved aphid electroantennogram. *Journal of Insect Physiology* 44 (10): 919-928.
- Park, K. C.; Cork, A. (1999). Electrophysiological response of antennal receptor neurons in female australian sheep blowflies, *Lucilia cuprina*, to host odours. *Journal of Insects Physiology* 45: 85-91.
- Roelofs, W. L. (1984). Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. En: Hummel, H.; Miller, T. A. (eds.). *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 131-159.
- Struble, D.; Arn, H. (1984). Combined gas chromatography and electroantennogram recording of insect olfactory response. En: Hummel, H.; Miller, T. A. (eds.). *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 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.
- Van Tol , R.; Visser, J. (2002). Olfactory antennal responses of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* to plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102: 49-64.

- 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.
- 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. *Journal of Chromatography A* 1056: 209-216.

*Esta alma de mujer viril y delicada,
dulce en la gravedad, severa en el amor,
es una encina espléndida de sombra perfumada,
por cuyos brazos rudos trepara un mirto en flor.*
-Gabriela Mistral-

Capítulo IV

Respuesta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* frente a compuestos volátiles emitidos por especies arbóreas hospedantes y no hospedantes

IV.1. Introducción: La emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por *Q. ilex* y *Q. suber*, y la influencia de los “COVs” sobre el comportamiento de los insectos

IV.1.1. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por *Q. ilex* y *Q. suber*

La emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por las plantas es una cuestión de interés creciente en el ámbito de la química atmosférica, debido principalmente a su influencia en el balance global del carbono y en la formación regional de oxidantes fotoquímicos como el ozono (Langenheim 1994; Kesselmeier y Staudt 1999). Entre los COVs de origen biótico se encuentran los isoprenoides o terpenoides (denominaciones que engloban al isopreno y los terpenos), alcanos, alquenos, carbonilos, alcoholes, ésteres, éteres y ácidos. El grupo de los isoprenoides, y en particular los más volátiles (isopreno y monoterpenos) se consideran los más relevantes (Kesselmeier y Staudt 1999), aunque Peñuelas y Llusà (2001) atribuyen a los compuestos C₆-C₁₀ no terpenoides, entre los que figuran los denominados “volátiles de hojas verdes” (GLV, de “*Green Leaf Volatiles*”), una relevancia similar a los anteriores en las emisiones globales de especies leñosas mediterráneas.

Los COVs son producidos en muchos tejidos vegetales diferentes y mediante diversos procesos fisiológicos. Las consecuencias de su emisión para la vida de las plantas siguen considerándose una gran incógnita (Dudareva *et al.* 2004); sin embargo, son varios los efectos que se han asociado tradicionalmente a la misma, en particular para los terpenos: defensiva contra patógenos y herbívoros; información entre las distintas partes de una misma planta, entre plantas distintas y entre plantas y animales (en particular microorganismos); y otras funciones como la estabilización y protección de las membranas celulares contra las altas temperaturas o la alteración de la floración de las plantas (Dicke y Sabelis 1989; Langenheim 1994; Peñuelas *et al.* 1995; Kesselmeier y Staudt 1999; Paré y Tumlinson 1999; Staudt *et al.* 2000; Peñuelas y Llusà 2002a y 2002b; Martin *et al.* 2003; Dudareva *et al.* 2004).

Cada grupo taxonómico muestra un espectro de emisión característico, ya que la constitución genética determina fuertemente la producción de COVs, haciendo la emisión

altamente específica de cada especie o incluso de cada ecotipo (Loreto *et al.* 1998b; Peñuelas y Llusà 2002b). Pero la variabilidad de la emisión también es resultado de la interacción con factores ecológicos tanto bióticos como abióticos (Peñuelas y Llusà 1995). Los efectos de estos factores han sido muy poco estudiados para compuestos distintos de los isoprenoides (Kesselmeier y Staudt 1999), resultando para éstos la luz y la temperatura las influencias ambientales mejor descritas; en cambio la humedad relativa parece tener menor importancia. La luz y la temperatura tienen efectos considerados “a corto plazo”, ya que la respuesta de la emisión ocurre en el periodo de tiempo de algunos minutos hasta una hora.

El género *Quercus* se ha considerado tradicionalmente un emisor de isopreno. Entre las especies presente en España, *Q. pubescens*, *Q. robur* y *Q. petraea* se comportan de esta manera (Loreto *et al.* 1998b), pero algunas especies euroasiáticas, en particular mediterráneas, se apartan de dicha afirmación. Así, en revisiones recientes sobre la tipología de emisión en este género se recoge que *Q. coccifera* y *Q. ilex* emiten monoterpenos en lugar de isopreno y que *Q. suber* no emite ningún tipo de isoprenoide (Kesselmeier y Staudt 1999; Loreto 2002). La consideración de *Q. suber* como especie no emisora se encuentra actualmente en profundo estado de revisión, fundamentalmente tras los recientes estudios de Owen y colaboradores (2002) y Staudt y colaboradores (2004). Estos autores consideran a *Q. suber* como un fuerte emisor de monoterpenos. En la tabla IV.1 figuran los principales isoprenoides foliares emitidos por *Q. ilex* y *Q. suber* y recogidos en la bibliografía.

En *Q. ilex* se han llegado a detectar 19 monoterpenos, que representan la mayor diversidad de COVs entre 40 especies leñosas mediterráneas (Owen *et al.* 2001). Se suele considerar que entre el 70 y >80% de las emisiones totales de esta especie corresponden al α -pineno, β -pineno, mirceno, sabineno y limoneno. Owen y colaboradores (2001) encontraron que estos cinco compuestos predominantes eran emitidos a tasas elevadas (emisiones normalizadas mayores de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}\text{peso seco h}^{-1}$). Hay que resaltar la detección de cineol en la encina por algunos autores (Kesselmeier *et al.* 1997; Street *et al.* 1997; Owen *et al.* 2001), por tratarse de un compuesto que se asocia más típicamente con otras especies arbóreas –como el género *Eucalyptus*– y no haber sido detectado en otros trabajos posteriores.

Los estudios sobre emisión de COVs por *Q. suber* son mucho más escasos que para *Q. ilex*, debido a su consideración generalizada hasta el año 2004 como especie no emisora. Staudt y colaboradores (2004) lo equiparan a la encina en cuanto a los principales monoterpenos emitidos (α -pineno, β -pineno, mirceno, sabineno y limoneno), pero las tasas de emisión conjunta de estos cinco compuestos fueron mayores en encina que en alcornoque (entre 2,8 y 4,7 veces, según la población estudiada). Los triterpenos y derivados encontrados en hojas mediante extracción en frío por Monaco y Previtiera (1984) no parecen tener relevancia como COVs; en este sentido Kesselmeier y Staudt (1999) apuntan que no siempre existe correlación entre la concentración de monoterpenos en hojas y la emisión foliar.

Tabla IV.1. Principales isoprenoides foliares de *Q. ilex* y *Q. suber*. Se indica el porcentaje de emisión aproximado de cada compuesto respecto al total.

Especie	Tipo de compuesto	Compuestos (%)	Referencia
<i>Q. ilex</i>	Monoterpenos	α -Pino (32), β -Pino (22), Sabineno (9), Cineol (8), γ -Terpino (4), p -Cimeno (4), Limoneno (4), Canfor (3), α -Terpino (3), Mirceno (2), (α -Tujeno, α -Terpinoleno, α -Terpineol, α -Felandreno, β -Felandreno, Linalol, Tri-ciclono: <2 cada uno)	Kesselmeier <i>et al.</i> (1997)
		α -Pino (33), β -Pino (25), Mirceno (14), Sabineno (7), Limoneno (2), <i>Cis</i> - β -Ocimeno (4), <i>trans</i> - β -Ocimeno (1), Linalol (<1), otros 14 terpenos (13 juntos)	Loreto <i>et al.</i> (1998)
		α -Pino (42), β -Pino (26), Sabineno (22), Mirceno (6), Limoneno (<5), Cineol, α -Terpino, Cimeno, Triciclono, Isopreno, α -Tujeno, α -fenchono, Canfeno, α -Felandreno, 3-careno, γ -Terpino (4), α -Terpineol, <i>Cis</i> -ocimeno, <i>trans</i> -ocimeno	Owen <i>et al.</i> (2001)
		α -Pino (30-35), β -Pino (30), Mirceno (15-20), Sabineno (10-15), α -Tujeno, α -Felandreno, Canfeno, α -Terpineol, Terpinoleno	Sabillón (2002)
		α -Pino (29-37), β -Pino (21-24), Limoneno (11-27), Sabineno (11-21), Mirceno (6-14)	Staudt <i>et al.</i> (2004)
<i>Q. suber</i>	Metil ésteres de ácidos triterpénicos	Betulinato (17), Oleanolato (16), 3-O-acetil betulinato (9%), Oleanonato (6%), Betulonato (5%), 3-epibetulinato (4%)	Monaco y Previtera (1984)
	Triterpenos	Lupeol (17), Lupenona (3%), Betulina (9), Eritrodiol (12), Beta-amirina (7), Beta-amirenona (4), 3,28-O-Diacetil betulina (3), Aldehído oleanólico (2), (Aldehído betulínico, Aldehído betulónico, 3-aldehído epibetulínico: <2 cada uno)	Monaco y Previtera (1984)
	Monoterpenos	Limoneno (83), Sabineno (8), α -Pino (3), β -Pino (3), Canfeno (2)	Owen <i>et al.</i> (2002)*
	Monoterpenos	α -Pino (24-28), β -Pino (14-18), Limoneno (23-33), Sabineno (23-26), Mirceno (3-5)	Staudt <i>et al.</i> (2004)

(*) La especie estudiada se consideró inicialmente como *Q. suber*, pero tras los resultados los autores dudaron de la veracidad de esta identificación.

Es interesante destacar, llegados a este punto, que las altas emisiones de monoterpenos y sus derivados suelen considerarse más típicas de coníferas que de frondosas; y en cualquier caso, al cuantificar las emisiones de una determinada especie, es frecuente encontrar que los compuestos predominantes sean precisamente el α -pino y β -pino (Zhang y Schlyter 2004, resumiendo los resultados de diversos autores).

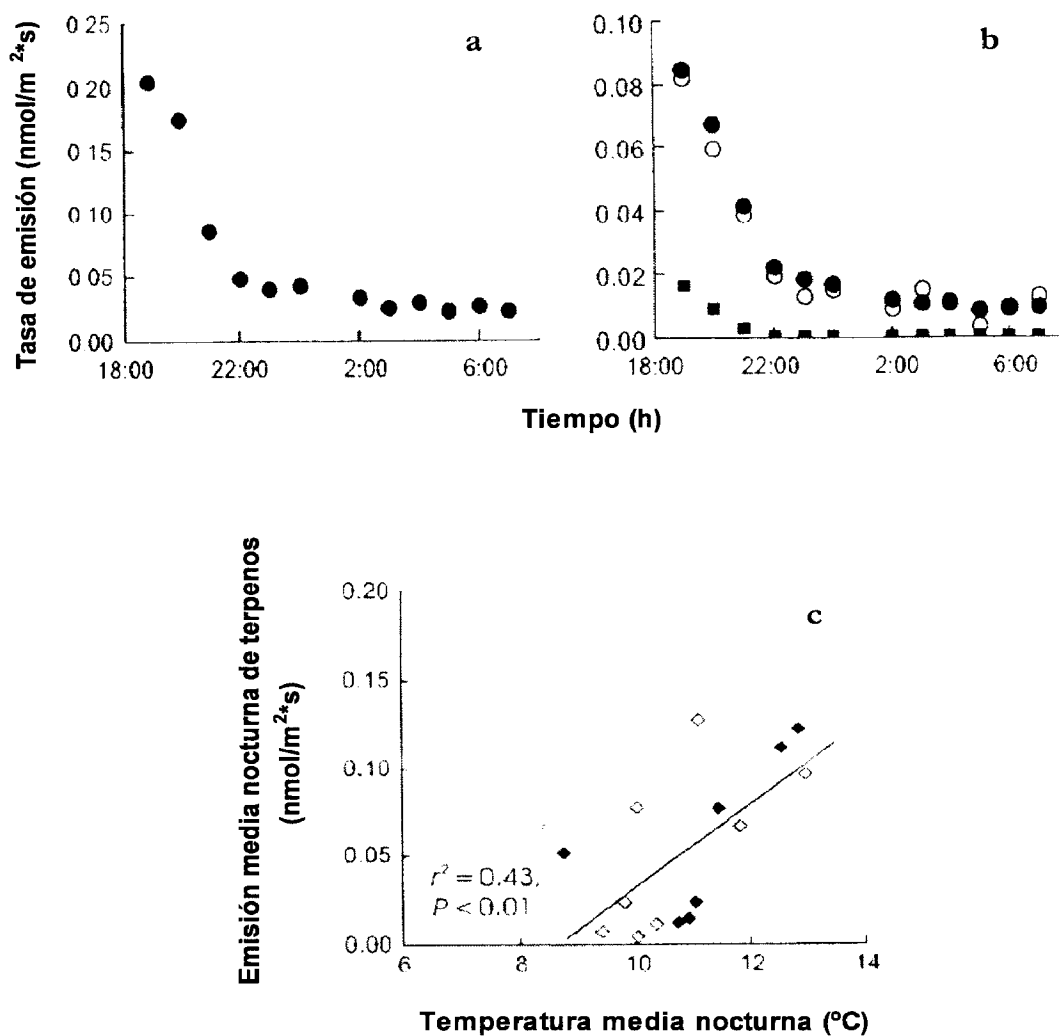
La emisión de monoterpenos en *Q. ilex* y *Q. suber* se ve afectada por los factores ambientales generales apuntados en párrafos anteriores. Así, se considera que la emisión por *Q. ilex* es dependiente de la luz y la temperatura (Bertin *et al.* 1997; Kesselmeier *et al.* 1997; Sabillón 2002; Staudt *et al.* 2003); mientras que la de *Q. suber* también podría ser dependiente de la luz (Owen *et al.* 2002). Loreto y colaboradores (1996a) encontraron una leve pero positiva influencia de la humedad relativa en la emisión de monoterpenos por *Q. ilex*; en cambio la regulación de la apertura de los estomas no influyó significativamente sobre la misma (los monoterpenos muestran la capacidad de atravesar la cutícula).

Muy vinculada con estos factores se encuentra la variación diaria y estacional de la emisión. A lo largo de un día la emisión sigue una evolución paralela a la transpiración foliar, a pesar de la escasa influencia de la regulación estomática. Esta variación es muy acentuada en

Q. ilex, para la cual se ha propuesto que la emisión de monoterpenos llega a cesar durante la noche, aproximadamente entre las 21:00h y las 6:00h, reanudándose a partir de este momento (Kesselmeier *et al.* 1997; Bertin *et al.* 1997). Pero estudios más recientes rechazan esta teoría, indicando que en *Q. ilex* y *Q. coccifera* la emisión foliar de monoterpenos continúa durante la noche entera (figura IV.1), aunque a una tasa baja (Niinemets *et al.* 2002); algo similar podría ocurrir en alcornoque considerando los resultados de Owen y colaboradores (2002).

Por otra parte, la tasa de emisión total en ambas especies varía fuertemente a lo largo del año (mayor en primavera-verano que en otoño-invierno, especialmente para *Q. suber*). Esta variación puede verse condicionada, además de por la luz y la temperatura, por la edad de las hojas, que puede provocar ligeros cambios en la composición y atenuaciones moderadas de la capacidad de emisión, tal y como se ha comprobado en *Q. ilex* (Staudt *et al.* 2003 y 2004).

Figura IV.1. Variación nocturna de la tasa de emisión global: a) de terpenos; b) de α pineno -círculo negro-, β -pineno -círculo blanco- y mirceno -cuadrado- en *Q. ilex* (Montpellier, octubre de 1996); c) relación entre la emisión nocturna de terpenos y la temperatura para *Q. ilex* -rombo blanco- y *Q. coccifera* -rombo negro- (Montpellier, julio de 1995 y octubre de 1996). Tomado de Niinemets y colaboradores (2002).



En cuanto a la variación intraespecífica de la emisión, Staudt y colaboradores (2004) sugieren que los compuestos dominantes en las emisiones de *Q. ilex* y *Q. suber* son siempre los mismos (los cinco principales); pero se produce una amplia variabilidad entre árboles respecto a las proporciones de estos cinco monoterpenos, que es explicada por la existencia de variabilidad genética en la síntesis de los mismos. Además, las fracciones medias de emisión de cuatro de estos compuestos (salvo el limoneno, cuya tasa de emisión mostró fuertes variaciones intraespecíficas) difieren significativamente entre las dos especies.

En esta variabilidad de emisión entre ejemplares se mantienen ciertos rasgos comunes, que permiten la clasificación de los ejemplares de ambas especies en grupos o tipos de perfil de emisión (Staudt *et al.* 2001a y 2004). Los tipos se definen según cuál sea, entre los cinco monoterpenos, la fracción dominante en la emisión global. A partir de 146 encinas (93 adultas y 53 plantas de dos años) los anteriores autores hallaron que en *Q. ilex* se podían establecer tres perfiles de emisión: "tipo pineno" (presente en el 71% de los pies; en los cuales la proporción de los dos isómeros del pineno suponía un 60-80% del total); "tipo limoneno" (21% de los árboles; con emisiones para este compuesto del 30-80% sobre el total); y "tipo mirceno" (8% de los ejemplares, en los que este volátil se emitió en la proporción del 60-90% del global de terpenos).

Un agrupamiento similar se pudo efectuar después en una muestra de 39 alcornoques (Staudt *et al.* 2004), encontrándose un 51% de ejemplares con emisiones "tipo pineno" y el 49% restantes de "tipo limoneno" (no encontraron emisiones "tipo mirceno", pero sí cuatro ejemplares que no emitieron ningún tipo de terpeno).

Estos perfiles cambian poco a lo largo del año para un árbol dado. Como excepción, Staudt y colaboradores (2003) encontraron como posible variación en el perfil de emisión en *Q. ilex* la inclusión del ocimeno. Por otro lado, las proporciones de limoneno y mirceno de los pies con estos tipos de perfil de emisión podían sufrir variaciones a largo plazo, determinadas por las condiciones de crecimiento de las plantas. Aunque en algunos casos se ha encontrado que la tasa de emisión global cambia según el perfil, presentando los tipos pineno y limoneno emisiones medias similares pero a tasas de casi la mitad de la emisión del perfil tipo mirceno (Staudt *et al.* 2001a), en trabajos recientes no se ha encontrado correlación entre la capacidad de emisión general y el perfil de emisión (Staudt *et al.* 2003).

Otro grupo de COVs emitidos por las plantas, que se han detectado en *Q. ilex* pero cuya presencia no se ha estudiado en *Q. suber*, son los ácidos orgánicos; entre ellos el ácido fórmico y el ácido acético son los dos emitidos en mayor proporción. La emisión diaria de estos ácidos sigue el patrón de evolución de la transpiración (Kesselmeier *et al.* 1997; Gabriel *et al.* 1999), en lo cual se parecen mucho a los terpenos, y se relaciona con la luz y la temperatura aunque parece más vinculada a la primera. También experimentan variación estacional, siendo la tasa de emisión en octubre aproximadamente la mitad que en mayo (Kesselmeier *et al.* 1997). Sin embargo el orden de magnitud de la emisión de estos compuestos es muy bajo comparado con los monoterpenos: en los primeros se expresa en $\mu\text{g g}^{-1}\text{peso seco h}^{-1}$, mientras que en los segundos se mide en $^1 \eta\text{g g}^{-1}\text{peso seco min}^{-1}$ (Kesselmeier *et al.* 1997; Kesselmeier y Staudt 1999).

Por último, uno de los grupos de COVs menos conocidos son los compuestos C₆-C₁₀ no terpenoides (GLV). Peñuelas y Llusà (2001) caracterizaron la emisión de compuestos de este

tipo para siete leñosas mediterráneas, entre las cuales se encontraba *Q. ilex*. Observaron que en esta especie se produjo la mayor diversidad de emisión (tres compuestos: 3-hexen-1-ol, 2-etoxietil acetato y fenol, de los cuatro encontrados entre las siete especies), con tasas similares a los terpenos y correlacionada significativamente con la temperatura y la variación estacional (máximos en verano y primavera). Ninguno de los demás factores estudiados (humedad relativa, tasa fotosintética, regulación estomática y déficit en la presión de vapor) tuvo efecto significativo sobre la emisión a escala estacional.

IV.1.2. La influencia de los “COVs” sobre el comportamiento de los insectos

Una vez que los compuestos volátiles son emitidos por una planta, cualquier organismo que los perciba puede verse afectado por ellos, o bien ser un potencial usuario de esta información (Langenheim 1994). En particular, la emisión de compuestos volátiles puede tener consecuencias desfavorables para la planta emisora. Los compuestos semioquímicos, y en particular las kairomonas, son una fuente de información clave utilizada por la mayor parte de insectos en su interacción reproductiva y con predadores, así como para localización de hospedantes (Dicke y Sabelis 1989; Wadhams 1992; Pickett *et al.* 1995).

Barata y colaboradores (2002) sintetizan los trabajos de varios investigadores que emplearon la técnica de CG-SCR para determinar semioquímicos procedentes de las plantas. En dichos estudios se encontraron respuestas selectivas de receptores neuronales olfativos frente a compuestos individuales dentro de la mezcla compleja liberada por la planta, empleándose concentraciones de estímulos fisiológicamente relevantes. Pero se conoce también la existencia de receptores altamente específicos que detectan volátiles considerados ubicuos en las plantas, como son los denominados GLV.

La mediación de volátiles de origen vegetal en la interacción insecto-planta hospedera es una cuestión bien apoyada documentalmente (Pickett *et al.* 1995). Son abundantes las citas bibliográficas en las que la actividad kairomonal de los COVs se centra principalmente, aunque no en exclusiva, sobre los terpenos y los compuestos GLV. En este sentido los trabajos de Van Beek y Groot (1986), Morgan y Mandava (1990), Pickett y colaboradores (1991), Byers (1995), y Allison y colaboradores (2004) constituyen claros ejemplos del papel que desempeñan los terpenos en la relación entre los insectos y las plantas; y Wadhams (1992) ilustra el papel desempeñado por los GLV.

Para que este modo de selección de hospedantes resulte eficaz, un insecto debería detectar los principales volátiles emitidos por sus hospedantes, así como algunos compuestos secundarios. Por otro lado, también debería percibir e interpretar las emisiones propias de especies no hospedantes, e incluso aquellas comunes a hospedantes y no hospedantes. Byers (1995) resume de forma clara una relación tipo entre insectos -en este caso escolítidos- y plantas. Según la misma un escarabajo ahorraría mucho tiempo y energía si pudiera discriminar por medio del olfato entre plantas no hospedantes y hospedantes, así como determinar la idoneidad de éstas, sin tener que volar hasta ellas. Cuando los insectos cayeran por error en plantas no hospedantes, la orientación olfativa de corto alcance les indicaría la inadecuación del pie; si el escarabajo no se decidiera aún, la horadación en el árbol durante un corto trecho le revelaría la carencia de estimulantes para la alimentación y/o la presencia de repelentes para la misma.

Son numerosos los trabajos en los cuales se manifiesta la relevancia, de cara al comportamiento de los insectos, de los volátiles más estimulantes en las pruebas de EAG. La existencia de este tipo de relación continúa siendo planteada y demostrada para diversas especies, como ha ocurrido para el crisomélido *Leptinotarsa decemlineata* (Dickens 2000), o para el lepidóptero polífago *Mamestra brassicae* (Rojas 1999) y el curculiónido polífago *Otiorhynchus sulcatus* (Van Tol y Visser 2002) frente a volátiles del grupo GLV. Recientemente se ha demostrado la capacidad atrayente o repelente de ciertos volátiles, que provocaron respuestas de EAG altamente significativas simultáneamente en cinco especies de dípteros transmisores de enfermedades (Birkett *et al.* 2004).

