

## Tesis Doctoral

# Estudios sobre el superparasitismo de larvas de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) por el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)

Devescovi, Francisco

2015-03-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Devescovi, Francisco. (2015-03-26). Estudios sobre el superparasitismo de larvas de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) por el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Devescovi, Francisco. "Estudios sobre el superparasitismo de larvas de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) por el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-26.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudios sobre el superparasitismo de larvas de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) por el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Francisco Devescovi**

Director de tesis: Dr. Diego F. Segura  
Consejero de Estudios: Dr. Javier López de Casenave

Lugar de trabajo: Instituto de Genética "Ewald A. Favret", INTA Castelar.

Buenos Aires, 26 de marzo de 2015

# **Estudios sobre el superparasitismo de larvas de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) por el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)**

## **Resumen**

El endoparasitoide solitario larval *Diachasmimorpha longicaudata* ha sido ampliamente utilizado como agente de control de moscas de la fruta que generan grandes pérdidas económicas. Con el objetivo general de conocer los procesos que influyen en su desarrollo y ciclo de vida utilizando *Ceratitis capitata* como especie hospedadora, en esta tesis se evaluaron los efectos del fenómeno conocido como superparasitismo (*i.e.* oviposición en un hospedador previamente parasitado por la misma u otra hembra de la misma especie) sobre parámetros relacionados al éxito reproductivo y aspectos del comportamiento, genética y electrofisiología. El superparasitismo resultó ser un fenómeno común en la cría experimental del IGEAF (INTA, Castelar). En aquellos niveles de superparasitismo en los que fue posible un completo desarrollo del adulto, no se registraron consecuencias asociadas al éxito reproductivo. La eliminación de las larvas competidoras durante el primer estadio larval permitiría que la mayor parte del desarrollo se produzca sin competencia, explicando la falta de efecto sobre el adulto. Estudios comportamentales mostraron que algunas hembras evitan superparasitar mientras que otras oviponen al azar, sugiriendo en éstas últimas, una incapacidad para discriminar larvas parasitadas y no parasitadas. Al evaluar un posible componente genético en hembras con y sin esa habilidad no se encontró una correlación con sus respectivas hijas (análisis de correlación e isoclinas). Estimulaciones en el extremo del ovipositor mediante técnicas de electrofisiología no evidenciaron una habilidad de discriminación entre larvas parasitadas y no parasitadas por parte del adulto. En conjunto, los resultados de esta tesis aportan nueva información sobre la biología básica de *D. longicaudata*, y contribuyen a futuros estudios dirigidos a una mejora en el proceso de cría artificial de este agente de control biológico de moscas de los frutos.

Palabras Clave: Superparasitismo, parasitoide, Hymenoptera, Moscas de la fruta, Tephritidae, plagas, cría artificial, efectos del superparasitismo, discriminación de hospedadores, electrofisiología, genética.

**Superparasitism on the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*  
(Diptera: Tephritidae) larvae by the parasitoid *Diachasmimorpha  
longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)**

**Abstract**

The solitary larval endoparasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* has been widely used as a biological control agent against fruit flies of economic importance. With the aim of assessing processes affecting its development and life cycle when artificially reared on *Ceratitis capitata* as host species, in the current thesis the effects of the phenomenon known as superparasitism (*i.e.* oviposition in a previously parasitized host) on fitness related parameters and several aspects regarding behavior, genetics and electrophysiology were studied. Superparasitism was a common phenomenon in the experimental rearing located at IGEAF (INTA, Castelar). For those levels in which a full development was possible, no negative consequences on the adult fitness were recorded. Elimination of supernumerary larvae during the first instar probably allowed to the surviving larva an almost normal development without the effects of a prolonged competition. Behavioral studies showed that some individually tested females avoid superparasitism, while other females laid their eggs randomly, suggesting a lack of host discrimination ability for the latter. When the possible genetic component of females' oviposition behavior regarding host discrimination and superparasitism was studied, neither a correlation with their respective daughters nor differences between isofemales strains were observed. Stimulations on the ovipositor apex using electrophysiological techniques did not provide a sensory basis for discrimination among parasitized and unparasitized larvae. In all, the results of this thesis contribute with new information about the basic biology of *D. longicaudata* for future studies aimed to improve artificial rearing processes of this important biological control agent.

Key Words: Superparasitism, parasitoid, Hymenoptera, fruit fly, Tephritidae, pest, artificial rearing, effects of superparasitism, host discrimination, electrophysiology, genetics.

## **Agradecimientos**

A quien más quiero agradecer es a mi director, Diego Segura, por haberme ayudado en todo momento con lo que necesité; tanto para organizarme, analizar y discutir problemas, guiarme, como también trabajar a mi lado cuando hizo falta. Siempre estuvo, incluso en el último ping pong de mails y archivos a altas horas de la noche en esta etapa de la vida de crecimiento familiar, que no debe ser fácil. Diego, un honor ser tu estudiante.

A Mariana Viscarret, por ser la que me permitió entrar al “Grupo Moscas” en el 2005 y estar en los primeros pasos de mi formación como investigador y luego estar disponible siempre que hubo que discutir algún problema. Desde que te mudaste se hizo menos frecuente el contacto, y me hubiera gustado tenerte más al tanto de mis progresos porque se que tus aportes son valiosos.

A todos los que pertenecen o pertencieron al grupo por todos los buenos momentos: Clara, Guille, Ana, Diego, Claudia, Costi, Marianela, Faby, Ceci, Lida, Silvia, Alita, Ale S., Irina, Germán, Pato, Eugenia y en especial a Jorge, por ser como un padre más que un jefe, intentando mejorar siempre las condiciones de trabajo y aportando siempre una vuelta de rosca en cada discusión.

Quiero agradecer especialmente a Guille, Clarita, Ana, Faby por las manos prestadas para ayudarme en los experimentos (pero también a juntar pecanes y paltas), que sin ellos hubiera sido difícil terminar la tesis a tiempo.

A Teresa Vera que, junto con Diego, posibilitó mis viajes a Viena y a Wageningen que me hicieron crecer enormemente como investigador, permitiendome conocer nuevos grupos de trabajo, profesionales y estudiantes de diversas disciplinas de la biología.

A mi consejero de estudios, Javier López de Casenave, por su siempre buena onda y excelentes cursos.

A Carlos Cáceres, en quien conocí a una persona muy amable y dispuesta a ayudar en lo que fuera.

Quiero agradecerle a Juan Rull por el apoyo y confianza que tuvo en mí para los intensivos trabajos que hicimos en Viena, que culminaron como mi primera publicación científica como primer autor.

A Joop van Loon y Hans Smid por haberme abierto las puertas del laboratorio para usar ese equipo tan delicado y difícil de poner a punto para hacer las mediciones electrofisiológicas. Siempre fueron muy amables y me ayudaron como pudieron, buscando el tiempo para hacerlo.

Agradezco a Joop van Lenteren, Joop van Loon, Lia Hemerik, Romina Barrozo y Eric Wajnberg por los comentarios, sugerencias y dudas despejadas para el diseño de experimentos o análisis y discusión de resultados.

A mis amigos, por sacarme de la rutina jugando al fútbol, paddle, juntadas, cenas, bebidas.

Agradezco al CONICET, por haberme otorgado las becas Tipo I y II y a la financiación de mis actividades en el laboratorio a través de diversos proyectos (PICT, PIP, etc.).

Al INTA, que me vió crecer desde el jardín y brindó un lugar que, junto con su gente, muchos envidiarían.

Por último, pero no menos importante, les doy las gracias a Mechi, Pedro, Marilén y Cacho, mi familia, que siempre me apoyaron, me motivaron, y estuvieron en todo momento presente. A ellos les dedico esta tesis.

# Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimientos.....	iii
<b>Capítulo 1. Introducción general.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>Objetivos de la tesis.....</b>	<b>8</b>
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
<b>Hipótesis.....</b>	<b>8</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>9</b>
<b>Capítulo 2. Efectos del superparasitismo sobre estadios inmaduros y adultos de Diachasmimorpha longicaudata utilizando Ceratitis capitata como hospedador...13</b>	
<b>Introducción.....</b>	<b>14</b>
2.1. Objetivos.....	18
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>19</b>
2.1. Insectos.....	19
2.2. Experimentos.....	19
2.2.1. Niveles de superparasitismo en la cría artificial.....	20
2.2.2. Métodos controlados para generación de NSPs.....	20
2.2.3. Efectos del superparasitismo en estadios inmaduros.....	22
2.2.4. Efectos del NSP sobre el tiempo de desarrollo, porcentaje de emergencia y tasa sexual.....	23
2.2.5. Fecundidad de las hembras y porcentaje de parasitismo y tasa sexual en la primera generación.....	24
2.2.6. Supervivencia y resistencia al hambreado.....	25
2.2.7. Capacidad de vuelo.....	26
2.2.8. Estimación de tamaño del adulto.....	26
<b>Resultados.....</b>	<b>28</b>
2.1. Niveles de Superparasitismo en la cría artificial.....	28

2.2. Métodos artificiales para generación de NSP.....	28
2.3. Efectos del superparasitismo en estadios inmaduros.....	29
2.4. Efectos del NSP sobre el tiempo de desarrollo, porcentaje de emergencia y proporción sexual .....	35
2.5. Fecundidad y porcentaje de parasitismo y proporción sexual en F1.....	37
2.6. Supervivencia y resistencia al hambreado.....	39
2.7. Capacidad de vuelo.....	41
2.8. Efectos del superparasitismo en el tamaño del adulto.....	42
<b>Discusión.....</b>	<b>45</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>50</b>
<b>Capítulo 3. Discriminación de larvas parasitadas y no parasitadas de <i>C. capitata</i> y <i>A. fraterculus</i> por parte de las hembras de <i>D. longicaudata</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>58</b>
3.1. Objetivos.....	61
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>62</b>
3.1. Insectos y condiciones generales.....	61
3.2. Métodos directos.....	63
3.2.1. <i>D. longicaudata</i> - <i>C. capitata</i> .....	63
3.2.2. <i>D. longicaudata</i> – <i>A. fraterculus</i> .....	65
3.3. Métodos indirectos.....	66
<b>Resultados.....</b>	<b>67</b>
3.1. Métodos directos.....	67
3.1.1. <i>D. longicaudata</i> - <i>C. capitata</i> .....	67
3.1.2. <i>D. longicaudata</i> – <i>A. fraterculus</i> .....	73
3.3. Métodos indirectos.....	77
<b>Discusión.....</b>	<b>80</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo 4. Bases genéticas del comportamiento de <i>D. longicaudata</i> para la discriminación entre larvas parasitadas y no parasitadas de <i>C. capitata</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>93</b>
4.1. Objetivo.....	95
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>95</b>



4.1. Insectos.....	95
4.2. Obtención de isolíneas.....	96
4.3. Evaluación de hijas.....	96
4.4. Análisis de datos.....	97
4.4.1. Regresión madres-hijas.....	97
4.3.2. Análisis de isolíneas.....	97
<b>Resultados</b> .....	98
<b>Discusión</b> .....	102
<b>Referencias</b> .....	106
<b>Capítulo 5. Quimiorreceptores y electrofisiología en el ovipositor de <i>D. longicaudata</i></b> .....	
<b>longicaudata</b> .....	110
<b>Introducción</b> .....	111
5.1. Objetivos .....	114
<b>Materiales y Métodos</b> .....	114
5.1. Insectos.....	114
5.2. Morfología y ubicación de receptores de gustación .....	115
5.3. Electrofisiología de receptores gustativos.....	116
5.3.1. Dispositivo de registro.....	116
5.3.2. Procedimiento para el registro de la señal electrofisiológica.....	118
<b>Resultados</b> .....	121
5.1. Morfología y ubicación de receptores.....	120
5.2. Electrofisiología.....	122
<b>Discusión</b> .....	128
<b>Referencias</b> .....	131
<b>Capítulo 6. Conclusiones finales</b> .....	
	135
<b>Material suplementario. ANEXO</b> .....	
	138

# Capítulo 1

## Introducción general

## Introducción

### *Valoración de hospedadores por insectos parasitoides*

Todos los animales están sujetos a toma de decisiones en casi todos los aspectos de sus vidas, especialmente cuando se trata de situaciones que reflejarán un mayor o menor éxito reproductivo (*e.g.* elección del alimento, refugio, pareja, sitios de oviposición, etc.) y la selección natural debería favorecer aquellos individuos que optimicen la búsqueda y explotación de recursos (Hoffmeister y Roitberg 1997). Particularmente, los insectos de hábito parasitoide depositan sus huevos sobre o dentro de sus hospedadores, a excepción de algunos dípteros y coleópteros, cuyos huevos son depositados cerca de los hospedadores y son sus larvas las encargadas de encontrarlos (Godfray 1994, Feener y Brown 1997). El sitio de oviposición determinará si la especie es clasificada como endo o ectoparasítica. A su vez, ambas formas pueden ser solitarias o gregarias, refiriéndose a la capacidad de una especie de producir uno o más de un adulto por hospedador, respectivamente, a partir de un número inicial de huevos depositado en cada individuo hospedador. La condición que todos los parasitoides comparten es que cada individuo se desarrolla a partir de la alimentación de un único hospedador, sin poder trasladarse o buscar otro bajo condiciones de estrés (Salt 1936). Los hospedadores son considerados, por lo tanto, como unidades discretas que representan una cantidad y calidad de recurso predeterminado. Por estas razones, presiones de selección natural favorecerán a las hembras adultas que elijan el sustrato de mejor calidad posible que, a su vez, determinará el éxito de desarrollo de su descendencia (Brodeur y Boivin 2004, Wajnberg *et al.* 2008).

### *Importancia del estado de parasitación*

Uno de los parámetros de calidad del hospedador con efectos sobre el éxito reproductivo es el estado de parasitación (*e.g.* no parasitado, parasitado por la misma hembra o conespecíficos, parasitado por otra especie, número de huevos). Suponiendo que una hembra posee la capacidad de determinar la calidad del hospedador, deberá decidir si incurrir o no en superparasitismo, definido como la oviposición en un hospedador previamente parasitado (Salt 1934) por la misma u otra hembra de la misma especie. Se han encontrado una gran cantidad de factores que afectan esta decisión, entre ellos la edad de la hembra, su estado de alimentación, su tamaño, el estadio y

estado del hospedador (Vet *et al.* 2002). La habilidad o capacidad de discriminación podría ser vista como una respuesta evolutiva en parasitoides solitarios para evitar los efectos de la competencia larval, que es de vital importancia específicamente en parasitoides solitarios. Sin embargo, el superparasitismo es común en la naturaleza y en poblaciones criadas artificialmente.

#### *Aceptación de hospedadores parasitados*

En un principio, el superparasitismo fue considerado como un error o incapacidad de las hembras para diferenciar hospedadores parasitados (van Lenteren 1981), aunque luego esa concepción fue cambiando. Actualmente, la capacidad de discriminación entre hospedadores parasitados y no parasitados ha sido confirmada en una gran cantidad de especies (van Lenteren 1981, Mackauer 1990, van Alphen y Visser 1990, Brodeur y Boivin 2004) y se considera que el hecho de que las hembras que son capaces de discriminar incurran de todas formas en superparasitismo porque probablemente este comportamiento sea adaptativo bajo determinadas combinaciones de factores internos y externos a las hembras. Asimismo, esta capacidad puede variar entre individuos de una misma población a causa de diferencias genéticas (Wajnberg 2010). Esto último ha sido demostrado en varias especies de parasitoides en relación a diferentes comportamientos de forrajeo y oviposición mediante técnicas sencillas de análisis cuantitativo (Futuyma y Peterson 1985, Wajnberg 2010). Existen otros casos en los cuales el superparasitismo no responde a una estrategia evolutiva de las hembras. Recientemente Varaldi *et al.* (2003, 2006) encontraron que el superparasitismo podría estar bajo la influencia de virus simbioses que manipulan el comportamiento de oviposición de los parasitoides para favorecer su transmisión horizontal.

#### *El parasitoide de moscas de los frutos Diachasmimorpha longicaudata*

*Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) es un endoparasitoide, koinobionte, solitario y sinovigénico, ya que se desarrolla dentro el hospedador, el cual continúa su desarrollo hasta la pupación luego de ser parasitado, del que emergerá sólo un parasitoide adulto con una carga inicial de huevos maduros con capacidad de continuar produciéndolos, respectivamente. Tiene una amplia distribución natural, y fue encontrado desde el sur y el sudoeste asiático hasta Australia (Wharton y Gilstrap 1983). Es un parasitoide generalista cuyos hospedadores nativos son moscas

del género *Bactrocera* (Tephritidae), pero también ataca los últimos estadios larvales [entre el segundo estadio larval tardío y el tercero temprano (Fisher 1971)] de varias otras especies de moscas de la fruta de la familia Tephritidae. El adulto emerge del pupario de la mosca, que muere en el estado pupal. Según Paladino *et al.* (2010), el desarrollo completo huevo-adulto de este parasitoide criado sobre *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) a 25°C, 85% HR y fotoperíodo 18:6 L:D toma aproximadamente 16 días, informando la duración de cada estadio como: huevo = 1,5 días; primer estadio larval = 1,5 días; segundo estadio larval = 2,7 días; tercer estadio larval = 1,5 días; prepupa = 2,5 días; pupa = 3 días; y adulto formado = 3 días. Comparativamente, Meirelles *et al.* (2013) utilizando el mismo sistema (25 ± 2°C; 65 ± 10% HR; 14:10 L:D) pero con insectos de una cría diferente, detallaron que los machos emergieron a los 18,5 ± 0,13 días y las hembras a los 19,2 ± 0,23 días. Las respectivas duraciones empleando a *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) fueron 17,2 ± 0,13 días para machos y 18,8 ± 0,17 días para hembras (Meirelles *et al.* 2013).

#### *La selección del hospedador para la oviposición en D. longicaudata*

Las larvas de moscas tefritidas se encuentran ocultas dentro de los frutos, por lo que se ha propuesto que *D. longicaudata* utiliza claves de tipo vibratorio y químico producidas por las larvas para la orientación una vez que se halla sobre un fruto infestado (Lawrence 1981, Duan y Messing 2000). Para poder discriminar entre hospedadores parasitados y no parasitados, las hembras deberán detectar claves o señales presentes en el hospedador que den información acerca de su estado. Los parasitoides están dotados de una gran cantidad y variedad de receptores sensoriales para percibir el mundo que los rodea (Basibuyuk *et al.* 2000). Existen receptores en antenas, tarsos y ovipositor, entre otras estructuras, posiblemente utilizados para evaluar a su hospedador tanto a partir de estímulos volátiles como gustativos (Meyhöfer *et al.* 1997, Obonyo *et al.* 2011). En *D. longicaudata*, Greany *et al.* (1977) sugieren que quimio y mecanoreceptores situados en el ovipositor informan a la hembra sobre el estado de parasitación, dado que el ovipositor entra en contacto directo con el hospedador. La información recogida por estos receptores será integrada en el sistema nervioso central junto con información proveniente tanto del exterior como del interior del insecto, y se determinará la respuesta final ante un determinado hospedador. Si la

decisión es la de oviponer, luego de penetrar la cutícula de la larva, la hembra la domina inyectando un veneno paralizante y prosigue con la oviposición (Montoya *et al.* 2003). Hasta el momento, en esta especie se desconoce si alguna señal es depositada durante o luego de la oviposición.

### *Moscas de los frutos plaga en Argentina*

La producción frutícola de regiones tropicales, subtropicales y templadas se ve afectada por moscas de la fruta pertenecientes a la familia Tephritidae. En Argentina, existen dos especies plaga de carácter cuarentenario: *C. capitata* y *A. fraterculus*. Ambas especies depositan sus huevos en el interior de los frutos que servirán de alimento para sus larvas. El perjuicio que estas moscas causan es doble: daño directo en la fruta por actividad de la larva y limitaciones al acceso a potenciales mercados por la imposición de restricciones cuarentenarias por parte de países libres de estas plagas (Malavasi *et al.* 1994). *Ceratitidis capitata*, o mosca del Mediterráneo, es una plaga cosmopolita muy importante debido a su gran capacidad invasora, destructiva y con un amplio rango de hospederos frutales (Christenson y Foote 1959). *Anastrepha fraterculus* es nativa de América del Sur, es polífaga y coexiste con *C. capitata* en el noroeste y noreste argentino (Ovruski *et al.* 2003, Segura *et al.* 2006) desde hace aproximadamente 100 años (Vergani 1952).

### *Métodos de control: técnica de insecto estéril y control biológico*

En nuestro país, los programas de control se han focalizado principalmente en la mosca del Mediterráneo, siendo la aplicación de insecticidas el método más utilizado. Sin embargo, con el surgimiento de técnicas alternativas agrupadas en lo que se conoce como Manejo Integrado de Plagas (MIP) comenzó a aplicarse la técnica del insecto estéril (TIE) (Knippling 1955) en determinadas regiones. La TIE se basa en la capacidad de criar artificialmente, esterilizar por irradiación y liberar insectos de la misma especie plaga, siendo aun sexualmente competitivos con los individuos silvestres, de manera tal que aquellas hembras que se apareen con un macho estéril (y no lo hagan con un macho silvestre) no producirán descendencia y disminuirá el tamaño poblacional con sucesivas repeticiones del proceso (Metcalf y Luckman 1994). Desde hace unos años, se evalúa incluir, dentro de las herramientas de manejo que conforma el MIP contra moscas de la fruta, la utilización de enemigos naturales en el marco de un programa de control

biológico (Ovruski et al. 1999). Por su utilidad como agente de control biológico de moscas de la fruta, *D. longicaudata* fue introducido en EEUU y México (Wong et al. 1991) y más tardíamente en Argentina (Ovruski et al. 1999). Su cría resulta relativamente sencilla y se puede realizar artificialmente sobre varias especies de moscas tefritidas de otros géneros (como *Anastrepha* y *Ceratitis*) (White y Elson-Harris 1992). En la actualidad los programas de control de moscas de la fruta en Argentina están iniciando su cría masiva utilizando como hospedador a *C. capitata* (Cladera et al. 2008, Taret 2008).

#### *El superparasitismo como problema*

A pesar de las ventajas del control biológico aumentativo, este método es criticado por los costos de producción, ya que, además de la necesidad de criar a la especie hospedadora, la tasa de parasitismo (productividad de la cría masiva) es raramente superior al 50%. Esta situación podría mejorar si se conocieran los factores que regulan esta tasa. Dentro de estos factores se encuentran las pérdidas debidas a la respuesta inmune del hospedador (Lemaitre y Hoffmann 2007) y las pérdidas por superparasitismo (Lawrence 1988). Al tratarse de una especie solitaria, el superparasitismo reduce las posibilidades de sobrevivir de alguno de los dos o más embriones (Lawrence 1988, Vinson y Hegazi 1998) que podrían desarrollarse en hospedadores no parasitados, aumentando el porcentaje de parasitismo y por ende la eficiencia productiva. Además, como se mencionó anteriormente, la calidad de los adultos estimada a través de parámetros del éxito reproductivo también podría ser afectada por el superparasitismo (Lawrence 1988, van Alphen y Visser 1990).

#### *Estudios previos sobre el superparasitismo en D. longicaudata*

Diversos aspectos del superparasitismo han sido estudiados en *D. longicaudata*, principalmente utilizando moscas del género *Anastrepha* como hospedadores. Utilizando *Anastrepha suspensa* Loew (Diptera: Tephritidae), Greany et al. (1977) estudiaron la morfología y ultraestructura del ovipositor en búsqueda de receptores que pudieran estar asociados a la detección y evaluación del hospedador. Por su parte, Lawrence et al. (1978) evaluaron el comportamiento de oviposición en grupos de hembras a diferentes densidades de hospedadores, sugiriendo la existencia de una capacidad de discriminación. Más tarde, Lawrence (1988) evaluó los mecanismos de

eliminación *in vivo* e *in vitro* de estadios inmaduros en situaciones de superparasitismo, observando que la eliminación ocurre durante estadios tempranos mediante mecanismos de supresión fisiológica y por combate físico. Utilizando *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae), Montoya *et al.* (2000) observaron un aumento de la actividad de parasitación en presencia de hembras conespecíficas, con una fuerte tendencia a parasitar varias veces un mismo hospedador (aún sin competencia con otras hembras) e informaron una disminución de la emergencia al aumentar la relación parasitoides: hospedadores a causa del superparasitismo. Montoya *et al.* (2003) determinaron que hembras con o sin experiencia de oviposición previa tienen un patrón de oviposición similar, aunque las primeras redujeron su tendencia a superparasitar con una mayor tasa de rechazo en larvas parasitadas 24 hs antes del ensayo. Concluyeron que la capacidad de discriminación es innata en *D. longicaudata*. González *et al.* (2007) observaron una alta prevalencia de hospedadores superparasitados, asociado a una disminución de la tasa de emergencia y un sesgo en la proporción sexual hacia una mayor producción de hembras. La longevidad y la fecundidad no resultaron afectadas por el superparasitismo, aunque la habilidad de vuelo fue menor en adultos emergidos de larvas parasitadas sólo una vez. Montoya *et al.* (2011) sugieren que la influencia del tamaño del hospedador en la decisión en la asignación del sexo del huevo a ser depositado es anulada por efectos asociados al superparasitismo, que a su vez está asociado positivamente al tamaño del hospedador. Montoya *et al.* (2013) determinaron que el superparasitismo es común en cultivos de mangos. El tamaño de estos frutos estuvo correlacionado positivamente con niveles de infestación por *Anastrepha* spp., y a su vez, con la tasa de parasitismo y superparasitismo. Altafini *et al.* (2013) determinaron que *D. longicaudata* superparasita larvas de *C. capitata* y *A. fraterculus* y que existe una proporción parasitoides:hospedador (asociada a distintas tasas de superparasitismo) óptima para la cría de este parasitoides. Por último, en *C. capitata*, Paladino *et al.* (2010) evaluaron la prevalencia de casos con superparasitismo en la cría experimental del IGEAF.

En esta tesis se estudiaron los efectos del superparasitismo y aspectos del comportamiento, la genética y la fisiología relacionados a este fenómeno en *D. longicaudata* en una cría experimental establecida en 1999 en el Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica, Instituto de Genética, INTA Castelar, que utiliza a *C. capitata* como hospedador. Se espera que los conocimientos generados sirvan para comprender mejor la biología de esta especie y que puedan ser aplicados en



el futuro para aumentar la eficiencia de crías masivas o semi-masivas en el marco de programas de control biológico.

## **Objetivos de la tesis**

### Objetivo general

Determinar la prevalencia y los efectos del superparasitismo bajo condiciones de laboratorio en el sistema *Diachasmimorpha longicaudata* – *Ceratitis capitata* y la capacidad de discriminación de larvas parasitadas desde una perspectiva comportamental, genética y electrofisiológica.

### Objetivos específicos

1. Estudiar la dinámica de eliminación de larvas supernumerarias en hospedadores superparasitados y el impacto del superparasitismo sobre parámetros biológicos en el sistema *D. longicaudata* - *C. capitata*. (Capítulo 2)
2. Determinar si *D. longicaudata* posee la habilidad de discriminar entre hospedadores parasitados y no parasitados. (Capítulo 3)
3. Evaluar las bases genéticas del comportamiento de discriminación de hospedadores parasitados en el parasitoide *D. longicaudata*. (Capítulo 4)
4. Evaluar la existencia de receptores ubicados en el ovipositor de *D. longicaudata* y determinar su rol en la discriminación de larvas de *C. capitata* con distinto estado de parasitación. (Capítulo 5)

## **Hipótesis**

1. El superparasitismo genera efectos adversos sobre el éxito reproductivo en el parasitoide *D. longicaudata*.
2. Las hembras de *D. longicaudata* son capaces de discriminar larvas hospedadoras de *C. capitata* previamente parasitadas de aquellas no parasitadas.
3. La variabilidad en los patrones de distribución de las oviposiciones de *D. longicaudata* se debe, al menos en parte, a variabilidad en genes asociados a la habilidad para discriminar larvas parasitadas.

4. Las hembras de *D. longicaudata* poseen estructuras sensoriales gustativas que les brindan información acerca del estado de parasitación de larvas de *C. capitata*.

## Referencias

- Altafini D.L., Redaelli L.R. y Jahnke S.M.** 2013. Superparasitism of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *The Florida Entomologist*, 96: 391-395.
- Basibuyuk H.H., Quicke D.L., Rasnitsyn A.P. y Fitton M.G.** 2000. Morphology and sensilla of the orbicula, a sclerite between the tarsal claws, in the Hymenoptera. *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 625-636.
- Brodeur J. y Boivin G.** 2004. Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Reviews in Entomology*, 49: 27-49.
- Christenson L.D. y Foote R.** 1959. Biology of Fruit Flies. *Annual Reviews of Entomology*, 5: 171-192.
- Cladera J.L., Viscarret M.M., Soria A., Carabajal Paladino L., Pietreck A., Ovruski S.** 2008. More than two: integrating biological control and sterile insects, from factory to field, and the possibility of its implementation in Argentina. En: *Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, Salvador, Brazil, pp. 143-155.
- Duan J.J. y Messing R.H.** 2000. Effects of host substrate and vibration cues on ovipositor-probing behavior in two larval parasitoids of tephritid fruit flies. *Journal of Insect Behavior*, 13: 175-186.
- Feener D.H. y Brown B.V.** 1997. Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 42: 73-97.
- Fisher R.C.** 1971. Aspects of the physiology of endoparasitic Hymenoptera. *Biological reviews*, 46: 243-278.
- Futuyma D.J. y Peterson S.C.** 1985. Genetic variation in the use of resources by insects. *Annual review of entomology*, 30: 217-238.
- Godfray H.C.J.** 1994. *Parasitoids behavioural and evolutionary ecology*. 1<sup>st</sup> edn. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 473 pp
- González P.I., Montoya P., Perez-Lachaud G., Cancino J. y Liedo P.** 2007. Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 40: 320-326.
- Greany P.D., Hawke S.D., Carlyle T.C. y Anthony D.W.** 1977. Sense organs in the ovipositor of *Biosteres (Opius) longicaudatus*, a parasite of the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America*, 70: 319-321.

