

## Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo para el estudio electroantenográfico de estímulos olfativos en cerambícidos

I. SÁNCHEZ-OSORIO, R. TAPIAS, G. LÓPEZ, L. DOMÍNGUEZ

La electroantenografía (EAG) es una técnica electrofisiológica, como tal aprovecha la naturaleza eléctrica de la excitación que experimentan los receptores olfativos de los insectos tras ser estimulados por una sustancia volátil. Esta cualidad permite estudiar la repercusión olfativa de los compuestos semioquímicos en los insectos. Tras revisar diferentes opciones de equipamiento para estudios de EAG, se propone un dispositivo para la aplicación de este tipo de estudios a insectos de la familia Cerambycidae, sobre todo a especies de tamaño medio y grande, como *Cerambyx* spp. y *Prinobius germari*, dos de los principales xilófagos del género *Quercus* en España. Los resultados indican que el dispositivo y la metodología propuestos resultan adecuados, obteniéndose líneas base estables y de baja magnitud, así como respuestas de EAG con la apariencia habitual: una rápida despolarización que se traduce en una caída de potencial, seguida de una recuperación más lenta hasta el nivel de base. Estas pruebas abren interesantes posibilidades de investigación, en torno a la influencia de los compuestos semioquímicos en el comportamiento de los cerambícidos xilófagos, y las posibilidades de su aplicación en el contexto del manejo integrado de plagas.

I. SÁNCHEZ-OSORIO, R. TAPIAS, G. LÓPEZ, L. DOMÍNGUEZ. Departamento de Ciencias Agroforestales, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Huelva. Carretera de Palos de la Frontera s/n. 21.819, Palos de la Frontera, Huelva. (España). isanchez@uhu.es

**Palabras clave:** electrofisiología, EAG, *Cerambyx*, *Prinobius*, *Quercus*.

### INTRODUCCIÓN

**Electroantenografía de estímulos olfativos: concepto y estructura de un dispositivo para estudio de la respuesta electroantenográfica**

Las técnicas electrofisiológicas permiten estudiar las propiedades eléctricas del material biológico, como pueden ser los receptores sensoriales periféricos de los insectos. Esto hace que constituyan herramientas básicas para estudiar la repercusión olfativa de los compuestos semioquímicos en estos animales. Dentro de este tipo de técnicas, la electroantenografía (EAG) constituye el pri-

mer paso para la interpretación de aspectos tan relevantes como la localización de hospedantes y/o congéneres, de cara al planteamiento de estudios sobre la posibilidad de control integrado de poblaciones de insectos.

La electroantenografía tiene su fundamento en la despolarización que tiene lugar en las membranas de los receptores olfativos antenales de los insectos tras resultar estimulados (LÁNSKY, 2001; KAISLING, 2002). Esta despolarización origina una serie de lentos potenciales negativos en las dendritas de las células olfativas, resultando la respuesta de EAG la suma de estos lentos potenciales negativos.

Siguiendo las referencias clásicas de ROELOIS (1984), STRUBLE y ARN (1984), y CORK *et al.* (1990), un dispositivo típico para el estudio de la respuesta de EAG de los insectos tiene una estructura sencilla, consistiendo en una fuente de estímulos (corriente de aire portador de una o varias sustancias volátiles), un sistema de captación de la respuesta mediante electrodos (uno denominado "registrador" y otro "de referencia") y un instrumento registrador capaz de amplificar, filtrar y procesar la señal eléctrica inducida en la antena. 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) (SYNTECH, 1998). 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.

En el presente trabajo se propone un dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG en insectos, en particular en especies con dimensiones medias a grandes como *Cerambyx welensii* Küster y *Prinobius germani* Dejcan, que se pueden considerar dos de los principales cerambícidos xilófagos del género *Quercus* en España. Se analizan, así mismo, algunas circunstancias asociadas a la preparación de los insectos y la forma de aplicación de estímulos, junto a otros aspectos relacionados con la puesta en práctica del dispositivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Dispositivo para el estudio de la respuesta de EAG

El cuadro 1 recoge los materiales y equipamiento empleados en los aspectos más destacados del dispositivo. Su diagrama de montaje se esquematiza en la figura 1.

Cuadro 1. Materiales y equipamiento empleados en el dispositivo para el estudio de EAG. Q: caudal; L: longitud en centímetros; D: diámetro en milímetros; T: tiempo mínimo de actividad y reposo en segundos.