Para los cerambícidos, la localización de lugares adecuados para la puesta es una cuestión crítica, porque las larvas son generalmente incapaces de desplazarse entre hospedantes. Linsley (1959) consideraba ya que en este grupo de insectos el sentido del olfato es uno de los más importantes para la localización de hospedantes adecuados para las larvas. En este sentido, Hanks (1999) cita el ejemplo del género *Monochamus*, cuyos individuos son atraídos por terpenoides de los pinos y etanol. La ocurrencia de esta interacción en la familia Cerambycidae ha sido comprobada hasta el momento en más de 30 especies (Allison *et al.* 2004), habiendo sido abordada con cierta profusión en los últimos años (Ikeda *et al.* 1993; Meurer y Tavakilian 1997; Hanks *et al.* 1998; Berkov *et al.* 2000; McIntosh *et al.* 2001; Suckling *et al.* 2001; Groot y Nott 2001; Barata 1997; Barata *et al.* 1992, 2000 y 2002).

En los estudios que han conducido a estos resultados ocupan un papel destacado las pruebas electrofisiológicas, tales como los estudios de la respuesta de EAG. Barata (1997) sugirió que la respuesta de EAG provocada en *P. semipunctata* por el etanol y diversos monoterpenos cuya emisión por uno de sus principales hospedantes (*Eucalyptus globulus*) era conocida, indicaba algún tipo de función de dichos compuestos en la orientación química para la búsqueda de hospedantes. Relaciones de este tipo han sido comprobadas para otras especies, como *Demonax transilis* y *Anaglyptus subfasciatus* (Ikeda *et al.* 1993) y *Arhopalus tristis* (Suckling *et al.* 2001).

Por otro lado, los compuestos GLV están implicados frecuentemente en la mediación en el comportamiento de los insectos por los semioquímicos (Wadhams 1992). La emisión de GLV se considera común en las plantas, encontrándose variaciones sólo respecto a las sustancias implicadas y su proporción. Van Tol y Visser (2002) sostienen que para un insecto polífago los GLV pueden ser importantes de cara a la selección de hospedantes. Pero habitualmente se establecen preferencias por ciertas plantas, de modo que la emisión de GLV debe asociarse a otros tipos de volátiles para que la discriminación resulte eficaz.

Hasta hace pocos años era frecuente considerar que la relación insecto <> planta no hospedera se basaba precisamente en la ausencia de kairomonas, aunque cada vez fue tomando mayor fuerza la atribución a las alomonas de un papel importante como reveladoras de la inadecuación como hospederas de ciertas plantas (Pickett *et al.* 1995). Según Barata y colaboradores (2002) la discriminación de no hospedantes puede deberse tanto a la detección de componentes comunes a diversas plantas, que se presentan en proporciones no encontradas normalmente en los hospedantes, como a la identificación de compuestos más o menos específicos de plantas no hospederas, empleando para ello receptores neuronales específicos.

En este contexto, es interesante la afirmación de Van Tol y Visser (2002) según la cual los rangos de liberación de diferentes volátiles en el mismo tipo de disolución pueden variar, produciéndose efectos dosis-respuesta. En los estudios sobre la respuesta olfativa de los insectos frente a compuestos volátiles es inevitable trabajar con sustancias de muy variadas volatilidades, de manera que la interpretación de la respuesta olfativa debe ser cuidadosa por el riesgo de que altas volatilidades favorezcan la aparición de respuestas elevadas y enmascaren la capacidad estimulante real de las sustancias.

Pero la comparación de la respuesta frente a un abanico de volátiles es aún factible puesto que la variación de respuestas entre los mismos depende principalmente de la sensibilidad del sistema receptor (Van Tol y Visser 2002). Esta idea se ilustra claramente a partir del ejemplo de Primo (1991), cuando expone que las feromonas de lepidópteros suelen tener una volatilidad bastante baja, por lo cual la sensibilidad de sus antenas es muy grande. Dickens (2000) sostiene que las diferencias de volatilidad entre compuestos no impiden el establecimiento de comparaciones relativas entre las respuestas, y que las comparaciones son tanto más válidas cuanto más relacionados estén los compuestos.

Brockerhoff y Grant (1999) corrigieron la volatilidad de cinco sustancias elaborando concentraciones de aplicación distintas para cada una, de manera que su presencia en el pulso de aire que llega a la antena resultara equimolar. Tal corrección no modificó el rango relativo de respuestas entre los terpenos analizados [(-)- α -pineno, (-)- β -pineno y (-)-limoneno]; en cambio, para dos GLV [(*E*)-2-hexenal y (*E*)-3-hexenil acetato] ocurrió algo distinto: mientras que a dosis no corregidas el aldehído y el éster provocaron respuesta significativamente mayores que los terpenos, para las corregidas el aldehído originó respuestas significativamente menores que el (-)- α -pineno, (-)-limoneno y (*E*)-3-hexenil acetato.

La corrección del efecto de la volatilidad en la respuesta de EAG presenta el inconveniente de que habitualmente se emplea un número elevado de sustancias (20 a 40 e incluso más) por lo que el procedimiento que permite determinar el factor de corrección resulta muy engorroso. Por otra parte, tal corrección sería deseable en términos de rigor experimental, pero tal vez no se corresponda con una interpretación más precisa de lo que sucede en el campo, ya que uno de los factores que condiciona la emisión de volátiles por las plantas es precisamente su volatilidad (Niinemets *et al.* 2002; Peñuelas y Llusà 2002b), y tal emisión no es “corregida” para que su concentración en el aire sea siempre equimolar. Más aún, cabría pensar que el hipotético condicionamiento de la orientación de los insectos por parte de este tipo de volátiles debería llevar implícita cierta capacidad de respuesta diferencial en función de las concentraciones de los compuestos en el aire, determinadas, entre otras cosas, por su volatilidad, su persistencia o las tasas de síntesis de los mismos en la planta.

Finalmente, indicaremos que las pruebas dosis-respuesta para las sustancias que resulten de interés, sobre todo las que provocan mayores respuestas, ayudan a entender mejor la relación respuesta de EAG <> volatilidad. En el otro extremo, resultaría prudente no descartar totalmente el posible papel de sustancias que provocan bajas respuestas. En este sentido resulta muy interesante la reflexión de Barata (1997), según la cual en las especies que manifiestan preferencia por ejemplares con estrés fisiológico, como ocurre con *P. semipunctata*, no se debería minimizar la posible función del etanol, aun cuando éste resulte aparentemente poco estimulante. Esta relación preferencia <> estrés la explicó ya Byers (1995) para el escolítido *T. piniperda*, y parece apuntarse para *C. welensii* y *P. germari* (López *et al.* 2004).

En este capítulo se analiza la respuesta de EAG de *C. welensii* y *P. germari* frente a un amplio abanico de compuestos volátiles sintéticos. Entre ellos figuran compuestos que la bibliografía considera constituyentes del espectro de emisión característico de encinas y alcornoques, así como otros más típicos de especies no hospedantes o bien comunes a ambos tipos de plantas. A partir de los resultados obtenidos se intentará interpretar la importancia de la estimulación olfativa en la selección de hospedantes por parte de estos dos cerambícidos.

Para dicha interpretación resultará de gran ayuda el estudio de las correlaciones entre las respuestas encontradas frente a las diversas sustancias. Este análisis podría reportar dos tipos de información: por un lado, mostraría las sustancias cuya detección olfativa esté ligada, en sentido positivo o negativo, lo que podría sugerir agrupamientos que puedan caracterizar olfativamente las especies vegetales; por otra parte, permitiría establecer hipótesis sobre qué tipo de receptores neuronales –específicos o, por el contrario, generalistas– podrían estar implicados en la detección olfativa. También resultará útil el análisis de la relación dosis-respuesta para algunos de los compuestos más estimulantes, lo cual permitirá estimar la precisión con la que son detectados por los insectos ciertos volátiles.

IV.2. Material y Métodos

IV.2.1. Insectos empleados

Para el estudio de la respuesta provocada por volátiles sintéticos se emplearon, para la especie *C. welensii*, un total de cinco machos y siete hembras para 32 de las sustancias; con el ácido tánico se estudiaron tres machos y dos hembras diferentes a los 12 ejemplares anteriores. Con *P. germari* se emplearon cinco machos y dos hembras. El estudio se efectuó considerando el global de insectos para cada especie, salvo en los casos para los cuales la respuesta entre sexos difirió significativamente; en esta situación se analizó el comportamiento de cada sexo por separado. Para el análisis de la relación dosis-respuesta se emplearon, en *C. welensii*, cuatro insectos para cada compuesto excepto para el cineol, con el cual se emplearon cinco. Con *P. germari* se emplearon cinco insectos. Todos los ejemplares se capturaron en período de vuelo.

IV.2.2. Compuestos estudiados

Se estudió la respuesta de EAG provocada por 33 compuestos de origen vegetal pero con distinta procedencia: la mayoría de ellos (32) fueron compuestos sintéticos obtenidos comercialmente (tabla IV.2 y figura IV.2), mientras que la última sustancia se obtuvo en laboratorio mediante extracción con hexano a partir de exudado de alcornoque. Entre el conjunto de compuestos sintéticos se encuentran los principales volátiles emitidos por nuestras especies hospedantes de interés (*Quercus ilex* y *Q. suber*), y por algunas no hospedantes que con frecuencia se pueden encontrar asociadas a estas (*Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster*) o habitan en su vecindad (*Eucalyptus globus*, *E. camaldulensis*).

El extracto de exudado se obtuvo por un procedimiento similar al descrito por Wang y colaboradores (2002), a partir de exudado fresco recogido la noche anterior a la extracción y que se debe, probablemente, a extravasaciones de savia junto con residuos de la acción de bacterias del género *Botryosphaeria*. Un fragmento de corcho de 2,11 gramos totalmente impregnado se mantuvo durante 10 horas en un vial de plástico cerrado, con 10 ml de hexano (Fluka); transcurrido este tiempo se retiró el fragmento y se dejó evaporar el extracto hasta obtener aproximadamente 2 ml. Todo el proceso se llevó a cabo a la temperatura y humedad ambiente del laboratorio (26 a 30 °C; 40-50% HR).

Tabla IV.2. Características de las sustancias presentadas como estímulos olfativos a *C. welensii* y *P. gerrari*. I. Kováts= índice de Kováts; Qi=Q. *ilex*, Pp=*P. pinea*, Ph=*P. halepensis*, Eg=*E. globulus*, Ec=*E. camaldulensis*, Pr=*P. pinaster*, Qs= *Q. suber*, GLV=volátil de hojas verdes; H=foliar, C=cortical, P=fermentación anaerobia de tejidos internos; N= Pureza no determinada; S= Sigma-Aldrich; F= Fluka; P= Panreac; L=Laevo.

Compuesto	Sinónimos	Fuente	Pureza (%)	I. Kováts	Órgano emisor	Especie emisora
Monoterpenos						
(1R)-(+)- α -Pinoeno *#	-	S	>99	920	H	Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec,
(1S)-(-)- α -Pinoeno #*	-	S	N	920	H	Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec
β -Pinoeno	-	L	96	985	H	Qi, Qs, Pr, Eg, Ec
(R)-(+)-Limoneno ##	d-Limoneno, Carveno	S	97	≈ 1016	H	Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec
α -Terpinoeno	Terpinoeno	S	94	1020	H	Qi, Pr, Eg, Ec
γ -Terpinoeno	-	S	97	1058	H	Qi, Pr, Eg, Ec
Ocimeno *	-	F	N	≈ 1035	H	Qi, Pp, Pr, Eg, Ec
α -Felandreno	-	S	N	1009	H	Qi, Ec, Pr
Sabineno hidrato	Isotujol, 4-tujanol	F	>98	970	H	Qi, Qs, Pr, Ph, Ec
β -Mirceno	Mirceno	S	N	≈ 990	H	Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec
ρ -Cimeno	Paracimeno	F	>90	1025	H	Qi, Pr, Eg, Ec
Trementina #	-	P	99,5	<1000	C, H	<i>Pinus</i> spp.
Alcoholes monoterpénicos						
Linalol	Linalil alcohol	S	97	1085	H	Qi, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec
Cineol **	1,8-cineol, eucaliptol	S	99	1015	H	Pp, Pr, Eg, Ec, Q**
Terpineol ***	Terpenol	S	65	1289	H	Pp, Qi
Triterpenos y derivados						
Eritrodiol	-	F	>97		H	Qs
Betulina	-	S	>98		C, H	Qs
Lupeol	Lupenol	S	98		H	Qs
Friedelina	-	F	>98		C	Qs
Lupenona	-	S	N		H	Qs
"GLV"						
(Z)-3-hexen-1-ol	Alcohol foliar	S	98	844	C, H	Qi, Pr, Eg, Ec
(Z)-3-hexenil acetato	Éster foliar	S	N	988	H	Pr, Eg, Ec
(E)-2-hexenal	Aldehído foliar	S	98	826	H	Ubicuo
(Z)-2-hexen-1-ol	Alcohol foliar	S	>90		H	Eg, Ec
Compuestos fenólicos						
Ácido elágico	-	S	95		C	Qs, Qi
Ácido gálico	-	S	>98		C	Qs, Qi
Ácido tánico	-	S	N		C	Qs
Otros compuestos						
3-Metil-1-butanol	Alcohol amílico	F	>98,5	736	C	Qs
Etil propionato	Etil propanoato	F	>99,7	686	H	Eg, Ec,
Ácido acético	-	F	>99,5	710	H	Qi, Pp
Etanol	-	P	>99,5	651	P	Ubicuo
3-Hidroxi-2-butanona	Acetoina	F	>97	701	H	Pr, Eg, Ec,

(*) Mezcla de isómeros, principalmente α .

(**). Compuesto no detectado en *Q. ilex* por Sabillón (2002), pero sí citado por otros autores (Owen *et al.* 1997; Street *et al.* 1997; Kesselmeier *et al.* 1997).

(***). Mezcla de isómeros: 75% ocimeno + 25% limoneno.

(#). Mezcla de monoterpenos. Según el proveedor: α -pinoeno y β -pinoeno principalmente; 3-careno y canfeno como componentes menores.

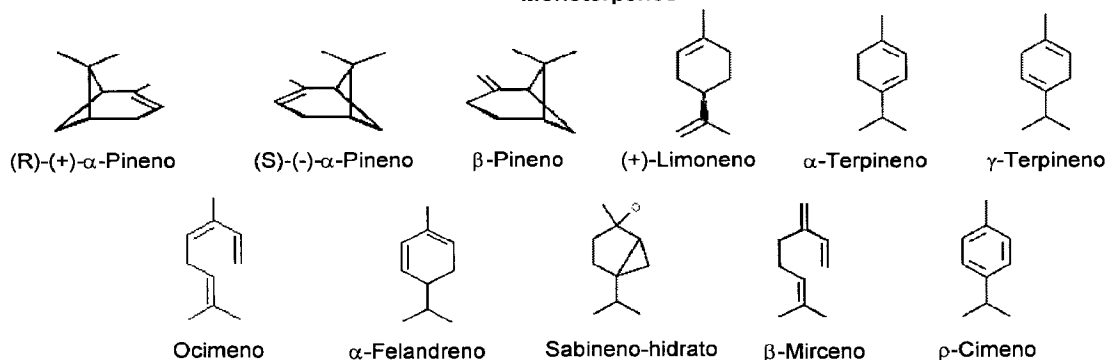
(*#). En adelante, (+)- α -pinoeno.

(#*). En adelante, (-)- α -pinoeno.

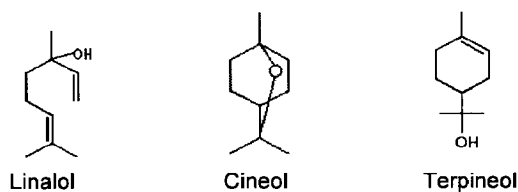
(##). En adelante, (+)-limoneno.

Figura IV.2. Estructura química de algunas de las sustancias presentadas como estímulos olfativos a *C. welensii* y *P. germari*.

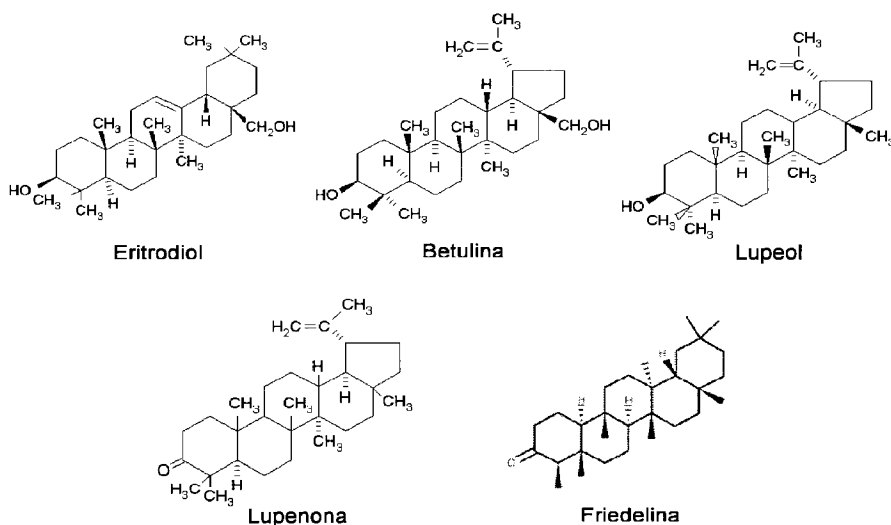
Monoterpenos



Alcoholes monoterpénicos



Triterpenos y derivados



Compuestos "GLV"



Compuestos fenólicos



IV.2.3. Metodología experimental

IV.2.3.1. Estudio de la respuesta de EAG frente a volátiles sintéticos

Las mezclas estimulantes consistieron en 20 microlitros de disolución de cada compuesto en hexano (50% v/v). Cada mezcla se depositó en una tira de papel Whatman N° 1, que posteriormente se introdujo en una pipeta Pasteur desechable de vidrio. A través de la pipeta cargada de esta manera con el estímulo, se inyectó un volumen de aire de 10 mililitros. La inyección se efectuó manualmente mediante una jeringa de plástico. Antes del sellado de la pipeta Pasteur se permitió la evaporación del solvente durante un tiempo aproximado de cinco minutos.

Cada sesión se inició con una inyección control de hexano, y se continuó con la aplicación de series de cuatro compuestos elegidos al azar, precedidas por una inyección del estímulo estándar ([*E*]-2-hexenal al 50% (v/v) en hexano para *C. welensii*, y esencia de trementina al 50% (v/v) en hexano para *P. germari*]. La frecuencia de estimulación en cada serie fue de un minuto, dejándose un tiempo de 10 minutos entre series distintas. A los diez minutos de finalizada la última serie se aplicó una nueva inyección del estándar, con el fin de disponer, también para esta serie, de dos respuestas frente a este estímulo.

IV.2.3.2. Análisis de la relación dosis-respuesta

Para ambas especies se escogieron las cuatro sustancias que provocaron mayores respuestas de EAG. En el caso de *C. welensii*, éstas fueron: cineol, beta pineno, (*E*)-2-hexenal y trementina. En *P. germari* fueron las siguientes: cineol, β -pineno, (-) α - pineno y trementina.

Para cada compuesto se elaboraron cinco disoluciones en hexano (10^{-4} hasta 1 v/v), preparándose para cada disolución tres pipetas Pasteur cargadas con 20 microlitros de la mezcla. El orden de aplicación de las series de estimulaciones correspondientes a los distintos compuestos se estableció al azar. Para cada uno de los compuestos, la serie consistió en tres inyecciones por cada dosis, aplicadas según una secuencia creciente de concentraciones. La frecuencia de aplicación de estímulos fue de un minuto, dejando un tiempo de entre 10 y 15 minutos entre series correspondientes a compuestos distintos.

Cada serie se inició con una inyección control compuesta exclusivamente por hexano y se continuó con una inyección de 20 microlitros de disolución 1:1 (v/v) en hexano del estímulo estándar (*E*)-2-hexenal, aplicación que se repitió al final de la serie. Los valores considerados para las respuestas de EAG correspondientes a cada concentración fueron los netos, estandarizados respecto a la respuesta neta media de las dos inyecciones del estímulo estándar.

IV.2.4. Análisis estadístico

IV.2.4.1. Secuencia del análisis

Los ejemplares de *C. welensii* empleados para el estudio de la respuesta de EAG frente a los volátiles sintéticos presentaban cierta heterogeneidad, ya que con algunos de ellos (dos machos y dos hembras) se emplearon capilares de diámetro en punta fina mayor a 170 micras en el electrodo de referencia. Por otra parte, en el grupo de las hembras dos ejemplares habían efectuado la puesta con anterioridad a la prueba de EAG, mientras que las cinco restantes lo hicieron con posterioridad. De esta manera, antes de estudiar las respuestas frente al conjunto de compuestos se analizó la posible influencia de estos dos factores.

Una vez efectuada esta comprobación previa se registró la respuesta de EAG del grupo de sustancias estudiado. La respuesta de cada compuesto se estandarizó respecto a la media entre dos inyecciones del estímulo estándar: la inicial de su serie y la inicial de la serie siguiente. Las respuestas brutas relativas obtenidas de esta manera se compararon posteriormente con la provocada por la inyección control, considerada como un tipo de estímulo más. Finalmente fueron seleccionados cuatro de los compuestos más estimulantes para cada especie, y con ellos se analizó la relación dosis-respuesta.

IV.2.4.2. Métodos estadísticos

En general, las pruebas estadísticas se efectuaron reuniendo los datos correspondientes a ambos sexos cuando las pruebas de Mann-Whitney y/o “t” de Student sugerían la ausencia de diferencias significativas entre machos y hembras. Para los compuestos que sí provocaron respuestas significativamente diferentes en los dos sexos, se consideró más adecuado mantener por separado las medias correspondientes a sexos distintos, salvo en el estudio de las correlaciones entre las respuestas.

El efecto del tamaño del capilar y la fecha de puesta sobre la respuesta de los individuos se analizó mediante la prueba de Mann-Whitney para cada uno de los compuestos estudiados. Las pruebas “t” y Wilcoxon se emplearon para comparar las respuestas medias provocadas por el conjunto de compuestos y la respuesta al control. La clasificación en conglomerados de los compuestos que presentaron diferencias significativas frente al control se efectuó mediante el procedimiento “Análisis de Conglomerados de K-medias”; previamente se decidió el número más adecuado de grupos entre un rango de dos a seis mediante la comparación de las soluciones dadas por la Vinculación de Ward (con distancia euclídea) y el Análisis de K-medias.

Finalmente, hay un aspecto que no es habitual incluir en este tipo de estudios, pero que puede ayudar a comprender el significado de las respuestas olfativas cuando se manejan grupos numerosos de sustancias: el análisis de las correlaciones entre las respuestas provocadas por cada compuesto. Para abordarlo se calculó el coeficiente de correlación de Spearman.

En el análisis dosis-respuesta se empleó en primer lugar la prueba de Mann-Whitney para detectar posibles diferencias de respuesta entre sexos frente al cineol para los ejemplares empleados; cuando no se detectaron tales diferencias se unieron los datos de ambos sexos.

Mediante el test de Kruskal-Wallis y la prueba ANOVA se compararon las medias entre compuestos para cada dosis. Dado que se trabajó con las respuestas relativas frente al estándar, cuando en la comparación estaba implicado alguno de dichos compuestos [(E)-2-hexenal en *C. welensii* y trementina en *P. germani*] a dosis de 1:1, se empleó la prueba “t” frente al valor $\mu=1$.

Por otro lado, para comparar medias entre dosis dentro de cada compuesto se emplearon las pruebas “t” o de Wilcoxon (según pudiera o no asumirse el requisito de normalidad). De manera análoga a la explicada anteriormente, cuando estuvo implicada la dosis 1:1 de los estímulos estándar, o bien dosis que provocaron respuesta “0” en todos los individuos, se empleó la prueba “t” de comparación de medias frente a los valores $\mu=1$ y $\mu=0$ respectivamente.