- Hoffmeister T.S. y Roitberg B.D.** 1997. To mark the host or the patch: decisions of a parasitoid searching for concealed host larvae. *Evolutionary Ecology*, 11: 145-168.
- Knipling G.F.** 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48, 459-462.
- Lawrence P.O.** 1981. Host vibration - a cue to host location by the parasite, *Biosteres longicaudatus*. *Oecologia*, 48: 249-251.
- Lawrence P.O.** 1988. Intraspecific competition among first instars of the parasitic wasp *Biosteres longicaudatus*. *Oecologia*, 74: 607-611.
- Lawrence P.O., Greany P.D., Nation J.L. y Baranowski R.M.** 1978. Oviposition behavior of *Biosteres longicaudatus*, a parasite of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America*, 71: 253-256.
- Lemaitre B. y Hoffmann J.** 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *The Annual Review of Immunology*, 25: 697-743.
- Mackauer M.** 1990. Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids. En: Mackauer M. y Ehler L.E. (eds.), *Critical issues in biological control*, Jens Roland, pp. 41-62.
- Malavasi A., Rohwer G.G. y Campbell D.S.** 1994. Fruit Fly Free Areas: Strategies to develop them. En: Calkins C.O, Klassen W. y Liedo P. (eds.), *Fruit flies and the sterile insect technique*, Boca Raton, Fla.: CRC Press, pp. 165-180.
- Meirelles R.N., Redaelli L.R. y Ourique C. B.** 2013. Comparative Biology of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) Reared on *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *The Florida Entomologist*, 96: 412-418.
- Metcalf R.L. y Luckmann W.H.** 1994. *Introduction to Insect Pest Management*. 3<sup>rd</sup> edn. New York: Wiley, 672 pp.
- Meyhöfer R., Casas J. y Dorn S.** 1997. Mechano- and chemoreceptors and their possible role in host location behavior of *Sympiesis sericeicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 208-219.
- Montoya P., Liedo P., Benrey B., Barrera J.F., Cancino J. y Aluja M.** 2000. Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 47-54.
- Montoya P., Benrey B., Barrera J.F., Zenil M., Ruiz L. y Liedo P.** 2003. Oviposition behavior and conspecific host discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 683-690.
- Montoya P., Cancino J., Pérez-Lachaud G. y Liedo P.** 2011. Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. *BioControl*, 56: 11-17.

- Montoya P., Ruiz L., Pérez-Lachaud G., Cancino J. y Liedo P.** 2013. Field superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* attacking *Anastrepha* spp. larvae on mango fruits. *Biological Control*, 64: 160-165.
- Obonyo M., Schulthess F., Chintawi M., et al.** 2011. Sensilla on antennae, ovipositor and tarsi of the larval parasitoids, *Cotesia sesamiae* (Cameron 1906) and *Cotesia flavipes* Cameron 1891 (Hymenoptera: Braconidae): a comparative scanning electron microscopy study. In: *Annales De La Societe Entomologique De France*, Taylor & Francis Group, 47: 119-127.
- Ovruski S.M., Cancino J.L., Fidalgo P. y Liedo P.** 1999. Nuevas perspectivas para la aplicación del control biológico contra moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en Argentina. *Manejo Integrado de Plagas*, Costa Rica 54: 1-12.
- Ovruski S.M., Colin C., Soria A., Oroño L.E. y Schliserman P.** 2003. Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62: 49-59.
- Paladino L.Z.C., Papeschi A.G. y Cladera J.L.** 2010. Immature stages of development in the parasitoid wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. *Journal of Insect Science*, 10:45, 12 pp.
- Salt G.** 1934. Experimental Studies in Insect Parasitism. II. Superparasitism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 114: 455-476.
- Salt G.** 1936. Experimental studies in insect parasitism IV. The effect of superparasitism on populations of *Trichogramma evanescens*. *Journal of Experimental Biology*, 13: 363-362.
- Segura D.F., Vera M.T., Cagnotti C., Vaccaro N., de Coll O., Ovruski S.M. y Cladera J.L.** 2006. Relative abundance of *Ceratitidis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in diverse host species and localities of Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 70-83.
- Taret G.A.A.** 2008. La mosca del Mediterráneo: un ejemplo de cría masiva en la Argentina. En: *VII Congreso Argentino de Entomología*. Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
- van Alphen J.J.M. y Visser M.E.** 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 35: 59-79.
- van Lenteren J.C.** 1981. Host discrimination by parasitoids. En: Nordlund N. (ed.), *Semiochemicals: their role in pest control*. Wiley, New York, pp. 153-179.
- Varaldi J., Fouillet P., Ravallec M., López-Ferber M., Boulétreau M. y Fleury F.** 2003. Infectious behavior in a parasitoid. *Science*, 302: 1930-1930.
- Varaldi J., Ravallec M., Labrosse C., Lopez-Ferber M., Boulétreau M. y Fleury F.** 2006. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of insect physiology*, 52: 1202-1212.
- Vergani A.R.** 1952. La mosca del Mediterráneo *Ceratitidis capitata*. *Boletín de Sanidad Vegetal* 8: 22.

- Vet L.E.M., Hemerik L., Visser M.E., Wäckers F.L., Lewis E.E., Campbell J.F. y Sukhdeo M.V.K.** 2002. *Flexibility in host-search and patch-use strategies of insect parasitoids*, CABI Publishing. pp. 39-64.
- Vinson S.B. y Hegazi E.M.** 1998. A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. *Journal of Insect Physiology*, 44: 703-712.
- Wajnberg E.** 2010. Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. En: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, Springer Netherlands, pp. 149-165.
- Wajnberg E., Bernstein C. y van Alphen J. (eds.)** 2008. *Behavioural ecology of insect parasitoids: from theoretical approaches to field applications*. John Wiley & Sons.
- Wharton R.A. y Gilstrap F.E.** 1983. Key to and status of Opiinae Braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* S. L. (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 76, 721-742.
- White I.M. y Elson-Harris M.M.** 1992. *Fruit Flies of Economic Significance; Their Identification and Bionomics*. Wallingford: CAB International. 601 pp.
- Wong T.T.Y., Ramadan M.M., McInnis D.O., Nishimoto J.I. y Herr J.C.** 1991. Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. *Biological Control*, 1: 2-7.

## Capítulo 2

Efectos del superparasitismo sobre estadios inmaduros y  
adultos de *Diachasmimorpha longicaudata* utilizando  
*Ceratitis capitata* como hospedador

## Introducción

Los estadios inmaduros de insectos parasitoides se desarrollan dentro o sobre un único individuo hospedador, que es seleccionado por la hembra para depositar uno o varios huevos, según si tiene hábitos solitarios o gregarios. Luego de eclosionar, las larvas parasitoides que consumen a su hospedador no tienen la posibilidad de abandonarlo en búsqueda de otro (Salt 1936). Su destino estará preestablecido por la calidad inicial que brinde el hospedador como recurso y que la hembra debería poder evaluar, aunque posteriormente muchos otros factores puedan afectar el desarrollo. En endoparasitoides solitarios, donde sólo un huevo completa su desarrollo hasta adulto, algunos de los parámetros que una hembra debería evaluar para maximizar su éxito reproductivo son: la especie hospedadora (en parasitoides generalistas); el estadio y el tamaño (relativo a otros individuos en el mismo estadio) del hospedador más adecuado; y el estado de parasitación. Por lo tanto, siempre que haya disponibilidad suficiente de hospedadores y según el estado fisiológico de la hembra, la descendencia debería ser depositada donde tenga las mayores probabilidades de desarrollarse en su máximo potencial.

El superparasitismo puede generar efectos adversos para los parasitoides en desarrollo con mayor o menor intensidad dependiendo del tipo de ciclo de vida de la especie (Tunca y Kilincer 2009). En especies koinobiontes, donde el hospedador es atacado en etapas tempranas de su desarrollo (continuando con su alimentación, crecimiento y metamorfosis), la disponibilidad de recursos para el parasitoide suele variar durante gran parte del desarrollo; a diferencia de especies idiobiontes que se desarrollan en hospedadores paralizados o en estadios del hospedador que no se alimentan (Sequeira y Mackauer, 1992). En combinación con esto, los efectos del superparasitismo pueden ser notablemente distintos según se trate de especies gregarias o solitarias. En las primeras es común observar un aumento en la actividad alimenticia para compensar los efectos de la actividad de las larvas parasitoides (Parker y Pinnell 1973, Sato *et al.* 1986, Schopf y Steinberger 1997, Nakamatsu *et al.* 2001), que a su vez permite suavizar los efectos sobre el éxito reproductivo de los descendientes. Los hospedadores parasitados por especies solitarias normalmente muestran una reducción de la actividad comportamental y crecimiento (Harvey *et al.* 1999), aunque existen

excepciones (ver Cloutier y Mackauer 1979) por lo que los efectos del superparasitismo serían más fuertes.

La habilidad de discriminar no siempre conlleva a la evitación del superparasitismo (Gu *et al.* 2003). En parasitoides gregarios, el superparasitismo generalmente resulta en una mayor cantidad de individuos emergidos pero con un menor tamaño individual, como por ejemplo en *Apanteles glomeratus* (= *Cotesia glomerata*) L. (Braconidae) (Ikawa y Okabe 1985), *Trichogramma evanescens* Westwood (Trichogrammatidae) (van Dijken y Waage 1987), *Aphaereta minuta* Nees (Braconidae) (Vet *et al.* 1994) e incluso más débiles, como en *Comperia merceti* Compere (Encyrtidae), aunque existen excepciones (Narasimham 1992). En parasitoides solitarios, esta situación promueve una intensa competencia entre las larvas en desarrollo (van Dijken y Waage 1987, van Alphen y Jervis 1996, González *et al.* 2007), en la que una sola sobrevive (Salt 1961, van Lenteren 1981, Bakker *et al.* 1989, González *et al.* 2007). A partir de este hecho, el superparasitismo ha sido considerado en el pasado como un comportamiento que reduce el éxito reproductivo. No obstante, el superparasitismo podría volverse una estrategia ventajosa (adaptativa) si hubiera algún beneficio potencialmente alto, por ejemplo si la presencia de uno o más huevos aumentara las probabilidades de supervivencia de la descendencia (Rosenheim y Hongkham 1996) por una supresión más eficiente de la respuesta inmune del hospedador (van Alphen y Visser 1990, White y Andow 2008) o frente a la presencia de otras hembras que pudieran oviponer en el mismo hospedador (Rosenheim y Mangel 1994, White y Andow 2008). Sin embargo, asociados a estos posibles beneficios existen costos sobre el éxito reproductivo que derivan del superparasitismo. En presencia de dos competidores, numerosos trabajos encontraron un aumento en la duración del tiempo de desarrollo (Simmonds 1943, Vinson y Sroka 1978, Wylie 1983, Eller *et al.* 1990, Harvey *et al.* 1993, Jones *et al.* 1999, Mayhew y van Alphen, 1999). Asimismo, un incremento en los niveles de superparasitismo (NSP, definido como el número de huevos parasitoides por cada hospedador) ha mostrado asociación con una reducción en el tamaño del adulto emergido (Eller *et al.* 1990). También se encuentran ejemplos opuestos (Bai y Mackauer 1992, Mackauer y Chau 2001), donde el superparasitismo



afecta positivamente el tamaño del parasitoide adulto, por lo que este fenómeno claramente afecta de manera diferencial a cada sistema hospedador-parasitoide.

La existencia de estrategias para la eliminación de individuos competidores en situaciones de superparasitismo parece ser común en parasitoides solitarios (Salt 1936, Fisher 1961, 1971). La supresión de larvas supernumerarias puede ocurrir por ataques físicos (común en casos donde los estadios inmaduros poseen mandíbulas desarrolladas que permiten infringir daño en los competidores) (Fisher 1961, Wylie 1971, Chow y Mackauer 1986) y/o supresión fisiológica [inanición, anoxia, cambios en la hemolinfa en reacción defensiva en respuesta a la primera parasitación o efectos de productos secretados por la primera larva como toxinas, enzimas citolíticas, teratocitos (ver revisión en Vinson y Hegazi 1998)]. El mecanismo de eliminación de larvas competidoras por supresión fisiológica tiene más sentido cuando la competencia ocurre (si la ventana temporal de ataque lo permite) entre competidores con una significativa diferencia de edad, siendo la larva más vieja la que elimina a la más joven (Godfray 1994). En cambio, cuando la eliminación ocurre a través de ataques físicos, la larva más joven generalmente sobrevive y la más vieja muere, aunque esto podría no aplicarse si la diferencia de edad es demasiado pequeña o demasiado grande. En este último caso, la larva de mayor edad perderá el combate si ya mudó a L2, al haberse despojado de las mandíbulas fuertemente esclerotizadas (Chau y Mackauer 1984, Bakker *et al.* 1985, Chau y Maeto 2008).

En *Diachasmimorpha longicaudata*, el fenómeno de superparasitismo fue estudiado en especies hospedadoras del género *Anastrepha* Schiner. Utilizando a *A. ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) como hospedador, González *et al.* (2007) determinaron que el superparasitismo en niveles moderados (estimados mediante entre 7 y 11 cicatrices en la cutícula del hospedador producidas por la inserción del ovipositor) en *D. longicaudata* no tiene efectos adversos sobre parámetros relacionados al éxito reproductivo, incluyendo habilidad de vuelo, fecundidad y longevidad. Como se mencionó anteriormente, el superparasitismo podría tener efectos sobre el tamaño de los adultos emergidos, que es una medida de los recursos que tuvo disponibles ese individuo en su etapa de desarrollo (King 1989). En general, esta variable está correlacionada con la fecundidad, lo que implica que el superparasitismo podría todavía

afectar indirectamente este importante parámetro. La competencia larval en *D. longicaudata* dentro de larvas superparasitadas de *A. suspensa* Loew (Diptera: Tephritidae) causa una abrupta mortalidad de larvas supernumerarias 24-36 hs antes de que la larva sobreviviente mude a L2 (Lawrence 1988). Clausen *et al.* (1965) determinaron para esta especie que la ocurrencia de larvas supernumerarias resulta en canibalismo, y luego Lawrence (1988) también demostró *in vitro* que las larvas L1 producen sustancias que eliminan a otras larvas conespecíficas, concluyendo que utiliza mecanismos de combate y de competencia por interferencia (posiblemente involucrando toxinas aleloquímicas) para eliminar competidores. Sin embargo, Paladino *et al.* (2010) no encontraron signos de daños físicos utilizando como hospedador larvas de *Ceratitis capitata*, aunque observaron que una de las larvas supernumerarias estuvo siempre en un estado más avanzado (más grande o incluso en L2) en comparación con el resto de los competidores. Si bien no fue objeto de investigación, Montoya *et al.* (2000) y González *et al.* (2007) utilizando *A. ludens* interpretaron el hecho de no haber encontrado efectos negativos del superparasitismo como una indicación de ausencia de combates físicos entre larvas supernumerarias. Por lo tanto, no queda aún claro si existe un único mecanismo de eliminación de larvas supernumerarias en *D. longicaudata* o este proceso resulta de la combinación de varios procesos.

El estudio del superparasitismo y los costos asociados a este fenómeno pueden tener implicancias aplicadas cuando se considera la utilización de parasitoides como enemigos naturales en programas de control biológico. Aquellas especies de parasitoides utilizadas en estrategias inundativas o aumentativas, requieren de una cría controlada y masiva. Por lo tanto, uno de los objetivos será obtener un producto de buena calidad al menor costo posible y por ello la calidad biológica de los individuos producidos juega un papel fundamental (van Lenteren 1991, Wong y Ramandan 1992). Diversas técnicas para la evaluación de la calidad de *D. longicaudata* han sido desarrolladas como parte de protocolos de control de calidad utilizando especies del género *Anastrepha* (Cancino y Yoc 1993, Messing *et al.* 1993, Purcell *et al.* 1994). En Argentina, la cría de este parasitoide se está desarrollando sobre *C. capitata* (Ovruski *et al.* 2003) y el estudio de los niveles de superparasitismo (*i.e.* número de huevos parasitoide/hospedador; NSP) en cría masiva podría brindar información sobre la

calidad del producto si parámetros asociados al éxito reproductivo estuvieran bajo la influencia de este factor.

En el presente Capítulo se estudiaron los efectos del superparasitismo en el sistema *D. longicaudata* – *C. capitata* sobre parámetros asociados al éxito reproductivo y aspectos relacionados a la dinámica de eliminación de larvas supernumerarias. El número de cicatrices contabilizados sobre la cutícula de la larva o pupa hospedadora ha sido utilizado por Montoya *et al.* (2000) y González *et al.* (2007) como estimador del NSP de un dado hospedador, utilizando *A. ludens* como especie hospedadora. En *C. capitata*, Paladino *et al.* (2010) no encontraron fuertes evidencias de que el número de cicatrices fuera un estimador fiable del número de huevos depositados. Por lo tanto, se deberá primero comparar este método con métodos alternativos que permitan generar de manera controlada y no invasiva niveles conocidos de superparasitismo.

## 2.1. Objetivos

### Objetivo general

Estudiar la dinámica de eliminación de larvas supernumerarias en hospedadores superparasitados y el impacto del superparasitismo sobre parámetros biológicos en el sistema *D. longicaudata* - *C. capitata*.

### Objetivos específicos

2.1. Determinar, en condiciones de cría semi-masiva del IGEAF, los niveles de superparasitismo (NSPs) de *D. longicaudata* utilizando a *C. capitata* como hospedador.

2.2. Seleccionar el método no invasivo más preciso para la determinación de una oviposición efectiva.

2.3. Determinar el momento de eliminación de las larvas supernumerarias y evaluar el efecto de distintos NSPs sobre la larva parasitoide sobreviviente.

2.4. Determinar si el tiempo de desarrollo, la probabilidad de alcanzar el estado adulto y la proporción sexual se ven afectados por el NSP.

2.5. Determinar si la fecundidad real por las hembras emergidas, y el porcentaje de parasitismo y la proporción sexual logrado en la descendencia de esas hembras son afectados por el NSP.

2.6. Determinar si el NSP afecta la supervivencia y la resistencia al hambreado de los individuos emergidos.

2.7. Comparar la capacidad de vuelo de individuos emergidos de distintos NSP.

2.8. Comparar el tamaño de los adultos emergidos de los distintos NSP.

## **Materiales y Métodos**

### 2.1. Insectos

Tanto los parasitoides como las larvas de *C. capitata* provinieron de la cría semimasiva mantenida en el Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica perteneciente al Instituto de Genética ‘E. A. Favret’ del INTA Castelar (de ahora en más, cría IGEAF). La cría y multiplicación de estos insectos fueron realizadas de acuerdo a protocolos estándares (Terán 1977, Ovruski *et al.* 2003, Viscarret *et al.* 2006). Para el experimento 2.2.1 (Niveles de superparasitismo en la cría artificial) las larvas provinieron de siembras de huevos de *C. capitata* de la cría artificial, a partir de 1ml de huevos/kg de dieta artificial. Las larvas fueron mantenidas en la dieta donde se desarrollaron hasta el momento de su utilización. En el resto de los experimentos, las larvas del hospedador utilizadas para la obtención de los parasitoides estudiados fueron obtenidas a partir de siembras de 0,125 ml de huevos (3000 huevos aprox.)/185 gr de dieta artificial. Esta es una densidad baja comparada con los estándares de cría y permitió obtener larvas de tercer estadio (L3) con un tamaño máximo y homogéneo al cabo de 7 días a 25°C, reduciendo de esta forma posibles efectos del tamaño del hospedador.

Los parasitoides adultos utilizados en el presente Capítulo fueron mantenidos en recipientes de vidrio de 400 ml de manera individual o en pareja, con acceso a agua y miel en una sala o cámara de cría (Sanyo MRL 350, Japón) con temperatura, humedad relativa y luz controladas (25°C, 65% HR, 14:10 luz:oscuridad).

### 2.2. Experimentos

### 2.2.1. Niveles de superparasitismo en la cría artificial

Para la determinación de los niveles de superparasitismo (NSP) en la cría, se utilizó el procedimiento normal de cría en condiciones semi-masivas (entre 25 y 30 hembras y similar número de machos en recipientes de 4L, con agua y miel *ad libitum*, 25°C y 65% HR; 14:10 luz:oscuridad) del IGAEF. Larvas L3 de *C. capitata* fueron presentadas en su dieta artificial a los parasitoides dentro de una caja de Petri pequeña (5 cm Ø) envuelta en tela *voile* (unidad de oviposición, UO). Los parasitoides introducen el ovipositor en busca de hospedadores a través de la tela *voile*. Al cabo de 4 horas, las UO fueron retiradas y las larvas fueron colocadas en un recipiente agregando dieta fresca. Se realizaron 10 réplicas en días distintos, sin reutilizar los parasitoides a los que se les expuso las UO. Para la revisión del NSP de cada larva, se disecó bajo lupa (60X) (Olympus, Japón) una muestra de entre 8 y 25 pupas tomadas al azar de cada UO, 48 hs después de la exposición, y se contabilizó la cantidad de huevos o larvas parasitoide en el interior.

Con la información obtenida se realizó estadística descriptiva sobre varios parámetros relacionados a la eficiencia de parasitación: porcentaje de larvas superparasitadas, porcentaje de larvas no atacadas, nivel promedio de superparasitismo, número total de huevos depositados en cada réplica, y porcentaje de huevos que no dieron lugar a un parasitoide adulto [calculado como el  $(\text{número total de huevos depositados} - \text{número de hospedadores parasitados}) \times 100 / \text{número total de huevos depositados}$ ] a causa del superparasitismo.

### 2.2.2. Métodos controlados para generación de NSPs

Para los siguientes ensayos y en la mayoría de los Capítulos de esta tesis, fue necesario generar de manera precisa y controlada larvas de *C. capitata* con números específicos de huevos del parasitoide en su interior (*i.e.* NSP). Para ello se propusieron dos métodos de estimación del número de huevos presentes en una larva sin afectar el desarrollo de la misma. A partir de los resultados y costos implicados se seleccionó el método a utilizar en el resto de los ensayos.

Para la evaluación de los efectos del superparasitismo (secciones 2.2.3 al 2.2.8) se establecieron categorías de NSP a partir de larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*: NSP  $i$ , donde  $i$  es el número de huevos por hospedador tomando los valores 0, 1, 2, 3, 5 y 10. Si bien los valores 0 y 1 de esta variable no representan casos de superparasitismo, se decidió mantener la nomenclatura por simplicidad. NSP 0 fue considerado como control de calidad de las larvas utilizadas. NSP 1 fue considerado un valor de referencia (control) contra el cual se contrastaron los otros NSPs. Estos valores fueron seleccionados a partir de trabajos previos (González *et al.* 2007, Paladino *et al.* 2010).

2.2.2.1. *Estimación del número de huevos sobre la base del número de cicatrices sobre la cutícula de larvas C. capitata.* En base al trabajo de Montoya *et al.* (2000) en el que se estudió la relación entre número de cicatrices, contabilizadas en estado pupal, producidos por inserción del ovipositor de *D. longicaudata* en el hospedador *A. ludens* y el número de huevos de parasitoide en su interior, se realizó un ensayo similar pero las cicatrices fueron contabilizadas en estado larval, ya que así se requería para determinados ensayos de esta tesis. Las hembras empleadas fueron seleccionadas aleatoriamente de la cría IGAAF, colocando 25 hembras y 25 machos por recipiente, con agua y miel, a 25°C, 65% HR y fotoperíodo 14:10 (luz:oscuridad). Se procedió a exponer una UO y luego se contabilizaron las cicatrices visibles bajo lupa (60X) de una muestra aleatoria de 45 larvas para cada tratamiento. Cada larva fue disecada registrando el número de huevos parasitoides. Se evaluaron los siguientes factores: a) ‘duración de la exposición’ (1, 2, 4 y 6 hs) y b) ‘experiencia previa’ (hembras con o sin experiencia de oviposición previa). Para el análisis estadístico se realizó una regresión lineal simple para cada tratamiento y se evaluó cuál de las combinaciones entre ‘tiempo de exposición’ y ‘experiencia previa’ sería útil para obtener larvas con distintos NSPs, considerando como caso ideal aquél tratamiento con asociación perfecta entre las variables (pendiente 1).

2.2.2.2. *Estimación de oviposición efectiva por observación directa.* Se estudió el comportamiento de oviposición por observación de hembras de manera individual. Varias hembras extraídas de la cría fueron colocadas en un recipiente de 4L utilizando

una tapa de tela *voile* tensa. Se colocaron pequeñas cantidades de dieta artificial utilizada por larvas de *C. capitata* sobre esta tapa, incentivando el comportamiento de oviposición, en el que los oviposidores atravesaban la tela en búsqueda de larvas. Por otro lado, se tomó suavemente una larva hospedadora con una pinza y se la colocó sobre la tapa de *voile*. En el momento en que una hembra lograba penetrar la larva, se iniciaba la observación y describió el comportamiento de ambos individuos. Los casos en los que varias hembras penetraron una misma larva fueron descartados al desconocerse el resultado de su interacción. A partir de estas observaciones se estableció una serie de criterios [ver Resultados, sección 2.2.2 (Estimación del número de huevos por observación directa)] que permitieron decidir una efectiva oviposición. Además, como parte de la descripción del comportamiento, se determinó la duración del evento de oviposición (desde la penetración hasta la liberación de la larva) y la duración de la parálisis de la larva (desde la parálisis inicial hasta la total recuperación de la movilidad).

Una vez seleccionado el método más adecuado, para la obtención de larvas con crecientes NSPs, luego de cada oviposición y hasta alcanzar el nivel deseado, cada larva era colocada en un medio acuoso con dieta artificial hasta la recuperación de la parálisis. Una vez generadas las larvas de cada NSP se colocaron con dieta fresca dentro de un recipiente con vermiculita. A partir de este punto, cada larva fue empleada de acuerdo al objetivo de cada ensayo.

### 2.2.3. Efectos del superparasitismo en estadios inmaduros

2.2.3.1. *Dinámica de eliminación de larvas supernumerarias.* Con el objeto de determinar la instancia del desarrollo en la cual las larvas supernumerarias son eliminadas, quedando una única larva que completará su desarrollo, se realizó una serie de disecciones de larvas expuestas a parasitoides a intervalos de tiempo creciente desde la parasitación. Las larvas parasitadas se obtuvieron de la cría IGCAF. De cada lote de larvas parasitadas, se tomaron muestras de pupas a las 48, 72, 96 y 120 hs desde la parasitación. El número final de pupas disecadas para cada combinación de tiempo de disección y NSP analizadas se observa en la Figura 2.2. Cada pupa fue disecada bajo lupa, registrando el número de huevos o larvas parasitoides. En el caso de encontrar

larvas, se registró el estadio larval y si se hallaba viva o muerta. Mediante esta metodología se observaron pupas parasitadas con diversos NSPs, pero para mantener simplicidad y coherencia con otros ensayos de este mismo Capítulo, se decidió contemplar solamente los casos con NSP 2, 3, 5 y se agrupó en una categoría a los casos mayores a 5 (NSP > 5).

2.2.3.2. *Efectos del superparasitismo sobre tamaño de la larva (L2) sobreviviente.* Con el objetivo de determinar si el desarrollo bajo distintos NSPs tiene algún impacto en el tamaño de la larva sobreviviente, las larvas L2 que fueron encontradas dentro de cada pupa al hacer disecciones (sólo a las 96 y 120 hs, ver Resultados) fueron fotografiadas bajo lupa (40X) (Lupa Motic DM39, China). Previamente fueron sumergidas en agua a 70°C por unos segundos para fijar la estructura. Mediante el programa Motic Images Plus 2.0 se midieron la longitud máxima y el perímetro de cada larva.

Se realizaron análisis estadísticos independientes para los casos de 96 hs y 120hs por falta de datos en algunos NSPs. En los casos de 96 hs, ambas variables se analizaron mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) al no seguir una distribución normal de los residuos y no encontrar transformación satisfactoria (Zar 1996). Si bien los datos mostraron heterocedasticidad, ésta fue leve (Prueba de Levene: largo: P = 0,037; área: P = 0,032) y se decidió proseguir. El largo de L2 a las 120 hs se comparó entre NSPs mediante ANOVA cumpliendo supuestos de normalidad de los residuos y homocedacea; mientras que el área fue transformada al log (área + 1) de manera de cumplir el supuesto de homocedacea.

2.2.4. Efectos del NSP sobre el tiempo de desarrollo, porcentaje de emergencia y proporción sexual.

Una vez obtenidas las larvas de cada NSP mediante el método seleccionado, éstas fueron transferidas individualmente a un recipiente plástico pequeño (2 cm Ø y 0,5 cm prof.) con dieta fresca. Este recipiente fue, a su vez, colocado sobre una capa de vermiculita dentro de una caja de Petri chica cubierta, la cual fue identificada y colocada en una cámara de cría (SANYO MRL 350, Japón) con condiciones ambientales controladas ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR, sin luz). Este procedimiento se llevó a



cabo a lo largo de varios días hasta alcanzar 106, 70, 69, 62 y 29 larvas para los NSP 1, 2, 3, 5 y 10, respectivamente. A medida que las larvas empupaban, el recipiente con dieta fue retirado para evitar el crecimiento de hongos. A partir de los 15 días desde la parasitación se revisó diariamente la emergencia de los adultos, y se registró la fecha y el sexo de los parasitoides emergidos. Luego, cada parasitoide fue colocado individualmente en un recipiente de vidrio (400 ml) con agua y miel para ensayos posteriores.

Se consideró el tiempo de desarrollo huevo-adulto como el número de días desde la fecha de exposición hasta la fecha de emergencia. Este valor fue comparado mediante un ANOVA de dos vías para NSP y sexo. Para cumplir con el supuesto de normalidad del análisis de varianzas fue necesario transformar los datos de las hembras aplicando logaritmo. Para obtener el porcentaje de emergencia de cada NSP, se registró la ‘emergencia’ o ‘no emergencia’ de un parasitoide adulto para cada larva parasitada. Teniendo en cuenta la duración promedio de los distintos estados de desarrollo (ver Capítulo 1), se consideró que aquellas pupas parasitadas de las que no emergió un parasitoide luego de 30 días desde la parasitación, los individuos se encontraban muertos. Como control de emergencia de las larvas utilizadas se registró la emergencia de moscas en el NSP 0, que no fue incluida en el análisis estadístico. Se comparó la cantidad total de adultos emergidos y no emergidos entre NSP 1 al 5 mediante una prueba de homogeneidad de  $\chi^2$ . El NSP 10 no fue incluido en este análisis al no haber producido emergencias de adultos.