Generación, conducción y aplicación del flujo de aire	Elaboración y presentación de estímulos
- Compresor Compair-Brisa (24 litros, presión máxima de 8 bares).	- Pipeta automática Digipette-Naita (2- 20 microlitros),.
- Tubo de poliamida (L: 300; D externo: 8; D interno: 6).	- Pipeta automática Digipette-Naita (100-1000 microlitros).
- Filtro Wilkerson F08-C2-SK00 (polipropileno sinterizado, poros de 5 micras de diámetro).	- Papel de filtro Whatman nº1.
- Caudalímetro Tecfluid (máximo de 6,6 l/min).	- (E)-2-hexenal, 98% de pureza (Sigma-Aldrich).
- Tubo flexible de polivinilo (L: 300; D externo: 6; D interno: 4).	- Aceite de parafina
- Boquilla Windjet 727-RY-15 (4,8 cm de ancho; 16 orificios con D=1,5 mm).	- Hexano, 99% de pureza (Fluka).
Captación y análisis de la respuesta	Inyección de estímulos
- Micropipetas de vidrio (0,5 mm DI y 1,5 mm DE)	- Caudalímetro Tecfluid (Q máx : 50 l/h).
- Filamento de plata de 0,4 mm de diámetro.	- Temporizador asimétrico Disibeint PIFA 230 192 (T: 0,1 segundos)
- Cloruro potásico 0,1 normal	- Electroválvula Lucifer. 121-M13/8980. (220 voltios)
- Polivinilpirrolidona.	- Adaptador de CA/CC. (3 V)
- Sonda registradora PRS-1 universal (Syntech <sup>(c)</sup> ; Hilversum, Holanda).	- Jeringa de PVC de 50 ml.
- Sonda de acero inoxidable con conexión a tierra (para el electrodo de referencia), Syntech <sup>(c)</sup> (Hilversum, Holanda)	
- Sistema de adquisición de datos multicanal USB-IDAC (Syntech <sup>(c)</sup> ; Hilversum, Holanda)	
- Programa Autospike-32 (Syntech <sup>(c)</sup> ; Hilversum, Holanda).	
- Base reductora de electricidad estática Anti-Static: $10^7 < R < 10^{10}$	

**Generación del flujo de aire y aplicación de estímulos**

El compresor eléctrico libera un flujo continuo de aire comprimido, con una presión de salida de 2 bares. Tras dividir este caudal en dos ramales, el flujo principal se dirige directamente hacia el insecto. Dado que las dos especies estudiadas poseen unas antenas de gran longitud -menos de 4 cm para los ejemplares más pequeños de *P. germari* hasta 10 cm para los machos más grandes de *C. welensii*-, se consideró que en el extremo de salida del caudal principal resultaría conveniente instalar un difusor ancho y plano (boquilla Windjet<sup>(R)</sup>), a la manera empleada por NAGAI (1981), que abarcara toda o gran parte de la antena.

Los estímulos se prepararon según el modo convencional, aplicando una pequeña cantidad de disolución del compuesto sobre una tira de papel de filtro (50 x 5 mm) Whatman n° 1, e introduciendo ésta dentro de una pipeta Pasteur desechable (fig. 2). El compuesto empleado se mezcló con aceite de parafina, al 50% v/v. La cantidad de mezcla estimulante empleada fue de 20 microlitros. Como inyección control se emplearon pipetas Pasteur conteniendo una tira similar de papel de filtro, cargadas únicamente con el solvente.

Las mezclas de estimulantes, así como el control, se inyectaron sobre el caudal principal, de este modo, cuando el flujo principal

llega a la antena del insecto incide también sobre la misma el compuesto estudiado. Esta inyección se efectuó aplicando un caudal determinado de aire ("caudal de inyección") a través de la pipeta Pasteur cargada, e introduciendo la punta de la pipeta directamente en el ramal principal (a 2,5 m de la antena). Se han probado dos procedimientos de inyección: uno manual empleando una jeringa, y otro automatizado mediante un sistema eléctrico de inyección (electroválvula con temporizador; fig. 3). En la inyección manual se aplicaron 10 ml de aire; en el caso automatizado se empleó un caudal de 0,5 l/min, durante 0,3 segundos.