Por último, aunque se contaba con pocos ejemplares para cada tipo de compuesto, se realizó un análisis de regresión logística de tipo Probit, que permitió obtener una orientación sobre las concentraciones para las cuales se superaban determinados umbrales de respuesta. Para ello se cuantificó el número de individuos cuya respuesta superaba un valor prefijado. En nuestro caso nos interesaba conocer la concentración de la mezcla que provocara respuestas de EAG superiores al valor mínimo medible por el software empleado (20 microvoltios), en un determinado porcentaje de la población, que fue establecido en la mitad de los individuos.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Respuesta de EAG de *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean frente a compuestos volátiles característicos de especies arbóreas hospedantes y no hospedantes

IV.3.1.1. *C. welensii*

Las pruebas previas revelaron que ni el tamaño del capilar empleado ni la fecha de puesta en relación al momento de estudio de EAG, tuvieron efectos significativos sobre la respuesta de los insectos (Mann-Whitney: $p > 0,1$ en todo caso, considerando $n_{ant.}=2$ y $n_{post.}=3$; $n_{>170}=2$ y $n_{<170}=3$ en los machos; y $n_{>170}=2$ con $n_{<170}=5$ en las hembras). Por lo tanto el estudio se efectuó sobre el conjunto de insectos de que se disponía.

Las respuestas relativas de cada compuesto, expresadas como porcentaje respecto al estímulo estándar, se muestran en la tabla IV.3. La observación conjunta de las pruebas “t” y de Mann-Whitney reveló la existencia de dos compuestos para los que las respuestas presentaron diferencias entre sexos: cineol y ocimeno ($p < 0,01$ y $p < 0,05$; respectivamente); no obstante, las respuestas de las hembras resultaron superiores a las de los machos en la mayoría de los casos. Esta cuestión aconsejó mantener individualizadas las respuestas de machos y hembras frente a las dos sustancias, dado que ello podría proporcionar información valiosa sobre el comportamiento olfativo según el sexo. Para el resto de sustancias, en cambio, se unieron los datos correspondientes a machos y hembras.

Tabla IV.3. Estadísticos descriptivos de las respuestas brutas relativas de *C. welensii* frente al abanico de compuestos estudiado. El número de ejemplares se expresa, salvo para el cineol y el ocimeno, de la siguiente manera: $N_{hembras} + N_{machos}$. H/M= respuesta media de las hembras dividida por la de los machos.

Compuesto	N	Media (%)	DT (%)	H/M	Compuesto	N	Media (%)	DT (%)	H/M
Trementina	7 + 5	102,64	23,15	1,25	Terpineol	7 + 5	38,54	20,23	0,88
(E)-2-hexenal	7 + 5	100,00	-	0,7	Etil propionato	7 + 5	38,02	38,68	1,57
β -Pinoeno	7 + 5	99,28	19,50	1,10	Ácido acético	6 + 5	30,85	19,67	1,44
(-)- α -Pinoeno	6 + 5	93,11	28,11	1,34	3-hidroxi-2-butanona	7 + 5	22,49	18,57	1,03
(Z)-2-hexen-1-ol	7 + 5	88,35	27,68	0,96	Etanol	7 + 5	18,11	11,36	0,68
(Z)-3-hexen-1-ol	7 + 5	85,97	18,49	1,05	Ácido elálgico	7 + 5	16,63	18,78	1,48
α -Felandreno	7 + 5	85,74	34,45	1,29	Sabineno	6 + 5	15,62	11,97	1,11
(+)- α -Pinoeno	6 + 5	81,85	18,70	1,13	Hexano	7 + 5	13,55	10,78	0,44
3-Metil-1-butanol	7 + 5	77,18	28,60	1,14	Lupeol	6 + 5	13,53	15,56	0,71
α -Terpinoeno	7 + 5	69,47	10,84	1,19	Friedelina	7 + 5	13,27	14,07	0,85
(Z)-3-hexenil acetato	7 + 5	68,82	18,61	1,24	Ácido gálico	7 + 5	12,53	10,25	0,65
(+)-Limoneno	7 + 5	61,40	26,39	1,39	Extracto exudado	6 + 5	11,99	5,40	0,72
β -Mirreno	7 + 5	52,43	13,08	1,06	Eritrodiool	7 + 5	11,21	9,00	0,50
Linalol	5 + 5	48,24	14,40	1,19	Betulina	7 + 5	9,61	10,71	0,42
γ -Terpinoeno	7 + 5	46,24	15,24	1,23	Ácido tánico#	2 + 3	1,82	4,07	-
ρ -Cimeno	7 + 5	41,90	12,91	1,25					
Cineol*	7*	135,81	20,38	1,47	Ocimeno*	7*	52,94	14,06	1,63
Cineol**	5**	92,38	10,49	1,47	Ocimeno**	5**	32,49	7,80	1,63

(*). Todas hembras.

(**). Todos machos.

(#). Insectos diferentes a los empleados con las demás sustancias; para ellos, la respuesta relativa media frente al hexano fue del 2,45%. No se calculó la relación H/M, ya que las respuestas de las dos hembras fue = 0.

A partir de estos resultados, las pruebas de comparación de medias permitieron cuantificar la significación de las diferencias entre las respuestas a cada compuesto y la respuesta a la inyección control de hexano (tabla IV.4). Resultaron significativamente diferentes al control las respuestas provocadas por 20 compuestos: todos los monoterpenos salvo el sabineno, los alcoholes monoterpénicos, los compuestos GLV, el ácido acético y el 3-metil-1-butanol. La respuesta frente al extracto de exudado de alcornoque no se distinguió del control; tampoco lo hizo la obtenida a partir de los triterpenos foliares de *Q. suber*, del etanol ni del grupo de compuestos fenólicos corticales.

Tabla IV.4. Pruebas de contraste de medias entre las respuestas brutas relativas de *C. welensii* frente a cada compuesto y la provocada por la inyección control.

Compuesto <> Hexano	N	Diferencias		Prueba "t"			Prueba de Wilcoxon	
		Media	Desv. típ.	t	gl	Sig. (bilat.)	Z	Sig. (bilat.)
Trementina	12	89,09	29,73	10,382	11	0,000	-3,059	0,002
(E)-2-hexenal	12	86,45	10,78	-27,773	11	0,000	-3,059	0,002
β -Pino	12	85,73	19,63	15,126	11	0,000	-3,059	0,002
(-)-α-Pino	11	81,36	34,43	7,837	10	0,000	-2,934	0,003
(Z)-2-hexen-1-ol	12	74,80	27,10	9,560	11	0,000	-3,059	0,002
(Z)-3-hexen-1-ol	12	72,42	16,14	15,545	11	0,000	-3,059	0,002
α -Felandreno	12	72,19	34,35	7,281	11	0,000	-3,059	0,002
(+)-α-Pino	11	67,22	20,74	10,751	10	0,000	-2,934	0,003
3-Metil-1-butanol	12	63,64	28,08	7,849	11	0,000	-2,981	0,003
α -Terpino	12	55,92	18,18	10,654	11	0,000	-3,059	0,002
(Z)-3-hexenil acetato	12	55,28	24,54	7,803	11	0,000	-3,059	0,002
(+)-Limoneno	12	47,86	27,89	5,944	11	0,000	-3,059	0,002
β -Mirceno	12	38,88	13,00	10,363	11	0,000	-3,059	0,002
Linalol	10	32,14	13,94	7,294	9	0,000	-2,803	0,005
γ -Terpino	12	32,69	15,60	7,257	11	0,000	-3,059	0,002
ρ -Cimeno	12	28,35	14,85	6,613	11	0,000	-2,981	0,003
Terpineol	12	24,99	17,90	4,836	11	0,001	-2,981	0,003
Etil propionato	12	24,47	41,00	2,067	11	0,063	-1,778	0,075
Ác. acético	11	18,82	19,78	3,156	10	0,010	-2,756	0,006
3-hidroxi-2-butanona	12	8,94	22,05	1,405	11	0,188	-0,889	0,374
Etanol	12	4,56	15,58	1,013	11	0,333	-1,156	0,248
Ác. elágico	12	3,08	22,68	0,471	11	0,647	-0,000	1,000
Sabineno	11	1,51	16,77	0,298	10	0,772	-0,059	0,953
Lupeol	11	-0,59	19,84	-0,098	10	0,924	-0,357	0,721
Friedelina	12	-0,28	18,44	-0,053	11	0,959	-0,357	0,721
Ác. gálico	12	-1,02	14,52	-0,243	11	0,813	-0,089	0,929
Extracto exudado	11	-2,18	10,86	-0,666	10	0,520	-0,652	0,515
Eritrodiol	12	-2,34	12,53	-0,648	11	0,530	-0,533	0,594
Betulina	12	-3,94	14,44	-0,945	11	0,365	-0,622	0,534
Ác. tánico#	5	-0,63	1,40	-1,016	4	0,367	-1,342	0,180
Cineol (a)	7	127,01	22,93	14,652	6	0,000	-2,366	0,018
Cineol (b)	5	72,18	9,17	17,61	4	0,000	-2,023	0,043
Ocimeno (a)	7	44,14	12,03	9,707	6	0,000	-2,366	0,018
Ocimeno (b) *	5	12,29	9,60	2,861	4	0,046	-1,753	0,080

(a). Sólo entre hembras.

(b). Sólo entre machos.

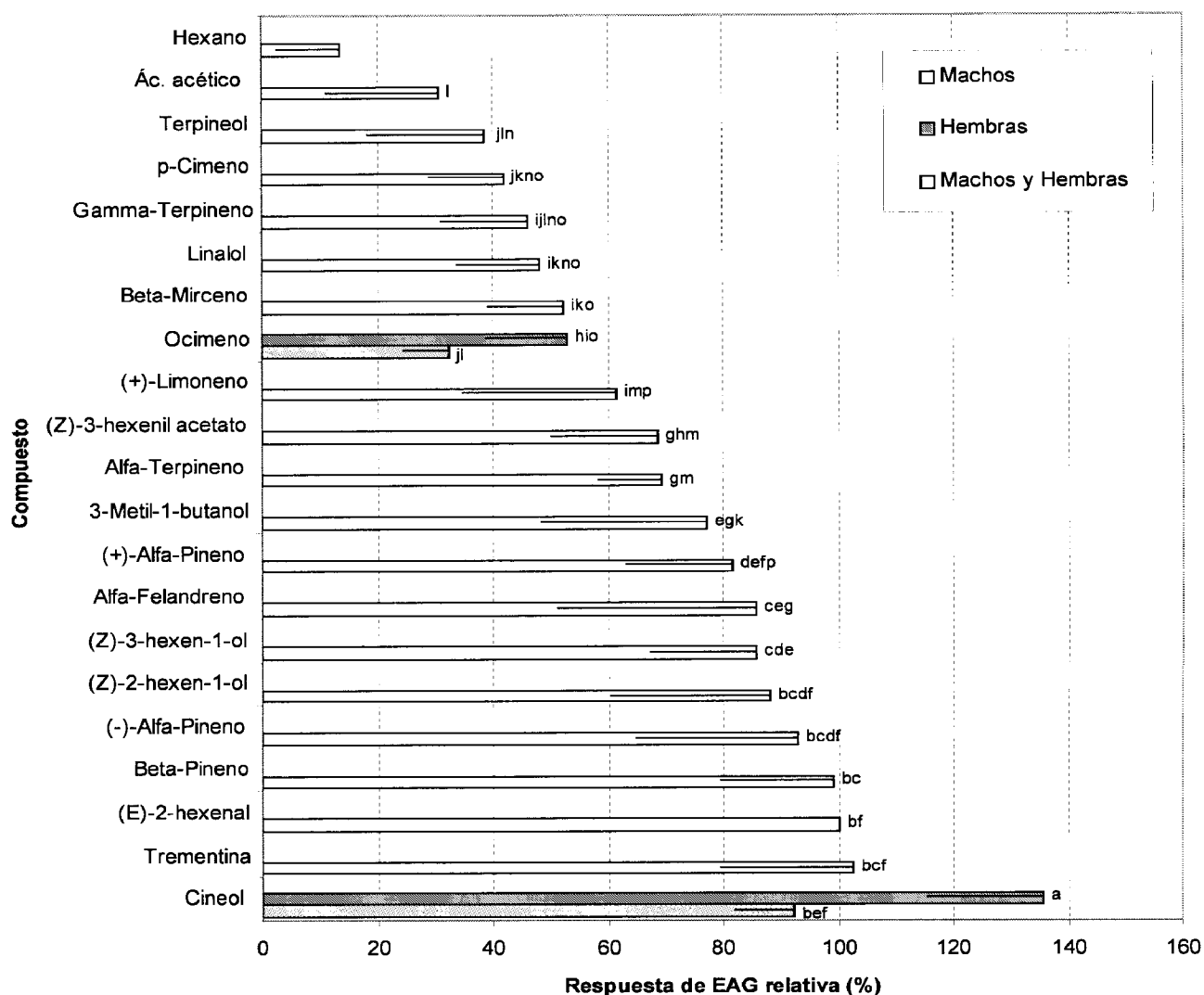
Los compuestos en **negrita** provocan respuestas significativamente diferentes a la del hexano, al nivel 0,05.

(*) Se ha considerado más fiable en este caso el resultado de la prueba "t".

(#). Insectos diferentes a los empleados con las demás sustancias; para ellos, la respuesta relativa media frente al hexano fue del 2,45%.

La figura IV.3 refleja las respuestas relativas medias de los 20 compuestos citados para el conjunto de machos y hembras, excepto para el cineol y ocimeno, para los cuales se reflejan por separado las respuestas de ambos sexos.

Figura IV.3. Respuestas brutas relativas frente a (*E*)-2-hexenal de *C. welensii* para los compuestos que se distinguieron del control. La línea horizontal en el extremo de cada barra indica la magnitud de la desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas.



Para el conjunto de los insectos, ninguno de las respuestas provocadas por los compuestos más estimulantes, al margen del (*E*)-2-hexenal, [trementina, , β -pineno y (-)- α -pineno] difirió significativamente del estándar. Si resultó, en cambio, significativamente mayor que el estándar la respuesta del cineol entre las hembras (prueba “t”, $p=0,004$; $n=7$). El valor medio alcanzado por este monoterpeno en las hembras ($135,81\% \pm 20,38$; media \pm DT) fue el mayor entre todas las sustancias probadas, tanto para el conjunto de individuos como por sexos. Otro monoterpeno -el terpeneol- y el ácido acético fueron los compuestos que provocaron las respuestas distinguibles del control más bajas para el conjunto de individuos ($38,54\% \pm 20,23$ y $30,85\% \pm 19,67$ respectivamente; media \pm DT).

En la figura IV.3 se muestran también los casos en que las respuestas fueron significativamente distintas entre compuestos; entre ellos podemos destacar los que atañen a compuestos relacionados estructuralmente, dichos casos se resumen a continuación:

- a) En relación con los isómeros estudiados, de los tres correspondientes al pineno se encontraron diferencias significativas entre el β -pineno y el (+)- α -pineno (prueba “t”: $p=0,016$; $n=12$). Por otro lado, en el grupo integrado por el (+)-limoneno, α -felandreno, α -terpineno y γ -terpineno (que denominaremos “grupo limoneno”) el efecto de la isomería en el terpineno fue muy significativo (Wilcoxon: $p=0,004$; $n=12$), y fue mayor la respuesta del α -felandreno que la del (+)-limoneno y γ -terpineno (Wilcoxon: $p=0,028$ y $p=0,004$ respectivamente; $n=12$). En cambio la posición del doble enlace no tuvo efecto significativo entre (Z)-2-hexen-1-ol y (Z)-3-hexen-1-ol (prueba “t”: $p=0,780$; $n=12$).
- b) En cuanto a los compuestos con analogía respecto al grupo funcional, en el grupo de los volátiles de hojas verdes hexacarbonados el (E)-2-hexenal resultó el más estimulante, aunque las diferencias con el (Z)-2-hexen-1-ol no resultaron significativas (prueba “t”: $p=0,173$; $n=12$); las menores respuestas las provocó el (Z)-3-hexenil acetato ($68,82\% \pm 18,61$). El β -mirceno, el linalol y el ocimeno (que nombraremos como “grupo mirceno”) no provocaron respuestas significativamente distintas entre sí ni en los machos ni en las hembras (prueba “t”: $p>0,05$; $n=5$ en cada caso). Por último, el terpineol -alcohol análogo del limoneno- originó respuestas significativamente menores que éste (Wilcoxon: $p=0,041$; $n=12$).

El agrupamiento de estas sustancias, incluyendo al estándar (E)-2-hexenal, a partir del análisis de conglomerados en función de la intensidad de las respuestas relativas que provocaron, se muestra en las tablas IV.5 y IV.6.

Tabla IV.5. Caracterización de los conglomerados formados con las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en *C. welensii*. La tipología de respuestas relativas se ha establecido tomando como referencia la empleada por Barata (1997): respuesta alta (>80%), respuesta media-alta (60-80 %), respuesta media-baja (40-60%) y respuesta baja (<40%).

	Conglomerado				
	1	2	3	4	5
Centro (respuesta en %)	114,10	93,58	71,74	46,31	34,70
Rango aprox. (respuesta en %)	> 103	85 a 103	61 a 82	41 a 53	30 a 39
Nº integrantes	1	7	5	5	2
Tipo de respuesta	Alta	Alta	Media-Alta a Alta	Media-baja	Baja

Tabla IV.6. Conglomerados de pertenencia para las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en *C. welensii*.

Compuesto	Conglomerado	Distancia al centro	Compuesto	Conglomerado	Distancia al centro
Cineol	1	0	α -Terpineno	3	2,27
Trementina	2	9,06	(Z)-3-hexenil acetato	3	2,92
(E)-2-hexenal	2	6,42	(+)-Limoneno	3	10,34
β -Pineno	2	5,70	β -Mirceno	4	6,124
(-)- α -Pineno	2	0,47	Linalol	4	1,93
(Z)-2-hexen-1-ol	2	5,23	γ -Terpineno	4	0,07
(Z)-3-hexen-1-ol	2	7,61	Ocimeno*	4	3,59
α -Felandreno	2	7,84	ρ -Cimeno	4	4,41
(+)- α -Pineno	3	10,11	Terpineol	5	3,85
3-Metil-1-butanol	3	5,44	Ácido acético	5	3,85

(*). Para el cineol y ocimeno se utilizó también la respuesta media del conjunto de insectos.

La clasificación que se consideró más adecuada implicó la formación de cinco grupos, uno de los cuales estaba representado exclusivamente por la respuesta provocada por el cineol. En el grupo 2 se encuentran otros compuestos altamente estimulantes, como los monoterpenos β -pineno, (-)- α -pineno y α -felandreno, la trementina y tres de los GLV [(E)-2-hexenal, (Z)-2-hexen-1-ol, (Z)-3-hexen-1-ol]. Las sustancias integrantes de los grupos 1 y 2 podrían considerarse los principales estimulantes olfativos para esta especie entre el abanico de compuestos probados. En el grupo 3 podríamos destacar la presencia del enantiómero (+) del α -pineno, el GLV restante [(Z)-3-hexenil acetato] y el 3-metil-1-butanol. El grupo 4 presenta ya respuestas muy discretas (inferiores al 60%) está encabezado por el ocimeno y en él destaca la presencia del limoneno y β -mirceno, dos de los cinco volátiles dominantes en las emisiones de *Q. ilex* y *Q. suber*. Los dos compuestos con respuestas más bajas (terpineol y ácido acético; que provocaron respuestas inferiores al 40%) se encuadran en el último grupo.

Para finalizar con esta especie se analizó la existencia de correlaciones entre las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control. Los resultados, referentes al conjunto de individuos, se exponen en la tabla IV.7. Dado que se trabajó con las respuestas relativas, no se incluyó en dicho análisis al estándar (E)-2-hexenal.

Tabla IV.7. Matriz de correlaciones ($R=R_{\text{Spearman}}$) entre compuestos que provocaron respuestas diferentes significativamente al control en *C. welensii*.

		Cineol	Tremen	β pineno	(-) α pin	2hexen	3hexen	Felan	(+) α pin	Metilbut	α terpin	3hexil	Limon	β mircen	Linalol	γ terpin	Ocimen	ρ cimen	Terpine	Acét
Cineol	R	1,000	0,678*	0,343	0,405	0,091	0,014	0,140	0,327	0,133	0,545	0,497	0,620*	0,154	0,406	0,322	0,552	0,252	-0,105	0,473
	N	12	12	12	11	12	12	12	11	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
Tremen	R	-	1,000	0,503	0,169	-0,308	-0,441	0,042	-0,027	-0,056	0,252	0,063	0,567	-0,210	0,188	-0,308	0,175	0,168	-0,573	0,564
	N	-	12	12	11	12	12	12	11	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
β pineno	R	-	-	1,000	0,100	0,175	-0,042	0,280	0,573	-0,063	0,231	-0,133	0,476	0,406	0,200	0,077	0,280	0,720*	-0,161	0,700*
	N	-	-	12	11	12	12	12	11	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
(-) α pin	R	-	-	-	1,000	0,096	-0,237	0,419	0,456	0,323	0,697*	0,200	0,112	0,050	-0,092	-0,200	0,456	0,255	0,182	0,358
	N	-	-	-	11	11	11	11	10	11	11	11	11	11	9	11	11	11	11	10
2hexen	R	-	-	-	-	1,000	0,336	0,308	0,527	0,273	0,469	0,413	0,119	0,294	-0,176	0,413	0,266	0,399	0,413	0,036
	N	-	-	-	-	12	12	12	11	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
3hexen	R	-	-	-	-	-	1,000	0,280	0,536	-0,056	-0,091	0,336	0,025	0,308	0,358	0,685*	0,413	0,035	0,650*	-0,327
	N	-	-	-	-	-	12	12	11	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
Felan	R	-	-	-	-	-	-	1,000	0,600	0,273	0,455	-0,056	0,109	0,462	0,212	0,147	0,783**	0,378	0,413	0,027
	N	-	-	-	-	-	-	12	11	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
(+) α pin	R	-	-	-	-	-	-	-	1,000	-0,018	0,582	0,318	0,319	0,455	-0,018	0,545	0,609*	0,609*	0,655*	0,321
	N	-	-	-	-	-	-	-	11	11	11	11	11	11	10	11	11	11	11	10
Metilbut	R	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,406	-0,231	0,312	0,112	0,236	0,245	0,231	0,420	0,308	0,264
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
α terpin	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,343	0,319	0,049	-0,091	0,140	0,497	0,455	0,357	0,173
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12
3hexil	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,361	-0,070	0,042	0,224	0,119	-0,021	0,140	-0,227
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	12	10	12	12	12	12	12
Limon	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,172	0,644*	0,217	0,109	0,683*	-0,014	0,536
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	10	12	12	12	12	12
β mircen	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,636*	0,615*	0,483	0,545	0,315	0,464
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	10	12	12	12	12	12
Linalol	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,552	0,248	0,406	0,067	0,400
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10	9
γ terpin	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,441	0,308	0,629*	0,045
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	12	12	11
Ocimen	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,203	0,329	0,164
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	12	12
ρ cimen	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,287	0,736**
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	12
Terpine	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	-0,245
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12
Acét	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) y (**). Correlaciones significativas al nivel 0,05 y 0,01 (bilateral) respectivamente.

Tremen= trementina; (-) α pin= (-) α pineno; 2hexen= (Z)-2-hexen-1-ol; 3hexen= (Z)-3-hexen-1-ol; Felan= α -felandreno; (+) α pin= (+) α -pineno; Metilbut= 3-metil-1-butanol; α terpin= α -terpineno; 3hexil= (Z)-3-hexenil acetato; Limon= (+)-limoneno; β mircen= β -mirceneno; γ terpin= γ -terpineno; Ocimen= ocimeno; ρ cimen= ρ -cimeno; Terpene= terpineol; Acét= ácido acético.

Se encontró correlación significativa en 17 emparejamientos (todas positivas; $0,609 \leq R_{\text{Spearman}} \leq 0,783$) pero los compuestos implicados fueron sólomente 16 (Cineol, trementina, α -felandreno, ocimeno, β -pineno, (+)- α -pineno, (-)- α -pineno, (+)-limoneno, α -terpineno, γ -terpineno, ρ -cimeno, terpineol, β -mirceno, linalol, (Z)-3-hexen-1-ol y ácido acético). La mayoría de ellos se pueden considerar pertenecientes, en cuanto a su estructura química, a dos grupos: derivados del pineno (tres compuestos) y “grupo” limoneno (cinco sustancias); entre los demás, dos tienen estructura relacionada con el mirceno.