#### 2.2.5. Fecundidad de las hembras y porcentaje de parasitismo y proporción sexual en la primera generación.

Las hembras emergidas en el ensayo anterior fueron colocadas individualmente en recipientes de vidrio (400 ml) con agua y miel, y mantenidas en una sala con temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), humedad relativa ( $60 \pm 10\%$ ) y fotoperiodo controlados (14:10, luz:oscuridad). En cada recipiente se introdujo, además, un macho joven de la cría seleccionado aleatoriamente para fecundar a la hembra. Al cabo de 4-6 días desde la emergencia, se ofreció a cada hembra larvas de *C. capitata* en una serie de exposiciones espaciadas por 24-48 hs por un periodo de 3 semanas (Segura *et al.* 2007), cubriendo

así el periodo de mayor fecundidad (Viscarret *et al.* 2006). Las larvas expuestas fueron colocadas dentro de una caja de Petri chica conteniendo dieta fresca y ésta fue, a su vez, colocada sobre una capa de vermiculita dentro de un recipiente plástico mayor (8 cm Ø y 4 cm prof.). Al revisar y comprobar que las larvas habían abandonado la dieta, ésta era retirada para evitar el crecimiento de hongos. Se esperó hasta la emergencia y muerte de todos los insectos y se registró el número y sexo de parasitoides emergidos, el número de moscas emergidas y el número de pupas no emergidas. Con estos datos se obtuvieron los siguientes parámetros: fecundidad realizada (número total de parasitoides producidos por cada hembra); proporción sexual de la progenie (número de hijas hembras/número total de parasitoides emergidos); porcentaje de parasitismo [(número total de parasitoides producidos/número total de larvas expuestas) x 100]. Como la cantidad de larvas ofrecidas no fue controlada, la comparación de la fecundidad entre NSPs fue realizada mediante ANCOVA, tomando al número de larvas ofrecidas como covariable. El porcentaje de parasitismo se comparó entre NSPs mediante un ANOVA de un factor. Los supuestos de normalidad y homocedacea fueron comprobados. La proporción sexual se comparó entre NSPs mediante intervalos de confianza al no encontrar una transformación de la variable apropiada.

#### 2.2.6. Supervivencia y resistencia al hambre

2.2.6.1. *Supervivencia.* Las hembras (a las que se les midió la fecundidad) y los machos emergidos de 2.2.4 (Efectos del NSP sobre el tiempo de desarrollo, porcentaje de emergencia y proporción sexual) fueron mantenidos en frascos de vidrio (400 ml) con agua y miel y rotulados con su fecha de emergencia. Diariamente se registró la fecha de aquellos individuos que fueron hallados muertos, transfiriéndolos luego a un tubo plástico de 1,5 ml con etanol al 70% para estudios posteriores (2.2.8. Estimación de tamaño del adulto).

La cantidad de días vividos en estado adulto, obtenida por diferencia entre fecha de muerte y emergencia, fue comparada entre NSPs mediante un análisis de supervivencia (ajuste Kaplan-Meier, distribución Weibull). Las curvas de supervivencia de machos y hembras fueron comparadas entre NSP. En un primer análisis se consideraron los efectos del NSP y sexo, debido a que la supervivencia entre sexos es

distinta de acuerdo a Viscarret *et al.* (2006). No obstante, por ausencia de diferencias significativas en el segundo factor se decidió agrupar ambos sexos dentro de cada NSP (ver sección 2.6.1 en Resultados). Se analizó la supervivencia de 28, 24, 20 y 20 individuos para los NSP 1, 2, 3 y 5 respectivamente.

2.2.6.2. *Resistencia al hambreado.* Las reservas energéticas de aquel adulto que logre sobrevivir podrían ser variables dependiendo de la cantidad de competidores con los que haya compartido el hospedador durante el desarrollo. En el laboratorio, las condiciones de vida del adulto son extremadamente favorables a tal punto que podrían enmascarar un efecto negativo del superparasitismo, por lo que para evidenciarlo se decidió evaluar individuos emergidos de distintos NSPs con agua pero sin miel. Éstos fueron mantenidos en recipientes de vidrio (400 ml), registrando la fecha de emergencia y el NPS. El sexo no fue considerado (ver sección 2.6.2 de Resultados). Diariamente se registró la fecha de muerte en los casos correspondientes. Se analizaron 45, 42, 43 y 30 individuos para los NSP 1, 2, 3 y 5 respectivamente. Los individuos muertos fueron conservados en etanol al 70% para estudios posteriores (2.2.8. Estimación de tamaño del adulto). El análisis estadístico se realizó como en 2.2.6.1 (Supervivencia).

#### 2.2.7. Capacidad de vuelo

Con el objetivo de evaluar el efecto del superparasitismo sobre la capacidad de vuelo de los parasitoides, se obtuvieron individuos adultos a partir de larvas con NSPs de 1, 2, 3 y 5. Se utilizó el método descrito por Cancino *et al.* (2002) como procedimiento de control de calidad de cría masiva de *D. longicaudata*. Para los NSPs 1, 2, 3 y 5 se alcanzaron respectivamente un número de 70, 78, 74 y 56 pupas que fueron mantenidas en cámaras de cría (25°C, 70% HR, en oscuridad) hasta 48-72 horas antes de la emergencia de los parasitoides. En ese momento, las pupas de cada NSP contenidas en cajas de Petri chicas sin tapa fueron colocadas en el centro de jaulas cúbicas de 50 cm<sup>3</sup> de tela mosquitero de plástico transparente. Estas jaulas fueron ubicadas debajo de una ventana, con incidencia de luz pareja para todas ellas además de utilizar tubos fluorescentes encendidos las 24 hs del día. Las pupas se colocaron de manera centrada dentro de un cilindro de PVC de 15 cm de alto y 10 cm de diámetro en posición

vertical. La superficie interna de este cilindro fue recubierta con una capa de talco blanco para impedir que los parasitoides emergidos pudieran abandonar el cilindro caminando por las paredes y sólo pudieran hacerlo volando (dejando 1cm sin talco en la base del cilindro para evitar que las alas de los insectos pudieran ensuciarse). Desde la emergencia, se registró dos veces por día (una a las 09:00 hs y otra a las 16:00 hs) el número de individuos dentro y fuera del cilindro. Los individuos que lograban escapar eran extraídos de la jaula y conservados en etanol al 70% para estudios posteriores (2.2.8. Estimación de tamaño del adulto). Este procedimiento se repitió por 10 días desde la emergencia del primer insecto. La proporción de individuos voladores fue comparada entre NSPs mediante una prueba de homogeneidad de  $\chi^2$  (Zar 1996).

#### 2.2.8. Estimación de tamaño del adulto

Con el objetivo de evaluar si los individuos provenientes de distintos NSPs mostraron diferencias en tamaño corporal, los insectos provenientes de los ensayos 2.2.6 (Supervivencia y resistencia al hambre) y 2.2.7 (Capacidad de vuelo) (mantenidos en etanol al 70%) fueron utilizados para un estudio morfométrico comparativo. De cada individuo se midió el ala anterior derecha (largo y ancho) y la tibia posterior derecha (largo) (López *et al.* 2009, Meirelles *et al.* 2013). Para ello se disecaron bajo lupa (50X) el ala y la pata de cada individuo y se los adhirió a portaobjetos sobre una fina capa de grasa siliconada (Industrias Químicas Essen SRL, Burzaco). Los preparados fueron visualizados bajo lupa con cámara de video incorporada (Motic DM39, China). Se tomaron fotografías para realizar las mediciones con el programa Motic Images Plus 2.0. Se analizaron entre 12 y 34 réplicas según la disponibilidad de individuos de cada sexo y NSP. Cada variable fue analizada independientemente mediante ANOVA de dos vías tomando NSP y sexo como factores. Los supuestos de normalidad de los residuos y homocedácea fueron comprobados.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con STATISTICA 10 (StatSoft, Inc. 1984-2011)

## Resultados

### 2.1. Niveles de Superparasitismo en la cría artificial

Los resultados mostraron que el fenómeno de superparasitismo en *D. longicaudata* es común bajo las condiciones de cría artificial del IGAEF. En 206 pupas disecadas a lo largo de 10 exposiciones en fechas distintas se encontró un rango de entre 0 y 40 huevos/larva, con una moda de NSP 0 (33% de los casos) y una mediana de NSP 4. Los hospedadores que presentaron sólo un huevo, representaron un promedio ( $\pm$  E.E.; n = 10) de  $7,9 \pm 1,7\%$  de las larvas expuestas. En promedio ( $\pm$  E.E.; n = 10), un  $59,5 \pm 4,4\%$  de las larvas expuestas fueron superparasitadas con  $10,8 \pm 1,1$  huevos/larva [aunque la distribución de frecuencias del número de huevos/larva (NSP) no siguió una distribución normal haciendo que este promedio no resulte representativo], dejando un  $32,6 \pm 3,9 \%$  de larvas sin parasitar. En cada turno de forrajeo, el conjunto de las hembras de un recipiente contenedor depositaron en total un promedio ( $\pm$  E.E.) de  $138,6 \pm 20,8$  huevos en los hospedadores ofrecidos. Se pudo determinar que el  $87,7 \pm 2,2\%$  (promedio  $\pm$  E.E., n = 10) de esos huevos no se desarrollan a causa del superparasitismo.

### 2.2. Métodos artificiales para generación de NSP

2.2.1. *Estimación del número de huevos sobre la base del número de cicatrices sobre la cutícula de larvas de C. capitata.* El método basado en el recuento de las cicatrices externas provocadas por la inserción del ovipositor y posterior corroboración con el número real de huevos por disección, no mostró resultados satisfactorios como para ser utilizado para la estimación precisa del NSP de una larva. En la Figura 2.1 se observa que bajo ninguno de los tratamientos aplicados hubo un buen ajuste entre esas variables. Por estas razones, este método fue descartado para la determinación del número de huevos depositado en cada larva.

2.2.2. *Estimación del número de huevos por observación directa.* A través de la observación del comportamiento, se establecieron una serie de criterios para considerar una oviposición exitosa: 1. La hembra penetra la larva con las valvas internas del

ovipositor (ver Capítulo 5) y ésta se mueve bruscamente en respuesta al ataque intentando escapar (en ocasiones lográndolo). En ocasiones puede observarse la valva interna del ovipositor atravesando la cutícula de la larva; 2. La larva es paralizada y la hembra se queda inmóvil con el abdomen elevado y el ovipositor dentro de la larva, incluso cuando hay otras hembras a su alrededor; 3. Luego de la paralización, la duración promedio ( $\pm$  E.E.) de un evento exitoso de oviposición es de  $44,4 \pm 2,9$  seg. ( $n = 72$ ); 4. La recuperación completa de la larva desde el comienzo de la paralización requiere  $6,56 \pm 0,31$  min. ( $n = 32$ ).

Con este método pudo determinarse con un 91,15% de efectividad ( $n = 650$ ) una oviposición exitosa en larvas de *C. capitata*. Éste fue el método seleccionado para continuar con el resto de los ensayos de la tesis.

### 2.3. Efectos del superparasitismo en estadios inmaduros

Mediante disecciones de hospedadores a distintos tiempos desde la exposición a los parasitoides, se cuantificó el número de larvas de parasitoides vivas. Se obtuvieron hospedadores con un rango de parasitación desde 1 hasta 10 huevos por hospedador. Para el estudio de la dinámica de eliminación de larvas potencialmente competidoras, los casos que contenían inicialmente solo un parasitoide no fueron considerados en los análisis.

En la Figura 2.2 se observa un patrón similar de eliminación para los distintos NSPs y el total agrupado de todos los NSPs. A las 48 hs de la parasitación, en cada hospedador disecado se encontraron solamente huevos y/o larvas vivas. Para ningún NSP a las 48 hs se encontraron casos que contuvieran larvas muertas (de hecho, se encontraban huevos aun no eclosionados). Por esta razón se decidió incrementar el número de disecciones en los otros tiempos, en los cuales se esperaba que la competencia larval fuera más intensa. A las 72 hs ya no se encontraron huevos sin eclosionar y hubo una proporción aproximadamente similar de casos conteniendo varias larvas vivas y casos conteniendo una larva viva y otras muertas. Desde este momento, pasando por las 96 hs y hasta las 120 hs desde la parasitación, se observó un aumento progresivo de casos conteniendo sólo una larva viva y otras muertas. A las 120 hs, en

casi la totalidad de los casos registrados la eliminación de larvas supernumerarias ya había concluido, habiéndose encontrado sólo una larva viva por cada hospedador.

Al comparar la dinámica de la eliminación, se observó que, a NSPs mayores, la eliminación se alcanza más tardíamente (Figura 2.3). En el caso NSP 1, el resultado es trivial, ya que el porcentaje de hospedadores conteniendo solamente una larva viva tomó el valor máximo y fue constante desde el inicio de la parasitación hasta las 120 hs. En comparación, todos los NSP >1 presentaron un valor nulo al inicio del desarrollo, por compartir el hospedador entre varias larvas (desde 2 hasta 10 dentro de un mismo hospedador). Estos casos fueron alcanzando gradualmente valores crecientes hasta las 120 hs. El patrón general que muestran estas curvas indica que con el aumento de los NSPs la larva ganadora requiere más tiempo para lograr la eliminación de las larvas competidoras.

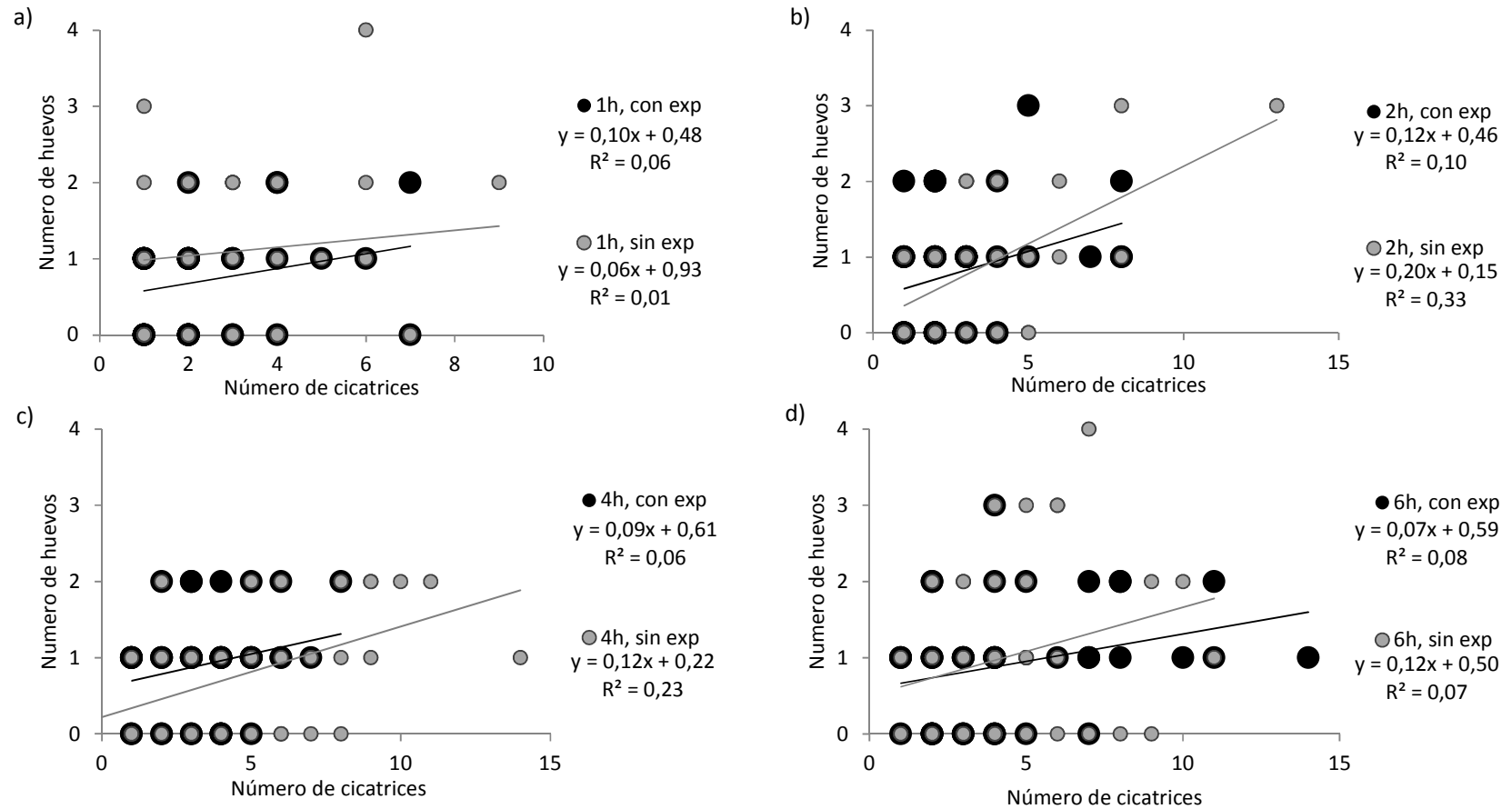


Figura 2.1. Relación entre el número de cicatrices contabilizadas en la cutícula de L3 *Ceratitis capitata* y el número de huevos en su interior para los distintos tratamientos: a) exposición de 1h, hembras con o sin experiencia previa; b) exposición de 2hs, hembras con o sin experiencia previa; c) exposición de 4hs, hembras con o sin experiencia previa y d) exposición de 6hs, hembras con o sin experiencia previa. Las líneas representan la recta de regresión con sus respectivas ecuaciones y coeficientes de determinación  $R^2$ .



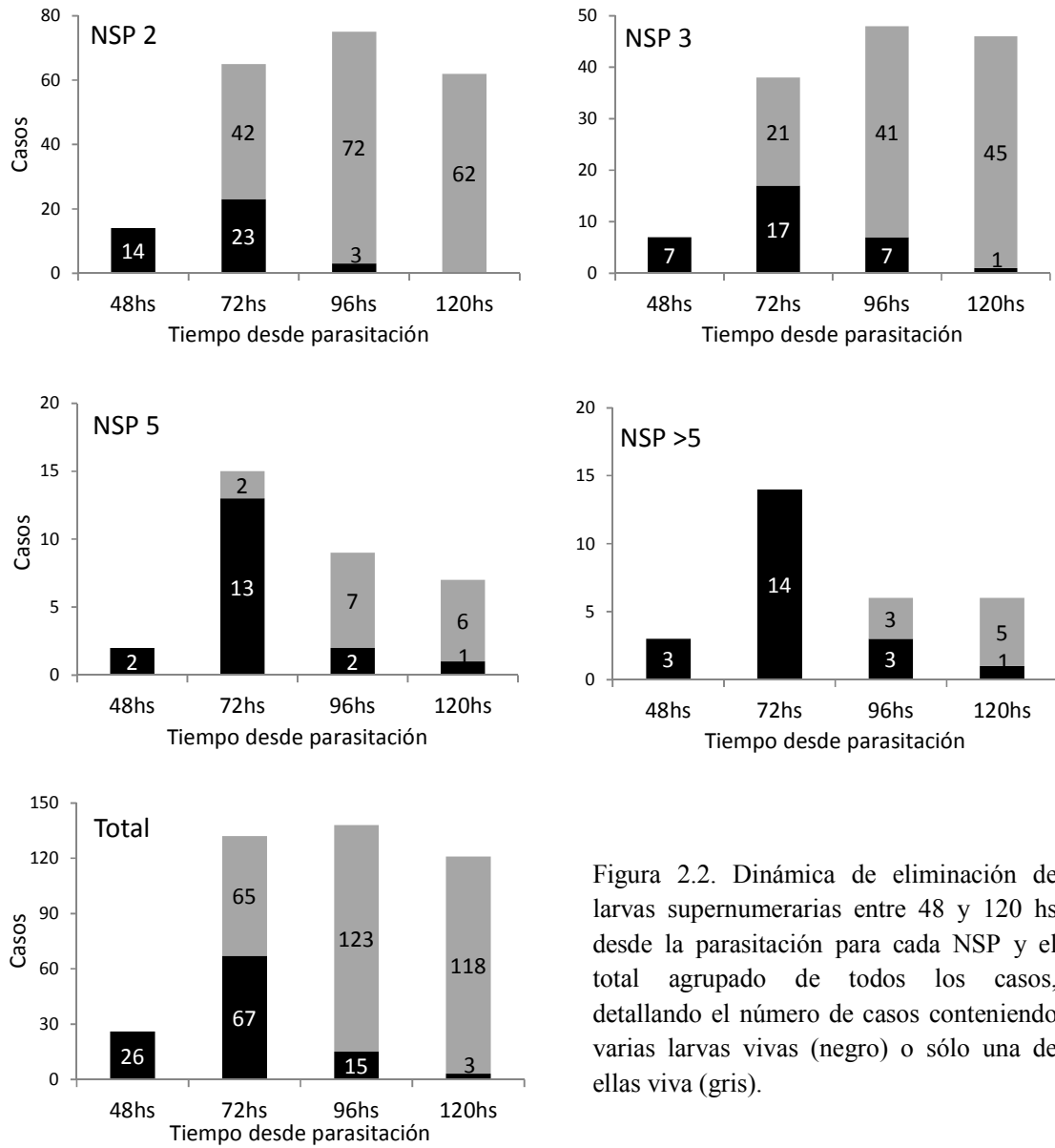


Figura 2.2. Dinámica de eliminación de larvas supernumerarias entre 48 y 120 hs desde la parasitación para cada NSP y el total agrupado de todos los casos, detallando el número de casos conteniendo varias larvas vivas (negro) o sólo una de ellas viva (gris).

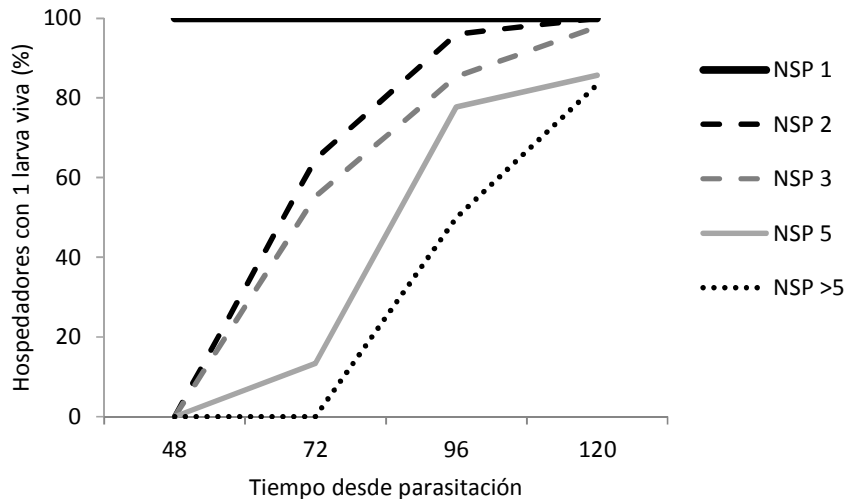


Figura 2.3. Dinámica de la eliminación de larvas supernumerarias evaluada mediante el porcentaje de hospedadores conteniendo solamente una larva viva, discriminando entre los NSP 1 (control), 2, 3, 5 y >5.

A las 48 y 72 hs desde de la parasitación, y para todos los NSPs considerados, todas las larvas vivas se encontraban en L1 (Figura 2.4). A partir de las 96 hs desde la parasitación comenzaron a encontrarse casos con L2, en menor frecuencia hacia mayores NSP. Esta situación pasó a ser predominante a las 120 hs en todos los NSPs. Tanto a las 96 como 120 hs en los casos que se encontraron larvas en L2, éstas fueron las únicas que se encontraban con vida, observándose otras larvas muertas siempre en L1.

Como se mencionó anteriormente, las larvas L2 comenzaron a aparecer a las 96 hs de desarrollo, retrasándose a mayores NSP. Por esta razón ninguna L2 fue encontrada a las 96 hs para NSPs  $\geq 5$ . Sólo se compararon el largo y el área de larvas L2 entre NSP 1, 2 y 3 (Figura 2.5). No se encontraron diferencias significativas tanto para el largo (K-W:  $H_{(2, n=46)} = 0,485$ ;  $P = 0,785$ ) como para el área ( $H_{(2, n=46)} = 0,691$ ;  $P = 0,708$ ) de las larvas L2.

Para las pupas hospedadoras disecadas a las 120 hs, se consideraron los NSP 1, 2, 3, 4, 5 y >5 y se encontraron diferencias significativas en el largo de las larvas L2 (ANOVA:  $F_{(4, 113)} = 3,86$ ;  $P = 0,007$ ) (Figura 2.6a). Las comparaciones múltiples indicaron que solamente el largo de las L2 de NSP 1 difirió de los valores obtenidos en NSP > 5 ( $P = 0,039$ ), siendo mayor en NSP 1. El área de estas larvas mostró diferencias

significativas entre NSPs (ANOVA:  $F_{(4, 113)} = 3,89$ ;  $P = 0,005$ ). Los contrastes mostraron diferencias entre los NSP 1 y 3 ( $P = 0,046$ ). En todos los casos, las larvas L2 de NSP bajos mostraron mayores tamaños corporales (Figura 2.6b).

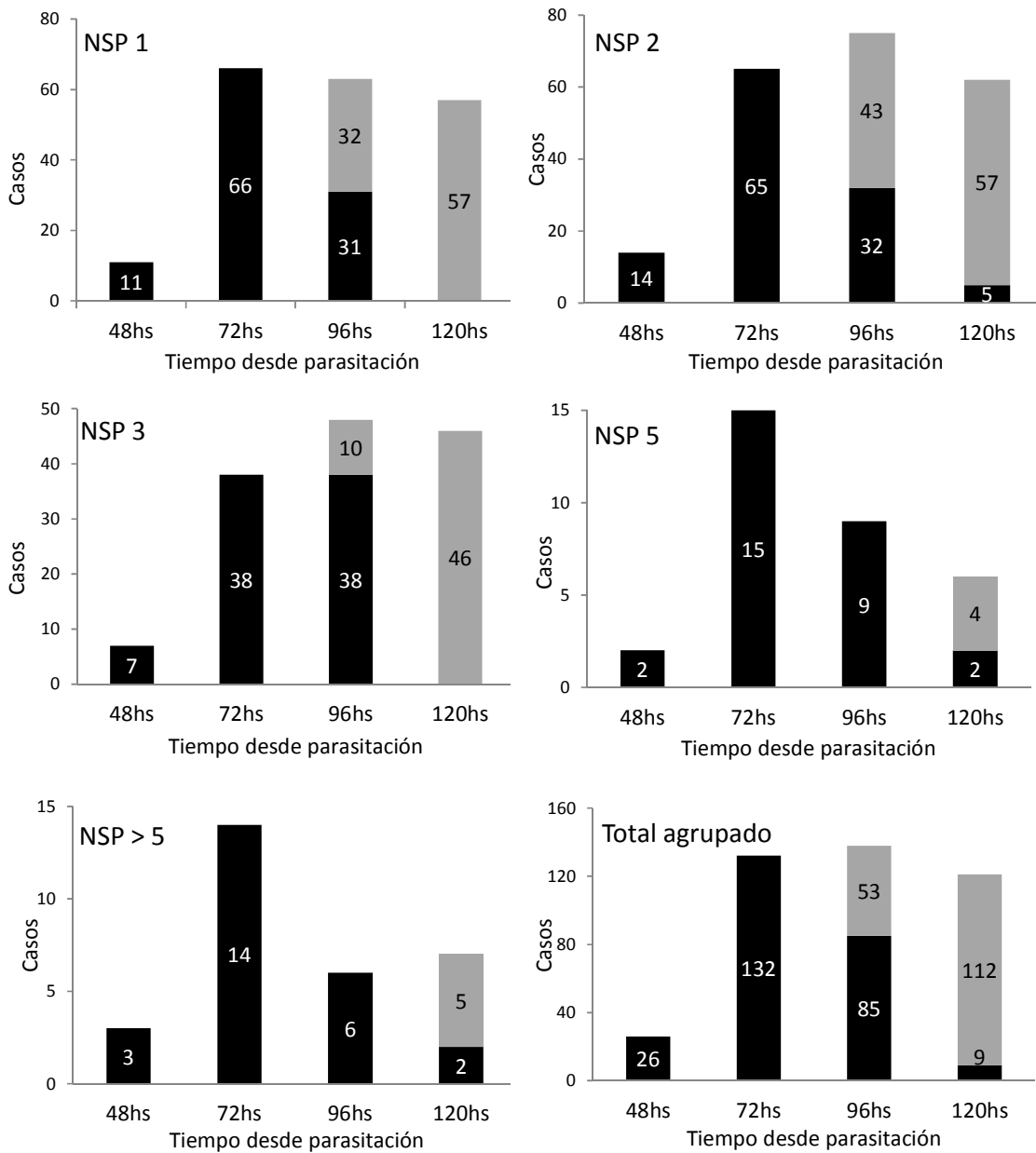


Figura 2.4. Dinámica del desarrollo de los estadios inmaduros involucrados desde el inicio de la competencia por los recursos del hospedador hasta su resolución, detallando el número de casos conteniendo L1 (negro) o L2 (gris) para cada NSP y el total agrupado para todos los valores de NSPs.

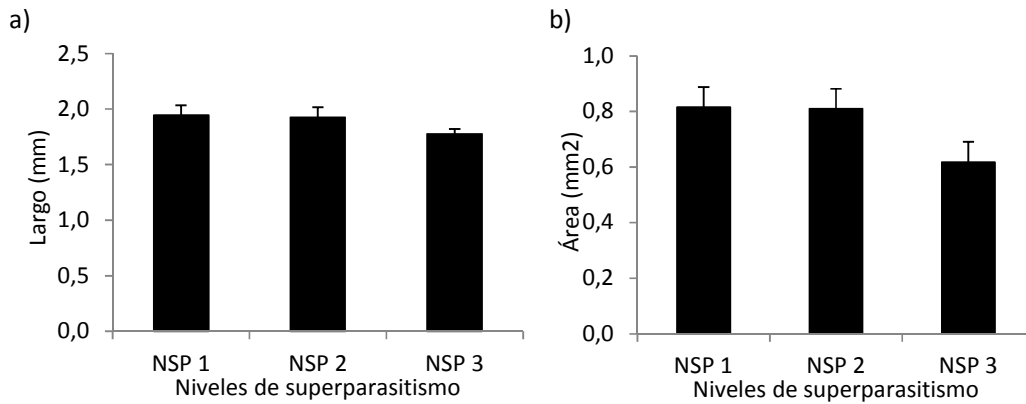


Figura 2.5. Comparación del (a) largo y el (b) área de larvas en segundo estadio entre NSP encontradas a las 96 hs desde la parasitación.