**Preparación de insectos para la captación de respuestas, y procesamiento de la señal**

Para llevar a cabo la sujeción de insectos fuertes como son los de los géneros *Cerambyx* y *Prinobius* hemos empleado una caja de madera a la que se atornillaron dos abrazaderas metálicas. El insecto se envolvía en una pieza rectangular de cuero y era sujetado por el tórax mediante las abrazaderas. La cabeza se inmovilizó de forma similar, mediante una pequeña pieza curva de plástico, que se podía atornillar también a la caja. Las antenas se fijaron a una pieza rectangular de goma ajustada a la caja de madera, mediante alambres finos de cobre a la manera propuesta por CORK *et al.* (1990), y PARK y HARDIE (1998).

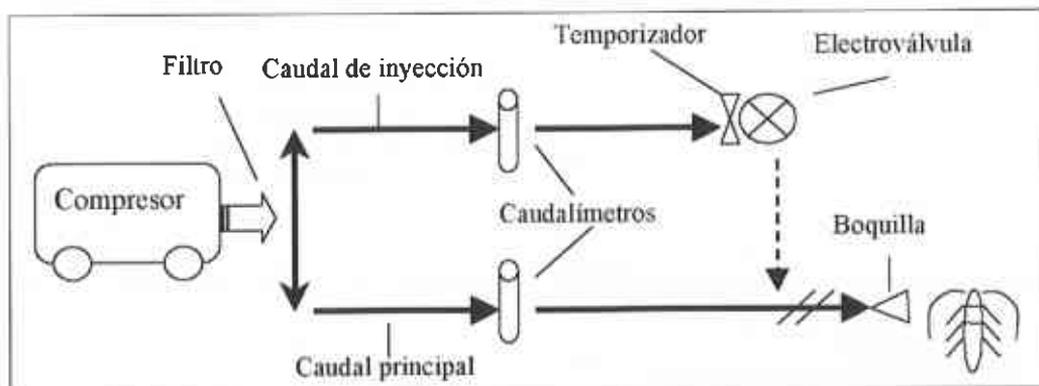


Figura 1. Esquema de montaje del dispositivo de generación, regulación y aplicación de estímulos.



Figura 2. Detalle de pipeta Pasteur preparada.

Para la elaboración de los microelectrodos, se calentaron los capilares de vidrio cuidadosamente a la llama de un mechero Bunsen y se estiraron manualmente. Así 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. Dicho capi-

lar se llenó con una solución salina 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). Se empleó una solución 0,1 N de cloruro potásico (SYNTECH, 1998), la cual penetraba por capilaridad hasta llenar los 1,5 cm extremos del microelectrodo. Para reducir la evaporación de la solución, se añadió a la misma polivinilpirrolidona en la proporción de un 3% en peso.

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 (fig. 4). El electrodo registrador se colocó recubriendo el extremo intacto del undécimo segmento (la mitad aproximadamente); el electrodo de referencia se insertó en la membrana intersegmental entre el escapo y el pedicelo (fig. 5).

El cometido final de este sistema es la recepción, almacenamiento y análisis de la respuesta olfativa del insecto ante determinados compuestos; dicha respuesta se refleja en forma de señal eléctrica. El contacto eléctrico entre la hemolinfa antenal y las terminales de las sondas "registradora y "de referencia se realizó mediante filamentos de plata de 4 a 5 cm de longitud y 0,4 mm de diámetro. Estos filamentos quedaban insertos en los capilares, y sumergidos 1,5 cm en la solución salina.



Figura 3. Electroválvula conectada a pipeta Pasteur.

**Cuadro 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.**

Parámetro	Valor
Caudal principal	4,1 litros/minuto: continuo
Caudal de inyección	0,5 litros/minuto
Duración de la inyección automatizada	0,3 segundos
Volumen de aire aplicado mediante inyección manual	10 mililitros
Filtro de baja frecuencia	0,1 hertzios
Filtro de alta frecuencia	20 hertzios
Intensidad de muestreo	400 muestras por segundo

El sistema USB-IDAC empleado, en conexión con un ordenador, como equipo de adquisición de respuestas se encargó de filtrar y procesar la señal eléctrica procedente del insecto, de modo que la pantalla refleja dicha señal como si se tratara de un osciloscopio. Cuando se conectan los electrodos al insecto, se produce una pequeña señal oscilatoria, 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 la amplitud de dicha línea base, así como

cualquier tipo de fluctuación que pueda tener lugar en la misma.