El ρ -cimeno es el compuesto implicado en el mayor número de correlaciones significativas (cuatro), participando en ellas el β -pineno, (+)- α -pineno, (+)-limoneno y ácido acético). Siguen a este compuesto el γ -terpineno y el terpineol, que además de correlacionarse entre sí y con el (Z)-3-hexen-1-ol, participaron cada uno en otra correlación más: el primero con el β -mirceno, y el segundo con el (+)- α -pineno.

IV.3.1.2. *P. germari*

La prueba de Mann-Whitney reveló diferencias significativas entre machos y hembras ($p < 0,05$) únicamente para cuatro compuestos: linalol, betulina, sabineno y 3-hidroxi-2-butanona; sin embargo, en la mayoría de los casos la respuesta media de las hembras resultó superior a la de los machos. El escaso número de hembras aconsejó tratar con precaución la reunión o separación de los datos de ambos sexos. La tabla IV.8 presenta las respuestas relativas medias para el conjunto de individuos, con indicación del cociente entre la respuesta de las hembras y la de los machos. Estas últimas se detallan en la tabla IV.9.

Tabla IV.8. Estadísticos descriptivos de las respuestas brutas relativas del conjunto de individuos de *P. germari* frente al abanico de compuestos estudiado. El número de ejemplares se expresa de la siguiente manera: N_{machos} + N_{hembras}. H/M= respuesta media de las hembras dividida por la de los machos.

Compuesto	N	Media (%)	DT (%)	H/M	Compuesto	N	Media (%)	DT (%)	H/M
β-Pineno	5 + 2	119,21	24,71	0,74	Etanol	5 + 2	21,8	23,7	3,07
Cineol	5 + 2	113,70	20,72	1,04	ρ-Cimeno	5 + 2	20,00	29,03	1,15
(+)-α-Pineno	5 + 2	113,19	44,25	1,09	Terpineol	5 + 2	15,7	20,42	5,85
(-)-α-Pineno	5 + 2	100,58	31,96	0,92	Ácido acético	5 + 2	12,37	15,27	1,18
Trementina	5 + 2	100	-	1	Friedelina	5 + 2	9,59	10,93	1,09
β-Mirceno	5 + 2	60,38	35,84	0,67	Sabineno	5 + 2	7,84	12,23	20,2
Ocimeno	5 + 2	59,98	19,49	1,02	Eritrodiol	5 + 2	6,6	9,29	2,99
(E)-2-hexenal	5 + 2	56,57	35,40	0,81	Lupenona	4 + 1	4,81	8,81	22,1
α-Terpineno	5 + 2	56,04	28,10	1,2	Ácido tánico*	4 + 2	4,6	11,26	-
α-Felandreno	5 + 2	49,63	23,38	0,61	Ácido elágico	5 + 2	3,23	4,24	0,91
3-Metil-1-butanol	5 + 2	44,80	37,85	2,72	Ácido gálico	5 + 2	2,9	3,7	1,7
(Z)-3-hexen-1-ol	5 + 2	44,34	29,10	1,49	Etil propionato	5 + 2	2,62	4,69	4,3
(Z)-3-hexenil acetato	5 + 2	41,86	27,75	0,82	3-hidroxi-2-butanona*	5 + 2	1,71	3,35	-
(Z)-2-hexen-1-ol	5 + 2	37,84	26,25	1,96	Extracto exudado*	5 + 2	1,64	2,8	-
(+)-Limoneno	5 + 2	32,98	16,87	1,28	Lupeol*	5 + 2	1,5	3,98	-
γ-Terpineno	5 + 2	29,40	22,06	1,88	Betulina*	5 + 2	1,39	2,63	-
Linalol	5 + 2	25,9	27,76	4,2	Hexano	5 + 2	1,38	2,43	3,92

(*). No se encontró respuesta medible en alguno de los dos sexos.

Tabla IV.9. Estadísticos descriptivos de las respuestas brutas relativas de los machos de *P. germari* frente al abanico de compuestos estudiado.

Compuesto	N	Media (%)	DT (%)	Compuesto	N	Media (%)	DT (%)
β-Pineno	5	128,90	21,10	Etanol	5	13,71	18,84
Cineol	5	112,31	24,81	ρ-Cimeno	5	20,00	29,03
(+)-α-Pineno	5	110,20	53,80	Terpineol	5	6,58	14,72
(-)-α-Pineno	5	103,07	38,31	Ácido acético	5	11,77	17,77
Trementina	5	100	-	Friedelina	4	9,31	14,01
β-Mirceno	5	66,61	41,04	Sabineno	5	1,21	2,71
Ocimeno	5	59,69	23,56	Eritrodiol	5	4,21	6,94
(E)-2-hexenal	5	59,91	41,17	Lupenona	4	0,94	1,89
α-Terpineno	5	53,00	33,21	Ácido tánico	4	0,00	0,00
α-Felandreno	5	55,83	23,67	Ácido elágico	5	3,32	4,72
3-Metil-1-butanol	5	30,05	34,40	Ácido gálico	5	2,42	3,33
(Z)-3-hexen-1-ol	5	38,87	33,63	Etil propionato	5	1,35	3,01
(Z)-3-hexenil acetato	5	44,20	33,63	3-hidroxi-2-butanona	5	0,00	0,00
(Z)-2-hexen-1-ol	5	29,69	21,91	Extracto exudado	5	2,29	3,15
(+)-Limoneno	5	30,52	19,50	Lupeol	5	0,00	0,00
γ-Terpineno	5	23,48	24,00	Betulina	5	0,00	0,00
Linalol	5	13,53	19,10	Hexano	5	0,75	1,69

Tabla IV.10. Pruebas de contraste de medias entre la respuesta de *P. germari* frente a cada compuesto y la provocada por la inyección control. Sig. =significación bilateral.

Compuesto<>hexano	N	Diferencias		Wilcoxon		Compuesto	N	Diferencias		Wilcoxon	
		Media	DT	Z	Sig.			Media	DT	Z	Sig.
β-Pineno	6	118,95	27,61	-2,207	0,027	γ-Terpineno	7	28,02	20,82	-2,023	0,043
Cineol	6	114,37	21,84	-2,207	0,027	Etanol	7	20,42	23,42	-1,826	0,068
(+)-α-Pineno	7	111,81	44,11	-2,366	0,018	ρ-Cimeno	7	19,49	23,54	-1,826	0,068
(-)-α-Pineno	6	100,93	35,65	-2,201	0,028	Terpineol	7	14,32	18,38	-1,604	0,109
Trementina	7	98,62	2,43	-2,456	0,014	Ác. acético	7	10,99	14,57	-1,826	0,068
β-Mirceno	7	59,00	36,11	-2,366	0,018	Friedelina	6	7,99	11,51	-1,826	0,068
Ocimeno	7	58,60	19,90	-2,366	0,018	Eritrodiol	7	5,22	10,16	-1,095	0,273
(E) 2-hexenal	5	58,58	39,70	-2,023	0,043	Lupenona	4	5,07	10,15	-1,000	0,317
α-Terpineno	6	60,07	24,85	-2,201	0,028	Ác. tánico	6	3,62	11,98	-0,447	0,655
α-Felandreno	5	49,97	24,71	-2,023	0,043	Ác. elágico	7	1,86	4,64	-1,461	0,144
3-Metil-1-butanol	7	43,42	36,53	-2,023	0,043	Ác. gálico	7	1,53	2,39	-1,604	0,109
(Z)-3-hexen-1-ol	7	42,96	28,42	-2,201	0,028	Etil propionato	7	1,24	5,28	-0,535	0,593
(Z)3hexenil acetato	6	35,57	27,09	-2,023	0,043	Extracto exudado	7	0,26	3,38	0,000	1
(Z)-2-hexen-1-ol	7	36,46	25,95	-2,201	0,028	Lupeol	6	0,78	1,90	-1,000	0,317
(+)-Limoneno	7	31,60	15,84	-2,201	0,028						
Linalol (a)	2	53,88	26,28	-1,342	0,180	3-hidroxi-2-butanona (a)*	2	3,06	8,15	-0,447	0,655
Linalol (b)	5	12,78	17,80	-1,342	0,180	Betulina (a)*	2	1,94	1,41	-1,342	0,180
Sabineno (a)	2	21,49	5,79	-1,342	0,180						
Sabineno (b)	5	0,46	1,02	-1,000	0,317						

(a). Sólo entre hembras.

(b). Sólo entre machos.

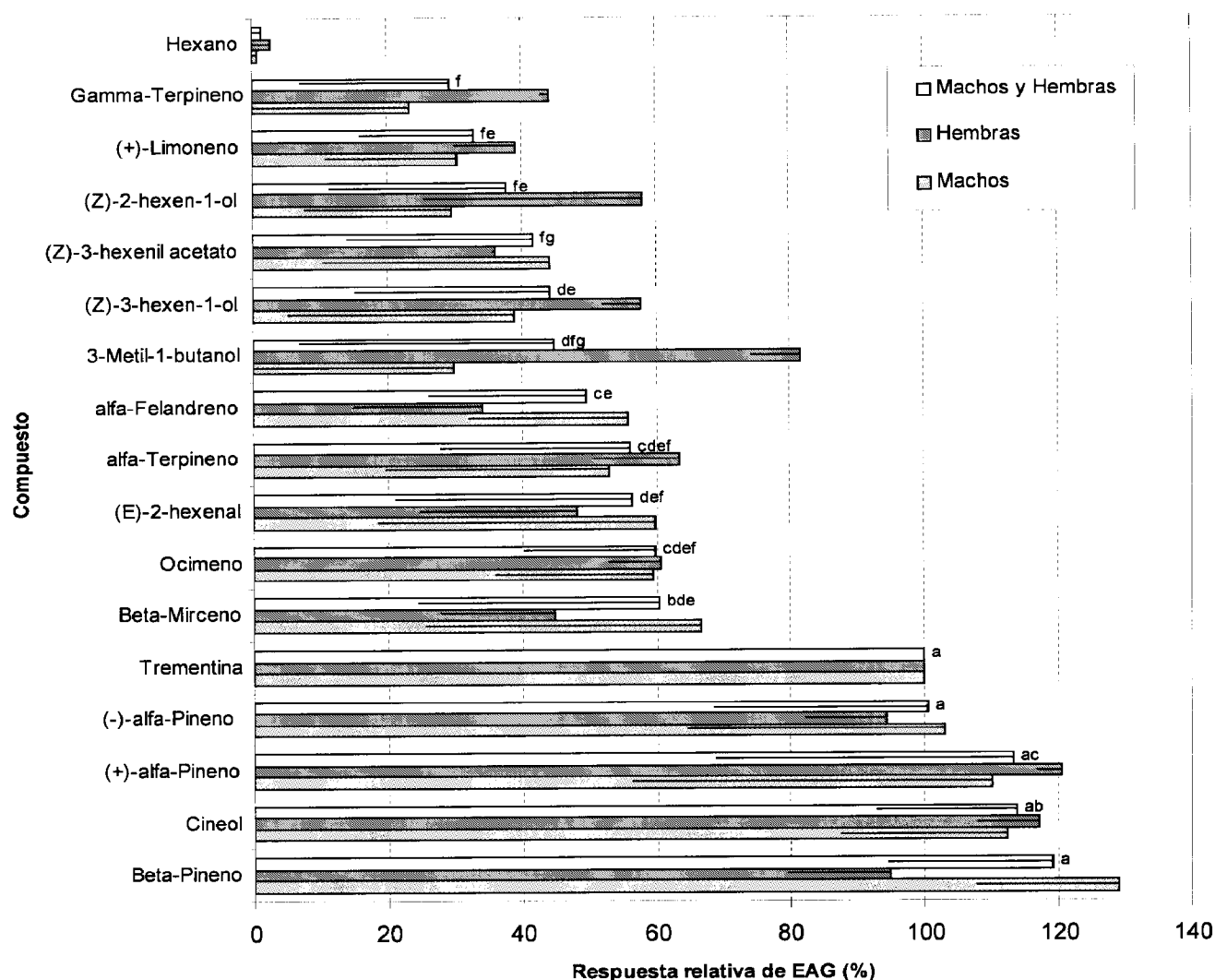
Los compuestos en **negrita** provocan respuestas significativamente diferentes a la del hexano, al nivel 0,05.

(*). En los machos no se encontró respuesta medible frente a estos compuestos.

Las respuestas provocadas por 16 compuestos fueron significativamente diferentes al control. En este grupo se encuentran la mayoría de monoterpenos (exceptuando el sabineno, linalol, terpineol y ρ-cimeno), los cuatro compuestos GLV y el alcohol 3-metil-1-butanol. En cambio no se distinguió del control la respuesta de los triterpenos foliares de *Q. suber*, tampoco la obtenida a partir del grupo de compuestos fenólicos corticales, del grupo de ácidos, del etanol ni del extracto de exudado de alcornoque.

El comportamiento de ambos sexos para los compuestos que provocaron estimulaciones distinguibles del control se ilustra en la figura IV.4. En ella se aprecia que los cinco últimos compuestos [(Z)-3-hexen-1-ol, (+)-limoneno, 3-metil-1-butanol, (Z)-2-hexen-1-ol y el γ-terpineno], que originaron en los machos respuestas relativas por debajo del 40%, provocaron en las hembras respuestas superiores. Las mayores diferencias se dieron para el 3-metil-1-butanol, el (Z)-2-hexen-1-ol, el (Z)-3-hexen-1-ol y el γ-terpineno. En el resto de compuestos la respuestas de ambos sexos tuvieron similar intensidad.

Figura IV.4. Respuestas brutas relativas frente a la trementina de *P. germari* para el conjunto de los individuos, los machos y las hembras frente a los compuestos que se distinguieron del control. La línea en el extremo de la barra indica la magnitud de la desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas.



De los cuatro compuestos que originaron las mayores respuestas relativas en los machos, al margen de la trementina (β -pineno, cineol, (+)- α -pineno, (-)- α -pineno), sólo la respuesta del β -pineno superó significativamente al estándar (prueba "t": $p = 0,038$; $n = 5$). Dicho compuesto provocó las respuestas relativas de mayor intensidad ($128,9 \% \pm 21,1$; media \pm DT) entre todas las sustancias estudiadas. No se encontraron, en cambio, diferencias significativas entre los cuatro primeros compuestos (Friedman: $p = 0,326$; $n = 4$). El compuesto que provocó en los machos las respuestas distinguibles del control más bajas fue el γ -terpineno ($23,28 \% \pm 24$; media \pm DT). Para las dos hembras las respuestas mayores se encontraron frente a los mismos cinco compuestos que los machos, añadiendo el 3-metil-1-butanol. El (+)- α -pineno provocó las estimulaciones de mayor intensidad ($120,66 \% \pm 3,72$; media \pm DT), mientras que el α -felandreno originó las más débiles ($34,11 \% \pm 19,11$; media \pm DT).

En cuanto a las respuestas provocadas por compuestos estructuralmente relacionados, se encontraron las siguientes situaciones:

- c) El tipo de isómero no tuvo efectos significativos respecto al pineno en los machos (Friedman: $p=0,472$; $n=4$). Tampoco se encontró entre el (Z)-2-hexen-1-ol y el (Z)-3-hexen-1-ol (Wilcoxon: $p=0,593$; $n=5$). Entre las respuestas de los compuestos del “grupo limoneno” [(+)-limoneno, α -felandreno, α -terpineno y γ -terpineno] tampoco hubo diferencias significativas (Friedman: $p=0,051$; $n=4$). En las hembras no se puede asegurar la significatividad de las diferencias. Los isómeros y enantiómeros del pineno provocaron altas respuestas, que decrecían según el orden siguiente: (-)- α -pineno > (+)- α -pineno > β -pineno. Los dos volátiles de hojas verdes produjeron respuestas relativas similares (alrededor del 60%). Por último, en el grupo relacionado con el limoneno el orden decreciente de respuestas encontrado (entre el 60 y el 30 % aproximadamente) fue el siguiente: α -terpineno > α -felandreno (+)-limoneno > γ -terpineno.
- d) Entre los compuestos con analogía respecto al grupo funcional, en el grupo de los volátiles de hojas verdes hexacarbonados no se encontraron diferencias significativas en las respuestas de los machos (Friedman: $p=0,265$; $n=3$). Tampoco se hallaron entre el β -mirceno y el ocimeno (respuestas relativas de alrededor del 60%. Wilcoxon: $p=0,893$; $n=5$). Para las hembras, los dos alcoholes foliares produjeron respuestas de similar intensidad y mayores que el éster foliar; por otro lado, la estimulación del ocimeno superó a la del β -mirceno (ambas por debajo del 60%).

El agrupamiento de estos compuestos en función de la respuesta relativa provocada se resume en las tablas IV.11 y IV.12.

Tabla IV.11. Caracterización de los conglomerados formados con las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en *P. germari*. La tipología de respuestas relativas se ha establecido tomando como referencia la empleada por Barata (1997): respuesta alta (>80%), respuesta media-alta (60-80 %), respuesta media-baja (40-60%) y respuesta baja (<40%).

		Conglomerados			
		1	2	3	4
Machos	Centro (respuesta en %)	128,90	106,40	59,01	32,80
	Rango aprox. (respuesta en %)	128,90	100 a 113	53 a 67	23 a 44
	Nº sustancias	1	4	5	6
	Tipo de respuesta	Alta	Alta	Media-baja	Baja
Hembras	Centro (respuesta en %)	118,91	92,76	60,14	41,22
	Rango aprox. (respuesta en %)	117-121	81-100	58-64	34-48
	Nº integrantes	2	4	4	6
	Tipo de respuesta	Alta	Alta	Media	Media-baja a baja

Tabla IV.12. Conglomerados de pertenencia para las sustancias que provocaron respuestas distinguibles del control en *P. germani*. Las flechas ligan la distinta ubicación de un mismo compuesto.

Machos			Hembras		
Compuesto	Conglomerado	Distancia al centro	Compuesto	Conglomerado	Distancia al centro
β -Pinoeno	1	0	(+)- α -Pinoeno	1	1,76
Cineol	2	5,92	Cineol	1	1,76
Trementina	2	6,40	Trementina	2	7,25
(-)- α -Pinoeno	2	3,33	(-)- α -Pinoeno	2	1,61
(+)- α -Pinoeno	2	3,81	β -Pinoeno	2	2,22
α -Felandreno	3	3,18	3-Metil-1-butanol	2	11,08
α -Terpineno	3	6,01	α -Terpineno	3	3,5
Ocimeno	3	0,68	Ocimeno	3	0,55
β -Mirceno	3	7,60	(Z)-2-hexen-1-ol	3	1,91
(E)-2-hexenal	3	0,90	(Z)-3-hexen-1-ol	3	2,14
(Z)-2-hexen-1-ol	4	3,11	(E)-2-hexenal	4	7,01
(Z)-3-hexen-1-ol	4	6,07	(Z)-3-hexenil acetato	4	5,18
(Z)-3-hexenil acetato	4	11,40	α -Felandreno	4	7,11
(+)-Limoneno	4	2,28	(+)-Limoneno	4	2,10
γ -Terpineno	4	9,32	γ -Terpineno	4	2,99
3-Metil-1-butanol	4	2,75	β -Mirceno	4	3,59

Entre los compuestos que provocaron las estimulaciones más intensas se formaron cuatro grupos para cada uno de los sexos. Los dos primeros grupos integraron, tanto en machos como en hembras, a las cinco sustancias más estimulantes (β -pinoeno, cineol, (+)- α -pinoeno), (-)- α -pinoeno y trementina); en este grupo se incluye además, para las hembras, el 3-metil-1-butanol. Mientras que la respuesta relativa media del grupo 1 supera claramente la respuesta al estándar en los dos sexos, la del grupo 2 sólo lo hace en el caso de los machos. En el grupo 3 de ambos sexos coinciden dos sustancias (α -terpineno y ocimeno) originando respuestas de tipo medio. Los compuestos GLV quedan englobados entre este grupo y el grupo 4, en el cual coinciden para ambos sexos dos compuestos emparentados: limoneno y γ -terpineno. La respuesta relativa en este grupo fue baja para los dos sexos, aunque las hembras mostraron tendencia hacia valores medios.

La tabla IV.13 muestra las correlaciones entre los compuestos cuya respuesta relativa se distinguió significativamente de la inyección control en el conjunto de individuos.

Tabla IV.13. Matriz de correlaciones ($R=R_{\text{Spearman}}$) entre los compuestos que provocaron respuestas significativamente diferentes al control en *P. gemari*. Cineol= cineol; β mircen= β -mirceno; 2-hexenal= (*E*)-2-hexenal; Ocimen= ocimeno; Felandre= α -felandreno; α -terpineno; 3hexeni= (*Z*)-3-hexenil acetato; 3hexen= (*Z*)-3-hexen-1-*l*; Metilbutano= 3-metil-1-butanol; 2hexen= (*Z*)-2-hexen-1-ol.

		β pineno	Cineol	(+) α pineno	(-) α pineno	β mircen	2-hexenal	Ocimen	Felandre	α terpinen	3hexenil	3hexen	Limoneno	Metilbutano	2hexen	γ terpineno
β pineno	R	1,000	-0,059	-0,493	0,103	0,348	0,462	-0,029	0,821	-0,058	0,058	0,058	0,147	-0,754	-0,696	-0,588
	N	6	6	6	6	6	5	6	5	6	6	6	6	6	6	6
Cineol	R	-	1,000	-0,319	-0,074	-0,696	0,462	-0,377	0,410	0,638	0,754	0,754	0,765	0,464	0,000	0,471
	N	-	6	6	6	6	5	6	5	6	6	6	6	6	6	6
(+) α pineno	R	-	-	1,000	-0,406	0,429	-1,000***	0,679	-0,700	-0,257	-0,429	-0,429	-0,306	0,126	0,000	0,072
	N	-	-	7	6	7	5	7	5	6	6	7	7	7	7	7
(-) α pineno	R	-	-	-	1,000	0,058	0,667	0,116	0,154	-0,667	-0,348	-0,145	-0,191	-0,116	0,203	-0,603
	N	-	-	-	6	6	5	6	5	6	6	6	6	6	6	6
β mircen	R	-	-	-	-	1,000	-0,200	0,643	0,300	-0,600	-0,829*	-0,286	0,072	-0,198	-0,071	-0,342
	N	-	-	-	-	7	5	7	5	6	6	7	7	7	7	7
2-hexenal	R	-	-	-	-	-	1,000	-0,900*	0,700	0,300	0,400	0,700	0,564	0,200	0,300	-0,051
	N	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ocimen	R	-	-	-	-	-	-	1,000	-0,400	-0,714	-0,771	-0,536	-0,198	-0,270	-0,321	-0,468
	N	-	-	-	-	-	-	7	5	6	6	7	7	7	7	7
Felandre	R	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,300	0,100	0,300	0,718	-0,300	-0,300	-0,205
	N	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5
α terpinen	R	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,886*	0,829*	0,638	0,543	0,143	0,812*
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	6	6	6	6	6
3hexenil	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,943**	0,522	0,543	0,143	0,580
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	6	6	6	6
3hexen	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,775*	0,739	0,571	0,685
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	7	7	7
Limoneno	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,509	0,342	0,600
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	7	7
Metilbutano	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,883**	0,809*
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	7
2hexen	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,577
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7
γ terpineno	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7

(*). La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
 (**). La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).
 (***). La correlación es significativa al nivel 0,001 (bilateral).