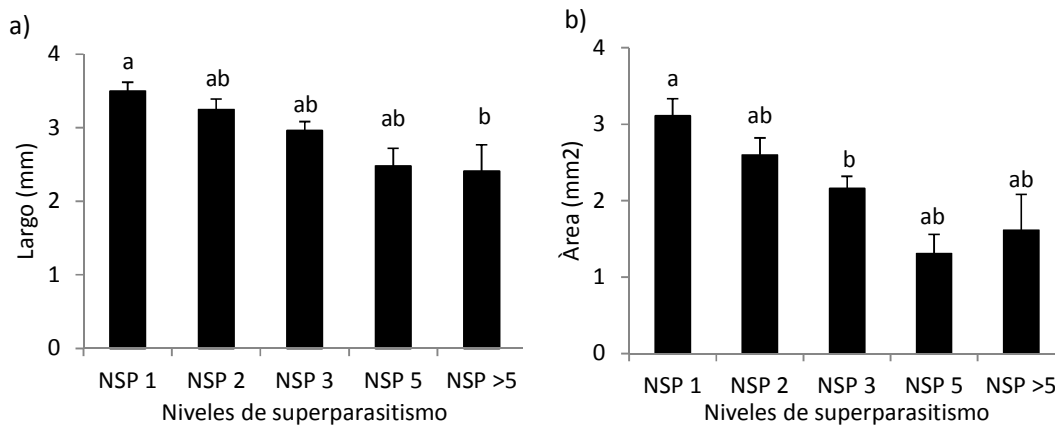


Figura 2.6. Comparación del (a) largo y el (b) área de larvas en segundo estadio entre NSP encontradas a las 120 hs desde la parasitación.

#### 2.4. Efectos del NSP sobre el tiempo de desarrollo, porcentaje de emergencia y proporción sexual

El tiempo de desarrollo huevo-adulto no difirió significativamente entre NSP, tanto para machos (ANOVA:  $F_{(2, 33)} = 1,77$ ;  $P = 0,186$ ) como para hembras (ANOVA:  $F_{(3, 81)} = 0,932$ ;  $P = 0,429$ ) (Figura 2.7). En el caso de los machos, el NSP 5 no fue incluido en el análisis estadístico porque emergió solamente un individuo, ocurriendo luego de 16 días

desde la parasitación. El promedio general ( $\pm$  E.E.) de los machos fue de  $19,4 \pm 0,5$  días ( $n = 36$ ) y de las hembras de  $21,2 \pm 0,4$  días ( $n = 85$ ).

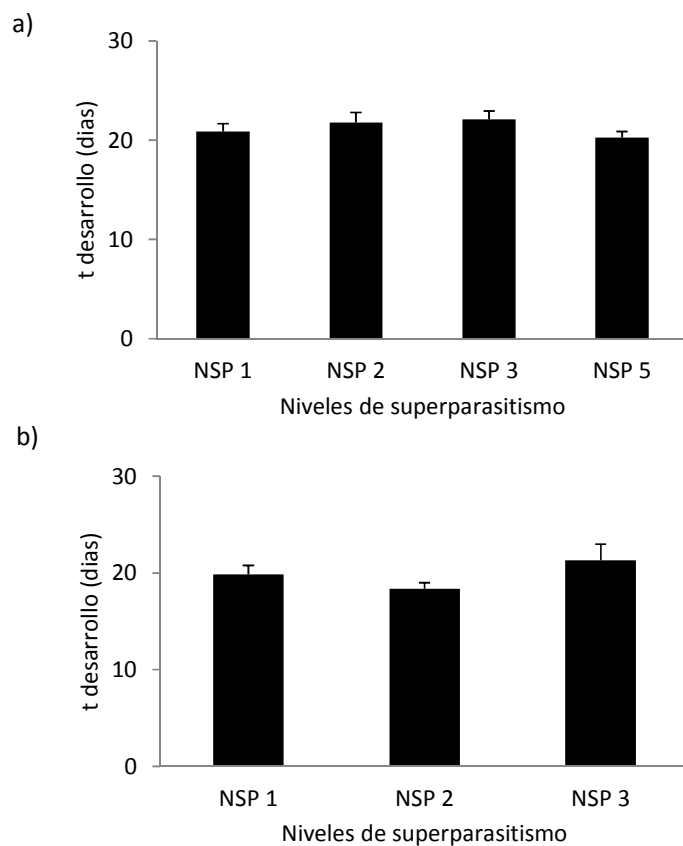


Figura 2.7. Tiempo de desarrollo promedio desde la oviposición hasta la emergencia del adulto para a) hembras de NSP 1 a 5 y b) machos de NSP 1 a 3. Las barras muestran en error estándar del promedio.

El porcentaje de emergencia total difirió significativamente entre los NSP 1, 2, 3 y 5 ( $\chi^2 = 16,02$ ; g.l. = 3;  $P = 0,001$ ;  $n = 668$ ). La emergencia de moscas en NSP 0 ( $n = 82$ ) fue del 81,7% y ningún parasitoide emergió en NSP 10 ( $n=29$ ). En la Figura 2.8 se observa un porcentaje de emergencia similar entre NSP 1 a 3 y recién en el NSP 5 ocurre una marcada disminución.

La proporción sexual de los individuos emergidos entre NSP fue significativamente distinta ( $\chi^2 = 48,41$ ; g.l. =3;  $P < 0,01$ ;  $n = 385$ ), con una tendencia a una mayor proporción de hembras con el aumento del NSP (Figura 2.9).

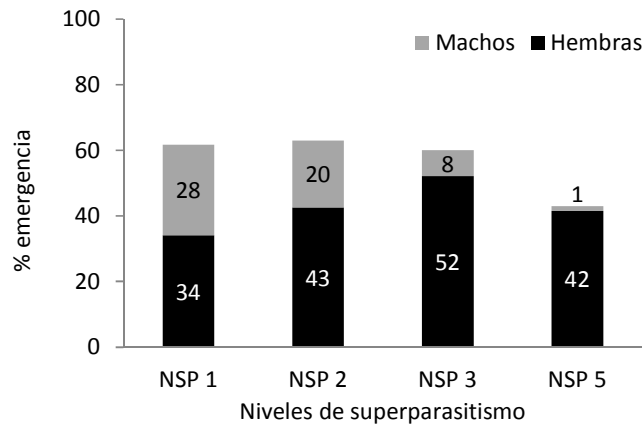


Figura 2.8. Porcentaje de emergencia de parasitoides sobre el total de larvas parasitadas para los distintos niveles de superparasitismo NSP 1, 2, 3 y 5, discriminado por sexos. Los valores dentro de la figura indican el porcentaje de individuos emergidos de cada sexo sobre el total de casos iniciales.

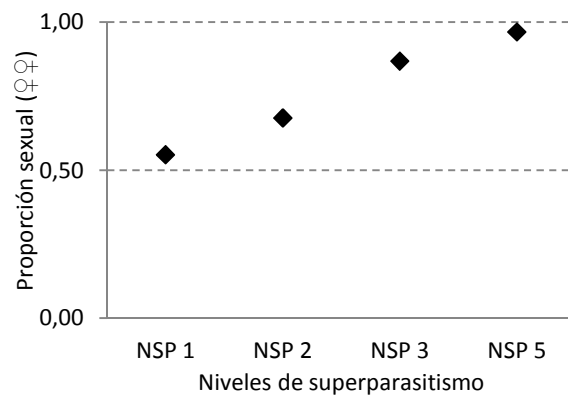


Figura 2.9. Proporción sexual (♀♀) obtenida para cada NSP conformada a partir de los individuos emergidos.

## 2.5. Fecundidad y porcentaje de parasitismo y proporción sexual en F1

La fecundidad no difirió significativamente entre hembras emergidas de larvas con distintos NSPs [ANCOVA: efecto del NSP:  $F_{(3, 67)} = 0,77$ ;  $P = 0,515$ ; efecto del nro. total de larvas ofrecidas (covariable):  $F_{(1, 67)} = 44,03$ ;  $P < 0,01$ ] (Figura 2.10).

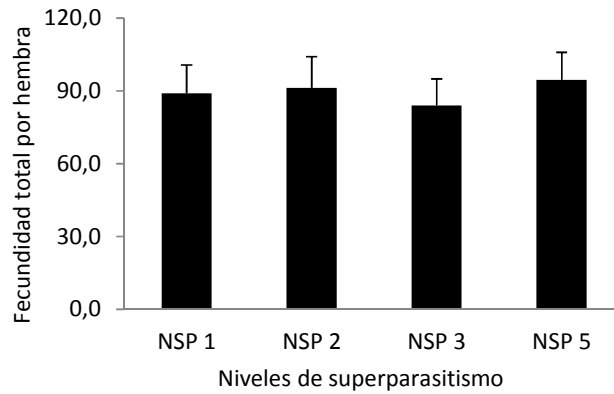


Figura 2.10. Fecundidad realizada por hembras emergidas de distintos NSP. Las barras indican el error estándar de la media.

Las tasas de parasitismo promedio en cada una de las sucesivas exposiciones generadas por las hembras provenientes de distintos NSPs no difirieron significativamente (ANOVA:  $F_{(3, 68)} = 1,180$ ;  $P = 0,324$ ) (Figura 2.11).

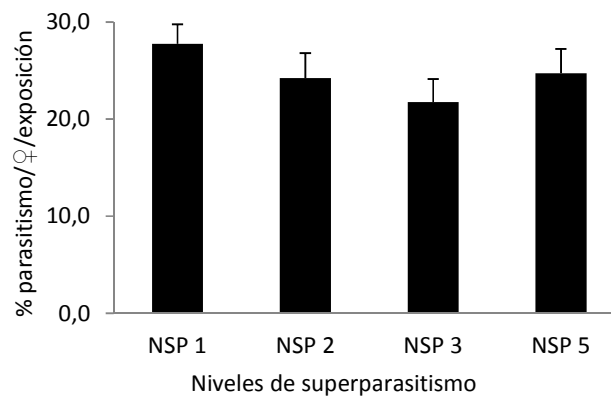


Figura 2.11. Tasa de parasitismo promedio por cada exposición producidas por cada hembra emergida de los NSP 1, 2, 3 y 5. Las barras indican el error estándar del promedio.

La proporción de sexos obtenida en la F1 fue similar entre NSPs (por superposición de intervalos de confianza del 95%), sesgado en todos los casos hacia una mayor producción de hembras (Figura 2.12).

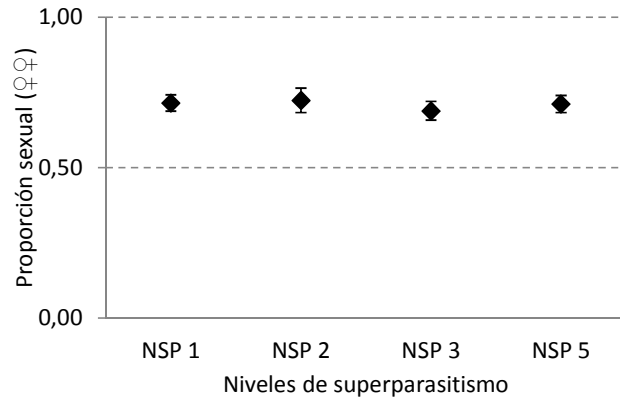


Figura 2.12. Proporción de sexos (♀♀) en la F1 producida por las hembras emergidas de los NSP 1, 2, 3 y 5. Las barras indican el error estándar del promedio.

## 2.6. Supervivencia y resistencia al hambre

2.6.1. *Supervivencia.* En una primera instancia se compararon todas las curvas de supervivencia obtenidas de los individuos diferenciados por sexo y NSP, a excepción de la combinación NSP 5-Macho que sólo produjo un individuo que vivió 36 días. La comparación múltiple de las 7 curvas no mostró diferencias significativas ( $\chi^2 = 6,26$ ; g.l. = 6;  $P = 0,394$ ). Por otro lado, también se analizaron individualmente para cada NSP (1 al 3) las curvas de supervivencia entre hembras y machos sin encontrar diferencias significativas en ningún caso ( $P > 0,05$ ). En la Tabla 2.1 se informan parámetros descriptivos de cada grupo. Dos casos fueron censurados a los 60 días: un macho NSP 1 vivió 78 días y un macho NSP 2 vivió 123 días. En promedio, las hembras vivieron  $26,63 \pm 1,51$  días y los machos  $25,12 \pm 2,39$  días.

Tabla 2.1. Valores de mediana del número de días vividos por individuos mantenidos con agua y miel y número de réplicas para cada combinación de sexo y NSP.

NSP	Sexo	Mediana	N
1	Hembra	22,25	16
2	Hembra	28	13
3	Hembra	25,5	15
5	Hembra	29	19
1	Macho	29,75	12
2	Macho	20,5	11
3	Macho	24,5	5
Total		24,5	91



A partir de este resultado, se decidió comparar las curvas de supervivencia entre NSPs agrupando ambos sexos (Fig. 2.13). Estas curvas tampoco difirieron significativamente ( $\chi^2 = 1,96$ ; g.l. = 3; P = 0,580). La Tabla 2.2 muestra los valores descriptivos para esta situación.

Tabla 2.2. Valores de mediana del número de días vividos por individuos mantenidos con agua y miel y número de individuos observados para cada NSP agrupando ambos sexos dentro de cada nivel.

NSP	Mediana	N
1	23	28
2	21,75	24
3	25,25	20
5	30	20
Total	24,75	92

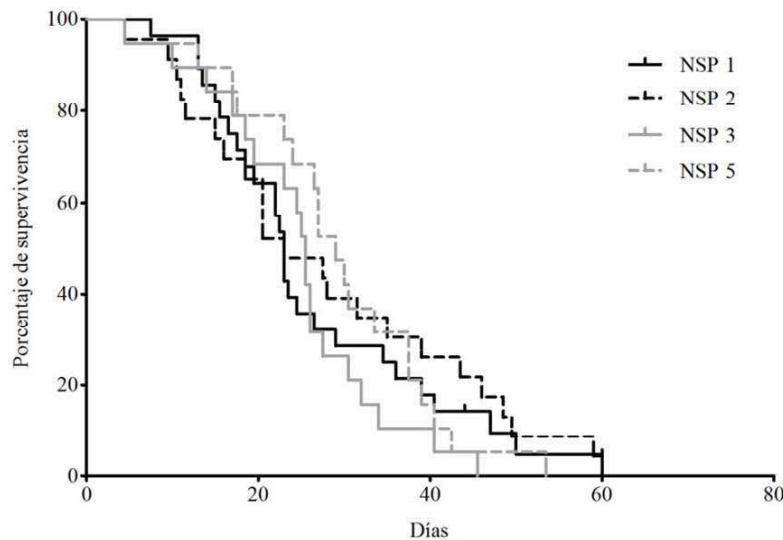


Figura 2.13. Curva de supervivencia para los individuos emergidos de los distintos NSP mantenidos con agua y miel.

2.6.2. Resistencia al hambreado. Como en la sección anterior se determinó que tanto machos como hembras tuvieron una supervivencia similar, en esta sección se realizó un análisis agrupando machos y hembras. Las cuatro curvas de supervivencia no mostraron

diferencias significativas ( $\chi^2 = 0,83$ ; g.l. = 3; P = 0,841) (Figura 2.14). La Tabla 2.3 muestra la estadística descriptiva.

Tabla 2.3. Valores de mediana del número de días vividos por individuos mantenidos con agua y número de individuos observados para cada NSP, agrupando ambos sexos.

NSP	Mediana	N
1	3,5	45
2	3,75	42
3	3,5	43
5	3,5	30
Total	3,5	160

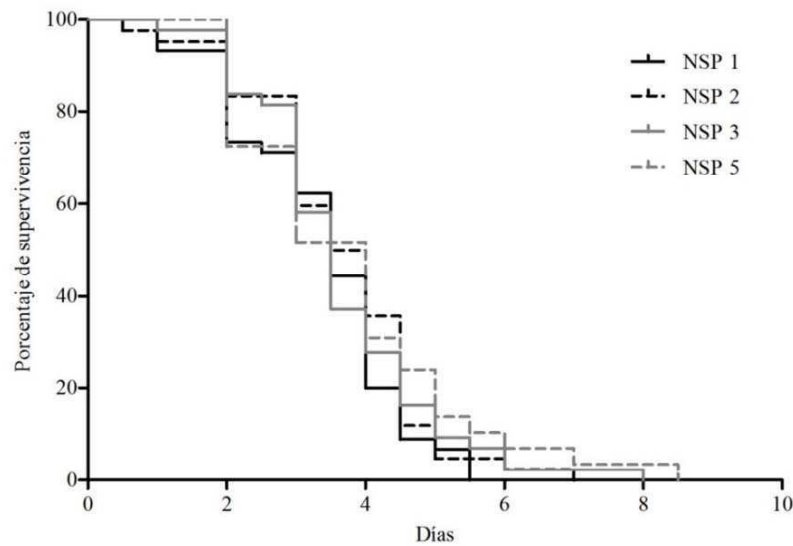


Figura 2.14. Curva de supervivencia para los individuos emergidos de los distintos NSP mantenidos solamente con agua.

### 2.7. Capacidad de vuelo

El porcentaje de individuos voladores no difirió estadísticamente entre los NSPs ( $\chi^2 = 2,53$ ; g.l. = 3; P = 0,470; n = 197) (Figura 2.15).

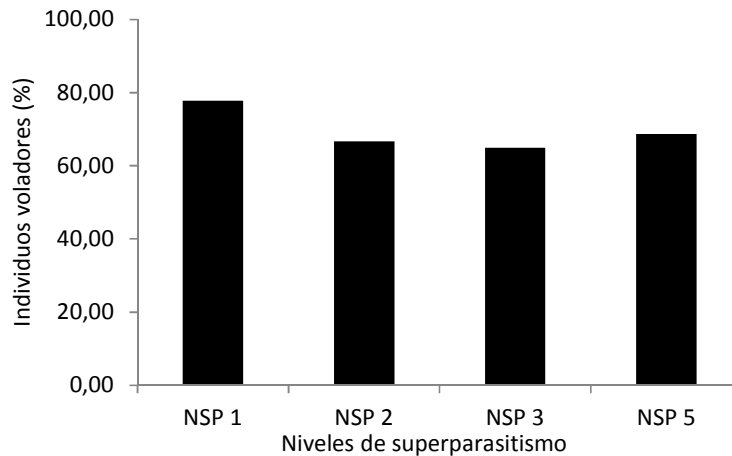


Figura 2.15. Porcentaje de individuos voladores emergidos de cada NSP.

### 2.8. Efectos del superparasitismo en el tamaño del adulto

En el caso de las hembras, ninguna de las variables analizadas mostró una diferencia significativa entre NSPs (ANOVA: Largo del ala derecha:  $F_{(3, 122)} = 0,630$ ;  $P = 0,597$ ; Ancho del ala derecha:  $F_{(3, 121)} = 0,827$ ;  $P = 0,482$ ; Largo de la tibia posterior derecha:  $F_{(3, 121)} = 1,628$ ;  $P = 0,186$ ) (Figura 2.16).

Resultados similares se obtuvieron para los machos (ANOVA: Largo del ala derecha:  $F_{(2, 68)} = 0,71$ ;  $P = 0,493$ ; Ancho del ala derecha:  $F_{(2, 67)} = 0,81$ ;  $P = 0,448$ ; Largo de la tibia posterior derecha:  $F_{(2, 68)} = 1,07$ ;  $P = 0,348$ ) (Figura 2.17).

Si bien no hubo diferencias significativas en el tamaño de los adultos estimado de manera indirecta, puede observarse en las Figuras 2.16 y 2.17 una tendencia general a una relación inversa entre el tamaño y el NSP.

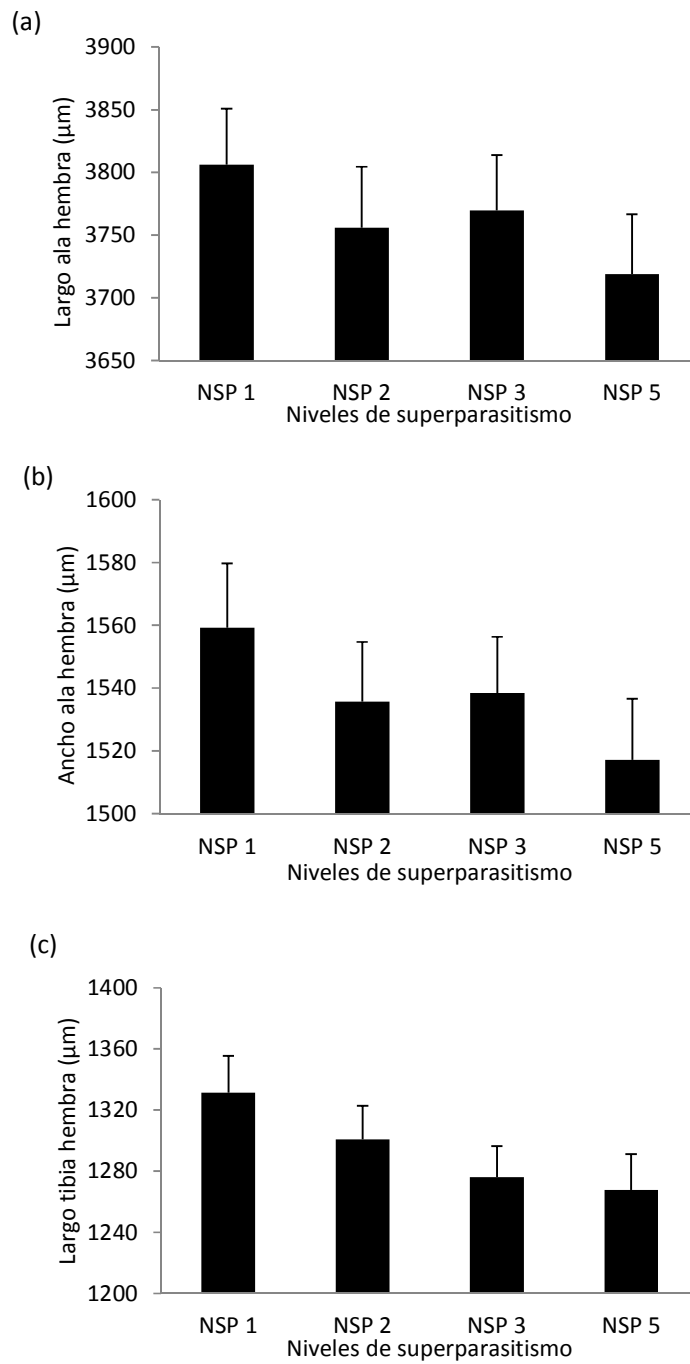


Figura 2.16. Valores promedio de (a) largo del ala derecha, (b) ancho del ala derecha y (c) largo de tibia posterior derecha de las hembras emergidas de los NSP 1, 2, 3 y 5. Las barras indican el error estándar de la media.

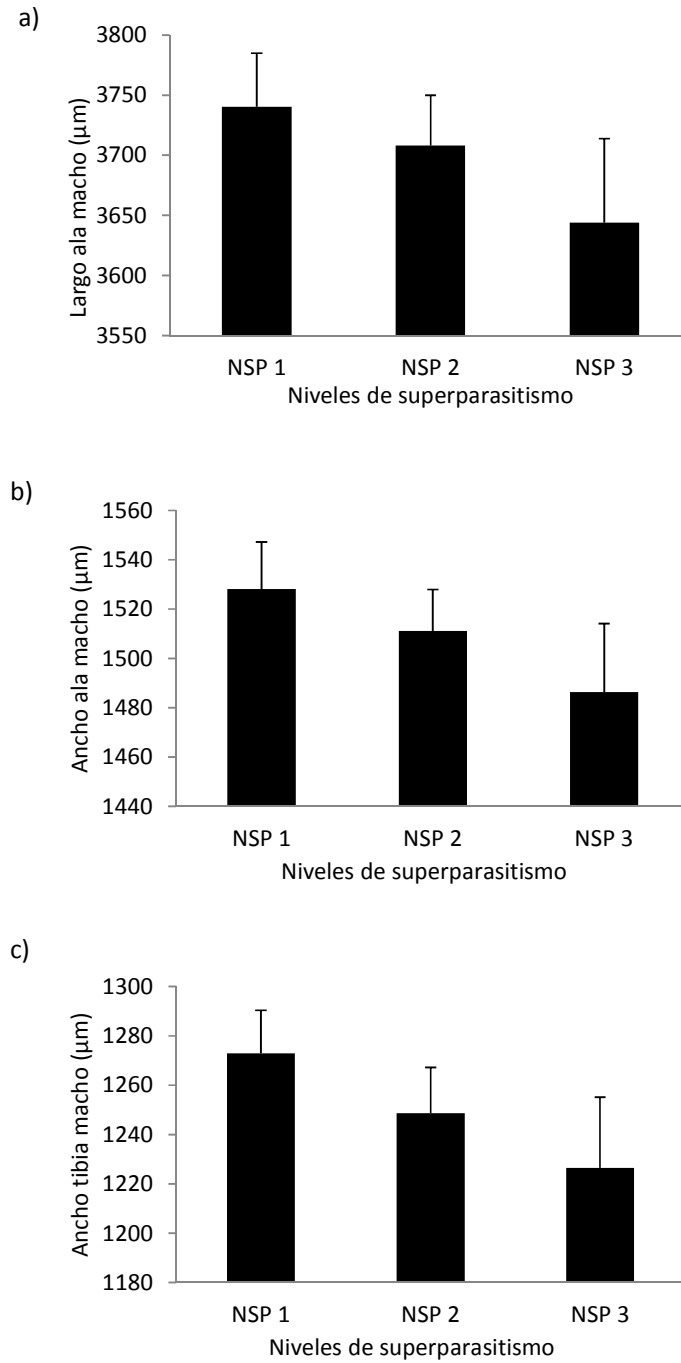


Figura 2.17. Valores promedios de a) largo del ala derecha, b) ancho del ala derecha y c) largo de tibia posterior derecha de los machos emergidos de los NSP 1, 2 y 3. Las barras indican el error estándar de la media.

## Discusión

El fenómeno de superparasitismo en *D. longicaudata* utilizando a *C. capitata* como hospedador mostró ser muy frecuente bajo las condiciones de cría artificial del IGEAF, dejando un tercio de las larvas ofrecidas sin parasitar y subutilizando el potencial de los huevos producidos. Un 59,5% de las larvas expuestas se encontraron superparasitadas ( $NSP > 1$ ), con una mediana de  $NSP = 4$  y un rango de entre  $NSP 0$  y  $40$  y moda de  $NSP 0$ . Esto se podría traducir en una tasa de parasitismo del 100% si las hembras distribuyeran sus oviposiciones más regularmente. González *et al.* (2007) encontraron un rango de valores similares utilizando larvas de *A. ludens* irradiadas. Comparativamente, en la misma cría artificial del IGEAF y bajo los mismos protocolos estándares, Paladino *et al.* (2010) encontraron casi un 20% de superparasitismo, un  $NSP$  máximo de 9 y una moda de  $NSP = 1$ . Estas diferencias entre los resultados obtenidos en esta Tesis y el trabajo de Paladino *et al.* (2010) podría estar reflejando que existen parámetros que no son estables y que por lo tanto deberían ser ajustados. Al ser estos valores tan distintos, habría que realizar un seguimiento periódico, para determinar el promedio y posibles fluctuaciones asociadas a variables no controladas hasta el presente. Cualesquiera sean las causas de estas fluctuaciones, en este Capítulo se propuso determinar la existencia y relevancia del fenómeno de superparasitismo, que a partir de lo encontrado puede implicar un serio problema en una cría masiva.

Los patrones de eliminación de larvas supernumerarias se encuadraron en lo que se esperaba para endoparasitoides solitarios cuyas L1 poseen mandíbulas visiblemente esclerotizadas y oponibles (Salt 1961, Vinson y Iwantsch 1980). Dependiendo del  $NSP$ , la eliminación total de los competidores ocurrió entre las 72 y 120 hs desde la parasitación (a  $25^{\circ}\text{C}$  y 65% HR), momento en el cual prácticamente la totalidad de los casos se encontró en L2 ya sin dichas mandíbulas visibles. Podría sugerirse que la presencia de mandíbulas esclerotizadas cumple una función fundamental para este objetivo, coincidiendo con los resultados de Lawrence (1988) en esta especie, como también en otros endoparasitoides solitarios (Chow y Mackauer 1984). La detección de larvas en combate suele ocurrir en muy baja frecuencia [2 casos en esta Tesis y 1 en 1270 disecciones realizadas por Altafini *et al.* (2013)]. Mediante estos medios *D. longicaudata* logró eliminar en un 63,6% de los casos a la especie competidora *Fopius arisanus* Sonan (Hymenoptera: Braconidae) en situación de multiparasitismo

(parasitación por distintas especies) (Palacio *et al.* 1991). Sin embargo, Lawrence (1988) también demostró en ensayos *in vitro* que la supresión fisiológica es un mecanismo de eliminación, ya que ocurre luego de 3 días de la presencia y condicionamiento del medio de cultivo por larvas L1. Sin embargo, los resultados de este Capítulo se realizaron con hospedadores parasitados en un corto período de tiempo, de no más de una o 2 horas, haciendo muy improbable que este mecanismo ocurriera.

Si bien no se realizaron medidas morfométricas en las larvas ganadoras y perdedoras en L1, las observaciones concordaron con los resultados de Lawrence (1988) en los que todas las larvas perdedoras eran del mismo tamaño, pero significativamente más chicas que la ganadora o el control. No obstante, en este Capítulo pudo demostrarse que a NSPs crecientes ocurre una tendencia a un menor tamaño de la L2 a las 120 hs de iniciado el desarrollo, siendo ya en ese estadio la única larva viva. Esto evidencia un claro retraso temporal hasta la recuperación de los efectos de la competencia, que probablemente implique disminución en la adquisición de recursos hasta la completa eliminación de competidores y/o un mayor consumo de energía debido a los combates físicos.