Los valores de filtrado establecidos en el software de procesado de la señal fueron 0,1 Hz y "DC" para el filtro de baja frecuencia, y 20 Hz para el de alta frecuencia (SYNTECH, 1998). En cuanto a la capacidad de muestreo del sistema, se probó con rangos de 400 a 15.000 muestras por segundo.

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

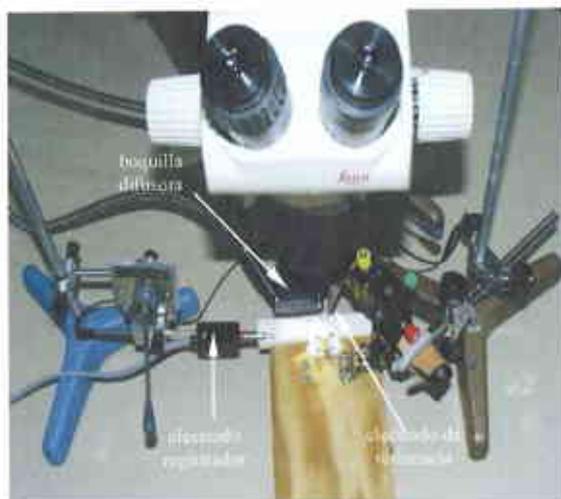


Figura 4. Dispositivo para la preparación de insectos.

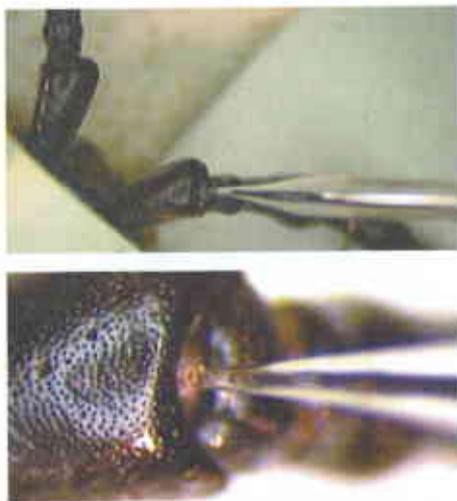


Figura 5. Colocación del electrodo de referencia.

## RESULTADOS

La preparación de un insecto para el estudio de la respuesta de EAG origina la aparición de una onda o ruido de fondo, la denominada línea base, con amplitud variable. La forma de colocación de los electrodos proporcionó líneas bases estables con un ruido de fondo de alrededor de 0,2 mV, con los filtros seleccionados y empleando base anti-estática. En algunas preparaciones la colocación exacta del electrodo registrador originó un pequeño problema: la deshidratación y precipitado de la solución salina. Tras la aplicación del estímulo olfativo aparece la respuesta de EAG; las respuestas encontradas en los dos cerambícidos presentan la forma típica de este tipo de señales (fig. 6), originada por una rápida despolarización de los receptores olfativos que se traduce en una caída de potencial (potencial negativo), 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; la recuperación de la señal varió, según su intensidad, entre 4,5 y 14 segundos. Las respuestas a la inyección control fueron inapreciables o bien de baja amplitud.

Respecto al funcionamiento del dispositivo, el caudal de aire suministrado por el compresor fluctuó ligeramente entre el momento de finalización de la carga de su depósito y el momento de reinicio de la carga. La fluctuación media observada cada 30 segundos tras efectuar tres ciclos seguidos "fin de carga-reinicio de carga", en las condiciones normales de aplicación de un compuesto (cuadro 3), se expone en la figura 7. 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 7 se aprecia que durante la carga del

compresor, que se prolongaba durante un tiempo aproximado 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 durante ese período. Aparte de estos inconvenientes, la pequeña variación en ambos caudales no produjo ningún efecto significativo ni en la línea base ni en la respuesta de EAG.

La inyección automatizada (fig. 8) depara resultados totalmente comparables a la manual (fig. 9). La distancia de inyección escogida (2,5 m) redujo la posibilidad de interferencia eléctrica por parte de la electroválvula o el temporizador, y solamente ocasionó un retraso en la aparición de la respuesta de menos de 0,5 segundos, con los caudales de trabajo manejados.