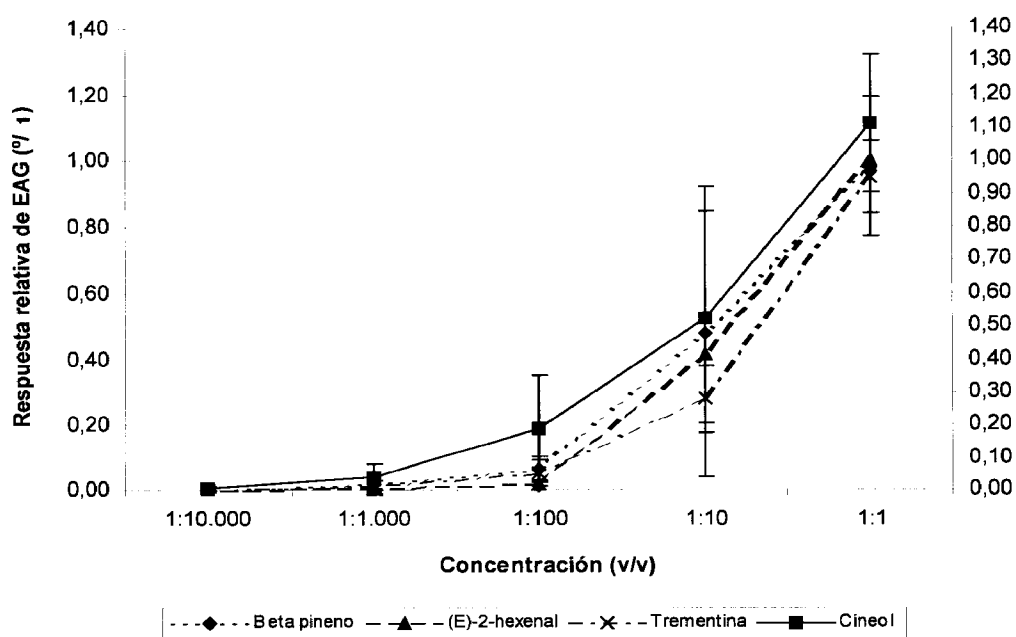
Se encontraron 10 emparejamientos en los que existió correlación significativa, ésta fue de signo negativo en tres casos ($-0,829 \leq R_{\text{Spearman}} \leq -1$) y positivo en los demás ($0,775 \leq R_{\text{Spearman}} \leq 0,943$). Los compuestos implicados fueron 11: los cuatro GLV; tres del “grupo limoneno” [(+)-limoneno, α -terpineno y γ -terpineno]; dos del “grupo mirceneno” (ocimeno y β -mirceneno); el (-)- α -pineno y el 3-metil-1-butanol. Destaca, así mismo, la triple correlación positiva entre el α -terpineno, el (Z)-3-hexenil acetato y el (Z)-3-hexen-1-ol.

IV.3.2. Relación dosis-respuesta de los compuestos volátiles que provocan una mayor respuesta en *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germari* Dejean

IV.3.2.1. Aplicación a *C. welensii*

La figura IV.5 muestra la variación de las respuestas netas relativas de EAG respecto a la concentración de la mezcla estimulante. Para el cineol, único de los compuestos empleados en este análisis que podía originar a priori respuestas distintas entre sexos, la prueba de Mann-Whitney no reveló la existencia de tales diferencias para ninguna de las concentraciones analizadas ($p > 0,1$). Por lo tanto el análisis se continuó uniendo los datos correspondientes a los dos sexos.

Figura IV.5. Relación dosis-respuesta para la estimulación relativa media (\pm 95% intervalo de confianza, $n=4-5$) provocada en *Cerambyx welensii* por cineol, β -pineno, (E)-2 hexenal y trementina. Estímulo estándar: (E)-2 hexenal 1:1 (v/v) en hexano.



La lectura a grandes rasgos muestra una fuerte dependencia dosis-respuesta para los cuatro compuestos, así como la ausencia de respuestas detectables para la dosis 1:10.000; por lo que se podría establecer como umbral de detección la concentración 1:1.000. Por otro lado, las respuestas continuaron aumentando hasta la mayor de las mayores concentraciones probadas. Las respuestas más altas se obtuvieron frente al cineol en todas las concentraciones, mientras que los valores más bajos se registraron para el (E)-2-hexenal hasta

la dosis 1:100, y a partir de aquí para la trementina. La observación conjunta de las pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA no reveló diferencias significativas entre compuestos para ninguna de las dosis estudiadas ($p > 0,05$).

Las diferencias entre compuestos comienzan a destacar para la mezcla 1:100, sobre todo para el cineol. A partir de esta dosis se aprecia un grado de mejora parejo de las respuestas, en particular para el beta pineno y el (*E*)-2-hexenal. Las pruebas de diferencias de medias entre las respuestas frente concentraciones distintas para el mismo compuesto revelaron un comportamiento similar para el cineol, trementina y (*E*)-2 hexenal. Para estas sustancias la respuesta a dosis de 1:1 difirió significativamente de las demás concentraciones, mientras que las medias correspondientes a 1:10 y 1:100 no se distinguieron y tampoco lo hicieron las halladas para 1:10.000, 1:1.000 y 1:100. Para el β -pineno, la respuesta a concentraciones de 1:1 superó significativamente a las demás salvo a la dosis 1:10; mientras que las medias para 1:1.000, 1:100 y 1:10 no se distinguieron significativamente. No se encontró respuesta medible para la dosis más baja en este compuesto (1:10.000).

El Análisis de Regresión Probit efectuado para cada uno de los compuestos y considerando como umbral de respuesta 20 microvoltios (la precisión del software de medición) arrojó los resultados que se muestran en la tabla IV.14.

Tabla IV.14. Concentraciones (v/v en hexano) de cineol, β -pineno, (*E*)-2-hexenal y trementina, frente a las cuales distintos porcentajes de población de *C. welensii* (50, 75 y 90%) presentan respuestas de EAG superiores al umbral de detección de 20 microvoltios.

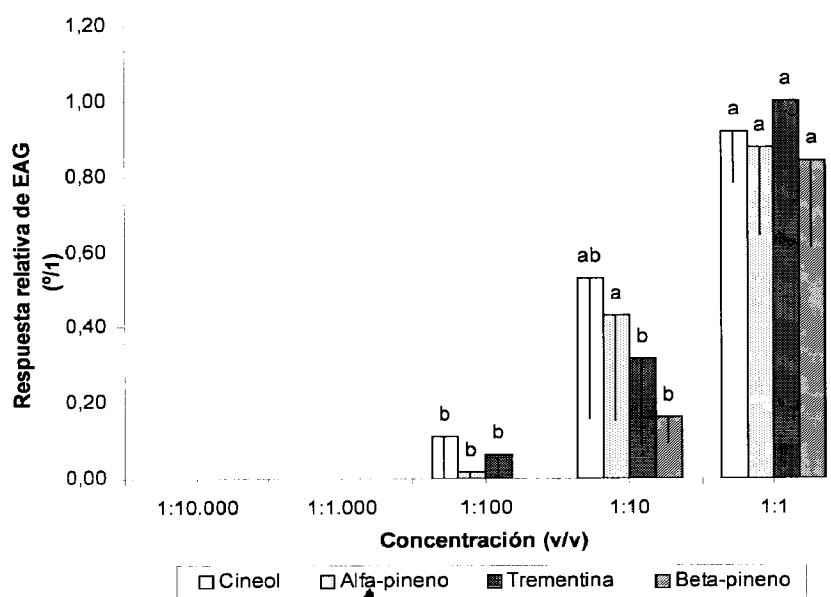
Compuesto	Ejemplares que superan el umbral de 20 microvoltios (%)	Concentración del estímulo (v/v)
Cineol	50	1:297
	75	1:56
	90	1:12
β -pineno	50	1:100
	75	1:19
	90	1:4
(<i>E</i>)-2-hexenal	50	1:32
	75	1:23
	90	1:17
Trementina	50	1:186
	75	1:59
	90	1:21

A partir de estos valores, podríamos considerar como concentración umbral para un determinado estímulo aquella a partir de la cual más de la mitad de los insectos estudiados produjeran respuestas netas superiores a 20 microvoltios. Esta concentración varió entre los distintos compuestos, obteniéndose la menor para el cineol (alrededor de 1:300 v/v), mientras que para el (*E*)-2-hexenal deberían aplicarse las mezclas estimulantes de mayor concentración (alrededor de 1:30). Tres de los cuatro compuestos (cineol, trementina y β -pineno) resultan detectados a concentraciones de 1:100 e inferiores por la mayoría de los individuos, mientras que ninguno de los compuestos estimularía un porcentaje importante de la población a disoluciones cercanas a 1:1000.

IV.3.2.2. Aplicación a *P. germari*

En esta especie se produce también una fuerte dependencia dosis-respuesta (fig. IV.6). Se evidenció asimismo que la disolución 1:100 puede considerarse como umbral de respuesta, mientras que las disoluciones más concentradas originaron respuestas siempre crecientes. Las respuestas más altas se obtuvieron en general frente al cineol salvo para la dosis 1:1, en la cual no superó a la trementina; el β -pineno originó las respuestas más bajas en todos los casos. El análisis conjunto de los resultados de las pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA no reveló diferencias significativas entre compuestos para ninguna de las dosis estudiadas ($p > 0,05$). En cambio, para cada compuesto, las respuestas medias a dosis distintas se comportaron de manera diferente (fig. IV.6).

Figura IV.6. Relación dosis-respuesta en *P. germari*, con intervalo de confianza al 95%, frente al cineol, α -pineno, trementina y β -pineno. Para cada compuesto, letras distintas indican diferencias significativas.



El Análisis de Regresión Probit efectuado para cada uno de los compuestos y el umbral de respuesta de 20 microvoltios (tabla IV.15), muestra que para que la detección pueda considerarse generalizada entre la población las disoluciones no deberían empobrecerse más allá del 1:15–1:30 aproximadamente. La trementina y el cineol serían, por este orden, los compuestos detectados por más del 50% de los individuos a partir de disoluciones menos concentradas; mientras que el β -pineno precisaría en todo caso las concentraciones más altas.

Tabla IV.15. Concentraciones (v/v en hexano) de cineol, β -pineno, (*E*)-2-hexenal y trementina, frente a las cuales distintos porcentajes de población de *P. germari* (50, 75 y 90%) presentan respuestas de EAG superiores al umbral de detección de 20 microvoltios.

Compuesto	Ejemplares que superan el umbral de 20 microvoltios (%)	Concentración del estímulo (v/v)
Cineol	50	1:27
	75	1:13
	90	1:6
β -pineno	50	1:12
	75	1:8
	90	1:7
(-) α -pineno	50	1:16
	75	1:11
	90	1:8
Trementina	50	1:32
	75	1:13
	90	1:6

IV.4. Discusión

IV.4.1. Las sustancias más estimulantes para *C. welensii* y *P. germari*, y su relación con *Q. ilex* y *Q. suber*

Esta es la primera vez, hasta donde conocemos, que se caracteriza la respuesta de EAG de *Cerambyx welensii* y *Prinobius germari*, los dos principales insectos xilófagos del género *Quercus* en Andalucía Occidental, frente a volátiles de origen vegetal. Se ha encontrado que ambas especies responden olfativamente de manera significativa ante un amplio abanico de compuestos característicos de la emisión tanto de hospedantes como de no hospedantes (al menos 20 para la primera especie y 16 para la segunda; tabla IV.16). La mayoría de estos compuestos son monoterpenos emitidos por vía foliar, pero también hay volátiles de hojas verdes (GLV), un alcohol alifático (3-metil-1-butanol) y, para *C. welensii*, un ácido no terpénico (ácido acético). Se ha encontrado, así mismo, respuesta en ambas especies frente la esencia de trementina, mezcla de monoterpenos en la cual suelen dominar, en este orden, el α -pineno y el β -pineno.

Tabla IV.16. Clasificación ordinal comparada entre las respuestas relativas de EAG de *C. welensii* y *P. germari* frente a sus principales estimulantes, y la encontrada para los mismos en *Phoracantha semipunctata* y *Otiorhynchus sulcatus*.

Compuesto	Clasificación ordinal de la respuesta relativa				Índice Kováts	Órgano emisor	Especie emisora
	<i>C. welensii</i>	<i>P. germari</i>	<i>P. semipunctata</i> *	<i>O. sulcatus</i> #			
Monoterpenos							
(1R)-(+)- α -Pineno	9	3	5	7	920	H	<i>Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec</i>
(1S)-(-)- α -Pineno	5	4	5	6	920	H	<i>Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec</i>
β -Pineno	4	1	4	8	985	H	<i>Qi, Qs, Pr, Eg, Ec</i>
(R)-(+)-Limoneno	13	15	7	10	≈ 1016	H	<i>Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec</i>
α -Terpineno	11	9	9	14	1020	H	<i>Qi, Pr, Eg, Ec</i>
γ -Terpineno	16	16	-	15	1058	H	<i>Qi, Pr, Eg, Ec</i>
Ocimeno	17	7	-	11	≈ 1035	H	<i>Qi, Pp, Pr, Eg, Ec</i>
α -Felandreno	8	10	8	12	1009	H	<i>Qi, Ec, Pr</i>
β -Mirceno	14	6	12	13	≈ 990	H	<i>Qi, Qs, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec</i>
ρ -Cimeno	18	-	13	-	1025	H	<i>Qi, Pr, Eg, Ec</i>
Trementina	2	5	-	-	<1000	C, H	<i>Pinus spp.</i>
Alcoholes monoterpénicos							
Linalol	15	-	10	3	1085	H	<i>Qi, Pp, Ph, Pr, Eg, Ec</i>
Cineol	1	2	6	5	1015	H	<i>Pp, Pr, Eg, Ec, Qi**</i>
Terpineol	19	-	-	4	1289	H	<i>Pp, Qi</i>
"GLV"							
(Z)-3-hexen-1-ol	7	12	3	1	≈ 844	C, H	<i>Qi, Pr, Eg, Ec</i>
(Z)-3-hexenil acetato	12	13	14	9	988	H	<i>Pr, Eg, Ec</i>
(E)-2-hexenal	3	8	1	2	826	H	<i>Ubicuo</i>
(Z)-2-hexen-1-ol	6	14	11	-	844	H	<i>Eg, Ec</i>
Otros compuestos							
3-Metil-1-butanol	10	11	2	-	736	C	<i>Qs</i>
Ácido acético	20	-	-	-	710	H	<i>Qi, Pp</i>

(*). Estándar (E)-2-hexenal. Concentraciones de estimulación de 10^3 ppm (Barata *et al.* 2000).

(#). Estándar (Z)-3-hexenol. Concentraciones de estimulación de 1:100 (Van Tol y Visser 2002).

Es habitual en este tipo de estudios concentrar la atención sobre los volátiles más estimulantes (según la tipología de Barata 1997, aquellos de repuesta relativa >80%). Esto es debido al riesgo de que en una respuesta de baja intensidad (valor relativo inferior al 60%) pueda existir una alta contribución de receptores olfativos adaptados para responder frente a estructuras químicas relacionadas, en lugar de ser el propio compuesto analizado el responsable (Barata 1997). Bajo este planteamiento, hemos encontrado nueve compuestos muy estimulantes para *C. welensii* entre el abanico de volátiles estudiados; y seis para *P. germari*. Las respuestas más intensas en la primera especie las provocaron, en orden decreciente, los siguientes compuestos: cineol, trementina, (*E*)-2-hexenal, β -pineno y (-)- α -pineno, (*Z*)-2-hexen-1-ol, (*Z*)-3-hexen-1-ol, α -felandreno y (+)- α -pineno. En el caso de *P. germari*, fueron: β -pineno, (+)- α -pineno, cineol, (-)- α -pineno, trementina y 3-metil-1-butanol.

Considerando los principales volátiles foliares emitidos por *Q. ilex* y *Q. suber* (α -pineno, β -pineno, mirceno, sabineno y limoneno; en orden decreciente de importancia. Tabla IV.1, página 129), se encuentra que ambos xilófagos detectan con intensidad cuatro de las cinco sustancias emitidas en mayor cantidad por ambas fagáceas. Dos de estas sustancias (α -pineno y β -pineno), que son emitidas por *Q. ilex* y *Q. suber* a tasas muy elevadas (tablas IV.17 y IV.18), son percibidas con intensidades relativas altas (>80%) por los dos cerambícidos. También son detectadas por ambas especies, aunque de forma más discreta, isómeros del mirceno y limoneno. El sabineno resultó el único volátil con emisiones relevantes en estas especies que no provocó respuesta significativa en ninguno de los dos insectos.

Tabla IV.17. Tasas superiores de emisión de isopreno y global de monoterpenos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco $\cdot\text{h}^{-1}$) para los principales hospedantes de *C. welensii* y *P. germari* (*Q. ilex* y *Q. suber*), otros hospedantes secundarios así como especies no hospedantes (a partir de Kesselmeier y Staudt 1999 y Staudt *et al.* 2004). Los valores separados por guiones para un mismo género indican variación entre especies.

	Especie	Isopreno	Monoterpenos ^{##}
Hospedante principal	<i>Q. ilex</i>	<0,2 [*]	58
	<i>Q. suber</i>	<0,1 [*]	41,5
Hospedante secundario	<i>Pistacia</i> spp.*	-	0,41-9
	<i>Ceratonia siliqua</i> **	-	<3
	<i>Morus</i> spp.*	-	1,6
	<i>Populus</i> spp.*	37-146	0-4,6
	<i>Salix</i> spp.*	12,5-115	0-0,33
	<i>Q. pyrenaica</i> **	59	0,3
	<i>Platanus</i> spp.**	10,9-27,5	-
	<i>Eucalyptus globulus</i>	57	9,2
No hospedante	<i>Pinus pinea</i>	-	15
	<i>Pinus halepensis</i>	-	1
	<i>Juniperus</i> spp.	<0,08	0,77-0,96
	<i>Olea europaea</i>	-	0,5

(*). Citados exclusivamente para *P. germari*.

(**). Citados exclusivamente para *C. welensii*. La correspondiente a *Q. pyrenaica* procede de observación propia.

([#]). Emisiones que pueden deberse a hibridaciones con otras especies típicamente emisoras de isopreno, como *Q. canariensis* (Staudt *et al.* 2004).

(^{##}). En su mayoría, α -pineno, β -pineno, mirceno, sabineno y limoneno.

Tabla IV.18. Tasas de emisión comparadas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco $\cdot\text{h}^{-1}$) de α -pineno y β -pineno para diferentes especies hospedantes y no hospedantes de *C. welensii* y *P. germari* (según la recopilación de Mannschreck *et al.* 2002).

Especie	α -pineno		β -pineno	
	Tasa inferior	Tasa superior	Tasa inferior	Tasa superior
<i>Quercus ilex</i>	5,4	53,2	5	5
<i>Quercus coccifera</i>	7,9	7,9	7,5	7,5
<i>Quercus petraea</i>	0	0,1	0	0,3
<i>Fagus sylvatica</i>	0	0,1	0,1	0,1
<i>Eucalyptus globulus</i>	0,1	1,2	0,1	0,1
<i>Pinus sylvestris</i>	0,7	1,1	0	0,1
<i>Betula pendula</i>	0	0,1	-	-
<i>P. halepensis</i> y <i>P. pinaster</i>	0	0,1	-	-
<i>Cupressus sempervirens</i>	0	0,1	-	-

Las respuestas de EAG más altas en *C. welensii* y *P. germari* se producen, pues, frente a un pequeño grupo de monoterpenos ampliamente conocidos y que son, además, emitidos por *Q. ilex* y *Q. suber* en cantidades consideradas de las más altas entre las especies emisoras de monoterpenos; en particular, entre leñosas mediterráneas que los acompañan frecuentemente (Kesselmeier y Staudt 1999; Owen *et al.* 2002; Staudt *et al.* 2004).

IV.4.2. Una hipótesis para la selección de hospedantes por *C. welensii* y *P. germari* a partir de estímulos olfativos

Una hipótesis sobre la participación de compuestos volátiles en la localización de hospedantes por *C. welensii* y *P. germari* debería considerar tres elementos clave: 1) los volátiles detectados con mayor intensidad desempeñan un papel preponderante; 2) la proporción en que son emitidos los cuatro monoterpenos principales de *Q. ilex* y *Q. suber* que son detectados olfativamente por los dos cerambícidos (α -pineno, β -pineno, limoneno y mirceno) inducen una discriminación positiva; y 3) la referencia olfativa que supone la detección, especialmente por las hembras, de volátiles ausentes de sus principales hospedantes o bien poco frecuentes en los mismos, como el cineol, la trementina y, tal vez, el (*E*)-2-hexenal, representa una discriminación negativa.

La magnitud orientativa de la emisión de volátiles a partir de ejemplares de *Q. ilex* de distinto tamaño, se estima en los valores que se recogen en la tabla IV.19. Para ello se ha considerado una tasa de emisión media de $\approx 0,05 \eta\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para el intervalo de 20.00 a 22.00 horas, y $\approx 0,015 \eta\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a partir de las 22.00 horas (Niinemets *et al.* 2002). La superficie foliar media empleada ha sido la obtenida considerando un Índice de Área Foliar (LAI) de $3,73 \text{ m}^2/\text{m}^2_{\text{cobertura}}$ (valor medio entre los 2,96 de Joffre *et al.* 1996 y los 4,5 de Cutini 2002). La cobertura de copa según la circunferencia del arbolado se obtuvo a partir de Montoya (1993).

Tabla IV.19. Emisión de α -pineno y β -pineno estimada para un ejemplar de *Q. ilex* en función de su tamaño. CN= circunferencia a la altura de 1,30 m; Cob.= cobertura de la copa; SFE= superficie foliar estimada.

CN (cm)	Cob. (m ²)	SFE (m ²)	E _{árbol} (μ mol/h)		E _{árbol} (mg/h)	
			20.00h – 22.00h	> 22,00 h	20.00h – 22.00h	> 22,00 h
45-59	16	59,68	10,74	3,22	1,46	0,44
120-134	66	246,18	44,31	13,29	6,04	1,81
210-224	159	593,07	106,75	32,03	14,54	4,36

Estas tasas de emisión, sobre todo las correspondientes a los árboles más grandes y antes de anochecer, son totalmente comparables a las tasas de liberación empleadas usualmente en las trampas cebadas para la atracción de cerambícidos xilófagos, como los del género *Monochamus*. Así, para trampas cebadas con α -pineno, el rango de liberación está comprendido entre 6,25 mg/h (De Groot y Nott 2004) y \approx 87,5 mg/h (Allison *et al.* 2001; Pajares *et al.* 2004).

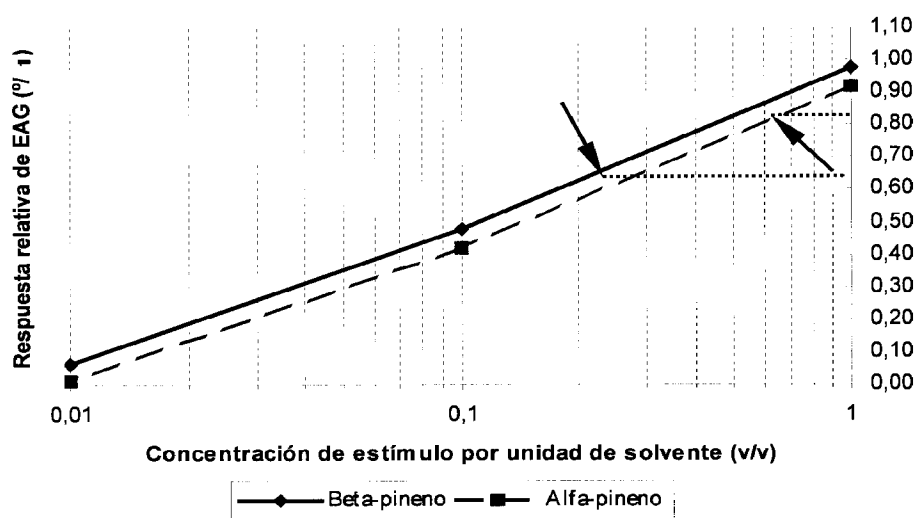
La elevada tasa de emisión observada en *Q. ilex* –y esperable, así mismo, en *Q. suber*- para compuestos que provocan respuestas olfativas intensas, sirve de apoyo a la idea de que los principales volátiles de encina y alcornoque desempeñan algún tipo de papel en la selección de estas dos especies como principales hospedantes por *C. welensii* y *P. germari*. Esto resulta especialmente interesante si se considera que dos de estos compuestos (α -pineno y β -pineno), que están entre los percibidos con las mayores intensidades, resultan comunes a una amplia variedad de especies, tanto gimnospermas como angiospermas (Zhang y Schlyter 2004). Por lo tanto es muy probable que la caracterización olfativa de las principales especies hospedantes precise, de cara a la selección por estos insectos, de la participación de otros compuestos con presencia más discreta (volátiles secundarios), pero que resulten detectados con cierta intensidad por los insectos, como podría ser el caso del α -felandreno.