A pesar del retraso en alcanzar L2, el tiempo de desarrollo desde la parasitación hasta la emergencia de los adultos fue similar para los NSPs evaluados menores a 10. En general, los machos emergieron entre 1 y 3 días antes que las hembras, lo cual es característico de la especie (Hoy 1994, Bautista y Harris 1997, Meirelles *et al.* 2013). En otros sistemas, el tiempo de desarrollo se vio afectado por el superparasitismo, como en *Microtonus vittatae* Muesebeck (Hymenoptera: Braconidae) (Whyllie 1983); varias especies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Parra *et al.* 1988); en *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) (Gerling 1972), *Microptilis croipes* Cresson (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Eller *et al.* 1990), *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Simmonds 1943) y *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) (Vinson y Sroka 1978), pero no en *Aphidius ervi* Haliday (Braconidae) (Bai y Mackauer 1992). Por lo tanto, a pesar del retraso inicial L1-L2 observado, lo que sugieren los resultados aquí presentados es que la larva ganadora acapara los recursos de manera temprana en su desarrollo permitiendo compensar luego los posibles efectos de una competencia inicial (Harvey *et al.* 1993) y, bajo NSPs que permitan la emergencia (NSP<10), lograr un tiempo de desarrollo

huevo-adulto normal, independientemente del NSP inicial. Esto permitiría, por ejemplo, reducir los costos del superparasitismo asociado a una mayor permanencia en estado inmaduro, que representaría mayor exposición a predadores de pupas de *C. capitata*.

Si bien no parece haber grandes efectos del superparasitismo en estadios inmaduros, el porcentaje de emergencia de adultos mostró una caída en el NSP 5 y la emergencia en NSP 10 fue nula. Esto indicaría que a partir de cierta carga de competidores, los efectos del superparasitismo comienzan a hacerse más evidentes, hasta el caso extremo en el que ningún adulto logra finalizar el desarrollo. Efectos similares fueron observados por Montoya *et al.* (2000) y González *et al.* (2007) en la cría masiva sobre *A. ludens*, así como en otros sistemas de endoparasitoides solitarios (Santolamazza-Carbone y Cordero-Rivera 2003, Tunca y Kilincer 2009). Esto podría ser consecuencia directa de los combates físicos o bien deberse a la muerte del hospedador por la gran cantidad de daños infringidos por los parasitoides hembras al introducir el ovipositor un elevado número de veces (González *et al.* 2007, van Nieuwenhove *et al.* 2012). Alternativamente, un alto consumo de recursos por las L1 podría reducir la cantidad del mismo a tal punto que no permitan que aquella larva que gane la competencia y avance a L2 pueda completar su desarrollo.

La relación entre la proporción de sexos y el superparasitismo ha sido discutida en numerosos estudios por su fuerte impacto en control biológico. En el presente Capítulo, la relación de sexos entre los individuos emergidos de los distintos NSPs mostró un sesgo gradual hacia hembras con el aumento de los NSPs, alcanzando casi el 100% de producción de hembras en NSP 5. Estos resultados coinciden con los de Montoya *et al.* (2011) y González *et al.* (2007) en *D. longicaudata* utilizando *A. ludens* como hospedador, al igual que ocurre con la especie emparentada *D. tryoni* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) evaluada sobre *C. capitata* (Wang y Messing 2003). Algunos autores (Galloway y Grant 1989, Mayhew y van Alphen 1999, Darrouzet *et al.* 2003) sugieren que el superparasitismo sería la causa del sesgo hacia hembras en parasitoides himenópteros (Darrouzet *et al.* 2007), pero también existen casos en los que el superparasitismo produce sesgos hacia una mayor producción de machos (Wylie 1965, Santolamazza-Carbone and Cordero-Rivera 2003) o en los que no hay efectos (Rivers 1996). En parasitoides, las hembras son capaces de asignar el sexo del huevo que van a depositar y esa decisión puede estar influenciada por factores como la



experiencia previa, la especie, densidad y calidad (*i.e.* tamaño y estado de parasitismo) del hospedador y la presencia de otros conespecíficos (King 1993, Santolamazza-Carbone y Cordero-Rivera 2003). Bajo distintas circunstancias y frente al superparasitismo, las hembras deberían favorecer al sexo más competitivo (van Dijken y Waage 1987; King 1987), siendo generalmente el caso de las hembras (Darrouzet *et al.* 2003, Lebreton *et al.* 2010). El cambio de la calidad en las larvas que fueron ofrecidas a las hembras para la generación de los distintos NSPs, quizás haya sido la causa que haya provocado en esas hembras la decisión de depositar una mayor proporción de huevos hembra a medida que aumentaba el número de competidores. Sin embargo, no puede descartarse que el sesgo observado sea el resultado de una mortalidad diferencial entre ambos sexos, como fue sugerido en las especies *Eupelmus vuilleti* Craw (Hymenoptera: Eupelmidae) (Darrouzet *et al.* 2003) y *Anaphes victus* Huber (Hymenoptera: Mymaridae) (van Baaren *et al.* 1999), en las que las larvas hembras tienen mayor probabilidad de ganar la competencia larval.

Los efectos del superparasitismo no se reflejaron en la fecundidad de las hembras emergidas, ni en la proporción sexual ni en la tasa de parasitismo lograda en la siguiente generación (F1). Tampoco fue afectada la supervivencia, tanto en condiciones con alimento como en condiciones de hambre, evidenciándose en este último ensayo que las reservas energéticas adquiridas durante el desarrollo fueron similares en todos los tratamientos. Comparativamente, Vinson y Sroka (1978) encontraron que la supervivencia del braconido *C. nigriceps* disminuyó al incrementar el número de huevos por hospedador. Si bien la supervivencia fue evaluada bajo las mismas condiciones para todos los NSPs, la evaluación simultánea de la fecundidad podría haber generado algún efecto si se produjera una dinámica energética diferencial. Sin embargo, Bernardo *et al.* (2005) evaluaron la supervivencia del endoparásitoide solitario *Thripobius semiluteus* Boucek (Hymenoptera: Eulophidae) bajo escenarios con o sin la exposición de hospedadores y no encontraron diferencias significativas; aunque Meirelles *et al.* (2013) encontraron diferencias en la supervivencia entre individuos vírgenes o fecundados de *D. longicaudata* criados sobre *C. capitata* y *A. fraterculus*. A pesar de estos aspectos, el estado de apareamiento fue similar para todos los individuos comparados en este Capítulo y los efectos potenciales serían percibidos en todos los NSPs, haciéndolos comparables entre sí. El superparasitismo tampoco afectó significativamente la capacidad de vuelo, ni el tamaño de los adultos emergidos bajo los distintos niveles,

coincidiendo con González *et al.* (2007) quienes no encontraron efectos sobre la fecundidad, supervivencia y habilidad de vuelo.

En su conjunto, los resultados aquí presentados sugieren que los efectos del superparasitismo son determinantes durante el desarrollo de los parasitoides, pudiendo ser letales para NSPs elevados. No obstante, para aquellos individuos que logran alcanzar el estado adulto no se evidenciaron efectos adversos mayores sobre los distintos parámetros relacionados al éxito reproductivo. Asimismo, para cualquier parasitoide solitario, incurrir en superparasitismo implica un costo de energía en la producción del huevo y tiempo que podría dedicar en la búsqueda de otro hospedador de mejor calidad. A pesar de esto, al haber utilizado insectos de una cría de laboratorio de más de 10 años estos resultados podrían no ser representativos de lo que ocurre en la naturaleza y las interpretaciones deban ser distintas. En las crías artificiales, los parasitoides son confinados en espacios reducidos, con todos los requerimientos necesarios para la expresión de su máxima fecundidad, con lo que es probable que el comportamiento se vea alterado. Incluso dando lugar a cambios en las frecuencias de genes que controlan el comportamiento de oviposición (Futuyma y Peterson 1985).

En relación al control biológico, el superparasitismo en *D. longicaudata* podría ser visto como un fenómeno que tiene ventajas y desventajas. Por un lado, en parasitoides solitarios este fenómeno tiene asociado una subutilización de los huevos producidos que podrían ser reubicados para aumentar las tasas de parasitismo. Además, de no controlar el superparasitismo, la cantidad total de individuos producidos podría disminuir si los niveles superaran ciertos umbrales (*i.e.* NSP ~5), al menos al utilizar *C. capitata* como hospedador, reduciendo la eficiencia de las crías artificiales. Sin embargo, estos niveles umbrales produjeron un sesgo máximo hacia la obtención de hembras en la progenie. Dado que son las hembras las que generan un mayor crecimiento poblacional, mientras que los machos no contribuyen a la mortalidad de la plaga (Heimpel y Lundgren 2000, Montoya *et al.* 2012), los rendimientos de la cría masiva se verían favorecidos. Esa ventaja podría, no obstante, verse oscurecida si un aumento descontrolado de los NSPs generara un colapso o cuello de botella al producirse pocos machos. En NSP 5 sólo un 1% de los individuos emergidos fueron machos. En otras especies criadas masivamente este tipo de sesgo no es raro y se lo atribuye a condiciones de laboratorio favorables (Heimpel y Lundgren 2000, Ode y

Heinz 2002), aunque sin embargo, no hay muchas especies de agente de control biológico disponibles comercialmente por su susceptibilidad a un sesgo hacia machos (Montoya *et al.* 2011), como por ejemplo en especies del género *Trichogramma* (Smith 1996). Otros parámetros podrían indicar un efecto levemente perjudicial para los adultos que emergen en el campo luego de ser liberados en estado de pupa, como por ejemplo la tendencia observada a un menor tamaño corporal de los adultos emergidos de mayores NSPs. Si bien la habilidad de vuelo evaluada en el laboratorio no difirió entre niveles, en el campo podría significar una disminución de la eficiencia de búsqueda y su impacto como agente de control de plagas.

## Referencias

- Altafini D.L., Redaelli L.R. y Jahnke S.M.** 2013. Superparasitism of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *The Florida Entomologist*, 96: 391-395.
- Bai B. y Mackauer M.** 1992. Influence of superparasitism on development rate and adult size in a solitary parasitoid *Aphidius ervi*. *Functional Ecology*, 6: 302-307.
- Bakker K., Peulet P.H. y Visser M.E.** 1989. The ability to distinguish between hosts containing different numbers of parasitoid eggs by the solitary parasitoid *Leptopilina heterotoma* (Thomson) (Hym., Cynip.). *Netherlands Journal of Zoology*, 40: 514-520.
- Bakker K., van Alphen J.J.M., van Batenberg F.H.D., et al.** 1985. The function of host discrimination and superparasitism in parasitoids. *Oecologia*, 67: 572-6.
- Bautista R.C., Harris E.J.** 1997. Effect of insectary rearing on host preference and oviposition behavior of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83: 213-218.
- Bernardo U., Viggiani G. y Sasso R.** 2005. Biological parameters of *Thripobius semiluteus* Bouček (Hym., Eulophidae), a larval endoparasitoid of *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché)(Thysan., Thripidae). *Journal of applied entomology*, 129: 250-257.
- Cancino J. y Yoc M.** 1993. Methods proposed to apply quality control in mass rearing of *Diachasmimorpha longicaudata*. En: *Proceedings: Seventh Workshop of the IOBC Global Working Group on Quality Control of Mass Reared Arthropods*, pp. 13-16.
- Cancino J., Cancino J.L., Martínez M. y Liedo P.** 2002. Quality Control Parameters of Wild and Mass Reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), A Fruit Fly Parasitoid. En: Leppla N.C., Bloem K.A. y Luck R.F. (eds), *Quality Control for Mass-Reared Arthropods*, Proceedings of the Eighth and Ninth Workshops of the IOBC Working Group on Quality Control of Mass-Reared Arthropods, pp. 84-84.

- Chau N.N.B. y Maeto K.** 2008. Intraspecific larval competition in *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae), a solitary endoparasitoid of lepidopteran larvae. *Applied entomology and zoology*, 43: 159-165.
- Chow F.J. y Mackauer M.** 1984. Inter- and intraspecific larval competition in *Aphidius smithi* and *Praon pequodorum* (Hymenoptera: Aphidiidae). *The Canadian Entomologist*, 116: 1097-1107.
- Chow F.J. y Mackauer M.** 1986. Host discrimination and larval competition in the aphid parasite *Ephedrus californicus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 41: 243-254.
- Clausen C.P., Clancy D.W. y Chock Q.C.** 1965. *Biological control of the oriental fruit fly (Dacus dorsalis Hendel) and other fruit flies in Hawaii* (No. 1322). Agricultural Research Service. US Dept. of Agriculture; for sale by the Supt. of Docs., US Govt. Print. Off.
- Cloutier C. y Mackauer M.** 1979. The effect of parasitism by *Aphidius smithi* (Hymenoptera: Aphidiidae) on the food budget of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Canadian Journal of Zoology*, 57: 1605-1611.
- Darrouzet E., Imbert E. y Chevrier C.** 2003. Selfsuperparasitism consequences for offspring sex ratio in the solitary ectoparasitoid *Eupelmus vuilleti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 109: 167-171.
- Darrouzet E., Bignon L. y Chevrier C.** 2007 Impact of mating status on egg-laying and superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123: 279-285.
- Eller F.J., Tumlinson J.H. y Lewis W.J.** 1990. Intraspecific competition in *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Heliothis* species (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83; 504-508.
- Fisher R.C.** 1961. A study in insect multiparasitism II. The mechanism and control of competition for possession of the host. *Journal of Experimental Biology*, 38: 605-629.
- Fisher R.C.** 1971. Aspects of the physiology of endoparasitic Hymenoptera. *Biological reviews*, 46: 243-278.
- Futuyma D.J. y Peterson S.C.** 1985. Genetic variation in the use of resources by insects. *Annual Review of Entomology*, 30: 217-238.
- Galloway K.S. y Grant B.** 1989. Reverse sex-ratio adjustment in an apparently outbreeding wasp, *Bracon hebetor*. *Evolution*, 465-468.
- Gerling D.** 1972. The developmental biology of *Telenomus remus* Nixon (Hym., Scelionidae). *Bulletin of Entomological Research*, 61: 385-388.
- Godfray H.C.J.** 1994. *Parasitoids behavioural and evolutionary ecology*. 1<sup>st</sup> edn. 473 pp. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- González P.I., Montoya P., Perez-Lachaud G., Cancino J. y Liedo P.** 2007. Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 40: 320-326.

- Gu H., Wang Q. y Dorn S.** 2003. Superparasitism in *Cotesia glomerata*: response of hosts and consequences for parasitoids. *Ecological Entomology*, 28: 422-431
- Harvey J.A., Harvey I.F. y Thompson D.J.** 1993. The effect of superparasitism on development of the solitary parasitoid wasp, *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ecological Entomology*, 18: 203-208.
- Harvey J.A., Jarvis M.A., Gols R., Jiang N. y Vet L.E.** 1999. Development of the parasitoid, *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae) in *Pieris rapae* and *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae): evidence for host regulation. *Journal of Insect Physiology*, 45: 173-182.
- Heimpel G.E., Lundgren J.G.** 2000. Sex ratios of commercially reared biological control agents. *Biological Control*, 19: 77-93.
- Hoy M.A.** 1994. Parasitoids and predators in management of arthropod pests. En: Metcalf RL, Luckman WH, (eds). *Introduction to insect pest management*, pp. 129-198.
- Ikawa T. y Okabe H.** 1985. Regulation of egg number per host to maximize the reproductive success in the gregarious parasitoid, *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera: Braconidae). *Applied Entomology and Zoology*, 20: 331-339.
- Jones W., Greenberg S.M. y Legaspi B. Jr.** 1999. The effect of varying *Bemisia argentifolii* and *Eretmocerus mundus* ratios on parasitism. *BioControl*, 44: 13-28.
- King B.H.** 1987. Offspring sex ratios in parasitoid wasps. *Quarterly Review of Biology*, 367-396.
- King B.H.** 1989. Host-size-dependent sex ratios among parasitoid wasps: does host growth matter? *Oecologia*, 78: 420-426.
- King B.H.** 1993. Sex ratio manipulation by parasitoid wasps. En: Wrensch, D. L., y Ebbert, M. A. (eds.). *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*, pp. 418-441.
- Lawrence P.O.** 1988. Intraspecific competition among first instars of the parasitic wasp *Biosteres longicaudatus*. *Oecologia*, 74: 607-611.
- Lebreton S., Chevrier C. y Darrouzet E.** 2010. Sex allocation strategies in response to conspecifics offspring sex ratio in solitary parasitoids. *Behavioral Ecology* 21: 107-112.
- López O.P., Hénaut Y., Cancino J., Lambin M., Cruz-López L. y Rojas J.C.** 2009. Is host size an indicator of quality in the mass-reared parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)? *Florida Entomologist*, 92: 441-449.
- Mackauer M. y Chau A.** 2001. Adaptive self superparasitism in a solitary parasitoid wasp: the influence of clutch size on offspring size. *Functional Ecology*, 15: 335-343.
- Mayhew P.J. y van Alphen J.J.M.** 1999. Gregarious development in alysiine parasitoids evolved through a reduction in larval aggression. *Animal Behaviour*, 58: 131-141.
- Meirelles R.N., Redaelli L.R. y Ourique C. B.** 2013. Comparative Biology of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) Reared on *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 96: 412-418.

- Messing R.H., Klungness L.M., Purcell M. y Wong T.T.Y.** 1993. Quality control parameters of mass-reared opine parasitoids used in augmentative biological control of tephritid fruit flies in Hawaii. *Biological Control*, 3: 140-147.
- Montoya P., Liedo P., Benrey B., Barrera J.F., Cancino J. y Aluja M.** 2000. Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 47-54.
- Montoya P., Cancino J., Pérez-Lachaud G. y Liedo P.** 2011. Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. *BioControl*, 56: 11-17.
- Montoya P., Pérez-Lachaud G. y Liedo P.** 2012. Superparasitism in the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) and the implications for mass rearing and augmentative release. *Insects*, 3: 900-911.
- Nakamatsu Y., Gyotoku Y. y Tanaka T.** 2001. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (CK) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and CK polydnavirus. *Journal of Insect Physiology*, 47: 573-584.
- Narasimham A.U.** 1992. Comparative biological parameters of *Comperia merceti* (Compere) (Hym., Encyrtidae) and *Anastatus tenuipes* Bolivar (Hym., Eupelmidae), oothecal parasitoids of the cockroach *Supella longipalpa* (Fab.). *Biological Control*, 2: 73-77.
- Ode P.J. y Heinz K.M.** 2002. Host-size dependent sex ratio theory and improving mass reared parasitoid sex ratios. *Biological Control*, 24:31-41.
- Ovruski S.M., Colin C., Soria A., Oroño L.E. y Schliserman P.** 2003. Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62: 49-59.
- Palacio I.P., Ibrahim A.G., Ibrahim R.** 1991. Interspecific competition among opiine parasitoids of the oriental fruit, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *The Philippine Entomologist*, 8: 1087-1097.
- Paladino L.Z.C, Papeschi A.G. y Cladera J.L.** 2010. Immature stages of development in the parasitoid wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. 12 pp. *Journal of Insect Science*, 10:45.
- Parker F.D. y Pinnell R.E.** 1973. Effect on food consumption of the imported cabbageworm when parasitized by two species of *Apanteles*. *Environmental Entomology*, 2: 216-219.
- Parra J.R.P., Zucchi R.A. y Silveira Neto S.** 1988. Perspectives of biological control using *Trichogramma* and/or Trichogrammatoidea in the state of São Paulo (Brazil). *Colloques de l'INRA (France)*.
- Purcell M.F., Daniels K.M., Whitehand L.C. y Messing R.H.** 1994. Improvement of quality control methods for augmentative releases of the fruit fly parasitoids, *Diachasmimorpha longicaudata* and *Psytalia fletcheri* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Science and Technology*, 4: 155-166.

- Rivers D.B.** 1996. Changes in oviposition behavior of the ectoparasitoids *Nasonia vitripennis* and *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) when using different species of fly hosts, prior oviposition experience, and allospecific competition. *Annals of the Entomological Society of America*, 89: 466-474.
- Rosenheim J.A. y Mangel M.** 1994. Patch-leaving rules for parasitoids with imperfect host discrimination. *Ecological Entomology*, 19: 374-380.
- Rosenheim J.A., Hongkham D.** 1996. Clutch size in an obligately siblicidal parasitoid wasp. *Animal Behaviour*, 51: 841-852.
- Salt G.** 1936. Experimental studies in insect parasitism IV. The effect of superparasitism on populations of *Trichogramma evanescens*. *Journal of Experimental Biology*, 13: 363-362.
- Salt G.** 1961. Competition among insect parasitoids. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 15: 119.
- Santolamazza-Carbone S. y A. Cordero-Rivera.** 2003. Superparasitism and sex ratio adjustment in a wasp parasitoid: results at variance with Local Mate Competition? *Oecologia*, 136: 365-73.
- Sato Y., Tagawa J. y Hidaka T.** 1986. Effects of the gregarious parasitoids *Apanteles ruficus* and *A. kariyai* on host growth and development. *Journal of Insect Physiology*, 32: 281-286.
- Schopf A. y Steinberger P.** 1997. The influence of the endoparasitic wasp, *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera: Braconidae) on the growth, food consumption, and food utilization of its host larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae). *European Journal of Entomology*, 93: 555-568.
- Segura D.F., Viscarret M.M., Paladino L.Z.C., Ovruski S.M. y Cladera J.L.** 2007. Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. *Animal Behaviour*, 74: 131-142.
- Sequeira R. y Mackauer M.** 1992. Nutritional ecology of an insect host-parasitoid association: the pea-aphid *Aphidus ervi* system. *Ecology*, 73: 183-189.
- Simmonds F.J.** 1943. The occurrence of superparasitism in *Nemeritis canescens* Grav. *Rev. Canad. Biol.* 2: 15-58.
- Smith S.M.** 1996. Biological control with *Trichogramma*: Advances, successes, and potential of their use. *Annual Review of Entomology*. 41: 375-406.
- Terán H.** 1977. Comportamiento alimentario y su correlación a la reproducción en hembras de *Ceratitis capitata* Wied. *Revista Agronómica del NOA*, 14: 17-34.
- Tunca H. y Kilincer N.** 2009. Effect of superparasitism on the development of the solitary parasitoid *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33: 463-468
- van Alphen J.J.M. y Visser M.E.** 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 35: 59-79.

- van Alphen J.J.M. y Jervis M.A.** 1996. Foraging behaviour. En: *Insect natural enemies*, Springer Netherlands, pp. 1-62.
- van Baaren J., Landry B.L. y Boivin G.** 1999. Sex allocation and larval competition in a superparasitizing solitary egg parasitoid: competing strategies for an optimal sex ratio. *Functional Ecology*, 13: 66-71.
- van Dijken M.J. y Waage J.K.** 1987. Self and conspecific superparasitism by the egg parasitoid *Trichogramma evanescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 43: 183-192.
- van Lenteren J.C.** 1981. Host discrimination by parasitoids. En: Nordlund N. (ed), *Semiochemicals: their role in pest control*. Wiley, New York, pp. 153-179.
- van Lenteren J.C.** 1991. Quality control of natural enemies: hope or illusion? En: Bigler F. (ed.), *Proceedings of the 5th Workshop of the Global IOBC Working Group Quality Control of Mass Reared Organisms*, Wageningen, The Netherlands. pp. 1-14.
- van Nieuwenhove G.A., Bezdjian L.P. y Ovruski S.M.** 2012. Effect of exposure time and ratio of hosts to female parasitoids on offspring production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Florida Entomologist*, 95: 99-104.
- Vet L.E., Datema A., Janssen A. y Snellen H.** 1994. Clutch size in a larval-pupal endoparasitoid: consequences for fitness. *Journal of Animal Ecology*, 807-815.
- Vinson S.B. y Sroka P.** 1978. Effects of superparasitism by a solitary endoparasitoid on the host, parasitoid and field samplings. *Southwestern Entomologist*, 3: 299-303.
- Vinson S.B. y Iwantsch G.F.** 1980. Host suitability for insect parasitoids. *Annual review of entomology*, 25: 397-419.
- Vinson S.B. y Hegazi E.M.** 1998. A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. *Journal of Insect Physiology*, 44: 703-712.
- Viscarret M.M., La Rossa R., Segura D.F., Ovruski S.M. y Cladera J.L.** 2006. Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 36: 147-153.
- Wang X.G. y Messing R.H.** 2003. Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. *Biological Control*, 27: 251-259.
- White J.A. y Andow D.A.** 2008. Benefits of self-superparasitism in a polyembryonic parasitoid. *Biological Control*, 46: 133-139.
- Wong T.T.Y. y Ramadan M.M.** 1992. Mass reared biology of larval parasitoids (Hymenoptera: braconidae: Opinae) of Tephritidae flies in Hawaii. En: Anderson T.E. y Leppla N.C. (eds.), *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management*, Westview Press, Oxford, England, pp. 405-426.



**Wylie H.G.** 1965. Discrimination between parasitized and unparasitized house fly pupae by females of *Nasonia vitripennis* (Walk.) (Hymenoptera: Pteromalidae). *The Canadian Entomologist*, 97: 279-286.

**Wylie H.G.** 1971. Observations on intraspecific larval competition in three hymenopterous parasites of fly puparia. *The Canadian Entomologist*, 103: 137-142.

**Wylie H.G.** 1983. Delayed development of *Microctonus vittatae* (Hymenoptera: Braconidae) in superparasitized adults of *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Canadian Entomologist*, 115: 441-422.

**Zar J. H.** 1996. *Biostatistical analysis*. 3<sup>rd</sup> edn. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall. 863 pp.

## Capítulo 3

Discriminación de larvas parasitadas y no parasitadas de *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* por parte de las hembras de *Diachasmimorpha longicaudata*

## Introducción

La elección del hospedador tiene un impacto definitorio sobre el éxito reproductivo de los parasitoides, ya que se desarrollan en unidades discretas con una cantidad y calidad de recurso alimenticio determinado. En parasitoides solitarios, uno de los muchos aspectos que pueden afectar el éxito para alcanzar el estado adulto es el estado de parasitación del hospedador. Consecuentemente, la habilidad de discriminar entre hospedadores parasitados y no parasitados será fuertemente favorecida por la selección natural. Esta habilidad ha sido demostrada en aproximadamente 200 especies de himenópteros (van Lenteren 1981, van Alphen y Visser 1990, Mackauer 1990, Brodeur y Boivin, 2004). En la actualidad hay varios trabajos que evidencian de manera empírica la capacidad de los parasitoides hembra de discriminar entre hospedadores parasitados y no parasitados (Salt 1961, van Lenteren 1981, van Alphen y Nell 1982, van Alphen y Visser 1990, Hemerik *et al.* 2002), pudiendo incluso discernir entre hospedadores parasitados por ellas mismas de hospedadores parasitados por co-específicos (*e.g.* Hubbard *et al.* 1987, van Dijken *et al.* 1992, Visser 1993, Montoya *et al.* 2003). También hay evidencias sobre la capacidad de determinar el número de huevos dentro de un hospedador (Bakker *et al.* 1990). La discriminación suele darse a través de algún tipo de clave o señal, interna o externa al hospedador, que indica su estado (Salt 1937, Greany y Oatman 1972, Guillot y Vinson 1972, van Lenteren 1976, Chow y Mackauer 1986, Takasu y Hirose 1988, Desneux *et al.* 2009). Señales químicas sobre el parche de forrajeo (Price 1970, Sugimoto *et al.* 1986), sustancias como venenos o productos de glándulas accesorias inyectadas por algunos parasitoides (Vinson 1976, Hubbard *et al.* 1987), o cambios fisiológicos en la hemolinfa del hospedador causados por la presencia de un huevo o larva en desarrollo también pueden causar rechazo (Völkl y Mackauer 1990).

Si bien el superparasitismo resulta en una utilización subóptima del tiempo y huevos, éste podría tener un valor adaptativo si la probabilidad de éxito es mayor a cero, por ejemplo, frente a la imposibilidad o incerteza de encontrar hospedadores no parasitados (Hughes 1979, Bakker *et al.* 1985, Hubbard *et al.* 1987, van Alphen 1988, Weisser y Houston 1993), cuando el riesgo de parasitismo por hembras conespecíficas es alto (van Alphen y Visser 1990, van Alphen *et al.* 1992), al percibir condiciones ambientales desfavorables que indican una baja probabilidad de sobrevivir (Roitberg *et*

*al.* 1992, 1993, Weisser *et al.* 1994), luego de un largo período de privación de acceso a hospedadores o si el costo implicado en la evaluación del hospedador es muy alto y la producción de huevos no es limitante (Mackauer 1990). También puede ser considerado ventajoso en aquellos casos en que el segundo huevo depositado tenga alguna probabilidad de vencer a individuos depositados con anterioridad y que ya tengan un mayor grado de desarrollo (van Dijken y Waage 1987, van Alphen y Visser 1990, Bai y Mackauer 1990, van Alphen *et al.* 1992, Chau y Maeto 2008). Además, trabajos con modelos de optimización dinámica y estática, y modelos de Estrategias Evolutivamente Estables (ESS en inglés) demostraron que el superparasitismo es frecuentemente una estrategia adaptativa (Jervis 2005). A pesar de todos estos argumentos, las probabilidades más altas de completar el desarrollo ocurren en hospedadores no parasitados, con lo que se esperaría una preferencia de las hembras sobre este tipo de hospedador (van Alphen y Visser 1990).