## DISCUSIÓN

El dispositivo empleado resulta adecuado para el estudio de la respuesta electroanteno-gráfica de cerambícidos, en particular para especies de tamaño medio-grande (longitud aproximada de 3 cm y mayores). Mediante tal dispositivo se han encontrado señales de EAG en *C. welensii* y *P. germari* cuya forma sigue el patrón general que se ha presentado en otros insectos. El tiempo requerido, generalmente, para la despolarización en ambas especies resulta comparable a los 0,5 segundos encontrados por CORK *et al.* (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-POILL., 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 *et al.* (1990).

El ruido de fondo obtenido mediante la colocación propuesta de los electrodos 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 calificar como bajos, mientras que valores próximos a 0,5 mV resultan relativamente altos; de esta manera, se pueden considerar adecuados tanto la forma propuesta de colocación de los electrodos como los filtros empleados. La eventual evaporación de la solución salina en el electrodo registrador podría hacer recomendable el aumento de la cantidad de polivinilpirrolidona hasta el 5%, y ajustar el diámetro del capilar en función del grosor de la antena.

Este tipo de respuesta puede sufrir perturbaciones ocasionadas por la variación de algunos parámetros del dispositivo. En este sentido, la oscilación 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 repercutiendo en la respuesta del insecto ya que la línea base se mantuvo estable mientras no era aplicado ningún estímulo. Por otro lado, la baja variación en el caudal de inyección (disminución < 6%), así como la brevedad del tiempo en que se produjo 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. En todo caso, el riesgo de que la carga del compresor afecte al normal funcionamiento de la unidad de adquisición de datos recomienda evitar las estimulaciones mientras aquella se produce.

La aplicación sobre la antena de una cortina de aire "plana" y uniforme (de unos 5 cm de anchura y 3 mm de alto) proporcionada por la boquilla Windjet<sup>®</sup> resultó más adecuada que la manera tradicional consistente en una boquilla cilíndrica de vidrio (MALO *et al.*, 2000; PARK y HARDIE, 1998) y suficiente para cubrir la totalidad de la antena en los ejemplares de tamaño medio y buena parte de la misma en los más grandes.

Respecto a la forma de inyección de estímulos, las dos modalidades probadas depa- ran resultados comparables. Se puede indicar a este respecto que para estudios sistemáticos y a frecuencias altas (menores de un minuto) resulta muy útil y cómodo el dispositivo automatizado; en cambio, para espaciamentos de las inyecciones superiores a un minuto es más versátil la inyección manual mediante jeringa. El caudal de la

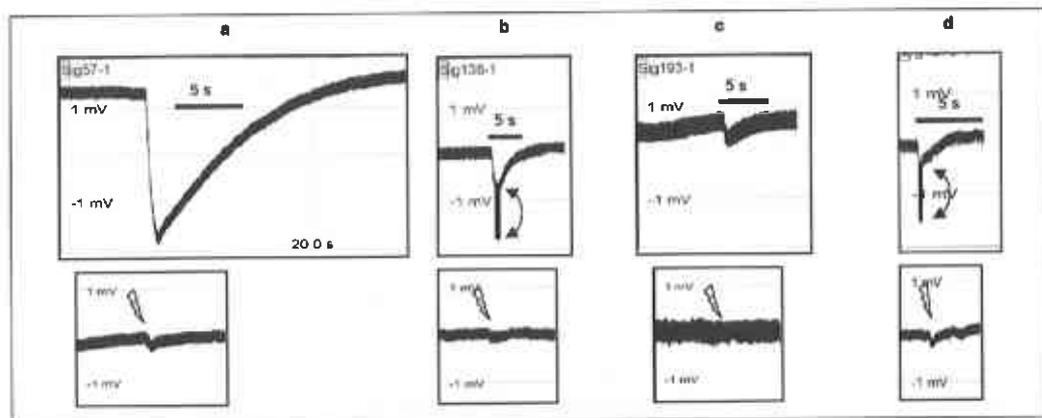


Figura 6. Respuestas de EAG frente al (*E*)-2-hexenal (fila superior) y a la inyección control (fila inferior) de un macho (a) y una hembra (b) de *C. welensii*, y un macho (c) y una hembra (d) de *P. germari*. En todos los casos la mezcla estimulante fue de 20 ml al 50% v/v en aceite de parafina, salvo para la hembra de *P. germari*, con la cual se empleó hexano como solvente. 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.

inyección automatizada (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). El volumen de inyección manual (10 ml) es alto comparado con los 1-3 ml que se han empleado en otros trabajos (ROELOFS, 1984; BARATA *et al.*, 1992; IKEDA *et al.*, 1993). La inyección manual ha sido recomendada por autores clásicos en esta disciplina, como ROELOFS (1984), quien sostiene, además, que ligeras variaciones en la velocidad de accionamiento del émbolo de la jeringa, así como en la cantidad de aire impulsado, no son críticas de cara a la amplitud de la respuesta resultante.