Por otra parte, entre los compuestos más estimulantes para los dos cerambícidos resultan destacables, según se reflejó en el apartado anterior, el cineol –en especial considerando la respuesta de las hembras de *C. welensii*-, la trementina y el (*E*)-2-hexenal (aunque éste sólo presentó relevancia para dicha especie). El cineol es uno de los principales volátiles de *E. globulus*, *E. camaldulensis* y *P. pinea* (Barata 1997; Sabillón 2002); la trementina es una mezcla de monoterpenos procedente de resina de pinos, principalmente α -pineno y β -pineno; y el (*E*)-2-hexenal es, como ya se ha comentado, un compuesto GLV considerado “ubicuo“ entre las plantas. Este compuesto ha provocado respuestas considerables en nuestras especies y en otros insectos, tanto emparentados como alejados taxonómicamente, como los cerambícidos *Arbopalus tristis* y *Phoracantha semipunctata* y los pulgones *Myzus persicae* y *Aphis fabae*.

Tanto el cineol como la trementina podrían ser detectados a las concentraciones más bajas por más del 50% de la población de *C. welensii* y *P. germari*. Estas concentraciones variaron según la especie, resultando 1:300 el umbral para el cineol y 1:190 para la trementina en la primera; mientras que para *P. germari* la concentración de ambas sustancias no debería bajar de 1:30 aproximadamente. Respecto al (*E*)-2-hexenal, su detección con respuestas elevadas podría indicar su contribución, junto a otros volátiles considerados ubicuos y no identificados en las especies hospedantes típicas, a discriminar entre mezclas de olores de encina y alcornoque y los de otras plantas, tal y como apunta Barata (1997) en relación a la detección de este compuesto por *P. semipunctata*.

En este punto, es interesante reflexionar brevemente sobre la relevancia de la detección olfativa de la esencia de trementina, en relación con la importancia relativa de los compuestos que la constituyen. Los dos principales integrantes de la trementina (α -pineno y β -pineno) se presentan en dicha sustancia en proporciones que podríamos estimar en un 65% y 21% respectivamente (siguiendo a Pajares *et al.* 2004). Las concentraciones equivalentes de estos compuestos en una inyección de trementina al 1:1 (v/v) en hexano serían 1:1,5 y 1:5, para α -pineno y β -pineno respectivamente. Considerando los resultados del análisis dosis-respuesta obtenidos para el β -pineno en *C. welensii*, y suponiendo una evolución similar para el α -pineno a partir de la respuesta frente a la dosis 1:1 del enantiómero (-), las respuestas relativas “individualizadas” para dichos compuestos a estas concentraciones se estimarían en $\approx 82\%$ y $\approx 65\%$ respectivamente (figura IV.7).

Figura IV.7. Detalle de la representación logarítmica, entre las concentraciones 1:100 y 1:1, de la relación dosis-respuesta para el β -pineno y el α -pineno en *C. welensii*. Las flechas indican las respuestas estimadas para las concentraciones 1:1,5 de β -pineno y 1:5 de α -pineno.



Estas respuestas son inferiores a las obtenidas frente a la trementina en *C. welensii* ($>102\%$). Por lo tanto, se refuerza la hipótesis de que la combinación de estos constituyentes es tal que la respuesta de EAG frente a la trementina podría indicar una discriminación olfativa de especies resinosas, en este caso el género *Pinus*. Esta idea está en consonancia con las consideraciones de Langenheim (1994), en el sentido de que ciertas mezclas de terpenoides, como los presentes en la resina, caracterizan determinados tipos de vegetación; y también con la sugerencia de la existencia de sinergismos respecto a la detección olfativa de mezclas de volátiles (Metcalf y Metcalf 1992).

Haremos una breve referencia, a continuación, a la percepción olfativa según el sexo. Para la mayoría de las sustancias estudiadas, la respuesta olfativa fue mayor en las hembras que en los machos de ambos cerambícidos. Sin embargo, respecto a los principales estimulantes, sólo en la especie *C. welensii* y respecto a dos sustancias (cineol y ocimeno) las diferencias fueron significativas. Es de destacar que, para dicha especie, uno de los estímulos más intensos y que fue de los pocos para los cuales la respuesta de los machos superó a la de las hembras resultó precisamente el estándar (E)-2-hexenal (como ya se encontró en el capítulo III). Tras la revisión efectuada por Zhang y Schlyter (2004), no se encontraron

referencias sobre la existencia de respuestas de EAG significativamente diferentes entre sexos frente a volátiles de no hospedantes. En caso de poder considerarse al cineol en estos términos, la especie *C. welensii* sería la primera para la cual se cita la existencia de tal diferencia de respuestas entre sexos.

Tampoco se encontraron respuestas distinguibles entre las hembras de *C. welensii* que habían ovipositado antes del estudio de EAG y las que ovipositaron después. Esto indica que la capacidad de detección tras la oviposición no se ve mermada, lo cual resulta congruente con las observaciones efectuadas en laboratorio sobre las hembras capturadas, las cuales llevaban a cabo puestas intermitentes que llegaron a prolongarse durante más de 20 días.

En *P. germari* no se encontraron indicios de diferencias de respuesta entre sexos para ninguna de las sustancias que provocaron estimulaciones significativas. No obstante, el estudio de cada sexo por separado en esta especie resulta útil para entender mejor su comportamiento olfativo, especialmente considerando el escaso número de hembras estudiado. Esto se debe al distinto comportamiento aparente de ambos sexos en relación a los desplazamientos, mostrándose las hembras más móviles que los machos (López *et al.* 2004).

Estos resultados apuntan, salvo en relación con los dos volátiles citados, hacia la no especificidad sexual de la localización de hospedantes por las dos especies a partir de estímulos olfativos; aunque para *P. germari* esta cuestión debe ser estudiada con más detalle. La variación del comportamiento olfativo según el sexo depende de la especie y, como hemos visto, del tipo de sustancia; y puede ser distinto entre insectos que comparten hospedantes para la puesta e incluso para la alimentación. Esto se ilustra claramente a partir del comportamiento de los cerambícidos *Demonax transilis* y *Anaglyptus subfasciatus*, para los cuales las respuestas de machos y hembras, respectivamente, superaron significativamente a las del otro sexo (Ikeda *et al.* 1993). En el género *Monochamus*, tres especies (*M. scutellatus*, *M. notatus* y *M. obtusus*) fueron atraídas hacia el mismo tipo de trampa cebada con volátiles procedentes de sus hospedantes, sin que hubiera diferencias significativas entre sexos; en cambio, la atracción hacia dichas trampas en *M. clamator* resultó superior para los machos que para las hembras (Allison *et al.* 2001).

IV.4.3. La influencia de la variación diaria de la emisión por *Q. ilex* y *Q. suber* en la percepción olfativa de *C. welensii* y *P. germari*

En nuestras observaciones de campo las visitas comenzaban generalmente entre las 21:00 y las 21:30h, encontrándose ya ejemplares de *C. welensii* plenamente activos (actitudes de vuelo y cópula). Cuando se efectuó alguna visita en horas más tempranas también se encontraron adultos activos (20:15h, julio de 2002). En cambio, para *P. germari* el inicio de la actividad se observó algo más tarde, a partir de las 21:30h, aunque el peculiar comportamiento “sedentario” de los machos observado en el campo y recogido por López y colaboradores (2004), junto a la dificultad de observar hembras, dificultan el establecimiento preciso del momento de inicio de la actividad diaria de esta especie, sobre todo para éstas últimas.

El inicio del período de actividad diario de estos insectos hace necesario, pues, reflexionar acerca de un aspecto importante en la emisión de volátiles por las dos principales especies hospedantes: la variación diaria de la emisión. Tras los estudios mencionados al

respecto en la introducción de este capítulo, consideramos de más probable generalización los resultados de Niinemets y colaboradores (2002), junto a los de Owen y colaboradores (2002). Según dichos resultados, *Q. ilex*, y probablemente también *Q. suber*, continúan emitiendo terpenos durante la noche, pero a una tasa mucho más baja que durante el día. A pesar de la importancia de esta consideración, dicha variación no ha sido tenido en cuenta al estudiar otros cerambícidos de hábitos similares, como *P. semipunctata* o *Arhopalus tristis*.

Dada la alta reactividad en la atmósfera que se atribuye a este tipo de volátiles, y puesto que sabemos que hay una fuerte variación día-noche en su emisión, resulta interesante conocer si la persistencia de estos compuestos también depende del momento del día. En este sentido, Kesselmeier y Staudt (1999) hacen una recopilación de los resultados de varios investigadores acerca de la vida media en la atmósfera de los principales monoterpenos; un extracto de esta información se resume en la tabla IV.20.

Tabla IV.20. Comparación de la vida media de algunos monoterpenos emitidos por *Q. ilex* y *Q. suber* y que provocaron respuesta de EAG en *C. welensii* y *P. germari* (a partir de Kesselmeier y Staudt 1999).

Compuesto	Persistencia media	
	Día	Noche
α -pineno y β -pineno	2-3 horas	5-30 minutos
limoneno y mirceno	40-80 minutos	5-20 minutos
α -felandreno	15-20 minutos	<1 minuto
α -terpineno	<5 minutos	<2 minutos

La permanencia de los dos isómeros del pineno es la mayor tanto de día como de noche, no superando la media hora en este último caso. Esta información, unida al descenso nocturno de la emisión, hace que podamos suponer que para el intervalo de tiempo que podríamos estimar entre las 21.00 y las 22.00 horas, cuando ya se va incrementando la actividad de ambos cerambícidos, la presencia en el aire de terpenos procedentes tanto de encina como de alcornoque se encuentre en sus niveles más bajos, o bien próxima a ellos. La consecuencia de esta situación es que si los principales volátiles de *Q. ilex* y *Q. suber* condicionaran el comportamiento olfativo de algún insecto, estos deberían haber desarrollado una alta capacidad de percepción de dichas sustancias. Y esto es lo que sucede, precisamente, para *C. welensii* y *P. germari* en relación a los volátiles α -pineno y β -pineno.

Observando la tabla IV.20, podríamos aplicar el anterior razonamiento también al mirceno y limoneno, aunque con más precaución dada la menor intensidad con que son detectados. De ellos, el limoneno parece presentar unas características de emisión tales que aconsejan no despreciar su posible relevancia. Así, Owen y colaboradores (2002) encontraron que para el ejemplar de *Quercus* spp. estudiado (hipotéticamente *Q. suber*) su emisión nocturna de limoneno pasó de $56,6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{peso seco}} \cdot \text{h}^{-1}$ durante el día a 2,37 de noche. Esta tasa de emisión nocturna resulta elevada en comparación a la del α -pineno (que pasó de 2,32 durante el día a 0,04 de noche). Peñuelas y Llusà (1999) encontraron que en primavera y verano el limoneno fue el monoterpeno emitido en mayor cantidad por la encina.

La especie no hospedantes *E. globulus* emite monoterpenos de noche (Harrison *et al.* 1997). En *P. pinea* parece que la emisión de terpenos (entre otros: α -pineno, β -pineno, sabineno, limoneno y mirceno) continúa también de noche, aunque a tasas reducidas respecto a la emisión diurna (reducción del 48-58% para el total de terpenos; del 28 a >66% para el α -

pineno, y 16% para el β -pineno y limoneno); en cambio, el linalol, cineol y trans- β -ocimeno parecen ser emitidos sólo bajo luz (Kesselmeier *et al.* 1997; Staud *et al.* 1997). También se pueden encontrar de noche en los encinares y alcornoques uno o varios de estos monoterpenos, entre otros, emitidos en distinta medida por especies típicamente acompañantes, como *Cistus monspeliensis*, *C. incanus* y *C. salvifolius*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* y *Lavandula stoechas* (Owen *et al.* 2002).

Nos hallamos entonces en la situación siguiente: en el intervalo de tiempo durante el cual se inicia e incrementa la actividad de *C. welensii* y *P. germari*, la emisión de los principales monoterpenos de encina y alcornoque (detectados con fuerza por los dos insectos) está disminuyendo. A partir de este momento su concentración en el aire que rodea a encinas y alcornoques debería ser baja. Pero continuaría la emisión de estos compuestos, también a bajas tasas, por parte de especies que no son hospedantes potenciales. Algunas de estas especies emiten en cantidades relevantes, además, volátiles no habituales en nuestras fagáceas (como el cineol o el p -cimeno procedentes de *Eucalyptus* spp.); o bien, aunque a tasas más discretas, sustancias como el ocimeno (por *Pinus* spp.) o el α -felandreno (por *Pinus* spp. y *Eucalyptus* spp.). También se produciría emisión de volátiles a partir de mezclas, como la trementina de *Pinus* spp. En todo caso, todas estas sustancias son claramente detectadas por los dos cerambícidos.

Considerando estas reflexiones, la selección de hospedantes a partir de estímulos olfativos resultaría más ventajosa si se produjera antes de que la emisión disminuyera hasta su tasa más baja; por lo tanto habría de producirse preferentemente en uno de estos dos momentos: 1) durante el inicio de la actividad diaria de los insectos, es decir en las últimas horas de la tarde; 2) o bien en las primeras horas de la madrugada, cuando se reanuda de nuevo la emisión (si bien, este momento se ajusta peor a la biología de estas especies). Ya durante la noche, tal vez las bajas tasas de emisión de encinas y alcornoques no permitan la selección de hospedantes a distancia; pero estas emisiones, unidas a las de las especies que constituyen sus cortejos habituales, podrían conformar un espectro olfativo diferenciador de un hábitat que los dos cerambícidos no deberían abandonar, si es que no quieren ver dificultada la búsqueda de hospedantes adecuados.

IV.4.4. La estimulación olfativa de *C. welensii* y *P. germari*, y los perfiles de emisión de *Q. ilex* y *Q. suber*

En la introducción al presente capítulo señalábamos la marcada diferencia que se encuentra, tanto en *Q. ilex* como en *Q. suber*, en razón al perfil típico de emisión de ejemplares distintos (Staudt *et al.* 2001a y 2004). A continuación, vamos a relacionar tal diferencia con el conocimiento de la respuesta olfativa de los insectos respecto a los compuestos que caracterizan dichos perfiles. Junto al grupo de compuestos que provocaron “altas respuestas relativas” en *C. welensii*, el agrupamiento en conglomerados determinó que el (+)-limoneno y el α -terpineno se clasificaran como “respuestas medias”; los compuestos del “grupo mirceno” provocaron en general respuestas bajas. En *P. germari*, el ocimeno y el α -terpineno provocaron respuestas medias en ambos sexos (tendientes a bajas en los machos, los cuales responden también al β -mirceno con valores medios); el (+)-limoneno estimuló poco tanto a machos como a hembras.

La variabilidad de emisión entre ejemplares para ambos hospedantes se refleja, pues, en una respuesta olfativa diferenciada de *C. welensii* y *P. germari*. De este modo, se podría establecer una gradación del arbolado, ya sean encinas o alcornoques, en función del interés que sus emisiones despiertan para el olfato de estos insectos; aunque no podemos aventurar aún si, finalmente, dicho interés se traduciría en una discriminación positiva o negativa, o bien si puede vincularse a ciertos estados fisiológicos de los árboles. Para *C. welensii*, el interés por los ejemplares se clasificaría, en orden decreciente, como sigue: ejemplares con perfil de emisión tipo pineno > ejemplares tipo limoneno > ejemplares tipo mirceno. En *P. germari*, el mayor interés lo suscitarían también los ejemplares de perfil tipo pineno, pero los otros perfiles mostrarían un interés difuso, ya que las hembras parecen mostrar bajo interés tanto por ejemplares “tipo limoneno” como de “tipo mirceno”; en cambio, entre ambos perfiles, los machos se interesan más por el tipo mirceno.

IV.4.5. La posibilidad de selección de ejemplares adecuados en las especies hospedantes, a partir de la orientación olfativa

Consideremos ahora la situación según la cual nuestros cerambícidos de interés consiguieran centrar su atención sobre una determinada especie potencialmente hospedante. Y tengamos en cuenta las grandes dimensiones de estos insectos, sus hábitos nocturnos así como la corta vida adulta de que disponen para afrontar la época reproductiva. En estas circunstancias está justificado pensar que estos cerambícidos hayan desarrollado la destreza suficiente para identificar con cierta precisión los ejemplares más adecuados para refugiarse, o que presenten presumiblemente las mejores condiciones para el desarrollo de sus larvas.

Las mismas razones congregan en dichos árboles a otros individuos, por lo que se facilitaría el encuentro sexual. Este tipo de razonamientos ha sido formulado con frecuencia (Byers 1995, Hanks 1999; Dickens 2000 y Allison *et al.* 2004). Es tradicional la consideración de la preferencia de *C. welensii* y *P. germari* por los árboles más viejos y dañados. Los trabajos de López y colaboradores (2004) pusieron de relieve que este tipo de árboles no sólo eran los más frecuentados por los adultos, sino que también en ellos resultó más probable la presencia de hembras y los fenómenos de agregación local.

Las limitaciones hídricas frecuentes en los ecosistemas mediterráneos afectan al crecimiento y la actividad fisiológica de las plantas, viéndose afectada entonces la síntesis de volátiles y disminuyendo, en consecuencia, su emisión. Los factores climáticos y edáficos, así como el estrés inducido por daños de tipo mecánico o por herbívoros y patógenos, pueden influir en la producción adicional o bien en altas reducciones en la emisión de volátiles (Kesselmeier y Staudt 1999; Staudt *et al.* 2003). Dado el vínculo entre la emisión de volátiles y las condiciones en que vegeta el arbolado, para insectos que empleen el olfato en la búsqueda de hospedantes, ciertas modificaciones en la emisión respecto a las tasas y composición habituales podrían reflejar cambios en el estado fisiológico de las plantas.

En este sentido, podríamos plantear que un perfil de emisión que estimula con cierta intensidad el olfato de nuestros dos cerambícidos, como el perfil tipo pineno, mantendría aquellos árboles que lo presentaran en su órbita de interés. Por otra parte, ciertas alteraciones en la fisiología del árbol podrían inducir una eventual disminución de la tasa de emisión de los compuesto que caracterizan este perfil, hasta alcanzar ciertos valores “umbral”, junto con la

aparición -o la adquisición de mayor relevancia- de volátiles secundarios. Y sería una cuestión interesante de cara a posteriores estudios, comprobar si tales cambios en el perfil olfativo podrían revelar que las condiciones fisiológicas de los árboles son tales que los mismos pudieran resultar hospedantes adecuados.

Condiciones de estrés por altas temperaturas y baja humedad dificultan la producción de terpenos en *Q. ilex* (Llusià y Peñuelas 1999). La reducción del factor de emisión de monoterpenos en esta especie bajo estrés hídrico estival llega a ser de un 25% (Staudt *et al.* 2002). Por otro lado, la baja humedad y una prolongada exposición a la luz favorecen la emisión de ocimeno e inducen la emisión de linalol (Loreto *et al.* 1996b). La importancia de la variación de la tasa de emisión entre ejemplares en *Q. ilex* y su relación con estos cerambícidos se acentúa al considerar los resultados de Bertin y colaboradores (1997), según quienes la variación intraespecífica máxima de la tasa de emisión (alrededor del 19%) se produce precisamente durante la tarde.

Una situación parecida se produce con *Phoracantha semipunctata*. Para este cerambícido se encontró diferencia de atracción por parte de árboles distintos, en este caso correspondientes a varias especies de *Eucalyptus*, algunas de ellas poco preferidas a priori por el insecto. Esta diferencia se vinculó con variaciones cuantitativas en la producción de ciertos compuestos que generaron altas respuestas de EAG, y se encontraban en las mezclas de volátiles procedentes de los árboles (Barata 1997).

La orientación de las hembras del cerambícido xilófago *Hylotrupes bajulus* se ve influida por monoterpenos, especialmente α -pineno (Nerg *et al.* 2004). Pero la selección de lugares adecuados para la puesta depende más de la concentración de monoterpenos individuales en la madera (como el β -pineno), y especialmente por las proporciones relativas entre algunos de ellos (relación β -pineno/ α -pineno), que por la concentración total de monoterpenos en la misma. En cambio Wallin y Raffa (1999) no encontraron relación entre la oviposición de *Monoctonus carolinensis* y la proporción de ningún monoterpeno del floema.

Un vínculo interesante entre el debilitamiento del arbolado y los compuestos volátiles lo muestran los resultados de Wallin y Raffa (1999), quienes indican que daños directos en un tejido de la planta, como el causado por una defoliación, no sólo pueden causar cambios químicos en otros tejidos, como el floema, sino que tales cambios pueden ser mayores en el tejido que no fue directamente afectado. Así, la proporción α -pineno/ β -pineno en el floema de *P. banksiana* decreció con el aumento de la defoliación. Se pueden producir, así mismo, diferencias en los niveles de emisión de ciertos compuestos entre plantas dañadas mecánicamente y plantas sanas. Esta cuestión ha sido observada respecto a la emisión de linalol por plantas de patata (Dickens *et al.* 2000), siendo las tasas de emisión superiores en las plantas dañadas.

IV.4.6. Implicaciones de la correlación entre las respuestas frente a distintos volátiles

La mayor parte de las correlaciones significativas para *C. welensii* (tabla IV.21), se presentaron entre compuestos relacionados con el pineno (respuestas altas) y sustancias del “grupo limoneno” distintas del propio (+)-limoneno, caracterizadas por provocar respuestas medias-bajas. También se hallaron correlaciones entre éstas y uno de los compuestos GLV, el (*Z*)-3-hexen-1-ol (que se sabe es emitido por *Q. ilex*). Por último, es destacable la correlación positiva encontrada entre el cineol y la trementina; resultado que se encuentra en la línea de la hipótesis planteada en anteriores apartados, sobre la vinculación de estas sustancias con la discriminación negativa de especies no hospedantes.

Tabla IV.21. Tipo de respuesta y estructura química de las sustancias implicadas en las correlaciones significativas entre las respuestas provocadas en *C. welensii*. R_{Sp} = Coeficiente de correlación de Spearman.

Correlación	Tipo de respuesta	Estructura	R_{Sp}
cineol <> trementina	Alta <> Alta	alcohol terpénico <> monoterpenos	0,678
cineol <> (+)-limoneno	Alta <> Media-Alta	alcohol terpénico <> “grupo limoneno”	0,620
α -felandreno <> ocimeno	Alta <> Media-baja	“grupo limoneno” <> “grupo mirceno”	0,783
(-)- α -pineno <> α -terpineno	Alta <> Media-alta	“grupo pineno” <> “grupo limoneno”	0,697
β -pineno <> ρ -cimeno	Alta <> Media-baja a Baja	“grupo pineno” <> “grupo limoneno”	0,720
β -pineno <> ácido acético	Alta <> Media-baja a Baja	“grupo pineno” <> “ácido orgánico”	0,700
(+)- α -pineno <> ocimeno	Alta <> Media-baja	“grupo pineno” <> “grupo mirceno”	0,609
(+)- α -pineno <> ρ -cimeno	Alta <> Media-baja a Baja	“grupo pineno” <> “grupo limoneno”	0,609
(+)- α -pineno <> terpineol	Alta <> Media-baja a Baja	“grupo pineno” <> “grupo limoneno”	0,655
(<i>Z</i>)-3-hexen-1-ol <> γ -terpineno	Alta <> Media-baja a Baja	GLV <> “grupo limoneno”	0,685
(<i>Z</i>)-3-hexen-1-ol <> terpineol	Alta <> Media-baja a Baja	GLV <> “grupo limoneno”	0,650
(+)-limoneno <> linalol	Media-Alta <> Media-baja a Baja	“grupo limoneno” <> “grupo mirceno”	0,644
(+)-limoneno <> ρ -cimeno	Media-Alta <> Media-baja a Baja	Ambos del “grupo limoneno”	0,683
γ -terpineno <> terpineol	Media-baja a Baja <> Media-baja a Baja	Ambos del “grupo limoneno”	0,629
γ -terpineno <> β -mirceno	Media-baja a Baja <> Media-baja a Baja	“grupo limoneno” <> “grupo mirceno”	0,615
β -mirceno <> linalol	Media-baja a Baja <> Media-baja a Baja	Ambos del “grupo mirceno”	0,636
ρ -cimeno <> ácido acético	Media-baja a Baja <> Media-baja a Baja	“grupo limoneno” <> “ácido orgánico”	0,736

En *P. germari*, por el contrario, las correlaciones implicaron en la mayoría de los casos a compuestos de respuestas relativas medias y bajas (tabla IV.22), con predominio de la participación de compuestos GLV (que aparecen en ocho de las diez correlaciones). Las únicas dos sustancias implicadas con altas respuestas fueron el (+)- α -pineno y el 3-metil-1-butanol (que originó respuestas relativas altas en las hembras pero no en los machos). Resultan destacables las correlaciones negativas entre el (+)- α -pineno y el (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexenal con el ocimeno, y (*Z*)-3-hexenil acetato con el β -mirceno.