Según la especie considerada y siempre que la hembra en cuestión posea habilidad de discriminación, la decisión de superparasitar dependerá de compromisos entre factores externos e internos. Entre los primeros, se han descrito efectos del número de hembras conespecíficas en el parche de forrajeo (van der Hoeven y Hemerik 1990, Visser *et al.* 1990, 1992a, 1992b), el número de hospedadores no parasitados (van Alphen y Nell 1982, Weisser y Houston 1993), el tiempo de permanencia en el parche o el número de huevos presentes en el hospedador (Charnov y Stephens 1988). Entre los factores internos, se encuentran algunos como la carga de huevos (Iwasa *et al.* 1984, Mangel 1989a), expectativa de vida (o edad) (Roitberg *et al.* 1992, 1993, Weisser *et al.* 1994), estado nutricional (Vet *et al.* 2002, Bernstein y Jervis 2008) y su estado informativo (Hoffmeister y Wajnberg 2008). Por otro lado, la habilidad de discriminación puede ser afectada por factores internos como el intervalo de tiempo entre oviposiciones (Chow y Mackauer 1986, Islam y Copland 2000, Outreman *et al.* 2001), la experiencia de oviposición previa en hospedadores no parasitados (van Lenteren y Bakker 1975, van Lenteren 1976, Klomp *et al.* 1979, van Lenteren 1981, van Alphen y Visser 1990, Bai y Mackaurer 1990, Cronin y Strong 1993, van Baaren y Nenon 1994, Miura *et al.* 1994), o la densidad de hospedadores relativa a la densidad de huevos ya presentes (Miura *et al.* 1994, Outreman *et al.* 2001, Ardeh *et al.* 2005). Dada esta gran cantidad de factores que parecen afectar la decisión de la hembra de aceptar un hospedador aun habiendo detectado que este ha sido ya parasitado, es importante tener

en cuenta su relevancia al momento de diseñar y realizar ensayos relativos a las habilidades de forrajeo de una especie.

El estudio de la habilidad de discriminación puede abordarse principalmente mediante métodos directos e indirectos (Jervis 2005). Los métodos directos, a través de la observación del comportamiento de aceptación/rechazo de hospedadores de conocido estado de parasitación, constituyen la mejor aproximación experimental para determinar si las hembras de una especie son capaces de discriminar (van Lenteren 1981). Estos estudios utilizan evidencias comportamentales tales como la tasa de rechazo de hospedadores parasitados respecto a la de hospedadores no parasitados (Jervis 2005), asignación de tiempo a parches conteniendo hospedadores parasitados o no parasitados, tamaño de la puesta y asignación del sexo en la descendencia (van Alphen *et al.* 1987). En los métodos indirectos, por el contrario, un grupo de hospedadores son expuestos a parasitoides hembra, y son luego examinados para determinar el número de huevos en cada uno de ellos. Con esta información se obtiene una distribución de frecuencias del número de huevos por individuo, y se compara con una distribución de frecuencias esperadas, generada por un modelo determinado. Para estos casos, el modelo nulo (patrón aleatorio o uniforme) más sencillo se representa con la distribución de Poisson. Un desvío significativo del modelo indica una distribución no aleatoria de huevos (Salt 1961), sugiriendo una preferencia por evitar (patrón regular de la distribución) o preferir (patrón agregado de la distribución) el superparasitismo. Además, van Lenteren *et al.* (1978) remarcaron las precauciones que deben tenerse en cuenta al aplicar estos enfoques y los posibles errores que pueden cometerse (ver Discusión). En la bibliografía se encuentran varios trabajos con diferentes sistemas de estudios en los que se evaluó la capacidad de discriminación de manera directa (*e.g.* van Lenteren 1976, Montoya *et al.* 2003, González *et al.* 2010), indirecta [ver ejemplos en Fenlon *et al.* (2009)], como también mediante ambos métodos (*e.g.* van Alphen y Nell 1982).

En el contexto de la ecología aplicada existen razones para evaluar la capacidad de discriminación en parasitoides solitarios, particularmente cuando hay que seleccionar agentes de control biológico (Arditi y Glairot 1995). En crías masivas y de laboratorio, el superparasitismo puede generar procedimientos de cría muy costosos con el fin de prevenir una alta mortalidad, individuos demasiado pequeños o débiles, como también desviación indeseada de la relación de sexos (van Lenteren 1986, Waage 1986). Se

espera que parasitoides utilizados como bio-controladores sean altamente eficientes en la búsqueda y discriminación de la calidad de los hospedadores (van Lenteren *et al.* 1978), evitando el superparasitismo y minimizando el tiempo y energía asociados al comportamiento de búsqueda (Mackauer 1990, Godfray 1994). Para ello, se propone que estudios de superparasitismo deberían ser considerados en protocolos de crías masivas y en programas de control mediante liberaciones aumentativas (Hamelin *et al.* 2007, González *et al.* 2010).

En *D. longicaudata*, el fenómeno de superparasitismo y la habilidad de discriminación han sido estudiados primero a través de métodos indirectos utilizando a *Anastrepha suspensa* Loew (Diptera: Tephritidae) como hospedador (Lawrence *et al.* 1978) y más tarde a través de métodos directos utilizando larvas (en algunos casos irradiadas) de *Anastrepha ludens* Loew (Montoya *et al.* 2003, González *et al.* 2010). En estos trabajos se concluyó que *D. longicaudata* posee la habilidad para discriminar entre larvas parasitadas y no parasitadas. En Argentina, las crías a nivel masivo o semi-masivo de este parasitoide se realizan principalmente sobre *C. capitata* como hospedador (Ovruski *et al.* 2003, Viscarret *et al.* 2006), por lo que resultaría importante corroborar los resultados obtenidos con otros hospedadores. Además, los resultados del Capítulo 2, en el que no se encontraron evidencias contundentes de un efecto negativo en aquellos parasitoides emergidos de niveles intermedios de superparasitismo (NSP 1, 2, y 3) utilizando una cepa del parasitoide criado sobre *C. capitata*, generan dudas sobre la relevancia adaptativa de la habilidad de discriminación bajo condiciones de laboratorio. En este Capítulo se estudiará la capacidad de discriminación en *D. longicaudata*, utilizando cepas criadas sobre *C. capitata* y *Anastrepha fraterculus*, tanto mediante métodos directos como indirectos.

### 3.1. Objetivos

#### Objetivo general

Determinar si *D. longicaudata* posee la habilidad de discriminar entre hospedadores parasitados y no parasitados.

### Objetivos específicos

3.2.1. Evaluar el comportamiento de discriminación mediante métodos directos utilizando a *C. capitata* como hospedador en una cepa de *D. longicaudata* criada sobre esa especie.

3.2.2. Evaluar el comportamiento de discriminación mediante métodos directos utilizando a *A. fraterculus* como hospedador en una cepa de *D. longicaudata* criada sobre esa especie.

3.2.3. Evaluar el comportamiento de discriminación mediante métodos indirectos utilizando a *C. capitata* como hospedador en una cepa de *D. longicaudata* criada sobre esa especie.

### **Materiales y Métodos**

#### 3.1. Insectos y condiciones generales

El protocolo general de obtención y manejo de las larvas de *C. capitata* y los parasitoides criados sobre esta especie fueron los mismos que los indicados en el Capítulo 2.

Para llevar a cabo el experimento 3.2.2 se inició una línea de *D. longicaudata* en la que se utilizaron larvas L3 de *A. fraterculus* como sustrato de cría, utilizando procedimientos similares a los parasitoides criados sobre *C. capitata*, pero exponiendo las larvas en las unidades de oviposición sin dieta larvaria. Los parasitoides evaluados para este punto fueron tomados de esta línea que había sido mantenida por al menos 10 generaciones. Las larvas de *A. fraterculus* provinieron de la cría del laboratorio mantenida en el IGEAF, INTA Castelar, siguiendo el protocolo de Jaldo *et al.* (2001) y Vera *et al.* (2007).

Las hembras parasitoides evaluadas en los experimentos descriptos a continuación provinieron de la cría del laboratorio y fueron mantenidas en forma aislada, vírgenes, con agua y miel desde la emergencia hasta el momento del ensayo. Las hembras fueron evaluadas entre los 7 y 10 días desde la emergencia y contaban con

experiencia de oviposición el día anterior al ensayo. Los ensayos comportamentales fueron realizados en una sala especialmente acondicionada con iluminación homogénea (tubos luz día, 600 luxes aproximadamente) y temperatura controlada a 25°C.

### 3.2. Métodos directos

#### 3.2.1. *D. longicaudata* - *C. capitata*

Mediante observaciones de hembras evaluadas individualmente dentro de una arena experimental se estudiaron parámetros comportamentales relativos a la habilidad para discriminar, en el momento de la oviposición, entre larvas parasitadas (LP) y larvas no parasitadas (LNP) de *C. capitata*. El diseño de este ensayo estuvo dirigido a evaluar la potencial discriminación en la instancia en que el parasitoide se posiciona sobre la larva y la examina al introducir el ovipositor, es decir, se asume que la evaluación estaría mediada por claves internas de la larva y no por volátiles del sustrato, restos producidos por la larva o por la larva misma.

La arena experimental utilizada para exponer de manera simultánea LP y LNP fue adaptada de van Alphen y Jervis (1996), y fue utilizada por Montoya *et al.* (2003) para evaluar la habilidad de discriminar larvas de *A. ludens* parasitadas por *D. longicaudata*. Se utilizaron placas para cultivo celular (13cm x 9cm) de 24 pocillos de 1 cm de diámetro y 1,5 cm de profundidad. Los pocillos de la periferia de la placa fueron rellenados con silicona acética transparente para reducir su profundidad a 0,5 cm y así permitir un alcance completo del parasitoide con su ovipositor. Las placas se dejaron secar por varios días, y luego fueron sumergidas en repetidas ocasiones en agua, lavadas y ventiladas hasta que las mismas no emanaron olor a ácido acético. Para cada ensayo, estos pocillos fueron completados al ras con agar (2g/100ml de agua) como sustrato donde permanecerían las larvas de *C. capitata* sólo en el momento del ensayo. El uso de agar permitió observar la posición exacta de la larva y el ovipositor en el momento del ataque del parasitoide. Tras colocar las larvas en los pocillos con agar, la arena experimental quedaba cerrada al tapar los pocillos con tela *voile* montada de forma tensa en un bastidor plástico, asegurando de esta manera el confinamiento de las larvas y generando además una superficie para el desplazamiento y oviposición del parasitoide. Esta tapa tenía aproximadamente el doble de superficie que la placa de pocillos (25 x 20 cm).



El procedimiento general consistió en ofrecer a cada parasitoide hembra dos tipos de larvas (LP y LNP) en igual cantidad dentro de la arena experimental. Se realizaron dos ensayos similares, variando el tiempo desde la parasitación (24 hs o 48 hs) de las larvas ofrecidas como LP. Para obtener estas larvas, 24 o 48 hs (LP24 y LP48, respectivamente) antes del ensayo se expusieron larvas del tercer estadio de *C. capitata* a parasitoides hembras como se detalló en el Capítulo 2, de manera de generar larvas parasitadas solo una vez (nivel de superparasitismo 1, NSP 1). Para cada ensayo (24 o 48 hs) y a partir del mismo lote de larvas de *C. capitata*, se separaron larvas sin parasitar (LNP) que fueron ofrecidas junto con las LP correspondientes.

En cada réplica, cuatro larvas de cada grupo (LP24/LP48 y LNP) fueron colocadas individualmente dentro de los pocillos de la placa. Las LP y LNP se colocaron de manera alternada, utilizando únicamente pocillos ubicados en la periferia de la placa. Previamente, las larvas fueron lavadas de manera de retirar restos de la dieta artificial en la que habían sido mantenidas. Por último, la placa fue cubierta con la tapa de tela *voile*. Para iniciar las observaciones, cada hembra fue tomada delicadamente con un aspirador del recipiente en el que había sido mantenida desde la emergencia, y liberada en el centro de la placa. Al adoptar un comportamiento de búsqueda, se inició un cronómetro. Se consideró que el parasitoide dio inicio al comportamiento de búsqueda cuando este plegaba las alas sobre el tórax y comenzaba a tocar el sustrato con las antenas, realizando pasos cortos y pausados. Para los ensayos con LP24 y LP48, se evaluaron 113 y 42 hembras respectivamente. Las observaciones duraron 30 minutos o hasta que el parasitoide abandonara la tapa de tela que cubría la placa con larvas. Se registraron las siguientes variables: 1- latencia hasta la primera oviposición (tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba hasta oviposición en LP como primera elección vs. tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba hasta oviposición en LNP como primera elección); 2- primera elección de oviposición (número de hembras que ovipusieron primero en LP vs. número de hembras que ovipusieron primero en LNP); 3- duración de la primera oviposición (LP vs. LNP); 4-número de oviposiciones totales por hembra (número de oviposiciones totales en LP vs. número de oviposiciones totales en LNP); 5- frecuencia de rechazo (frecuencia de casos en que la hembra ataca un hospedador y decide rechazarlo); 6- índice de superparasitismo [ISP = (número de veces que ovipone en LP/tiempo destinado en parches LP)/(número de veces que ovipone en LNP/tiempo destinado en parches LNP)] (Sirot *et al.* 1997). Este índice hace referencia

a la aceptación o rechazo de uno u otro tipo de larva (LP o LNP) y considera que el éxito de un ataque (oviposición efectiva) depende tanto de la habilidad de la larva para escapar como de la destreza del parasitoide para encontrarla y la motivación por aceptarla (Sirot *et al.* 1997). El ISP toma valores positivos: ISP=1 indica oviposición aleatoria; ISP<1 indica el rechazo de LP; ISP >1 indica aceptación de LP.

Para determinar la ocurrencia de una oviposición efectiva se utilizó la serie de criterios comportamentales detallados en el Capítulo 2. Como método de control, al finalizar las observaciones, de manera aleatoria se conservaron y disecaron larvas sospechadas de haber sido atacadas.

### 3.2.2. *D. longicaudata* – *A. fraterculus*

Montoya *et al.* (2003) concluyeron que *D. longicaudata* es capaz de discriminar entre larvas parasitadas y no parasitadas utilizando métodos similares a los descritos en la sección anterior (3.2.1). Sin embargo, en ese estudio los parasitoides no fueron criados ni evaluados sobre *C. capitata*, sino sobre *A. ludens*. En el IGEAF se cuenta con una cría artificial de *A. fraterculus*, una especie filogenéticamente más cercana a *A. ludens* que *C. capitata*. Se decidió entonces iniciar una línea de *D. longicaudata* criada sobre *A. fraterculus* y repetir el ensayo de discriminación directa como aproximación al trabajo realizados en *A. ludens* y permitir una comparación con los resultados entre éstos y los encontrados en la sección anterior. Con estos parasitoides se repitieron los procedimientos, condiciones y análisis de las variables de 3.2.1, utilizando larvas de *A. fraterculus* LP24 y LNP. Se evaluaron 42 hembras.

#### *Análisis estadísticos*

La latencia hasta la primera oviposición se comparó entre LP y LNP mediante una prueba de t. Para el ensayo en el que se ofrecieron LP48 (*C. capitata*) y LP24 (*A. fraterculus*), se realizó una transformación tomando el logaritmo y la raíz de la latencia registrada, respectivamente. La primera elección de oviposición fue analizada mediante una prueba de homogeneidad de G. La duración de la primera oviposición se analizó mediante pruebas de t. Para el caso con LP24 (*C. capitata*) y LP24 (*A. fraterculus*) se evaluó el logaritmo y la raíz de la duración de la oviposición, respectivamente. Al no encontrar transformación adecuada, para el análisis en el caso de LP48 (*C. capitata*) se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. El número de oviposiciones totales

por hembra fue analizada en cada caso mediante pruebas de t pareado. La frecuencia de rechazo fue analizada mediante pruebas de homogeneidad o con la prueba exacta de Fisher en aquellos casos que no cumplieron con el requerimiento de una frecuencia esperada mayor a 5. Los supuestos y requerimientos de estas pruebas fueron comprobados. El ISP fue analizado cualitativamente.

### 3.3. Métodos indirectos

Con el objetivo de obtener información sobre la capacidad de discriminación de larvas parasitadas que sea complementaria con los ensayos 3.2.1 y 3.2.2, se decidió evaluar la habilidad de discriminación utilizando métodos indirectos. Para tal fin, se ofreció una cantidad fija de larvas de *C. capitata* a una hembra del parasitoide, y se dejó que esta explorara y parasitara libremente por un espacio de tiempo fijo. Posteriormente se determinó el estado de parasitación de cada larva y se utilizó esta información para determinar la habilidad de discriminar de la hembra evaluada.

Como arena experimental se utilizó una caja rectangular de acrílico transparente (65 x 16 x 16 cm) conteniendo un compartimiento central (15 x 15 x 15 cm) con un orificio en cada cara lateral para permitir el escape de la hembra evaluada hacia uno u otro lado. En el compartimiento central se ubicó una unidad de oviposición (UO) focal, utilizando una base de una caja de Petri grande con entre 20 y 30 larvas no parasitadas del estadio 3 de *C. capitata*, utilizando agar (2g/100ml agua) como sustrato y envuelta con tela *voile*. En cada compartimiento lateral se colocó una UO (similar a la anterior, pero utilizando una base de caja de Petri chica con 5 larvas de *C. capitata*) para permitirle a la hembra abandonar la UO focal en búsqueda de otros parches para oviposición.

Para la evaluación, las hembras fueron liberadas en el centro de la UO focal y se le permitió forrajear durante 4hs. Al finalizar el turno de forrajeo, se retiró a la hembra y las larvas expuestas fueron colocadas en un recipiente con dieta fresca y éste se ubicó dentro de una caja de Petri chica con una base de vermiculita. Cada caja se rotuló con un código propio referido a la hembra que las parasitó y se mantuvo a 25°C. Dos días después del ensayo, luego de la pupación de los hospedadores y de la eclosión de los huevos parasitoides (ver Capítulo 2), se disecaron bajo lupa (60x) (Olympus, Japón)

todas las pupas obtenidas y se registró el número de larvas dentro de cada pupa hospedadora (*i.e.* nivel de superparasitismo, NSP).

#### *Análisis estadísticos*

Con los datos obtenidos de las disecciones se construyó, para cada hembra, una distribución de frecuencias del número de hospedadores con determinado NSP. La distribución observada fue comparada con una distribución esperada por azar calculando las frecuencias de cada categoría (NSP 0, NSP 1 y NSP>1) con la ecuación de probabilidades de Poisson [ $f(k, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$ ], donde k es el número de ocurrencias de un NSP determinado y  $\lambda$  es una constante positiva que representa el número de veces que se espera que ocurra una oviposición en un hospedador, estimado por el número promedio observado de huevos por hospedador] (Rogers 1975). Luego, esas frecuencias esperadas fueron comparadas con las observadas mediante una prueba de bondad de ajuste de  $\text{Chi}^2$ . Por último, a modo de control metodológico, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre el valor p de las pruebas de  $\text{Chi}^2$  obtenido para cada hembra y su correspondiente número promedio de huevos por hospedador ( $\lambda$ ). Un valor p mayor a 0,05 indicará una distribución aleatoria. De encontrarse una asociación podría inferirse que las hembras se vieron forzadas a superparasitar sobre una primera distribución no aleatoria (van Alphen y Nell 1982) causado por un tiempo de exposición demasiado largo o por una cantidad baja de larvas ofrecidas.

Estos ensayos se realizaron en la misma sala con las mismas condiciones de luz y temperatura que los experimentos 3.2.1 y 3.2.2. Todos los análisis estadísticos se realizaron con STATISTICA 10 (StatSoft, Inc. 1984-2011).

## **Resultados**

### 3.1. Métodos directos

#### 3.1.1. *D. longicaudata* - *C. capitata*

3.1.1.1. *Evaluación frente a larvas parasitadas 24 hs previas al experimento (LP24) y larvas no parasitadas (LNP)*. De las 113 hembras evaluadas, 49 mostraron un comportamiento relevante para el análisis de las variables propuestas. El resto de las

hembras no mostraron comportamientos de búsqueda ni oviposición y fueron descartadas del análisis.

La latencia hasta la primera oviposición y la duración del primer evento de oviposición no difirieron estadísticamente entre LP24 y LNP (Tabla 3.1). En la elección para la primera oviposición, las hembras no mostraron una preferencia significativa por uno u otro tipo de larva (Prueba G:  $G = 1,67$ ; g.l. = 1;  $P = 0,197$ ;  $N = 49$ ) (Figura 3.1).

El número de oviposiciones totales por hembra no difirió estadísticamente entre LP24 y LNP (Tabla 3.1). Cabe destacar que hubo casos (en ambos tipos de hospedadores) en los que la hembra realizó hasta 3 oviposiciones. En promedio ( $\pm$  E.E.) cada hembra depositó un total (LP + LNP) de  $1,84 \pm 0,14$  huevos en un período máximo de 30 minutos.

Al evaluar la frecuencia de aceptación o rechazo frente a LP24 y LNP, se observó que las hembras rechazaron ambos tipos de larva en la misma proporción (Prueba Exacta de Fisher:  $P = 0,463$ ) (Figura 3.2).

Respecto al índice de superparasitismo, dada su construcción matemática se requiere que cada hembra haya visitado y depositado al menos un huevo en ambos tipos de larva. Si bien las 49 hembras observadas visitaron y permanecieron en parches de larvas parasitadas y larvas no parasitadas, sólo 15 depositaron huevos en los dos tipos de hospedadores, de los cuales 13 casos indicaron un valor menor a 1 (tendencia a evitar el superparasitismo) y 2 casos un valor mayor a 1 (tendencia a superparasitar) (Figura 3.3).

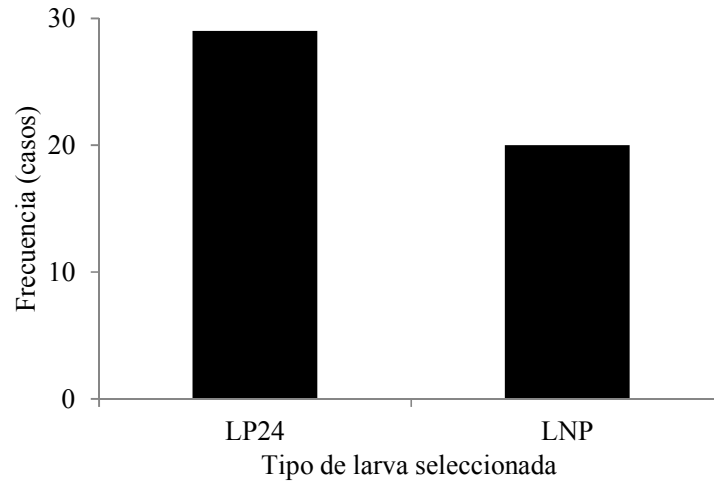


Figura 3.1. Frecuencia observada de cada tipo de larva seleccionada (*Ceratitis capitata*) por cada hembra para su primera oviposición.

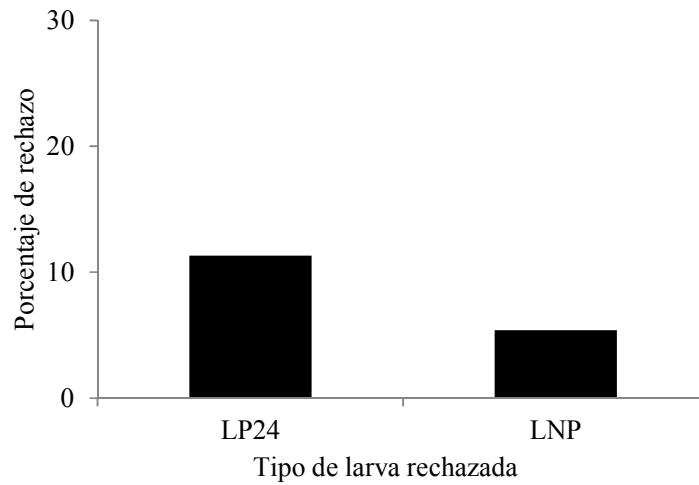


Figura 3.2. Rechazo de cada tipo de larva (*Ceratitis capitata*) al momento de la primera oviposición.

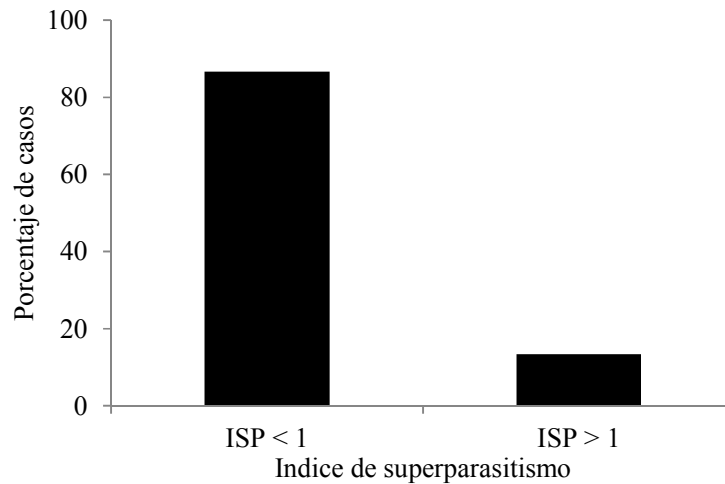


Figura 3.3. Índices de Superparasitismo mostrados por las hembras evaluadas frente a LP24 y LNP (*Ceratitis capitata*).

3.1.1.2. *Evaluación frente a larvas parasitadas 48 hs previas al experimento (LP48) y larvas no parasitadas (LNP)*. De las 42 hembras evaluadas, 33 mostraron un comportamiento relevante para el análisis de las variables propuestas.

No se encontraron diferencias significativas para la latencia hasta la primera oviposición, la duración de la primera oviposición, ni el número de oviposiciones por hembra entre LP48 y LNP (Tabla 3.2). En promedio ( $\pm$  E.E.) cada hembra depositó un total (LP + LNP) de  $2,09 \pm 0,21$  huevos en un período máximo de 30 minutos.

En la elección para la primera oviposición, las hembras no mostraron una preferencia significativa por uno u otro tipo de larva (Prueba G:  $G = 0,76$ ; g.l. = 1;  $P = 0,383$ ;  $N = 33$ ) (Figura 3.4). En este ensayo hubo casos con 3 oviposiciones en ambos tipos de larvas y un caso con 4 oviposiciones en LP48.

La frecuencia de rechazo de una larva como hospedador fue significativamente mayor hacia LP48 en comparación con LNP (Prueba Exacta de Fisher:  $P = 0,027$ ) (Figura 3.5).

Tabla 3.1. Resultados obtenidos del análisis estadístico de la latencia hasta la primera oviposición, la duración de la primera oviposición y el número de oviposiciones por hembra en cada tipo de larva *Ceratitis capitata* ofrecida (LP24 y LNP). Se indican los valores promedios  $\pm$  E.E. y el número de réplicas. G.l. = grados de libertad; t = estadístico de la prueba de t; t (pareado) = estadístico de la prueba de t pareado; Valor P = significancia de la prueba estadística.

Variable	Larva parasitada (24hs)	Larva no parasitada	Valor del estadístico	G.l.	Valor P
Latencia	5,86 $\pm$ 1,15 min (n=26)	8,22 $\pm$ 1,18 min (n=21)	t = 1,59	45	0,119
Duración 1ra ovip.	56,96 $\pm$ 5,42 seg (n=25)	45,50 $\pm$ 5,93 seg (n=20)	t = 1,24	43	0,222
Nro. de oviposiciones	1,06 $\pm$ 0,13 (n=49)	0,78 $\pm$ 0,12 (n=49)	t (pareado) = 1,43	48	0,159



De las 33 hembras que visitaron los parches y depositaron al menos un huevo, sólo 16 depositaron huevos en los dos tipos de hospedadores y su ISP pudo ser calculado (Figura 3.6). Once hembras mostraron un valor menor a 1 (tendencia a evitar el superparasitismo) y 5 hembras un valor mayor a 1 (tendencia a superparasitar).

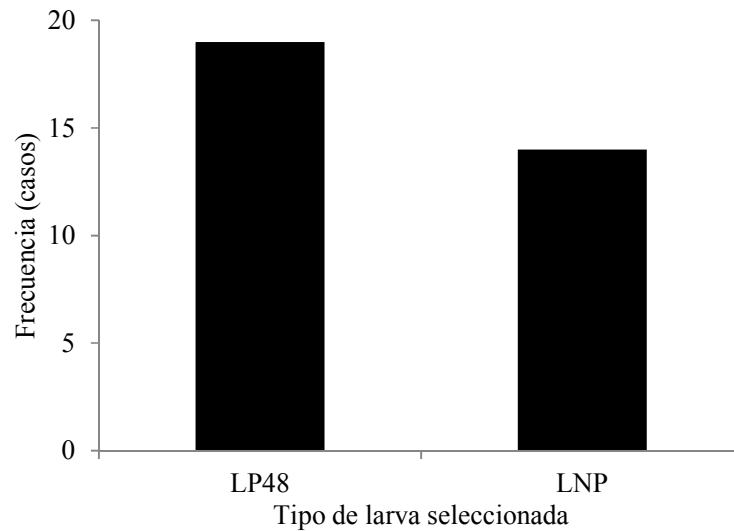


Figura 3.4. Frecuencia observada de cada tipo de larva seleccionada (*Ceratitits capitata*) por cada hembra para su primera oviposición.

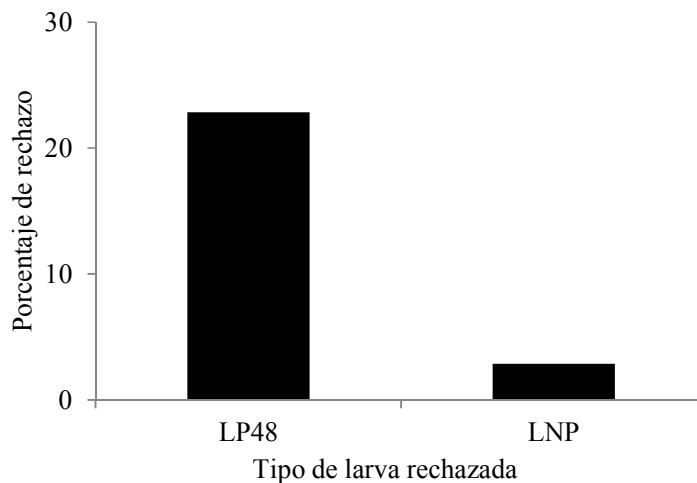


Figura 3.5. Rechazo de cada tipo de larva (*Ceratitits capitata*) al momento de la primera oviposición.