El retraso en la aparición de la respuesta (menos de 0,5 segundos) debido a la separación entre el punto de inyección y la antena (2,5 m), no supone ningún inconveniente. Otros autores han efectuado igualmente

inyecciones muy separadas de la antena, como los 1,5 m empleados por BARATA *et al.* (1992), indicando igualmente la ausencia de inconvenientes, salvo el mencionado retraso entre la inyección y la aparición de la respuesta.

En cuanto a la duración de la estimulación, se considera que entre 0,3 y 0,5 segundos resultan suficientes para provocar la mayor variación de potencial (SYNTECH, 1998). 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, la duración escogida (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, ya que pretendíamos comprobar la idoneidad del dispositivo y metodología propuestos para detectar la respuesta de EAG, y no tanto caracterizar la misma. Aún así, los resultados

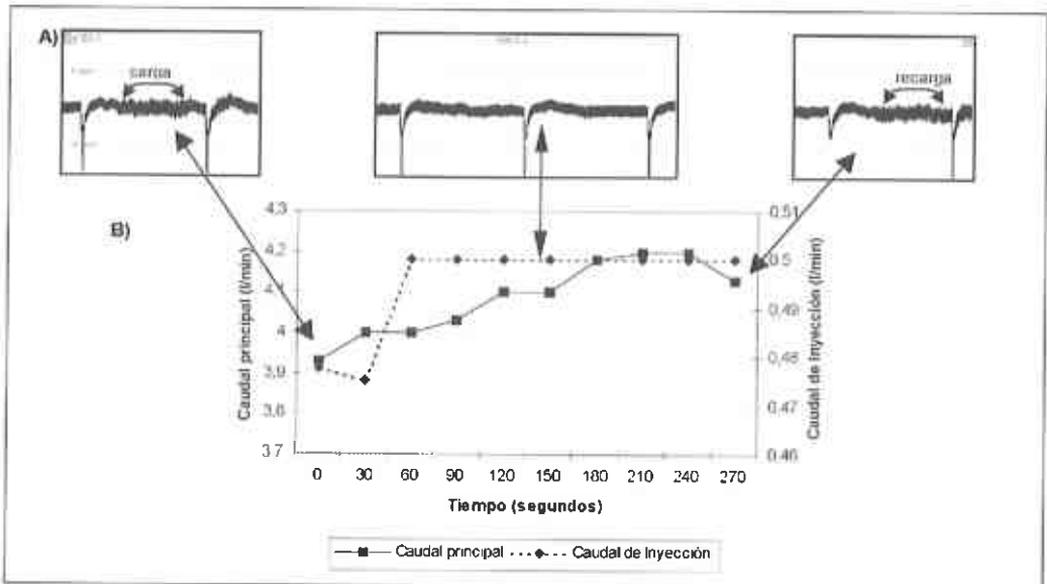


Figura 7. A) evolución de la línea base y las respuestas de *C. welensii* frente a estimulaciones sucesivas cada 30 segundos [(E)-2-hexenal 50% en aceite de parafina], durante un ciclo completo carga-recarga del compresor. B) fluctuación media de los caudales "principal" y "de inyección" suministrados por el compresor, a partir de tres ciclos seguidos fin de carga (T=0) <math>\diamond</math> reinicio de carga (T=270). Presión de salida: 2 bares; temperatura: 25,5°C.

muestran que la frecuencia de 15 segundos puede resultar insuficiente 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. welen-sii* frente a la inyección de 20 ml de (*E*)-2-hexenal al 50% (v/v) en aceite de parafina (fig. 6).