El β -mirceno, dominante en el tercer tipo de perfil presente en la encina, no se correlacionó en *C. welensii* con ninguno de los derivados del pineno y tampoco con el (+)-limoneno. Pero las respuestas a estos dos compuestos sí se correlacionaron con las provocadas por otras sustancias [γ -terpineno (“grupo limoneno”) <> β -mirceno, y linalol (“grupo mirceno”) <> (+)-limoneno]. Algo parecido ocurrió en *P. germari*, donde las respuestas al β -mirceno y al (+)-limoneno aparecieron correlacionadas únicamente con dos GLV: (*Z*)-3-hexenil acetato y (*Z*)-3-hexen-1-ol respectivamente.

Tabla IV.22. Tipo de respuesta y estructura química de las sustancias implicadas en las correlaciones significativas entre las respuestas provocadas en *P. germari*. R_{Sp} = Coeficiente de correlación de Spearman.

Correlación	Tipo de respuesta	Estructura	R _{Sp}
(Z)-2-hexen-1-ol <> 3-metil-1-butanol*	Media-baja <> Alta*	GLV <> alcohol alifático	0,883
(E)-2-hexenal <> (+)- α -pineno	Media-baja <> Alta	GLV <> "grupo pineno"	-1
(E)-2-hexenal <> ocimeno	Media-baja <> Media	GLV <> "grupo mirceno"	-0,9
(Z)-3-hexen-1-ol <> (+)-limoneno	Media-baja <> Baja	GLV <> "grupo limoneno"	0,775
(Z)-3-hexen-1-ol <> α -terpineno	Media-baja <> Media	GLV <> "grupo limoneno"	0,829
(Z)-3-hexen-1-ol <> (Z)-3-hexenil acetato	Media-baja <> Baja	GLV <> GLV	0,943
(Z)-3-hexenil acetato <> α -terpineno	Baja <> Media	GLV <> "grupo limoneno"	0,886
(Z)-3-hexenil acetato <> β -mirceno	Baja <> Media	GLV <> "grupo mirceno"	-0,829
3-metil-1-butanol * <> γ -terpineno	Alta* <> Baja	alcohol alifático <> "tipo limoneno"	0,809
α -terpineno <> γ -terpineno	Media <> Baja	"grupo limoneno" <> "grupo limoneno"	0,812

(*). La respuesta frente al 3-metil-1-butanol se consideró alta tomando como referencia la provocada en las hembras.

La existencia de correlaciones significativas entre las respuestas frente a distintas sustancias plantea una cuestión interesante, de cara a la realización de futuros estudios. Ésta sería la comprobación de si tales correlaciones podrían indicar indirectamente la existencia de receptores neuronales generalistas en estos insectos. De ser esto así, volátiles detectados mediante respuestas de intensidad media o baja pero implicados en correlaciones, en especial con sustancias que provocan altas respuestas, podrían adquirir un papel relevante contribuyendo a completar la configuración olfativa de la especie emisora, bien *per se* o en determinadas circunstancias. Éste sería el caso de sustancias como las que se citan a continuación: ρ -cimeno, α -terpineno, γ -terpineno, terpineol y ácido acético para *C. welensii*; y γ -terpineno, (Z)-2-hexen-1-ol y (E)-2-hexenal para *P. germari*.

La actividad de receptores neuronales generalistas se ha vinculado con la percepción de volátiles involucrados sólo en la localización de alimento u hospedante (Wadhams 1992). Este autor apunta así mismo que la actividad de este tipo de receptores codifica información olfativa referente a la totalidad de compuestos de una mezcla, mientras que, por un canal de codificación diferente, la información sobre la presencia relativa de cada compuesto se obtiene a partir de receptores especialistas. Recientemente se ha propuesto que la detección de numerosos volátiles por el lepidóptero *Rhyacionia frustrana* sugiere que sus preferencias, de cara a la oviposición, dependen más de la percepción de mezclas de compuestos en proporciones específicas que de la concentración absoluta de semioquímicos individuales (Asaro *et al.* 2004).

La existencia de receptores no específicos ha sido constatada en *P. semipunctata* (Barata *et al.* 2002). En la antena de esta especie se encuentran al menos tres tipos de receptores neuronales: el primero lo componen aquellos que responden específicamente ante una determinada sustancia (por ejemplo el 3-metil-1-butanol, o bien el (Z)-3-hexen-1-ol); el segundo tipo está integrado por receptores capaces de ser estimulados simultáneamente por dos sustancias distintas o relacionadas estructuralmente (por ejemplo, mirceno y limoneno; o bien (Z)-3-hexen-1-ol y (Z)-2-hexen-1-ol); y el último los constituyen aquellos receptores que se activan frente a tres o más sustancias (α -pineno, β -pineno y cineol; o bien α -pineno, mirceno, limoneno y ocimeno), aunque la estimulación provocada por cada una puede ser de distinta intensidad.

IV.4.7. La detección por *C. welensii* y *P. germari* de volátiles secundarios de *Q. ilex* y *Q. suber*, y otros característicos de especies no hospedantes

Hasta ahora hemos prestado la mayor atención a los volátiles que provocaron las respuestas más altas, y que se podían asociar con las especies hospedantes (las distintas formas del pineno), o bien que podrían caracterizar a ciertas no hospedantes (cineol, trementina). Conviene ahora reflexionar sobre el posible papel que podrían desempeñar otras sustancias. Resultan particularmente interesantes los compuestos que provocaron respuestas relativas consideradas altas y, junto a ellos, aquellos cuyas respuestas asociadas estuvieron implicadas en correlaciones relevantes (bien porque el vínculo se produjo con sustancias que provocaron altas respuestas, o bien por su signo). Ambos tipos se explicitan en la tabla IV.23 interpretándose su posible influencia sobre el comportamiento de los dos cerambícidos en los párrafos siguientes.

Tabla IV.23. Volátiles secundarios de *Q. ilex* y *Q. suber* y/o de no hospedantes que provocan altas respuestas, o cuyas respuestas están implicadas en correlaciones significativas.

Especie	Tipo de volátil	
	Alta respuesta	Implicados en correlaciones
<i>C. welensii</i>	α -felandreno, (Z)-3-hexen-1-ol, (Z)-2-hexen-1-ol, (E)-2-hexenal	α -terpineno, γ -terpineno, terpineol, ρ -cimeno, terpineol, ácido acético
<i>P. germari</i>	3-metil-1-butanol	γ -terpineno, (Z)-2-hexen-1-ol, (E)-2-hexenal, ocimeno, β -mirceno

(*). La consideración de repuesta alta se debe a la intensidad provocada en las hembras.

Entre estas sustancias, las que conforman el denominado “grupo limoneno” y relacionadas (α -felandreno, ρ -cimeno, α -terpineno, γ -terpineno y terpineol) tienen una importancia en la emisión de *Q. ilex* mayor que la encontrada en algunas especies no hospedantes, como *P. halepensis*, *P. pinea* y *P. pinaster*. En éstas no han sido detectadas o, caso de serlo, se presentan en bajas proporciones (Kesselmeier *et al.* 1997; Street *et al.* 1997; Staudt *et al.* 1997; Barata *et al.* 2000; Owen *et al.* 2001; Owen *et al.* 2002). En otras no hospedantes, como el género *Eucalyptus*, la situación varía según el compuesto. Así, el α -felandreno no ha sido detectado en *E. camaldulensis* ni *E. globulus* (Barata *et al.* 2000); la emisión de ρ -cimeno por *E. camaldulensis* supera la correspondiente a la encina, mientras que la emisión de ésta resulta parecida a la de *E. globulus*. La presencia de α -terpineno fue, en cambio, similar en *E. camaldulensis* y en *Q. ilex*, pero más baja en ésta que en *E. globulus*. En *Q. suber* tampoco se detectó ninguno de estos cinco compuestos (Owen *et al.* 2002).

Por lo tanto estas sustancias parecen contribuir a la caracterización olfativa de especies distintas, bien sean hospedantes o no hospedantes. En particular, el α -felandreno podría estar muy vinculado a la identificación de encinas por *C. welensii*. La correlación del ρ -cimeno y α -terpineno con sustancias “tipo pineno” también podría indicar su contribución a la caracterización de *Q. ilex*; pero un perfil de emisión en el que dominara el ρ -cimeno podría indicar inadecuación como hospedante.

Un caso interesante lo constituye la correlación β -pineno <> ácido acético en *C. welensii*. Este ácido es emitido en cantidades similares por *Q. ilex* y *P. pinea*, y su variación diaria sigue un patrón parecido al de los monoterpenos, estando fuertemente condicionada por la apertura estomática (Kesselmeier *et al.* 1997). De esta manera, las condiciones que alteren la

regulación estomática, como el estrés hídrico, limitarían la emisión de este ácido. Esta circunstancia, unida a la correlación apuntada con un volátil tan importante en *Q. ilex* y *Q. suber* como el β -pineno, sugiere que su ausencia, o bien la presencia a muy bajas concentraciones, podría indicar “situación debilitante” para los ejemplares con el mencionado perfil, y favorecer entonces la selección de los mismos.

Ya Chararas (1978) apuntaba que los eucaliptos con estrés hídrico eran más atacados por *P. semipunctata*, lo mismo ocurría con *Populus* spp., que en casos de estrés hídrico resultaban más vulnerables frente a *Capnodis miliaris* y al bupréstido xilófago *Melanophila picta*. Recientemente, Fernández y colaboradores (2004) han encontrado que es la humedad de la peridermis la que desempeña un papel crucial de cara a la susceptibilidad de los eucaliptos frente al ataque de *P. semipunctata*.

El 3-metil-1-butanol estimuló con intensidad a las hembras de *P. germari*, y también considerablemente (algo menos del 80% de respuesta relativa) a *C. welensii*. Este compuesto resultó uno de los mayores estimulantes para *P. semipunctata*, activando receptores neuronales específicos (Barata 2002). Ha sido encontrado en altas concentraciones en el corcho afectado por enmohecimiento (Rocha *et al.* 1996), así como en la savia de un ejemplar de *Quercus* spp. (Ômura *et al.* 2000), asociándose su presencia con actividad microbiana.

Estos últimos autores indican que diversos insectos son atraídos preferentemente hacia tejidos vegetales infectados por microorganismos; pero este hábito implica la tolerancia frente a dichos microorganismos y sus metabolitos. Los hábitos alimenticios de *C. welensii* y *P. germari*, la ausencia aparente de este compuesto en alcornoques y encinas salvo, presumiblemente, en casos como los citados, así como su conocida emisión por no hospedantes como *E. globulus*, *E. camaldulensis* y *Olea europaea* (Barata *et al.* 2000), parecen atribuir al 3-metil-1-butanol un posible papel como caracterizador de inadecuación del árbol. De ser esto así tendría cierta lógica una mayor capacidad de detección de las hembras de *P. germari* hacia este compuesto, dada la aparente mayor movilidad de las mismas.

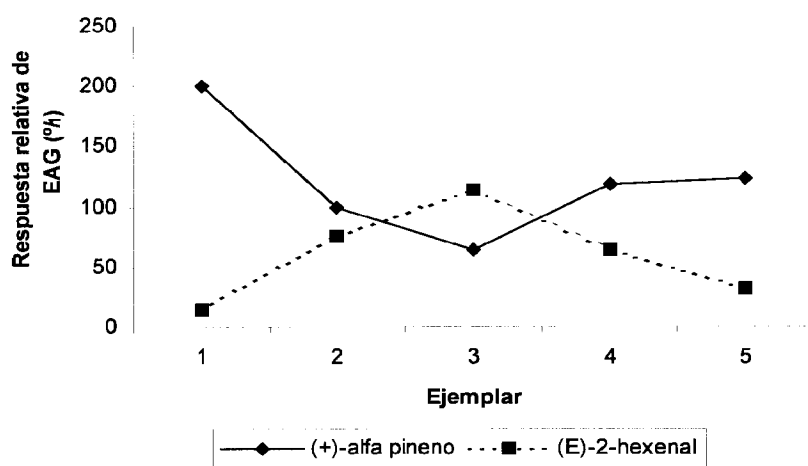
El grupo de compuestos GLV merece un trato particular. Peñuelas y Llusà (2001) relacionan su aparición con la descomposición de ácidos grasos en respuesta a estrés y daños mecánicos o por herbívoros. Zhang y Schlyter (2004) consideran que los GLV suelen resultar los volátiles predominantes en las emisiones de angiospermas arbóreas, mientras que en las emisiones de coníferas se presentan a nivel de trazas. El (*E*)-2-hexenal se ha encontrado como volátil cortical de *Q. robur* (Vrkocova *et al.* 2000); pero en nuestras especies de interés sólo se han encontrado, hasta el momento, emisiones de 3-hexen-1-ol, y únicamente en la encina (Peñuelas y Llusà 2001). Otras angiospermas a priori no hospedantes (*Betula pendula*, *B. pubescens*) emiten foliarmente la forma “cis” de este compuesto (Zhang y Schlyter 1999), que aparece también como volátil de corteza en *P. tremula*.

En el cerambícido *Arhopalus tristis*, perforador en el género *Pinus*, la mezcla (*E*)-2-hexen-1-ol + (*E*)-2-hexenal resultó fuertemente repelente (Suckling *et al.* 2001), como ya ocurría para algunos escolítidos de coníferas. Un comportamiento similar de repulsión frente al (*E*)-2-hexen-1-ol se ha encontrado para el escolítido de las piñas *Conophthorus resinosae* (De Groot *et al.* 2002). Por otra parte, el comportamiento inducido por los GLV puede depender de la forma estructural presente. En el escolítido del olivo *Phloeotribus scarabaeoides*, la adición del (*Z*)-3-hexen-1-ol (volátil foliar de *O. europaea*) a la feromona undecanal aumentó la respuesta

frente a este compuesto, mientras que la forma “trans” (no emitida por el olivo) redujo significativamente la atracción de los machos (Szauman-Szumski *et al.* 1998).

Es difícil, pues, interpretar la detección de GLV por especies como *C. welensii* y *P. germari*. Podría deducirse la idea general de que estos compuestos contribuyan a discriminar, por un lado, entre coníferas y frondosas; y por otro, entre frondosas potencialmente hospedantes y otras inadecuadas. Este razonamiento estaría en consonancia con la consideración de estas especies como oligófagas más que polífagas (Jolivet 1992, en Vives 2000). Pero dicha idea se puede matizar más en el caso de *P. germari*, especie para la que se ha encontrado una circunstancia singular: las correlaciones que afectaron a algunos compuestos GLV fueron de signo negativo (tabla. IV.22). Dada la intensidad de las respuestas provocadas por las sustancias implicadas (véase la figura IV.8 para el caso (*E*)-2-hexenal <> (+)- α -pineno), así como su relevancia como volátiles de encina y alcornoque, parece sugerirse que el interés olfativo de este cerambícido se decanta en mayor medida por los monoterpenos asociados con estas dos fagáceas que sobre los GLV. Esta actitud olfativa lo alejaría, incluso, de su consideración como oligófago.

Figura IV.8. Respuesta relativa de EAG comparada de cinco ejemplares de *P. germari* frente a (*E*)-2-hexenal y (+)- α -pineno.



El ocimeno parece mostrar un comportamiento peculiar, ya que su emisión parece seguir el principio del “todo o nada” determinado por la temperatura (Staudt *et al.* 2002 y 2003). Así, la temperatura de 30°C constituye un umbral para la emisión, presentando ésta, además, una inercia mucho mayor que la de los otros monoterpenos, tanto en el incremento como en su disminución. Aunque se ha pensado que su emisión podía considerarse un indicador de condiciones de estrés para la planta, este punto no fue confirmado por los resultados de dichos autores en *Q. ilex*.

Se trata, pues, de un compuesto poco habitual en la encina (y tal vez en alcornoque) pero que es más frecuente en *Pinus* spp. y también se presenta en otras especies como *Eucalyptus* spp. y *Olea europaea* (Barata *et al.* 2000; Sabillón 2002). Provoca en las hembras de *C. welensii* respuestas significativamente superiores a los machos y, además, la respuesta que provoca en el conjunto de individuos se correlaciona con la inducida por el α -felandreno y el (+)- α -pineno. Por lo tanto, su detección por las hembras de esta especie resulta difícil de interpretar

y, a la par, muy interesante. Su presencia podría tener un significado similar a la del α -felandreno, indicando la adecuación del árbol; pero tasas elevadas de este compuesto podrían indicar inadecuación, de manera análoga a lo razonado para el ρ -cimeno. En *P. germari*, la respuesta se correlacionó negativamente con la provocada por el (*E*)-2-hexenal; lo que puede significar, en consonancia con lo comentado para *C. welensii*, cierto estrechamiento de su vínculo con los hospedantes principales, al menos con *Q. ilex*.

Por último, citaremos la peculiaridad que supone el hecho de que ni en *C. welensii* ni en *P. germari* se produzcan respuestas de EAG significativas frente al sabineno, y que el β -mirceno sea detectado con respuestas medias (tendiendo a bajas para *C. welensii* y para las hembras de *P. germari*). Staudt y colaboradores (2004) encontraron que la diferencia entre el perfil de emisión de *Q. ilex* y *Q. suber* se debe principalmente a variaciones en las fracciones de sabineno y mirceno en relación a los otros compuestos. Así, *Q. suber* emite relativamente más sabineno y menos mirceno que *Q. ilex*. La posible discriminación entre estas dos especies a partir de una caracterización de la emisión exclusivamente cualitativa no tiene, pues, un reflejo claro en la capacidad olfativa de estos insectos. Esto sugiere que la selección entre especies hospedantes de un mismo género podría depender, en mayor medida, de la tasa de emisión de los compuestos que caracterizan sus perfiles típicos, tal y como indican Hanks y colaboradores (1993), y Barata (1997).

IV.5. Bibliografía

- Allison, J.D.; Borden, J.; McIntosh, R.; De Groot, P.; Gries, R. (2001). Kairomonal response by four *Monochamus* species (Coleoptera: Cerambycidae) to bark beetle pheromones. *Journal of Chemical Ecology* 27 (6):1151-1161.
- 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. *Ph.D. thesis*. University of 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. En: Menken, S. B. J.; Visr, H.; Harrewijn, P. (eds.). *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, No. 8: 1877-1895.
- Barata, E.; Mustaparta, H.; Pickett, J.; Wadhams, L.; Araujo, J. (2002). Encoding of host and non-host plant odours by receptor neurones in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. Volume 188, Number 2: 121 – 133.
- Berkov, A.; Meurergrimes, B.; Purzycki, K. (2000). Do Lecythidaceae specialists (Coleoptera, Cerambycidae) shun fetid tree species. *Biotropica* 32 (3): 440-451.
- Bertin, N.; Staudt, M.; Hansen, U.; Seufert, G.; Ciccioli, P.; Foster, P.; Fugit, J.L. y Torres, L.. (1997). Diurnal and seasonal course of monoterpene emission from *Quercus ilex* (L.) under natural conditions- application of light and temperature algorithms. *Atmospheric Environment* 31: 135-144.
- 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.
- Brockerhoff, E.; Grant, G. (1999). Correction for differences in volatility among olfactory stimuli and effect on EAG responses of *Dioryctria abietivorella* to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* Vol. 25, Nº 6: 1353-1368.

- Byers, J. (1995). Host tree chemistry affecting colonization in bark beetles. En: Cardé, R.; Bell, W. (eds.). *Chemical Ecology of Insects*. pp: 154-213.
- Cutini, A. (2002). Litterfall and Leaf Area Index in the CONECOFOR permanent monitoring plots. En: Mosello, R.; Petriccione, B.; Marchetto, A. (eds.). Long-term ecological research in italian forest ecosystems. *J. Limnol.* 61 (Suppl. 1): 62-68.
- Chararas, C. (1978). La presión osmótica de las especies forestales y sus relaciones con los insectos xilófagos. *Ecología de Pesson*. Mundi-Prensa. 207-227.
- De Groot, P.; Nott, R.; MacDonald, L. (2002). Influence of enantiomers of alfa-pineno o the response of the red pine cone beetle, *Conophthorus resinosae* to its pheromone pityol. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 105: 169-174.
- De Groot, P.; Nott, R. (2004). Response of the whitespotted sawyer beetle, *Monochamus s. scutellatus*, and associated woodborers to pheromone of some *Ips* and *Dendroctonus* bark beetles. *Journal of Applied Entomology* 483-487.
- 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 (5): 1265-1279.
- Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plants volatiles. *Plant Physiology* 135: 1893-1902.
- Gabriel, R.; Schäfer, L.; Gerlach, C.; Rausch, T.; Kesselmeier, J. (1999). Factors controlling the emission of volatiles organic acids from leaves of *Quercus ilex* L. (Holm oak). *Atmospheric Environment* 31: 1347-1355.
- Hanks, L. M.; Paine, T. D.; Millar, J. G. (1993). Host species preferences and larval performance in the wood-boring beetle *Phoracantha semipunctata* F. *Oecologia* 95: 22-29.
- Harrison D., Hunter M.C., Lewis A.C., McQuaid J.B. and Seakins P.W. (1997). Measured and Modelled Variations of Biogenic Hydrocarbons above a Portuguese *Eucalyptus* Forest. <http://www.chem.leeds.ac.uk/Atmospheric/Field/david.html>. consultado noviembre 2004.
- 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.
- Joffre, R.; Rambal, S.; Romane, F. (1996). Local variations of ecosystem functions in Mediterranean evergreen oak woodland. *Annales des Sciences Forestieres* 53: 2/3, 561-570.
- Jolivet, P. (1992). Insects and Plants. Parallel evolution and adaptations. *Flora & Fauna Handbooks* 2:1-190.
- Kesselmeier, J. (2001). Exchange of short chain oxygenated volatile organic compounds (VOCs) between plants and the atmosphere: a compilation of field and laboratory studies. *Journal of Atmospheric Chemistry* 39: 219-233.
- Kesselmeier, J.; Bode, K.; Hofmann, U.; Müller, H.; Schäfer, L.; Wolf, A.; Ciccioli, P.; Brancaleoni, E.; Cecinato, A.; Frattoni, M.; Foster, P.; Ferrari, C.; Jacob, V.; Fugit, J.L.; Dutaur, L.; Simon, V. y 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.; Bode, K.; Schäfer, L.; Schebeske, G.; Wolf, A.; Brancaleoni, E.; Cecinato, A.; Ciccioli, P.; Frattoni, M.; Dutaur, L.; Fugit, J.L.; Simon, V. y Torres, L. (1998). Simultaneous field measurements of terpene and isoprene emission from two dominant mediterranean oak species in relation to a north american species. *Atmospheric Environment* 32: 1947-1953.
- 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 (6): 1223-1280.
- Linsley, E.G. (1959). Ecology of Cerambycidae. *Annual Review of Entomology* 4: 99-138.
- 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: Arianoutsou, M.; Papanastasis, V. (eds.). *Ecology, Conservation and Management of Mediterranean Climate Ecosystems*. Proceedings 10th MEDECOS Conference, Rhodes, Greece, April 25-May 1; 8 pp.
- Loreto, F. (2002). Distribution of isoprenoid emitters in the *Quercus* genus around the world: chemo-taxonomical implications and evolutionary considerations based on the ecological function of the trait. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* 5: 185-192.
- Loreto, F.; Ciccioli, P.; Cecinato, A.; Brancaleoni, E.; Frattoni, M.; Tricoli, D. (1996a). Influence of environmental factors and air composition on the emission of α -pinene from *Quercus ilex* leaves. *Plant Physiol* 110 (1), 267-275.
- Loreto, F.; Ciccioli, P.; Brancaleoni, E.; Cecinato, A.; Frattoni, M.; Sharkey, T. (1996b). Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (18), 9966-9969.
- Loreto, F.; Ciccioli, P.; Brancaleoni, E.; Cecinato, A.; Frattoni, M. (1998a). Measurements of isoprenoid content in leaves of mediterranean *Quercus* spp. by a novel and sensitive method and estimation of the isoprenoid partition between liquid and gas phase inside the leaves. *Plant Science* 136 : 25-30.
- Loreto, F.; Ciccioli, P.; Brancaleoni, E. (1998b). A hypothesis on the evolution of isoprenoid emission by oaks based on the correlation between type and *Quercus* taxonomy. *Oecologia* 115: 302-305.
- Llusià, J.; Peñuelas, J. (1999). *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* terpene emission as affected by temperature and humidity. *Biologia Plantarum* 42 (2): 317-320.
- Llusià, J.; Peñuelas, J. (2000). Seasonal patterns of terpene content and emission from seven mediterranean woody species in field conditions. *American Journal of Botany* 87(1): 133-140.