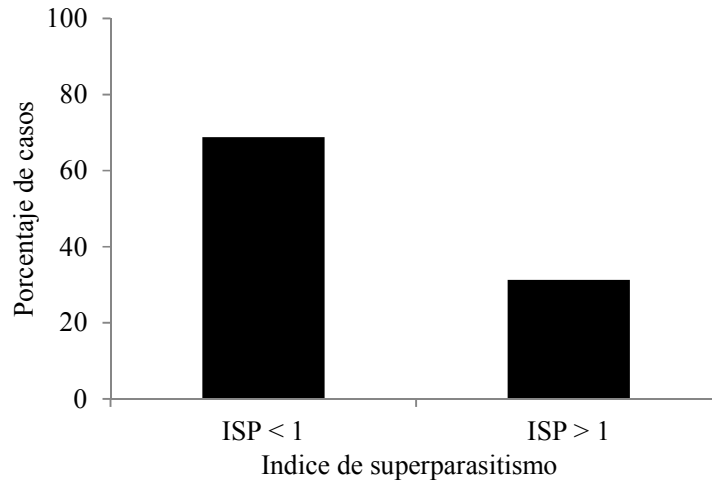


Figura 3.6. Índice de Superparasitismo mostrado por las hembras evaluadas frente a LP48 y LNP (*Ceratitis capitata*).

Al comparar el comportamiento entre los ensayos utilizando LP24 y LP48 pudo determinarse una proporción de rechazos similar hacia LP (Prueba de Independencia:  $\chi^2 = 2,10$ ; g.l. = 1; P = 0,148; N = 88).

### 3.1.2. *D. longicaudata* – *A. fraterculus*

De las 42 hembras evaluadas frente a LP24 y LNP, 8 fueron descartadas por no realizar ningún comportamiento de forrajeo.

La latencia hasta la primera oviposición, la duración promedio de la primera oviposición y el número promedio de oviposiciones totales realizada por cada hembra no mostraron diferencias significativas entre LP24 y LNP (Tabla 3.3). En promedio ( $\pm$  E.E.) cada hembra depositó un total (LP + LNP) de  $2,25 \pm 0,20$  huevos en un período máximo de 30 minutos. Las hembras no mostraron una preferencia entre los dos tipos de larva en la primera oviposición (Prueba G: G = 0,12; g.l. = 1; P = 0,732; N = 34) (Figura 3.7).

La decisión de rechazar resultó dependiente del tipo de larva encontrado por la hembra (Prueba de homogeneidad:  $\chi^2 = 5,35$ ; g.l. = 1; P = 0,021; N = 81). Se observó una mayor proporción de rechazos frente a LP24 que frente a LNP (Figura 3.8).

Tabla 3.2. Resultados obtenidos del análisis estadístico de la latencia hasta la primera oviposición, la duración de la primera oviposición y el número de oviposiciones por hembra en cada tipo de larva de *Ceratitis capitata* (LP48 y LNP) ofrecida. Se indican los valores promedios  $\pm$  E.E. y el número de réplicas. G.l. = grados de libertad; t = estadístico de la prueba de t; U = estadístico de la prueba Mann-Whitney; t(pareado) = estadístico de la prueba de t pareado; Valor P = significancia de la prueba estadística.

Variable	Larva parasitada (48hs)	Larva no parasitada	Prueba estadística	G.l.	Valor P
Latencia	3,88 $\pm$ 0,52 min (n=17)	4,00 $\pm$ 0,98 min (n=13)	t = -0,53	28	0,597
Duración 1ra ovip.	56,76 $\pm$ 6,63 seg (n=17)	38,43 $\pm$ 2,28 seg (n=14)	U = 78,5	-	0,112
Nro. de oviposiciones	1,03 $\pm$ 0,16 (n=33)	1,06 $\pm$ 0,14 (n=33)	t (pareado) = 0,13	32	0,893

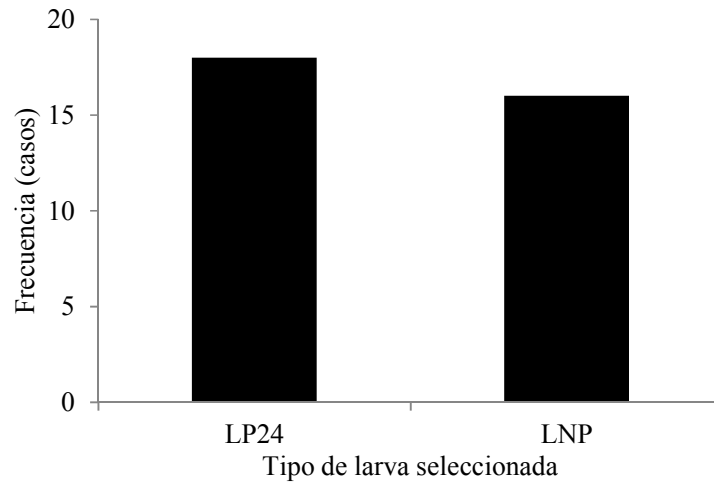


Figura 3.7. Frecuencia observada de cada tipo de larva (*Anastrepha fraterculus*) seleccionada por cada hembra para su primera oviposición.

De las 34 hembras evaluadas, sólo 16 depositaron huevos en los dos tipos de hospedadores y su ISP pudo ser calculado. Nueve hembras obtuvieron un valor menor a 1 (tendencia a evitar el superparasitismo) y otras 7 hembras un valor mayor a 1 (tendencia a superparasitar) (Figura 3.9).

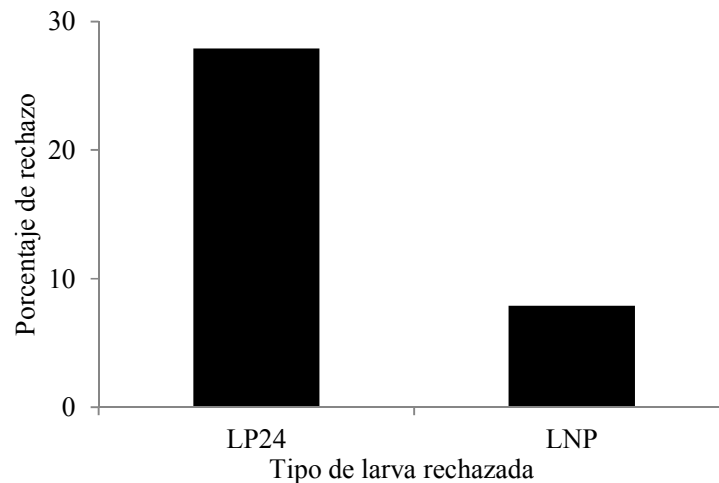


Figura 3.8. Rechazo de cada tipo de larva (*Anastrepha fraterculus*) al momento de la primera oviposición.

Tabla 3.3. Resultados obtenidos del análisis estadístico de la latencia hasta la primera oviposición, la duración de la primera oviposición y el número de oviposiciones por hembra en cada tipo de larva *Anastrepha fraterculus* (LP24 y LNP) ofrecida. Se indican los valores promedios  $\pm$  E.E. y el número de réplicas. G.l. = grados de libertad; t = estadístico de la prueba de t; t (pareado) = estadístico de la prueba de t pareado; Valor P = significancia de la prueba estadística.

Variable	Larva parasitada (24hs)	Larva no parasitada	Prueba estadística	G.l.	valor P
Latencia	5,36 $\pm$ 1,05 min (n=20)	8,09 $\pm$ 1,75 min (n=16)	t = 1,47	34	0,151
Duración 1ra ovip.	63,46 $\pm$ 6,52 seg (n=18)	51,06 $\pm$ 4,59 seg (n=16)	t = 51,06	32	0,151
Nro. de oviposiciones	1,08 $\pm$ 0,16 (n=33)	1,17 $\pm$ 0,15 (n=33)	t (pareado) = 0,36	35	0,723

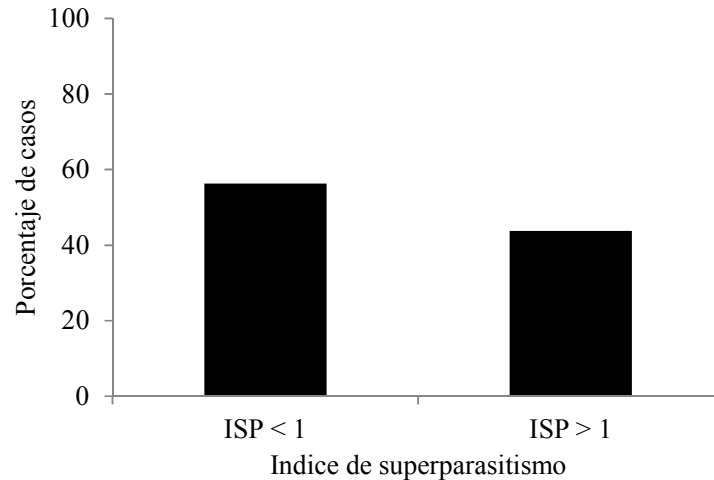


Figura 3.9. Índice de Superparasitismo mostrado por las hembras evaluadas frente a LP24 y LNP (*Anastrepha fraterculus*).

Por último se comparó el comportamiento de rechazo hacia LP24 entre los ensayos utilizando *C. capitata* y *A. fraterculus*, evidenciándose en éste último un rechazo significativamente mayor respecto al primero (Prueba de Independencia:  $\chi^2 = 4,29$ ; g.l. = 1; P = 0,038; N = 96).

### 3.3. Métodos indirectos

Por un lado, al analizar la distribución de las frecuencias del NSP (*i.e.* número de huevos/larva de *C. capitata*) agrupando los resultados de todas las hembras evaluadas individualmente, pudo observarse que ésta difirió significativamente de la distribución de frecuencias esperada por azar (*i.e.* distribución de Poisson), observándose una distribución general regular que indicaría la evitación de incurrir en superparasitismo [Prueba Chi<sup>2</sup>:  $\chi^2 = 93,14$ ; g.l. = 2; P < 0,001; N = 1120; se agruparon los casos de superparasitismo en una misma categoría (>1)] (Figura 3.10). Este análisis incluyó la distribución de huevos de 50 hembras, para las cuales se disecó un total de 1120 pupas (con un rango por hembra de entre 18 y 30 hospedadores inicialmente no parasitados). De este total, el 49,6% de las larvas ofrecidas no fue parasitado; el 44,6% presentó solamente un huevo; el 5% presentó 2 huevos; y el resto entre 3 y 5 huevos. Otras 31 hembras también evaluadas, no depositaron ningún huevo (o depositaron un total menor a 5 huevos) durante el período de 4 hs de forrajeo y no fueron consideradas en el análisis.

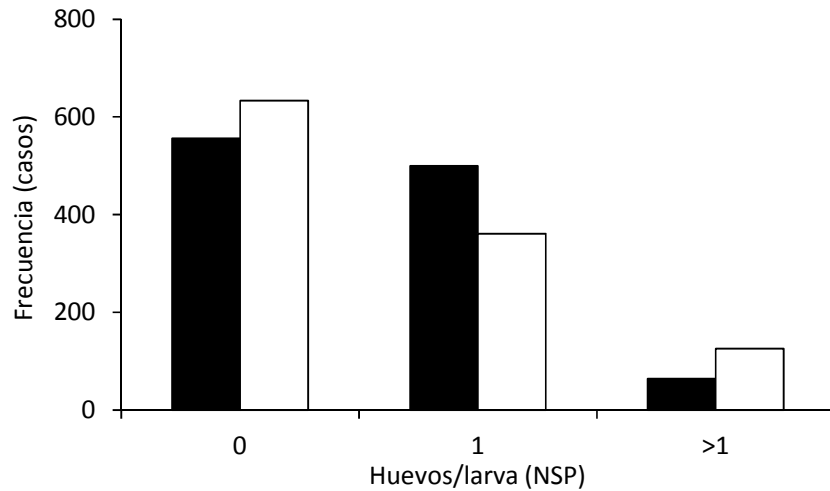


Figura 3.10. Distribuciones agrupadas de frecuencias observadas (en negro) y esperadas por azar (*i.e.* Poisson, en blanco) del número de huevos parasitoides por larva hospedadora.

Por otro lado, al analizar la distribución individual de huevos para cada una de las 50 hembras por separado se descubrió que no todas mostraron un mismo comportamiento de oviposición: el 74% de las hembras mostró un ajuste a la distribución esperada por azar, mientras que el 26% restante mostró una distribución significativamente distinta a la distribución esperada por azar, de manera uniforme (Figura 3.11). De éstas últimas, 19 hembras no incurrieron en superparasitismo (*i.e.*, generando sólo NSP 0 y 1), parasitando, en promedio, aproximadamente la mitad de las larvas expuestas. Cabe aclarar que, en la mayoría de los casos, las frecuencias esperadas de la categoría NSP >1 fue menor a 5 (requisito para prueba de  $\chi^2$ ) (distribuciones observadas en Tabla suplementaria 1, ANEXO). En promedio ( $\pm$  E.E.), cada hembra depositó un total de  $12,76 \pm 0,59$  huevos, con un mínimo de 5 y un máximo de 24 huevos, y  $0,58 \pm 0,03$  huevos/larva.

Por último, se observó una correlación no significativa entre el resultado de la prueba  $\chi^2$  al comparar frecuencias observadas con las esperadas por azar (valor P) y el número promedio de huevos/larva ( $\lambda$ ) de cada hembra (Correlación de Spearman:  $r = -0,25$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 3.12), que indicaría no haberse alcanzado una situación en la que las hembras estuvieran forzadas a seguir parasitando.

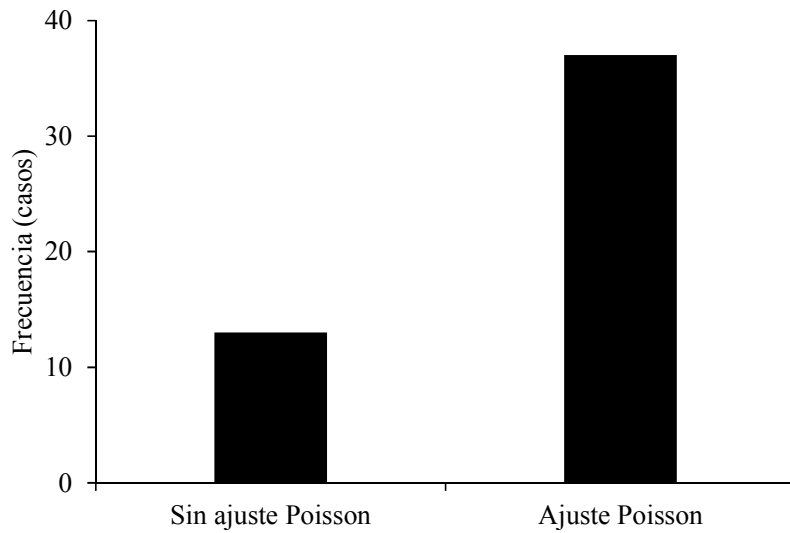


Figura 3.11. Recuento de casos analizados individualmente con o sin ajuste de las frecuencias observadas a las esperadas por azar.

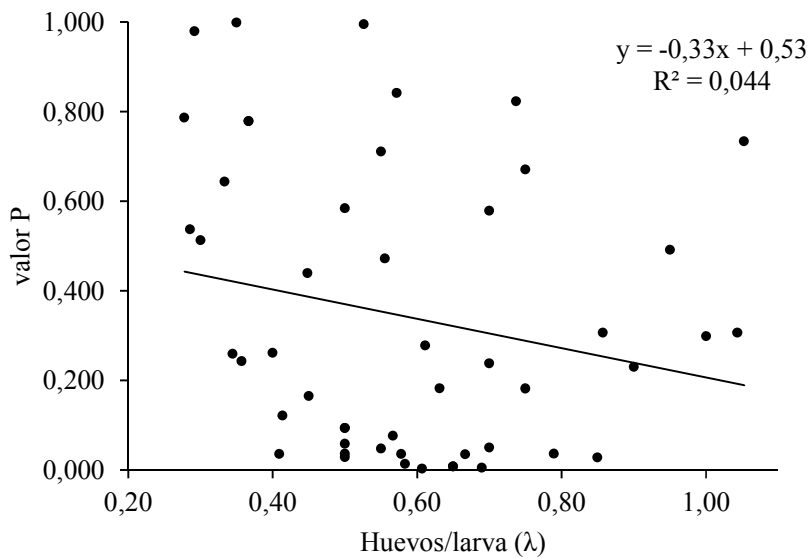


Figura 3.12. Relación entre el valor P del análisis de  $\chi^2$  al comparar frecuencias observadas con las esperadas por azar y el número promedio de huevos/larva para cada hembra. La línea representa la recta de regresión con su respectiva ecuación y coeficiente de determinación  $R^2$ .



## Discusión

En este Capítulo se evaluó la capacidad de discriminación de *D. longicaudata* frente a larvas parasitadas y no parasitadas mediante métodos directos e indirectos. En el primer método se evaluaron dos cepas de hembras parasitoides (criadas sobre larvas de *C. capitata* y de *A. fraterculus*) utilizando sus respectivas especies hospedadoras. Además, para la cepa criada sobre *C. capitata*, se evaluó el comportamiento en ensayos distintos, ofreciendo larvas parasitadas con diferentes tiempos desde la parasitación previa. Para el segundo método de evaluación, sólo se empleó la línea del parasitoide criada sobre *C. capitata*.

En los ensayos realizados mediante métodos directos, los análisis del comportamiento de *D. longicaudata* no revelaron de manera clara y precisa la capacidad de discriminación entre larvas parasitadas y no parasitadas. En la evaluación con *C. capitata*, hubo una frecuencia de rechazo significativamente mayor al ofrecer LP48, mientras que el resto de las variables (latencia, elección y duración de la primera oviposición y número de oviposiciones totales) no mostraron diferencias entre LP y LNP. Estos resultados difieren levemente de los obtenidos por Montoya *et al.* (2003) quienes, quitando de lado el hecho de haber empleado *A. ludens* como hospedador, encontraron una mayor frecuencia de rechazos y un menor número de oviposiciones tanto en LP24 como LP48 en comparación con LNP. Estos autores plantean que la capacidad de discriminación frente a larvas con mayor tiempo desde una parasitación previa debería ser expresada con mayor intensidad si el mecanismo de reconocimiento ocurriera por cambios fisiológicos en el hospedador. Esto ocurre en muchos endoparasitoides, donde la discriminación sólo puede ocurrir luego de cambios comportamentales o fisiológicos del hospedador (Mackauer 1990, Danyk y Mackauer 1993) y es esperable que esos cambios sean más notorios a medida que transcurra más tiempo (van Alphen y Nell 1982). Para explicar sus resultados, Montoya *et al.* (2003) propusieron que el reconocimiento de larvas parasitadas (LP24) podría ocurrir si la hembra, en la oviposición inicial antes del ensayo, hubiera depositado una marca química a modo de señalización y ésta aún siguiera siendo activa.

Frente a los resultados del grupo de Montoya y los del presente Capítulo, todos estos mecanismos de reconocimiento podrían ser válidos, aunque el empleo de las distintas especies hospedadoras, que posiblemente tengan diferencias en la respuesta inmunológica o defensiva frente al ataque de parasitoides, podría ser una de las razones para reflejar resultados distintos. En el caso del empleo de *A. fraterculus* como hospedador, los resultados coinciden con los de Montoya *et al.* (2003), al menos en cuanto a las frecuencias de rechazo. *A. fraterculus* es filogenéticamente más cercana a *A. ludens* que *C. capitata*, por lo que es esperable que los procesos frente a un cuerpo extraño sean similares en especies de un mismo género. Estas diferencias biológicas podrían explicar, en parte, el hecho de haberse evidenciado una proporción de LP24 rechazadas significativamente mayor comparando el comportamiento de las hembras criadas y evaluadas con *A. fraterculus* respecto al ensayo homólogo realizado con *C. capitata*.

En cuanto a los índices de superparasitismo (Sirot *et al.* 1997) se encontró un porcentaje similar (en el ensayo con *A. fraterculus*) o superior (en ambos ensayos con *C. capitata*) de casos con valores menores a 1 respecto al porcentaje de casos con valores mayores a 1, sugiriendo respectivamente que una proporción de las hembras evita el superparasitismo (entre un 87% y 56% de los casos entre los distintos experimentos) y otra tiende a superparasitar (entre 13 y 44% de los casos, respectivamente). Si bien esto evidencia distintos grados de evitación (al ser un índice con valores continuos) e incluso una tendencia a superparasitar no evidenciada anteriormente, estos valores parecen exagerar la capacidad de discriminación respecto al comportamiento general observado. La estimación de este índice se basa en el tiempo de permanencia sobre el parche de determinado tipo de larva y no necesariamente en esa situación ocurre que el parasitoide esté evaluando la calidad del hospedador por lo que, asumiendo el supuesto de que la calidad de la larva es evaluada por la hembra al ser penetrada con el ovipositor, el índice de superparasitismo podría estar sobreestimando la capacidad de discriminación en *D. longicaudata*. A pesar de estas limitaciones, este índice fue utilizado previamente de manera confiable como variable respuesta para poner a prueba un modelo matemático estado-dependiente que predijo la tendencia a superparasitar bajo distintas condiciones de carga de huevos y expectativa de vida en *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Sirot *et al.* 1997). Además fue utilizado para investigar el modo de uso de claves en la explotación de parches parcialmente parasitados por

hembras con modo de reproducción arrenotoco de esa misma especie (Amat *et al.* 2009). Por lo tanto, este índice aporta un enfoque distinto pero que concuerda, aunque con valores más elevados, con las variables antes discutidas.

Respecto al análisis mediante métodos indirectos (únicamente con *C. capitata*), los datos tratados de manera agrupada confirmaron los resultados hallados por Lawrence *et al.* (1978), obtenidos también con métodos indirectos utilizando *A. suspensa*. Sin embargo, al agrupar las distribuciones de huevos de varias hembras (como en esta sección de este Capítulo) o considerar la distribución de varias hembras forrajeando simultáneamente (ver Lawrence *et al.* 1978), se corre el riesgo de incurrir en uno de los artefactos metodológicos remarcado por van Lenteren *et al.* (1978): considerando individualmente la distribución de huevos de distintas hembras pueden observarse resultados distintos que difieren de la sumatoria de las distribuciones, principalmente a causa de los distintos valores en el promedio de huevos/larva (*i.e.*  $\lambda$  de la ecuación de Poisson). De hecho, los mismos resultados que aquí mostraron una diferencia con la distribución de Poisson, al analizar los casos de manera individual pudieron determinarse comportamientos que, si bien pueden ser clasificados por su significancia estadística, abarcan un rango continuo: 74% de las hembras ovipusieron según lo esperado bajo una distribución de Poisson (al azar) y 26% mostraron una diferencia significativa con la distribución de Poisson, sugiriendo una tendencia a la evitación del superparasitismo (distribución regular de los huevos). Es importante notar que, en ningún caso, las hembras tendieron a depositar sus huevos en forma agregada.

En un ensayo similar al realizado en este Capítulo, van Alphen y Nell (1982) observaron algunos casos con distribución aleatoria de huevos en hembras del endoparasoide larval *Asobara tabida* Nees (Hymenoptera: Braconidae) confinadas de manera prolongada (20hs) en un parche con hospedadores. No obstante, conociendo que esa especie tiene la capacidad de discriminar, concluyeron que la distribución observada al final de la prueba era resultado de una combinación de una primera distribución de huevos no aleatoria a la cual se superpuso una distribución aleatoria posterior. En estos casos, de las 32 larvas ofrecidas, todas (salvo 1 o 2 en algún caso) habían sido parasitadas al menos con un huevo. Van Lenteren (1976) explicó que en *Leptopilina heterotoma* Förster (Hymenoptera: Figitidae) puede ocurrir una tendencia creciente a oviponer ante una situación en la que la hembra se vea forzada a permanecer en un

parche, incurriendo finalmente en superparasitismo. En el presente Capítulo, además de evaluar a las hembras durante sólo 4 hs y ofrecer la posibilidad de escape hacia parches con nuevas larvas no parasitadas (la mayor parte de las hembras fue observada fuera del parche focal en algún momento), el análisis de correlación entre el tipo de distribución de huevos (a través del valor  $P$ ) y el número de huevos/larva ( $\lambda$ ) no mostró una asociación significativa, demostrando que las condiciones fueron propicias para la expresión del comportamiento de discriminación, si lo hubiere.

En otro ensayo del mismo trabajo, van Alphen y Nell (1982) demostraron que en *A. tabida* debe transcurrir cierta cantidad de tiempo para que los parasitoides reconozcan y eviten larvas parasitadas previamente. Si esto fuera cierto para *D. longicaudata*, y sumado a lo anterior, los casos que fueron determinados como hembras capaces de discriminar podrían explicarse por una capacidad diferencial para detectar alguna señal (ya sea una marca química depositada en la primera oviposición o cambios fisiológicos en el hospedador, o ambas) en un tiempo más reducido. Más aún, los casos en los que se encontraron únicamente larvas parasitadas sólo una vez junto con larvas no parasitadas (*i.e.* sólo NSP 0 y NSP 1) podrían considerarse como las hembras más eficientes para discriminar. Esto sólo podría afirmarse suponiendo que la potencia de la prueba estadística no fue suficiente como para determinar una distribución no aleatoria de huevos, que además de estar caracterizados por NSP 0 y 1 únicamente, también exhibieron un bajo promedio de oviposiciones por larva ( $\lambda$ ) (10 de 19 casos con NSP 0 y 1 no resultaron en una distribución significativamente distinta a la esperada por azar, Tabla suplementaria 1, ANEXO). Aunque poco probable, alternativamente podría tratarse de hembras con baja fecundidad o algún problema no detectado que hiciera que depositaran pocos huevos, aunque no explicaría los casos con una distribución significativamente distinta a la esperada por Poisson.

Para explicar la ocurrencia de larvas superparasitadas dentro del parche explotado por una hembra, varios autores plantean que una preferencia parcial por depositar huevos en una larva previamente parasitada, aun habiendo larvas no parasitadas, puede surgir por factores como una habilidad imperfecta por discriminar (Krebs y McCleery 1984, Outreman *et al.* 2001), una respuesta a cambios en el estado interno de la hembra (McNamara y Houston 1987, Courtney *et al.* 1989, Mangel 1989b), cambios en las características del ambiente (Visser 1993, 1995) y/o

manipulación por virus simbiotes (Varaldi *et al.* 2003, 2006). El primero, sin embargo es un factor intrínseco de una especie con lo que no se esperarían grandes cambios en evaluaciones bajo distintas condiciones. La dependencia del estado interno es un factor importante para comprender el comportamiento de una especie. Una gran cantidad de trabajos (*e.g.* Mangel 1987, Sirot y Bernstein 1996, Sirot *et al.* 1997) han evaluado la importancia del estado interno sobre la decisión de optar por el superparasitismo como estrategia óptima, aunque incluso se planteó que parte de las decisiones tienen un componente estocástico (Plantegenest *et al.* 2004). Quizás, los eventos de superparasitismo encontrados se deban en parte a una presión fisiológica (*e.g.* por una alta carga de huevos), haciendo poco selectivas a las hembras. A su vez, para conjugar este razonamiento junto con aquel planteado para las hembras con NSP 1 y NSP 0, podría sugerirse que esa presión fisiológica tampoco es constante para todos los individuos generando variaciones fenotípicas (comportamentales) que podría incluir un componente genético. En cuanto al tercer factor, no se esperarían grandes efectos sobre el comportamiento, al haber mantenido las condiciones constantes. Sin embargo, podría haber alteraciones ambientales no controladas que alterarían a los insectos. Por último, en *D. longicaudata* se han descrito partículas virales (entomopoxvirus, DLEPV) que son inyectadas en el hospedador durante la oviposición (Lawrence y Akin 1999, Khoo y Lawrence 2002, Lawrence 2002, Mwaengo y Lawrence 2003), aunque su relación con el superparasitismo aún no ha sido estudiada.

Los dos métodos empleados para determinar si las hembras del parasitoide *D. longicaudata* poseen capacidad de discriminar entre larvas hospedadoras parasitadas y no parasitadas mostraron evidencias que apoyan la presencia de esta habilidad en la especie. El método indirecto, no obstante, permitió determinar con mayor certeza la existencia de variabilidad en el comportamiento de discriminación, que al menos fue evidenciado en un 26% de los casos. Los resultados e interpretación del comportamiento individual de las hembras obtenidos mediante métodos indirectos podrían justificar la falta de poder o inadecuación del método directo utilizado para mostrar evidencias de discriminación, que para el número de observaciones realizadas podría no haber tenido poder estadístico suficiente para evidenciar una preferencia por larvas no parasitadas. Hasta el momento, no se encontró ningún trabajo, a excepción del publicado por van Alphen y Nell (1982), en el que se haya utilizado simultáneamente

ambos enfoques metodológicos para evaluar el fenómeno de superparasitismo y capacidad de discriminación, aunque no con un sentido comparativo.

En el marco del control biológico, para una mayor eficiencia en la utilización de *D. longicaudata* (tanto para la cría masiva como para su desempeño en el campo) es importante profundizar en el conocimiento del comportamiento de discriminación. Más allá de los efectos causados por el superparasitismo sobre la calidad del parasitoide como producto (Capítulo 2), este fenómeno en la cría siempre va a significar, en sentido antropocéntrico, un desperdicio de huevos que podrían generar nuevos individuos al ser depositados en larvas no parasitadas y en el campo podría significar una pérdida de tiempo para el parasitoide. Los resultados del presente Capítulo muestran la existencia de comportamientos dentro de un rango de variación continua y, si esta variación tuviera base genética, podrían pensarse procesos de selección para producir un agente de control más efectivo.

## Referencias

- Amat I., Desouhant E. y Bernstein C.** 2009. Differential use of conspecific-derived information by sexual and asexual parasitic wasps exploiting partially depleted host patches. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63: 563-572.
- Ardeh M.J., de Jong P.W. y van Lenteren J.C.** 2005. Intra-and interspecific host discrimination in arrhenotokous and thelytokous *Eretmocerus* spp. *Biological Control*, 33: 74-80.
- Arditi R. y Glaizot O.** 1995. Assessing superparasitism with a model combining the functional response and the egg distribution of parasitoids. *Entomophaga*, 40: 235-262.
- Bai B. y Mackauer M.** 1990. Host discrimination by the aphid parasitoid *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae): When superparasitism is not adaptive. *The Canadian Entomologist*, 122 363-372.
- Bakker K., Peulet P.H. y Visser M.E.** 1989. The ability to distinguish between hosts containing different numbers of parasitoid eggs by the solitary parasitoid *Leptopilina heterotoma* (Thomson) (Hym., Cynip.). *Netherlands Journal of Zoology*, 40: 514-520.
- Bakker K.J.J.M., Van Alphen J.J.M., Van Batenburg F.H.D. et al.** 1985. The function of host discrimination and superparasitization in parasitoids. *Oecologia*, 67: 572-576.
- Bernstein C. y Jervis M.** 2008. Food-searching in parasitoids: the dilemma of choosing between 'immediate' or future fitness gains. En: Wajnberg E., Bernstein C., van Alphen J.J.M.