Esta frecuencia de inyección, unida al flujo de aire aplicado y a la cantidad y concentración de estímulo empleadas, hacen que podamos considerar que las condiciones de estimulación han sido intensas. En este sentido, el caudal principal resulta medio-alto comparado con los 0.25 l/min de nitrógeno empleados por CORK *et al.* (1990) y los 9 l/min de DEN OTTER y SAINI (1985); la cantidad de disolución utilizada (20 ml) es simi-

lar a los 25 ml empleados por diversos autores (BARATA, 1997; PARK y HARDIE, 1998; VAN TOL y VISSER, 2002), y aunque está muy por debajo de los 50 ml de WEIBBECKER *et al.* (1997) se puede considerar alta frente a los 3 ml de BARATA *et al.* (2002) o los 10 ml de WHITE y BIRCH (1987), y PARK *et al.* (2002). Estas condiciones de estimulación intensas han permitido la captación de respuestas por pequeñas que éstas pudieran resultar: y sin embargo el comportamiento de las respuestas no hace temer la saturación de los receptores olfativos o la aparición de problemas de desecación de la antena frente a flujos de aire continuos de tal magnitud.

Por último, las causas por las que no se encuentra ningún tipo de respuesta en algunos insectos pueden ser de dos tipos: no se logra un contacto eléctrico adecuado con la

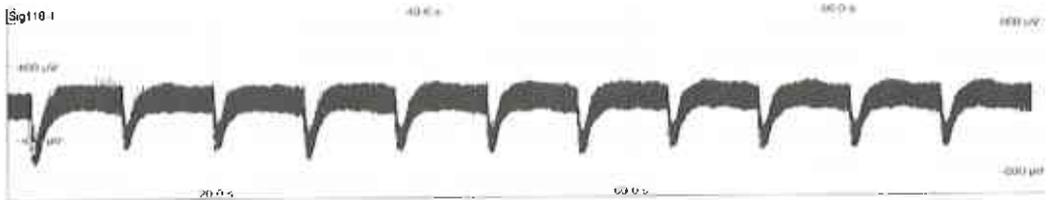


Figura 8. Respuestas de *C. welen-sii* frente a inyecciones sucesivas, automatizadas cada 9 segundos, con 20 ml de (*E*)-2-hexenal 50% (v/v) en aceite de parafina.

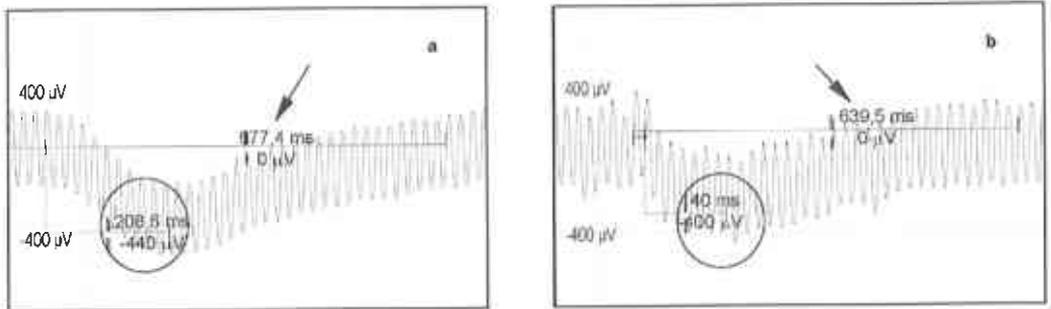


Figura 9. Respuestas de un ejemplar de *P. germari* frente a 20 ml de trementina al 50% (v/v) en aceite de parafina, aplicados mediante dos procedimientos: a) inyección manual de 10 ml de aire con jeringa; b) inyección automatizada (0.5 l/min durante 0.3 s; equivalentes a  $\approx$ 2.5 ml). La circunferencia enmarca los valores del potencial negativo máximo (440 mV en el primer caso y 400 mV 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.

antena del insecto, o bien puede que el estado fisiológico del mismo no sea el adecuado; también pueden darse las dos cuestiones simultáneamente.

El contacto eléctrico puede entorpecerse por muchas razones: obstaculización del flujo de hemolinfa dentro de los electrodos por alguna partícula; 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 la mala colocación inicial de alguno o los dos electrodos. En varios insectos en los cuales no se encontró respuesta se pudo apreciar que la preparación de la antena para la colocación de los electrodos no ocasionaba flujo de hemolinfa, o éste era escaso. Este grado de deshidratación 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.