- Mannschreck, 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.
- Martin, D.; Gershenzon, J and Bohlmann, J. (2003). Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of norway spruce. *Plant Physiol.* Vol. 132: 1586-1599.
- 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.
- 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.
- Monaco, P.; Previtera, L. (1984). Isoprenoids from the leaves of *Quercus suber*. *Journal of Natural Products* 47, No. 4. 673-676.
- Nerg, A.; Heijari, J.; Noldt, U.; Viitanen, H.; Vuorinen, M.; Kainulainen, P.; Holopainen, J. (2004). Significance of wood terpenoids in the resistnace of scots pine provenances against the old house borer, *Hylotrupes bajulus*, and brown-rot fungus, *Coniophora puteana*. *Journal of Chemical Ecology* Vol 30, N° 1: 125-141.
- Niinemets, Ü.; Hauff, K.; Bertin, N.; Tenhunen, J.; Steinbrecher, R.; Seufert, G. (2002). Monoterpene emissions in relation to foliar photosynthetic and structural variables in mediterranean evergreen. *New Phytologist* 153: 243-256.
- Ômura, H.; Honda, K. y Hayashi, N. (2000). Identification of feeding attractants in oak sap for adults of two nymphalid butterflies, *Kaniska canace* and *Vanessa indica*. *Physiological Entomology* 25 (3), 281-287.
- Owen, S.; Boissard, C.; Street, R.; Duckham, S.; Csiky, O.; Hewitt, C. (1997). Screening of 18 Mediterranean plant species for volatile organic compound emissions. *Atmospheric Environment*. 31: 101-118.
- 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.
- Pajares, J.A.; Ibeas, F.; Díez, J.J.; Gallego, D. (2004). Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *Journal of Applied Entomology* 633-638.
- Paré, P. y Tumlinson, J. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* Vol. 121: 325-331.
- Peñuelas, J y Llusà, J. (2002a). Linking photorespiration, monoterpenes, and plant thermotolerance. *New Phytologist* 155: 227- 237.

- Peñuelas, J y Llusà, J. (2002b). La emisión de compuestos orgánicos volátiles por las plantas mediterráneas. *Ecosistemas* N° 1. Enero-abril.
- Peñuelas, J.; Llusà, J. (2001). Seasonal patterns of non-terpenoid C6-C12 VOC emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. *Chemosphere* 45: 237-244.
- Peñuelas, J.; Llusà, J. (1999). Seasonal emission of monoterpenes by the Mediterranean tree *Quercus ilex* in field conditions: Relations with photosynthetic rates, temperature and volatility. *Physiologia Plantarum* Volume 105 Issue 4 Page 641.
- Peñuelas, J.; Llusà, J.; Estiarte, M. (1995). Terpenoids: a plant language. *Trends in Ecology and Evolution* 10(7): 289..
- 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.
- Pickett, J.A.; Wadhams, L.J. Woodcock, C.M. (1995). Nonhost interactions in insect chemical ecology 1. En: Konopinska, D.; Goldsworth, G.; Nachman, R.J.; Nawrot, J.; Orchard, I.; Rosinski, G. Sobótka, W. (eds.). *Proceedings of the 1st international Conference on Insects: Chemical, physiological and environmental aspects*. September 26-29, 1994Ladek Zdroj, Poland, University of Wroclaw 126-133.
- Rocha, S.; Delgado, I. ; Correia, A. (1996). GC-MS study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.* 44 (3), 865-871.
- Rojas, C. (1999). Electrophysiological and behavioral responses of the cabbage moth to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1867-1883.
- Sabillón, D. (2002). *Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: Pinus pinea, Pinus halepensis y Quercus ilex*. Tesis doctoral. [en línea]. www.tdx.cesca.es. Última consulta, mayo de 2004.
- Staudt, M.; Bertin, N.; Hansen, U.; Seufert, G.; Ciccioli, P.; Foster, P.; Frenzel, B.; Fugit, J.L. (1997). Seasonal and diurnal patterns of monoterpene emission from *Pinus pinea* (L.) under field conditions. *Atmospheric Environment* 31: 145-156.
- Staudt, M.; Joffre, R.; Rambal, S. (2003). How growth conditions affect the capacity of *Quercus ilex* leaves to emit monoterpenes. *New Phytologist* 158: 61-73.
- Staudt, M.; Mir, C.; Joffre, R.; Rambal, S.; Bonin, A.; Landais, D. y 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.
- Staudt, M.; Rambal, S.; Joffre, R. y Kesselmeier, J. (2002). Impact of drought on seasonal monoterpene emissions from *Quercus ilex* in southern France. *Journal of Geophysical Research* 107: doi:10.1029/2001JD002043.
- Staudt, M.; Mandl, N.; Joffre, R.; Rambal, S. (2001). Intraspecific variability of monoterpene composition emitted by *Quercus ilex* leaves. *Can. J. For. Res.* 31: 174-180.
- Street, R.; Owen, S.; Duckham, S.; Boissard, C.; Hewitt, C. (1997). Effect of Habitat and Age on Variations in Volatile Organic Compound (VOC) Emissions from *Quercus ilex* and *Pinus pinea*. *Atmospheric Environment* 31: 89-100.

- 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.
- Szauman-Szumski, K.; Peña, A.; Kelly, D.; Campos, M. (1998). Identification of chemicals attractive to the olive bark beetle, *Phloeotribus scarabaeoides*, in laboratory bioassays. *BioControl* 43: 345-355.
- Van Beek, T. A.; De Groot, A. (1986). Terpenoid antifeedants, part I. An overview of terpenoid antifeedants of natural origin. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 105: 513-527.
- Van Tol, R.; Visser, J. (2002). Olfactory antennal responses of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* to plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102: 49-64.
- Vives, E. (2000). En: Ramos, M. A. et al. (eds.). *Coleoptera, Cerambycidae. Fauna Ibérica*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSI, Madrid. Vol. 12. 716 pp., 5h. lám.
- 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 (10): 933-947.
- Wadhams, L. J. (1992). The perception of semiochemicals. En: Crampton, J. M. y Eggleston (eds.). *Insect Molecular Science. Proceedings, 16th Symposium of the Royal Entomological Society London. Imperial College London, september 1991*. Academic Press, London. 152-162.
- Wallin, K.; Raffa, K (1999). Altered constitutive and inducible phloem monoterpenes following natural defoliation of jack pine: implications to host mediated interguild interactions and plants defense theories. *Journal of Chemical Ecology* 25 (4): 861-877.
- 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]. www.vv.slu.se/fs/zhang/sjfr_qhz.htm. Última consulta, enero 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.

Conclusiones

1. El dispositivo propuesto para estudio de la respuesta electroantenográfica de estímulos olfativos resulta adecuado para cerambícidos de tamaño medio-grande, como *Prinobius germari* y *Cerambyx welensii*, incluso para ejemplares de tamaño pequeño, como *Phoracantha semipunctata*. Intensas condiciones de estimulación: caudales elevados (continuo de 4,1 l/min, e inyección de 0,5 l/min, o bien 10 ml) y fuertes disoluciones estimulantes (20 μ l al 1:1 v/v) aplicadas con altas frecuencias (15 segundos a 1 minuto), originan ligeras mermas de sensibilidad de las antenas ($\leq 11\%$), no significativas para ambas especies al cabo de 5 horas de estudio.
2. La forma de la respuesta de EAG encontrada en *C. welensii* y *P. germari* es la habitual en señales de este tipo: una caída de potencial rápida (transcurre en 0,3-0,6 segundos) seguida de una recuperación más lenta del nivel de base, variable según la intensidad de la respuesta (<1 a 14 segundos). La colocación tradicional de los electrodos (registrador en el extremo intacto de la antena, e indiferente inserto a través de la membrana intersegmental entre el escapo y el pedicelo) resulta adecuada para originar líneas base estables y de baja magnitud ($\approx 0,2$ mV).
3. El (*E*)-2-hexenal y la esencia de trementina resultan adecuados como estímulos estándar para *C. welensii* y *P. germari*, respectivamente. El primero provoca estimulaciones altas en *C. welensii* ($0,92$ mV $\pm 0,6$); en *P. germari*, las respuestas al estándar son bajas ($0,28$ mV $\pm 0,24$). Los solventes empleados (aceite de parafina y hexano) contribuyen muy poco a la respuesta absoluta de EAG ($\leq 12\%$ en las dos especies), resultando esta contribución atribuible en su mayor parte a receptores antenales no químicos (higro-térmicos y/o mecánicos).
4. En ambas especies las respuestas varían muy significativamente entre individuos. Hasta un 68% de esta variabilidad se puede explicar, en *C. welensii*, por factores experimentales (diámetro del capilar del electrodo de referencia y amplitud de la línea base), y por el estado fisiológico del individuo. Para *P. germari* no se puede establecer una explicación clara. Las respuestas de ambos sexos no difieren significativamente en *C. welensii*, no pudiéndose asegurar lo mismo para *P. germari*, debido al escaso número de hembras estudiadas.
5. *C. welensii* y *P. germari* responden olfativamente de manera significativa ante un amplio grupo de volátiles (20 y 16, respectivamente, de 33 estudiados) presentes en la emisión tanto de especies hospedantes como de no hospedantes; la mayoría son monoterpenos y volátiles de hojas verdes (GLV) emitidos por vía foliar. Cuatro de las cinco sustancias que completan el 70-80 % de la emisión de *Q. ilex* y *Q. suber* (α -pineno, β -pineno, limoneno y mircenolol) son detectadas por ambos xilófagos. Las dos primeras, que se emiten a tasas muy elevadas, son percibidas con respuestas relativas altas por las dos especies; isómeros del mircenolol y limoneno son detectados, en cambio, de forma más discreta.

A la vista de los resultados, y considerando los datos de emisión de las principales especies arbóreas hospedantes y no hospedantes, se sugieren las siguientes hipótesis para explicar el mecanismo de selección de hospedantes por parte de *C. welensii* y *P. germari* [que deberían ser contrastadas en posteriores estudios con túnel de viento, cromatografía de gases asociada a la electroantenografía (CG-EAD) y estudio electrofisiológico de *sensilla* individuales (SCR)]:

6. La detección olfativa de compuestos volátiles participa en la localización de hospedantes por *C. welensii* y *P. germari*. Las claves del mecanismo de selección son: a) para una discriminación positiva, la proporción en que se emiten los cuatro monoterpenos principales de *Q. ilex* y *Q. suber*, detectados por ambos insectos; b) para la discriminación negativa, la detección, especialmente por las hembras, de volátiles ausentes de los principales hospedantes o bien poco frecuentes en los mismos, como el cineol, la trementina o, incluso, el (*E*)-2-hexenal.

7. Variaciones genéticas entre individuos de una especie hospedante, así como variaciones ambientales que condicionen distintos estados fisiológicos, provocan diferencias de perfil de emisión entre ejemplares; lo cual puede ayudar a los insectos para la detección de árboles adecuados para el desarrollo de las futuras generaciones. Los compuestos implicados en esta diferenciación son, posiblemente, los derivados del pineno, y los isómeros del limoneno y del mircenol.

8. Algunos volátiles secundarios pueden contribuir a completar la configuración olfativa de la especie emisora de cara a la percepción por el insecto, bien *per se* o en determinadas circunstancias. Esto puede ocurrir en relación a volátiles detectados con alta intensidad (α -felandreno por *C. welensii*), o a sustancias que provocan respuestas discretas pero que se correlacionan con otras muy estimulantes (como ocurre con el ρ -cimeno, α -terpineno, γ -terpineno, terpineol y ácido acético, para *C. welensii*; y γ -terpineno, (*Z*)-2-hexen-1-ol y (*E*)-2-hexenal para *P. germari*).

Glosario

VI.1. Glosario de términos

Aleloquímico, sustancia que afecta a organismos de especies diferentes a la especie emisora, por otras razones aparte de la alimentación.

Alomona, sustancia producida por un organismo, que provoca en el organismo receptor, de distinta especie, una reacción que es favorable para el emisor pero no para el receptor.

Cairomona, sustancia producida por un organismo, que provoca en el organismo receptor, de distinta especie, una reacción que es favorable para el receptor pero no para el emisor.

Enantiómeros, dos estereoisómeros son enantiómeros si la imagen especular de uno no puede ser superpuesta con la del otro. Dicho de otra forma: un enantiómero es una imagen especular no superponible de sí mismo. Son moléculas quirales.

Feromona, sustancia secretada externamente por un individuo, que produce una reacción específica en individuos de la misma especie.

Isómeros, moléculas con la misma fórmula química y el mismo tipo de enlaces entre átomos, pero en el que éstos están dispuestos de diferente forma. Típicamente, los isómeros tienen muchas características similares, si no idénticas, en cuanto a sus propiedades y reactividad. Se distingue entre *isomería estructural*, en la que los grupos funcionales están dispuestos de diferente forma (originando distintas características y reactividad); y *estereoisomería*, en la que las diferencias sólo son apreciables frente a luz polarizada o reactivos quirales.

Kóvats (índice de), índices de retención relativos calculados respecto a compuestos estándar, de tipo alcano alifático. Constituyen una referencia sobre la volatilidad de las sustancias, de manera que índice más bajos corresponden a mayores volatilidades.

Quiralidad, propiedad de un objeto de no ser superponible con su imagen especular. Como ejemplo sencillo, la mano izquierda humana no es superponible con su imagen especular (la mano derecha). Como contraejemplo, un cubo o una esfera sí son superponibles con sus respectivas imágenes especulares. En general, un objeto quiral carece de planos de simetría. Es una propiedad de gran interés en química orgánica, en química inorgánica y en bioquímica, donde da lugar a la estereoquímica, a las reacciones estereoespecíficas y a los estereoisómeros.

Semioquímico, sustancia química involucrada en la interacción entre individuos de la misma o diferente especie.

Sensilla, (singular: *sensillum*) pequeñas estructuras cuticulares de los insectos que constituyen los órganos sensoriales relacionados con la percepción de estímulos mecánicos, químicos, térmicos e incluso la humedad.

Sensilla ampullacea, *sensilla* de forma similar a las *coeloconica*, de las que se distinguen por la profundidad de las depresiones en las cuales van situadas: depresiones profundas identifican a *sensilla ampullacea*, pero cuando son más llanas se consideran *sensilla coeloconica*.

Sensilla basiconica, (singular: *sensillum basiconicum*) *sensilla* con forma de pequeño gancho o estaca, o de cono (en cuyo caso se denominan *sensilla styloconica*), más gruesas, sólidas y cortas que las *trichodea*. Se encuentran normalmente en la antena aunque también pueden aparecer en otros órganos. Tienen pared gruesa o delgada y pueden presentar base articulada y asentar sobre una depresión de la cutícula. A veces no está clara la división entre las *basiconica* y las *trichodea*; incluso aquellas pueden confundirse con las *coeloconica*.

Sensilla campaniformia, *sensilla* con forma de pequeña cúpula o campana. Su función es discutida, ya que si bien estructuralmente la pequeña superficie que presentan así como la posesión de una sola neurona hacen pensar en actividad mecanoreceptora, el hecho de que suelen aparecer habitualmente en grupos deja abierta la posibilidad de que como grupo también participen en tareas olfativas.

Sensilla chaetica, *sensilla* con forma de pelo o espina y estructura similar a las *trichodea*, Presentan pared gruesa y se asocian generalmente a tareas mecanoreceptoras.

Sensilla coeloconica, (singular: *sensillum coeloconicum*) *sensilla* de forma similar a las *basiconica* y *styloconica*, de las que se diferencian porque siempre van situadas en pequeñas depresiones de la cutícula, por lo general no muy profundas, de modo que son poco visibles en lugar de proyectarse por encima de ella. Pueden presentar pared gruesa o delgada.

Sensilla placodea, (singular: *sensillum placodeum*) *sensilla* constituidas por láminas cuticulares delgadas de forma elíptica, oval o alargada que recubren huecos más o menos grandes de la cutícula. Toman la apariencia, pues, de superficies más o menos planas; su estructura interna es similar a las *basiconica* de múltiples neuronas.

Sensilla trichodea, (singular: *sensillum trichodeum*) estructuras con forma de pelo más o menos alargado, ápice agudo o romo y pared delgada o gruesa. Son llamadas habitualmente pelos olfativos, se encuentran normalmente en las antenas de muchos insectos y a este tipo pertenecen los quimiorreceptores más comúnmente encontrados.

Sinomona, sustancia producida por un organismo, que provoca una reacción en otro de distinta especie de manera que ambas especies salen beneficiadas.

VI.2. Glosario de especies citadas con frecuencia

Anaglyptus subfasciatus, (Coleoptera: Cerambycidae). Xilófago en *Cryptomeria japonica* y *Chamaecyparis obtusa*.

Anoplophora glabripennis, (Coleoptera: Cerambycidae). Perforador polífago en angiospermas arbóreas.

Aphis fabae, (Homoptera: Aphididae). Chupador polífago, plaga típica en *Vicia faba*.

Arhopalus tristis, (Coleoptera: Cerambycidae). Xilófago en *Pinus* spp., especialmente sobre ejemplares afectados por el fuego.

Conophthorus resinosae, (Coleoptera: Scolytidae). Perforador de conos en *Pinus resinosa*.

Demonax transilis, (Coleoptera: Cerambycidae). Perforador polífago de leño en coníferas y frondosas; se asocia, también, a *Cryptomeria japonica* y *Chamaecyparis obtusa*.

Dioryctria abietivorella, (Lepidoptera: Pyralidae). Perforador de conos en *Abies* spp.

Leptinotarsa decemlineata, (Coleoptera: Chrysomelidae). Defoliador en *Solanum tuberosum*.

Otiorhynchus sulcatus, (Coleoptera: Curculionidae). Polífago de semillas y pequeños frutos, con preferencia por las familias *Rosaceae*, *Ericaceae* y *Taxaceae*.

Phoracantha semipunctata, (Coleoptera: Cerambycidae). Perforador considerado xilófago del género *Eucalyptus*, aunque sus daños se centran más bien en la zona subcortical.

Phloeotribus scarabaeoides, (Coleoptera: Scolytidae), perforador subcortical en *Olea europaea*.

Rhyacionia frustrana, (Lepidoptera: Tortricidae). Perforador de brotes con preferencia por *Pinus taeda*.

VI.3. Glosario de abreviaturas

Ancho, ancho del pronoto en la zona próxima al mesonoto (cm).

An_P, relación peso del insecto (gr) / ancho pronoto (cm).

Capi, diámetro apical del capilar del electrodo de referencia.(micras). Empleada con *C. welensii*.

C_ant, longitud total de la antena derecha (cm), transformada por la función potencial cuadrática en *P. germari*.

CG-EAD, (cromatografía de gases-electroantenodetección) técnica mediante la cual se acoplan la cromatografía de gases y la electroantenografía. En este caso, el insecto actúa como *detector biológico* de los compuestos inyectados en el cromatógrafo, bien sea individualmente o presentes en una mezcla, de ahí que las siglas EAG se reemplacen por EAD.

EAGb, respuesta bruta media de EAG (mV) por insecto para una serie de tres estimulaciones con el estímulo estándar.

- EAGbruta**, respuesta bruta media por insecto (mV) para una serie de siete a nueve estimulaciones con el estímulo estándar.
- EAGn**, respuesta neta media por insecto (mV) a partir de tres estimulaciones con el estímulo estándar.
- EAGneta**, respuesta neta media por insecto (mV) para una serie de siete a nueve estimulaciones con el estímulo estándar.
- GLV**, volátiles de hojas verdes (de *Green Leaf Volatiles*). Son compuestos C₆-C₁₀ no terpenoides, generalmente derivados de ácidos grasos.
- Grupo P**, grupo de insectos con los cuales se empleó aceite de parafina como solvente en la mezcla estimulante.
- Grupo H**, grupo de insectos con los cuales se empleó hexano como solvente en la mezcla estimulante.
- Lg_ant**, longitud total de la antena derecha (cm), transformada por la función logaritmo decimal en *C. welensii*.
- Lg_capi**, diámetro apical del capilar del electrodo de referencia (micras), transformada por la función logaritmo decimal. Empleada con *P. germari*.
- Lg_lib**, amplitud de la línea base de la respuesta de EAG (mV), transformada por la función logaritmo decimal. Empleada con *C. welensii*.
- Lg_ret**, retraso en el estudio de EAG tras la captura del insecto (días), transformada por la función logaritmo decimal.
- Lg_scap**, supervivencia tras la captura (días), transformada por la función logaritmo decimal.
- Lg_seag**, supervivencia tras la prueba de EAG (días), transformada por la función logaritmo decimal.
- Li_bas**, amplitud de la línea base de la respuesta de EAG (mV). Empleada con *P. germari*.
- Log_EAGbruta**, respuesta bruta media de EAG (mV) para una serie de siete a nueve estimulaciones con el estímulo estándar, transformada por la función logaritmo decimal
- Longit**, longitud del insecto (cm), medida entre las mandíbulas y el ápice elitral.
- Lon_P**, relación peso del insecto (gr) /longitud.(cm).
- Peso**, peso (gr) en el momento de estudio de la respuesta de EAG.
- Rai_EAGbruta**, respuesta bruta media de EAG (mV) para una serie de siete a nueve estimulaciones con el estímulo estándar, transformada por la función raíz cuadrada.
- Rai_EAGn**, respuesta neta media de EAG (mV) a partir de tres estimulaciones con el estímulo estándar, transformada por la función raíz cuadrada.
- Rai_EAGneta**, respuesta neta media de EAG (mV) para una serie de siete a nueve estimulaciones con el estímulo estándar, transformada por la función raíz cuadrada.
- Rai_vcon**, respuesta de EAG frente a la inyección control" (mV) (ver **Vcontrol**) transformada por la función raíz cuadrada.

SCR (o **SSR**), términos sinónimos que aluden a la respuesta eléctrica de una de las *sensilla* de la antena individualmente. SCR es la abreviatura de “*single cell recording*” (\equiv registro de una célula individual), mientras que SSR lo es de “*single sensillum recording*” (\equiv registro de un *sensillum* individual).

Temp, temperatura de la habitación ($^{\circ}\text{C}$) al inicio de la sesión de EAG .

Vcontrol, respuesta de EAG (mV) frente a la “inyección control”, consistente en una pipeta Pasteur cargada con 20 microlitros del compuesto usado como solvente (Capítulo III, apartados III.2.2 y III.3.2).

Vseco, respuesta de EAG (mV) frente a una “inyección en blanco”, consistente en una pipeta Pasteur provista de papel de filtro pero sin añadirle ningún tipo de sustancia (Capítulo III, apartados III.2.2 y III.3.2).



Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para Juzgar la Tesis Doctoral de
D./D^a. ISRAEL SÁNCHEZ OSORIO
Titulada ORIENTACIÓN OPERATIVA DE
CRAMBSYL WELWITSII
acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE
CON LAUDE

Huelva, 5 de JULIO de 2005

El Vocal

El Vocal

El Vocal

El Presidente

El Secretario

El Doctorando

UNIVERSIDAD DE HUELVA
BIBLIOTECA



0000210934