#### ABSTRACT

SÁNCHEZ-OSORIO I., R. TAPIAS, G. LÓPEZ, L. DOMÍNGUEZ. 2006. Device for testing the electroantennographic response to olfactory stimuli within Cerambycidae: basic frame and main parameters. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 109-119.

Electroantennography (EAG) is an electrophysiological technique using the electrical nature of the excitation of olfactory receptors in insects, after being stimulated by a volatile compound. This quality allows to study the role of semiochemical compounds in insects behaviour. After analyzing several equipments to study the EAG response, we propose a device for the application of these studies to woodborer beetles, particularly focussed to medium and large size species of the Cerambycidae family, like *Cerambyx* spp. and *Prinobius germari*, two of the main *Quercus* woodborers in Spain. The results show that both device and methodology proposed are suitable, allowing stable and low base-lines, as well as typical appearance of EAG responses, caused for a rapid depolarization followed by a more slow recovery phase back to the standing potential. These results display an interesting set of opportunities around the role of the olfactory cues in silophilous cerambycids behaviour, and the application of this knowledge within an integrated pest management context.

**Key words:** electrophysiology, EAG, *Cerambyx*, *Prinobius*, *Quercus*.

#### REFERENCIAS

- BARATA, E. 1997: Olfactory mechanism underlying host-finding by the *Eucalyptus* woodborer, *Phoracantha semipunctata* Fab. (Coleoptera, Cerambycidae). A behavioural and electrophysiological approach. *Tesis doctoral*. Universidad de Évora, Portugal. 202 pp.
- BARATA, E. N., FONSECA, P., MATEUS, E., ARAÚJO J. 1992: Host-finding by *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera, Cerambycidae): Host volatiles, electroantennogram recordings and baited field traps. *Proceedings of the 8th International Symposium on Insects-Plant Relationships*. Kluwer Academic, Dordrecht. pp.: 133-135.
- BARATA, E., MUSTAPARTA, H., PICKETT, J., WADLIAMS, L., ARAUJO, J. 2002: Encoding of host and non-host plant odours by receptor neurones in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera, Cerambycidae) [en línea]. Disponible en <http://link.springer.de/link/service/journals/00359/contents/02/00282/paper> [Consulta: 15 de mayo de 2005].
- CORACINI, M., BENGTSOON, M., RECKZIEGEL, A., LOFQUIST, J., FRANCKE, W., VIIJELA, E., EIRAS, A., KOVALESKI, A., WITZGALL, P. 2001: Identification of a four-component sex pheromone blend in *Bonagota cranandes* (Lepidoptera, Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, 94 (4): 911-914.
- 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 morsitan 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]. Disponible en

- archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z-2002/0185* [Consulta, enero de 2005].
- 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.
- KAISLING, K. E. 2002: Model of perireceptor and receptor events in olfactory sensilla. En: ESITO-VI: *European Symposium for Insect Taste and Olfaction* [en línea]. Disponible en [www.esito-symp-org/](http://www.esito-symp-org/) [Consulta junio de 2005].
- KELLING, F. J. 2001: Olfaction in Houseflies: Morphology and Electrophysiology [en línea]. Disponible en [www.ub.rug.nl/lede/disciplines/144](http://www.ub.rug.nl/lede/disciplines/144) pp. [Consulta, enero de 2005].
- LANSKY, P. 2001: Receptor heterogeneity and its effect on sensitivity and coding range in olfactory sensory neurons. *Bulletin of Mathematical Biology*, **63**: 885-908.
- 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.
- NAGAI, T. 1981: Electroantennogram response gradient on the antenna of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.*, **27**: 889-894.
- PARK, K. C., HARDIE, J. (1998): An improved aphid electroantennogram. *Journal of Insect Physiology*, **44** (10): 919-928.
- PARK, K., OCHIENG, S., ZHU, J., BAKER, T. 2002: Odor discrimination using insect electroantennogram responses from an insect antennal array. *Chem. Senses*, **27**: 343-352.
- ROELOFS, W. L., 1984: Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. En: *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: *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. 161-178.
- 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 *Otiiorhynchus sulcatus* to plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **102**: 49-64.
- WEHBECKER, B., SCHÜLZ, 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.

(Recepción: 12 agosto 2005)

(Aceptación: 14 diciembre 2005)