(eds.), *Behavioural Ecology of Insect Parasitoids*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 129-171.

**Brodeur J. y Boivin G.** 2004. Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Reviews in Entomology*, 49: 27-49.

**Charnov E.L. y Stephens, D. W.** 1988. On the evolution of host selection in solitary parasitoids. *American Naturalist*, 132: 707-722.

**Chau N.N.B. y Maeto K.** 2008. Intraspecific larval competition in *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae), a solitary endoparasitoid of lepidopteran larvae. *Applied Entomology and Zoology*, 43: 159-165.

**Chow F.J. y Mackauer M.** 1986. Host discrimination and larval competition in the aphid parasite *Ephedrus californicus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 41: 243-254.

**Courtney S.P., Chen G.K. y Gardner A.** 1989. A general model for individual host selection. *Oikos*, 55-65.

**Cronin J.T. y Strong D.R.** 1993. Superparasitism and mutual interference in the egg parasitoid *Anagrus delicatus* (Hymenoptera: Mymaridae). *Ecological Entomology*, 18: 293-302.

**Danyk T.P. y Mackauer M.** 1993. Discrimination between self-and conspecific-parasitized hosts in the aphid parasitoid *Praon pequodorum* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae). *The Canadian Entomologist*, 125: 957-964.

**Desneux N., Barta R.J., Delebecque C.J. y Heimpel G.E.** 2009. Transient host paralysis as a means of reducing self-superparasitism in koinobiont endoparasitoids. *Journal of Insect Physiology*, 55: 321-327.

**Fenlon J.S., Faddy M.J., Toussidou M. y de Courcy Williams M.E.** 2009. Egg distributions of insect parasitoids: modelling and analysis of temporal data with host density dependence. *Acta Biotheoretica*, 57: 309-320.

**Godfray H.C.J.** 1994. *Parasitoids behavioural and evolutionary ecology*. 1<sup>st</sup> edn. 473 pp. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

**González P.I., Montoya P., Pérez-Lachaud G., Cancino J. y Liedo P.** 2010. Host discrimination and superparasitism in wild and mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Hym.: Braconidae) females. *Biocontrol Science and Technology*, 20: 137-148.

**Greany P.D. y Oatman E.R.** 1972. Analysis of host discrimination in the parasite *Orgilus lepidus* (Hymenoptera: Braconidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 65: 377-383.

**Guillot F.S. y Vinson S.B.** 1972. Sources of substances which elicit a behavioural response from the insect parasitoid, *Campoletis perdinctus*. *Nature*, 235: 169 – 170.

**Hamelin F., Bernhard P. y Wajnberg É.** 2007. Superparasitism as a differential game. *Theoretical Population Biology*, 72: 366-378.

- Hemerik L., van der Hoeven N. y van Alphen J.J.M.** 2002. Egg distributions and the information a solitary parasitoid has and uses for its oviposition decisions. *Acta Biotheoretica*, 50: 167-188.
- Hoffmeister T.S. y Wajnberg E.** 2008. Finding optimal behaviors with genetic algorithms. En: Wajnberg E., Bernstein C. y van Alphen J. (eds.), *Behavioural ecology of insect parasitoids - From theoretical approaches to field applications*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 384-401.
- Hubbard S.F., Marris G., Reynolds A. y Rowe G.W.** 1987. Adaptive patterns in the avoidance of superparasitism by solitary parasitic wasps. *The Journal of Animal Ecology*, 387-401.
- Hughes R.N.** 1979. Optimal diets under the energy maximization premise: the effects of recognition time and learning. *American Naturalist*, 209-221.
- Islam K.S. y Copland M.J.W.** 2000. Influence of egg load and oviposition time interval on the host discrimination and offspring survival of *Anagyrus pseudococci* (Hymenoptera: Encyrtidae), a solitary endoparasitoid of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bulletin of entomological research*, 90: 69-75.
- Iwasa Y., Suzuki Y. y Matsuda H.** 1984. Theory of oviposition strategy of parasitoids. I. Effect of mortality and limited egg number. *Theoretical population biology*, 26: 205-227.
- Jaldo H.E., Gramajo M.C. y Willink E.** 2001. Mass rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): a preliminary strategy. *Florida Entomologist*, 716-718.
- Jervis M.** (ed.). 2005. *Insects as natural enemies: a practical perspective*. Springer Science & Business Media, pp. 748.
- Khoo C.C. y Lawrence P.O.** 2002. Hagen's glands of the parasitic wasp *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae): ultrastructure and the detection of entomopoxvirus and parasitism-specific proteins. *Arthropod structure & development*, 31: 121-130.
- Klomp H., Teerink B.J. y Ma W.C.** 1979. Discrimination between parasitized and unparasitized hosts in the egg parasite *Trichogramma embryophagum* (Hym.: Trichogrammatidae): a matter of learning and forgetting. *Netherlands Journal of Zoology*, 30: 254-277.
- Krebs J.R. y McCleery R.H.** 1984. Optimization in behavioural ecology. En: Krebs J.R. y Davies N.B. (eds.), *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*, 2nd. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 91-121.
- Lawrence P.O.** 2002. Purification and partial characterization of an entomopoxvirus (DIEPV) from a parasitic wasp of tephritid fruit flies. *Journal of Insect Science*, 2: 10.
- Lawrence P.O. y Akin D.** 1990. Virus-like particles from the poison glands of the parasitic wasp *Biosteres longicaudatus* (Hymenoptera: Braconidae). *Canadian Journal of Zoology*, 68: 539-546.
- Lawrence P.O., Greany P.D., Nation J.L. y Baranowski R.M.** 1978. Oviposition behavior of *Biosteres longicaudatus*, a parasite of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America*, 71: 253-256.



- Mackauer M.** 1990. Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids. En: Mackauer M. y Ehler L.E. (eds.), *Critical issues in biological control*, Jens Roland, pp. 41-62.
- Mangel M.** 1987. Opposition site selection and clutch size in insects. *Journal of Mathematical Biology*, 25: 1-22.
- Mangel M.** 1989a. An evolutionary interpretation of the “motivation to oviposit”. *Journal of Evolutionary Biology*, 2: 157-172.
- Mangel M.** 1989b. Evolution of host selection in parasitoids: does the state of the parasitoid matter?. *American Naturalist*, 688-705.
- McNamara J.M. y Houston A.I.** 1987. Partial preferences and foraging. *Animal Behaviour*, 35: 1084-1099.
- Miura K., Matsuda S. y Kobayashi M.** 1994. Discrimination between Parasitized and Unparasitized Hosts in an Egg Parasitoid, *Trichogramma chilonis* ISHII (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Applied Entomology and Zoology*, 29: 317-322.
- Montoya P., Benrey B., Barrera J.F., Zenil M., Ruiz L. y Liedo P.** 2003. Oviposition behavior and conspecific host discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 683-690.
- Mwaengo D.M. y Lawrence P.O.** 2003. A putative DNA helicase and novel oligoribonuclease in the *Diachasmimorpha longicaudata* entomopoxvirus (DIEPV). *Archives of Virology*, 148: 1431-1444.
- Outreman Y., Le Ralec A., Wajnberg E. y Pierre J.S.** 2001. Can imperfect host discrimination explain partial patch exploitation in parasitoids?. *Ecological Entomology*, 26: 271-280.
- Ovruski S.M., Colin C., Soria A., Oroño L.E. y Schliserman P.** 2003. Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62: 49-59.
- Plantegenest M., Outreman Y., Goubault M. y Wajnberg E.** 2004. Parasitoids flip a coin before deciding to superparasitize. *Journal of Animal Ecology*, 73: 802-806.
- Price P.W.** 1970. Trail odors: recognition by insects parasitic on cocoons. *Science*, 170: 546-547.
- Rogers D.** 1975. A model for avoidance of superparasitism by solitary insect parasitoids. *The Journal of Animal Ecology*, 623-638.
- Roitberg B.D., Mangel M., Lalonde R.G., Roitberg C.A., van Alphen J.J. y Vet L.** 1992. Seasonal dynamic shifts in patch exploitation by parasitic wasps. *Behavioral Ecology*, 3: 156-165.
- Roitberg B.D., Sircom J. y Roitberg C.A.** 1993. Life expectancy and reproduction. *Nature*, 364: 108.

- Salt G.** 1937. The sense used by *Trichogramma* to distinguish between parasitized and unparasitized hosts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 122: 57-75.
- Salt G.** 1961. Competition among insect parasitoids. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, Mechanisms in biological competition, 15: 96-119.
- Sirot E. Ploye H. y Bernstein C.** 1997. State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behavioral Ecology*, 8: 226-232.
- Sirot E. y Bernstein C.** 1996. Time sharing between host searching and food searching in parasitoids: state-dependent optimal strategies. *Behavioral Ecology*, 7: 189-194.
- Sugimoto T., Uenishi M. y Machida F.** 1986. Foraging for patchily-distributed leaf-miners by the parasitoid, *Dapsilarthra rufiventris* (Hymenoptera: Braconidae). I Discrimination of previously searched leaflets. *Applied Entomology and Zoology*, 21: 500-508.
- Takasu K. y Hirose Y.** 1988. Host discrimination in the parasitoid *Ooencyrtus nezarae*: the role of the egg stalk as an external marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 47: 45-48.
- van Alphen J.J.M.** 1988. Patch-time allocation by insect parasitoids: superparasitism and aggregation. En: *Population genetics and evolution*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 215-221
- van Alphen J.J.M. y Nell H.W.** 1982. Superparasitism and Host Discrimination By *Asobara Tabida* Nees (Braconidae: Alysiniinae), a Larval Parasitoid of Drosophilidae. *Netherlands Journal of Zoology*, 32: 232-260.
- van Alphen J.J.M., van Dijken M.J. y Waage J.K.** 1987. A functional approach to superparasitism: host discrimination needs not to be learnt. *Netherlands Journal of Zoology*, 37: 167-79.
- van Alphen J.J.M. y Visser, M. E.** 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual review of entomology*, 35: 59-79.
- van Alphen J.J.M., Visser M.E. y Nell H.W.** 1992. Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: searching in groups vs. sequential patch visits. *Functional Ecology*, 528-535.
- van Alphen J.J.M. y Jervis M.A.** 1996. Foraging behavior: Host discrimination. En Jervis M.A. y Kidd N. (eds.), *Insect Natural Enemies. A practical approach to their study and evaluation*, Chapman and Hall, UK, pp. 32-36.
- van Baaren J. y Nénon J.P.** 1994. Factors involved in host discrimination by *Epidinocarsis lopezi* and *Leptomastix dactylopii* (Hym., Encyrtidae). *Journal of Applied Entomology*, 118: 76-83.
- van der Hoeven N. y Hemerik L.** 1990. Superparasitism as an ESS: to reject or not to reject, that is the question. *Journal of theoretical biology*, 146: 467-482.
- van Dijken M.J. y Waage J.K.** 1987. Self and conspecific superparasitism by the egg parasitoid *Trichogramma evanescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 43: 183-192.

- van Dijken M.J., van Stratum P. y van Alphen J.J.M.** 1992. Recognition of individual-specific marked parasitized hosts by the solitary parasitoid *Epidinocarsis lopezi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30: 77-82.
- van Lenteren J.C.** 1976. The development of host discrimination and the prevention of superparasitism in the parasite *Pseudeucoila bochei* Weld (Hym.: Cynipidae). *Netherlands journal of zoology*, 26: 1-83.
- van Lenteren J.C.** 1981. Host discrimination by parasitoids. *Semiochemicals: their role in pest control*. Wiley, New York, 153-179.
- van Lenteren J.C.** 1986. Parasitoids in the greenhouse: Successes with seasonal inoculative release systems. En: Waage J. y Greathead D. (eds.), *Insects Parasitoids*, London: Academic press, pp. 342-374.
- van Lenteren J.C. y Bakker K.** 1975. Discrimination between parasitised and unparasitised hosts in the parasitic wasp *Pseudeucoila bochei*: a matter of learning. *Nature*, 254: 417-419.
- van Lenteren J.C., Bakker K. y van Alphen J.J.M.** 1978. How to analyse host discrimination. *Ecological entomology*, 3: 71-75.
- Varaldi J., Fouillet P., Ravallec M., López-Ferber M., Boulétreau M. y Fleury F.** 2003. Infectious behavior in a parasitoid. *Science*, 302: 1930-1930.
- Varaldi J., Ravallec M., Labrosse C., Lopez-Ferber M., Boulétreau M. y Fleury F.** 2006. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of insect physiology*, 52: 1202-1212.
- Vera T., Abraham S., Oviedo A. y Willink E.** 2007. Demographic and quality control parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) maintained under artificial rearing. *Florida Entomologist*, 90: 53-57.
- Vet L.E.M., Hemerik L., Visser M.E., Wäckers F.L., Lewis E.E., Campbell J.F. y Sukhdeo M.V.K.** 2002. *Flexibility in host-search and patch-use strategies of insect parasitoids*, CABI Publishing. pp. 39-64.
- Viscarret M.M., La Rossa R., Segura D.F., Ovruski S.M. y Cladera J.L.** 2006. Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.)(Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 36: 147-153.
- Visser M.E.** 1993. Adaptive self-and conspecific superparasitism in the solitary parasitoid *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Eucoilidae). *Behavioral Ecology*, 4: 22-28.
- Visser M.E.** 1995. The effect of competition on oviposition decisions of *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Eucoilidae). *Animal Behaviour*, 49: 1677-1687.
- Visser M.E., van Alphen J.J.M. y Nell H.W.** 1990. Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: the influence of the number of parasitoids depleting a patch. *Behaviour*, 114: 21-36.

**Visser M.E., van Alphen J.J. M. y Nell H.W.** 1992b. Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: the influence of pre-patch experience. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 31: 163-171.

**Visser M.E., van Alphen J.J.M. y Hemerik L.** 1992a. Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: an ESS model. *Journal of Animal Ecology*, 61: 93-101.

**Völkl W. y Mackauer M.** 1990. Age-specific pattern of host discrimination by the aphid parasitoid *Ephedrus californicus* Baker (Hymenoptera: Aphidiidae). *The Canadian Entomologist*, 122: 349-361.

**Waage J.K.** 1986. Family planning in paraitoids: Adaptive patterns of progeny and sex allocation. En: Waage J. y Greathead D. (eds.), *Insects Parasitoids*, London: Academic press, pp. 63-95.

**Weisser W.W. y Houston A.I.** 1993. Host discrimination in parasitic wasps: when is it advantageous?. *Functional Ecology*, 7: 27-39.

**Weisser W.W., Houston A.I. y Völkl W.** 1994. Foraging strategies in solitary parasitoids: the trade-off between female and offspring mortality risks. *Evolutionary Ecology*, 8: 587-597.

## Capítulo 4

Bases genéticas del comportamiento de *D. longicaudata*  
para la discriminación entre larvas parasitadas y no  
parasitadas de *C. capitata*

## Introducción

El comportamiento de forrajeo de los artrópodos, tanto para la alimentación como para la oviposición, está directamente relacionado con el éxito reproductivo y por lo tanto está constantemente sometido a presiones de selección. En la naturaleza es común encontrar estrategias variadas para explotar los recursos entre poblaciones de una especie, pero incluso también entre individuos de una misma población. A pesar de la impresión generada en trabajos anteriores a la década del '80 con el uso de la genética clásica y técnicas electroforéticas, se demostró que la variación de rasgos fenotípicos es continua en la gran mayoría de los rasgos comportamentales (Parsons 1980). En poblaciones naturales de insectos herbívoros donde se evidencia variación genética para caracteres como preferencia por hospederos y éxito de la descendencia, se espera que la selección favorezca individuos que prefieran depositar sus huevos en los sitios más adecuados para su descendencia (Rausher 1983, Thompson 1988). Por eso, a través de presiones selectivas podrían producirse correlaciones genéticas entre preferencia de las hembras y éxito en la descendencia bien a través de desequilibrio de ligamiento (ligamiento genético entre dos o más *loci*) o favoreciendo alelos que afecten de manera pleiotrópica a estos rasgos (Fox 1993). Sin embargo, si bien estos comportamientos son influenciados por la genética, también son modulados por otros factores como condiciones climáticas, características de los hospedadores y el estado fisiológico de la hembra (Pompanon *et al.* 1999).

Existe una cantidad de trabajos que intentaron evidenciar las bases genéticas de caracteres relacionados al forrajeo como la atracción hacia volátiles de plantas inducidos por herbivoría [en el ácaro *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Jia 2002)], elección de hospedero [en las mariposas *Colias eurytheme* (Tabashnik *et al.* 1981) y *Euphydryas editha* Boisduval (Singer *et al.* 1988); en el escarabajo *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Fox 1993); en la chicharrita *Nilaparvata lugens* Stål (Sezer y Butlin 1998); en el áfido *Episyrphus balteatus* De Geer (Sadeghi y Gibert 1999)], respuestas olfativas, duración de cópula y velocidad de apareamiento, aprendizaje, etc. [en varias especies del género *Drosophila* Fallén (Fuyama 1976), revisión por Parsons (1980)]. La variabilidad fenotípica comportamental se ha estudiado principalmente en parasitoides de huevos de las familias Trichogrammatidae y Scelionidae en caracteres como tiempo de manipuleo de la presa (Wajnberg 1989), distancia reactiva (Bruins *et*

al. 1994), asignación del sexo de la descendencia (Wajnberg 1993), comportamiento de oviposición (Chassain y Bouletreau 1987, Wajnberg *et al.* 1989), locomoción y actividad circadiana (Pompanon *et al.* 1999), mecanismos de interferencia directa mutua (Wajnberg *et al.* 2004) y reglas de decisión de abandono de parche (Wajnberg *et al.* 1999). Este tipo de aproximación permite un abordaje cuantitativo de la variación total hallada mediante dos métodos que permiten estimar el componente genético heredable de la varianza (varianza genética aditiva) de los comportamientos. Para uno de los métodos, luego de evaluar un determinado comportamiento de forrajeo en distintas hembras, se obtienen sus respectivas hijas que tendrán un alto grado de parentesco (hermanas completas). A través de un análisis de correlación (Spiess 1977) o regresión lineal (Falconer y Mackay 1996) se estudia la similitud entre las madres y el promedio de sus hijas (ver sección Materiales y Métodos). El otro método, el análisis de familias, consiste en generar isolíneas a partir una única hembra y analizar los componentes de varianza (a través del análisis de varianzas, ANOVA), que se relacionan con la varianza genética. Una ventaja del empleo de estos métodos es que todos los individuos son criados bajo condiciones controladas de laboratorio, con lo que las diferencias entre isolíneas son mayormente genéticas (Hoffman y Parsons 1988). Si, además, se evalúan los caracteres considerando y controlando los factores intrínsecos (no genéticos), se espera que la estimación sea aún más precisa. Ambos métodos pueden ser complementarios y son utilizados para estimar la heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) y estricto ( $h^2$ ) de los rasgos estudiados, aproximando la proporción de la varianza fenotípica observada que es explicada por la varianza genotípica aditiva (Wajnberg 2010).

Dentro de los estudios realizados sobre el comportamiento de forrajeo en insectos parasitoides, el comportamiento de discriminación de hospederos reviste fundamental importancia para la comprensión de la conducta que provoca el superparasitismo, tema central de esta tesis. El fenómeno de superparasitismo ha sido estudiado de diversas maneras en un amplio rango de especies parasíticas. Puntualmente en el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*, este fenómeno ha sido estudiado a través de métodos comportamentales directos e indirectos, determinando la presencia de una capacidad discriminatoria entre hospedadores parasitados y no parasitados (Lawrence *et al.* 1978, Montoya *et al.* 2003, González *et al.* 2010). Sin embargo, en el Capítulo 3 de la presente tesis, el análisis de este comportamiento a través de ambos

métodos evaluando hembras individualmente mostró una tendencia variable a evitar el superparasitismo, lo que podría estar sugiriendo la presencia de variabilidad genética para el comportamiento de discriminación en la población mantenida en el laboratorio. El estudio a través de la distribución de huevos por hospedador en un parche con una cantidad determinada de hospedadores da la posibilidad de estudiar las bases genéticas relacionadas al superparasitismo mediante un método estandarizado. De esta manera, Chassain y Bouletreau (1987) y Wajnberg *et al.* (1989) sugieren que, en *Trichogramma maidis* Pintureau y Voegelé (Hymenoptera: Trichogrammatidae), el comportamiento de oviposición y superparasitismo parecieran estar genéticamente determinados.

A partir de una selección de hembras evaluadas en el Capítulo 3, para las que se determinó su capacidad de discriminación, en el presente Capítulo se estudiará la importancia de un componente genético asociado a ese comportamiento en *D. longicaudata* analizando la heredabilidad mediante el estudio de correlaciones comportamentales entre las madres y sus respectivas hijas, y comparando las isolíneas fundadas a partir de dichas madres bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

#### 4.1. Objetivo

Evaluar las bases genéticas del comportamiento de discriminación de hospedadores parasitados en el parasitoide *D. longicaudata*.

### **Materiales y Métodos**

#### 4.1. Insectos

Todos los parasitoides evaluados provinieron de la cría del laboratorio mantenida en el IGEAF, utilizando a *C. capitata* como especie hospedadora. Las hembras de *D. longicaudata* fueron mantenidas individualmente en frascos de vidrio de 400 ml con agua y miel desde su emergencia en una sala con temperatura controlada (25°C) y ciclo de luz natural. Todas las hembras fueron evaluadas antes de ser fecundadas.



#### 4.2. Obtención de isolíneas

A partir de la evaluación de hembras realizada en el Capítulo 3 (mediante métodos indirectos, sección 3.3 de Resultados) pudo determinarse la existencia de variabilidad en la tendencia a superparasitar. Con el fin de determinar si la discriminación de hospedadores parasitados como carácter fenotípico tiene una base genética, se fundaron 18 isolíneas a partir de las hembras antes mencionadas que mostraron en un rango continuo de comportamientos; desde un ajuste casi perfecto a la distribución de huevos esperada por azar (*i.e.* distribución aleatoria de huevos,  $0,999 > P \geq 0,05$ ), hasta hembras con distribuciones significativamente distintas a la esperada por el modelo aleatorio (*i.e.* distribución regular; evitación de superparasitismo,  $0,05 > P > 0,004$ ). Estas isolíneas fueron fundadas por las hembras 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 28, 29, 31, 32, 33, 37 y 41 (ver Tabla suplementaria 1), 5 de las cuales mostraron un valor  $P < 0,05$ , con tendencia a evitar el superparasitismo. Luego de su evaluación (ver Resultados en Capítulo 3), las hembras fueron devueltas al recipiente donde habían sido mantenidas con agua y miel. A cada hembra se le ofreció una unidad de oviposición con larvas de *C. capitata* para depositar huevos no fecundados y obtener hijos para posteriores retrocruzas (por ser haplo-diploides y no estar fecundadas). Al cabo de aproximadamente 18 días a 25°C, dos machos hijos fueron introducidos al recipiente de sus respectivas madres para su fecundación. A partir del día siguiente se realizó una serie de nuevas exposiciones hasta obtener y evaluar exitosamente entre 4 y 8 hijas por isolínea.

#### 4.3. Evaluación de hijas

Las hijas fueron mantenidas y evaluadas con el mismo dispositivo y bajo las mismas condiciones que sus madres (ver Materiales y Métodos, Capítulo 3), y fueron evaluadas individualmente en tandas de 4 réplicas por la mañana y otras 4 por la tarde. La evaluación de las hijas de todas las isolíneas fue realizada aleatoriamente dependiendo de la disponibilidad. Se evaluaron con una edad de entre 5 y 12 días.

La distribución de huevos en los hospedadores ofrecidos fue determinada como en el Capítulo 3 (por disección de hospedadores tras 48 hs desde la parasitación), utilizando luego esos datos para evaluar el ajuste de las frecuencias observadas de cada hija a las frecuencias esperadas bajo el modelo de Poisson. Estos análisis arrojaron datos

que fueron utilizados como variables continuas asociadas al comportamiento de oviposición.

#### 4.4. Análisis de datos

##### 4.4.1. Regresión madres-hijas

De los datos obtenidos del ajuste a la distribución de Poisson, para cada madre y cada hija se calculó: a) el número promedio de huevos/hospedador ( $= \lambda$ ); b) la varianza del número de huevos por hospedador/ $\lambda$  ( $= \text{Var}/\lambda$ ; coeficiente de dispersión de Poisson); y c) el número total de huevos depositado. La primera variable,  $\lambda$ , fue considerada por Fiske (1910) como un estimador de la intensidad de superparasitismo y corresponde a la misma constante de la ecuación de probabilidades de Poisson (sección 3.2.3 en Materiales y Métodos, Capítulo 3). La segunda variable,  $\text{Var}/\lambda$ , es un índice de dispersión que toma valor 1 cuando la distribución observada es igual a la esperada por el modelo de Poisson (indicando distribución aleatoria de huevos) y valores menores o mayores a 1 si la distribución de huevos es regular o agrupada, respectivamente. La tercera variable fue considerada como un carácter relacionado con la actividad general de oviposición.

Para comparar los valores de estas variables entre las madres y las hijas se realizó un análisis de regresión lineal simple incluyendo todas las isolíneas que alcanzaron un mínimo de 4 hijas evaluadas, tomando los valores de las madres como variable predictiva y el promedio de las hijas como la variable dependiente. Con la pendiente (b) y el error estándar [ $EE_{(b)}$ ] de la recta de regresión se calculó la heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ) y su error estándar [ $EE_{(h^2)}$ ] según Falconer y Mackay (1996) como:  $h^2 = 2b$ ;  $EE_{(h^2)} = 2EE_{(b)}$ . Cabe aclarar que, con este diseño experimental en el que sólo se evalúan hembras, no puede separarse el efecto maternal de la varianza genética aditiva (Singer *et al.* 1988).

##### 4.3.2. Análisis de isolíneas

Se realizó un ANOVA de un factor considerando la isolínea como factor aleatorio. Para cada variable, las réplicas de cada isolínea fueron los datos obtenidos de las hijas. Si la variación entre isolíneas es mayor a la variación dentro de cada isolínea, entonces habría evidencias de que el carácter evaluado es heredable (Hoffman y Parsons 1988). Este

análisis permite calcular la heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) como la proporción de la varianza explicada por las isolíneas (componente de varianza dentro isolíneas,  $s^2_d$ ) en relación a la varianza total (componente de varianza dentro,  $s^2_d$ , y entre isolíneas,  $s^2_e$ ) (Drent *et al.* 2003), calculada como:  $H^2 \leq 2[s^2_d/(s^2_d + s^2_e)]$ . En este parámetro se incluye la varianza genética total (aditiva, por dominancia y por epístasis), por lo que se considera como una cota superior a la heredabilidad en sentido amplio (Falconer y Mackay 1996).

Los valores de todas las variables, tanto en las madres como en las hijas, se distribuyeron normalmente. Para los análisis de varianza se comprobó también el supuesto de homogeneidad de varianzas. Todos los análisis estadísticos se realizaron con STATISTICA 10 (StatSoft, Inc. 1984-2011).

## Resultados

De las 18 isolíneas (madres fundadoras) consideradas inicialmente, 6 fueron descartadas por no haberse alcanzado un mínimo de 4 hijas evaluadas. De cada una de las 12 restantes se analizaron entre 4 y 8 hijas (total de 77 hembras y un promedio de 6,5 hijas por isolínea), mantenidas y evaluadas bajo las mismas condiciones que sus madres. El detalle de la distribución de las oviposiciones y los parámetros calculados para el análisis pueden verse en la Tabla suplementaria 2 (ANEXO).

Las pendientes de las rectas de regresión para cada una de las variables relacionadas con el comportamiento de discriminación no resultaron significativamente distintas de cero (Tabla 4.1 y Figuras 4.1.a-c).

A partir de los resultados de regresión para cada variable, no puede afirmarse que los valores de heredabilidad estimados a partir de la pendiente de regresión sean significativos (observar que los valores de error estándar son de la misma magnitud que los propios valores de  $h^2$ ) (Tabla 4.1).

El análisis de isolíneas tampoco evidenció diferencias entre isolíneas ni similitudes entre las hijas de cada isolínea en el comportamiento de oviposición

[ANOVA- ‘Isolínea’ como factor aleatorio:  $\text{Var}/\lambda$ :  $F_{(11, 65)} = 1,53$ ,  $P = 0,141$ ;  $\lambda$ :  $F_{(11, 65)} = 1,69$ ,  $P = 0,096$ ; Total huevos depositados por hembra:  $F_{(11, 65)} = 1,50$ ,  $P = 0,154$ ] (Figuras 4.2a-c) como para poder atribuir fundamentos genéticos en la variabilidad del comportamiento de las madres encontrada en el Capítulo 3. La mayor parte de la variación observada se debió a la variación dentro de cada isolínea (término de error) (Tabla 4.2).

Tabla 4.1. Análisis de regresión lineal para los valores obtenidos de las madres (variable predictora) y los valores promedio de sus respectivas hijas (variable dependiente) considerando como variables aleatorias aquellas relacionadas con el comportamiento de oviposición. Valor P: valor de significancia de la pendiente de regresión.  $h^2$ : heredabilidad en sentido estricto ( $\pm$  E.E.) calculada como el doble de la pendiente ( $\pm$  doble del error estándar de la pendiente) (Falconer y Mackay 1996).

Variable	Pendiente regresión $\pm$ EE	Valor P	$h^2 \pm$ EE
Var/ $\lambda$	-0,29 $\pm$ 0,22	0,223	0,58 $\pm$ 0,44
$\lambda$	0,39 $\pm$ 0,32	0,247	0,78 $\pm$ 0,63
Total huevos depositados	0,28 $\pm$ 0,30	0,373	0,55 $\pm$ 0,59

Tabla 4.2. Componentes de varianza obtenidos del ANOVA y heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) para las variables asociadas al comportamiento de oviposición.

Variable	Isolínea (% componente de varianza)	Error (% componente de varianza)	$H^2$
Var/ $\lambda$	7,71	92,29	0,15
$\lambda$	9,70	90,30	0,19
Total huevos depositados	7,22	92,78	0,14

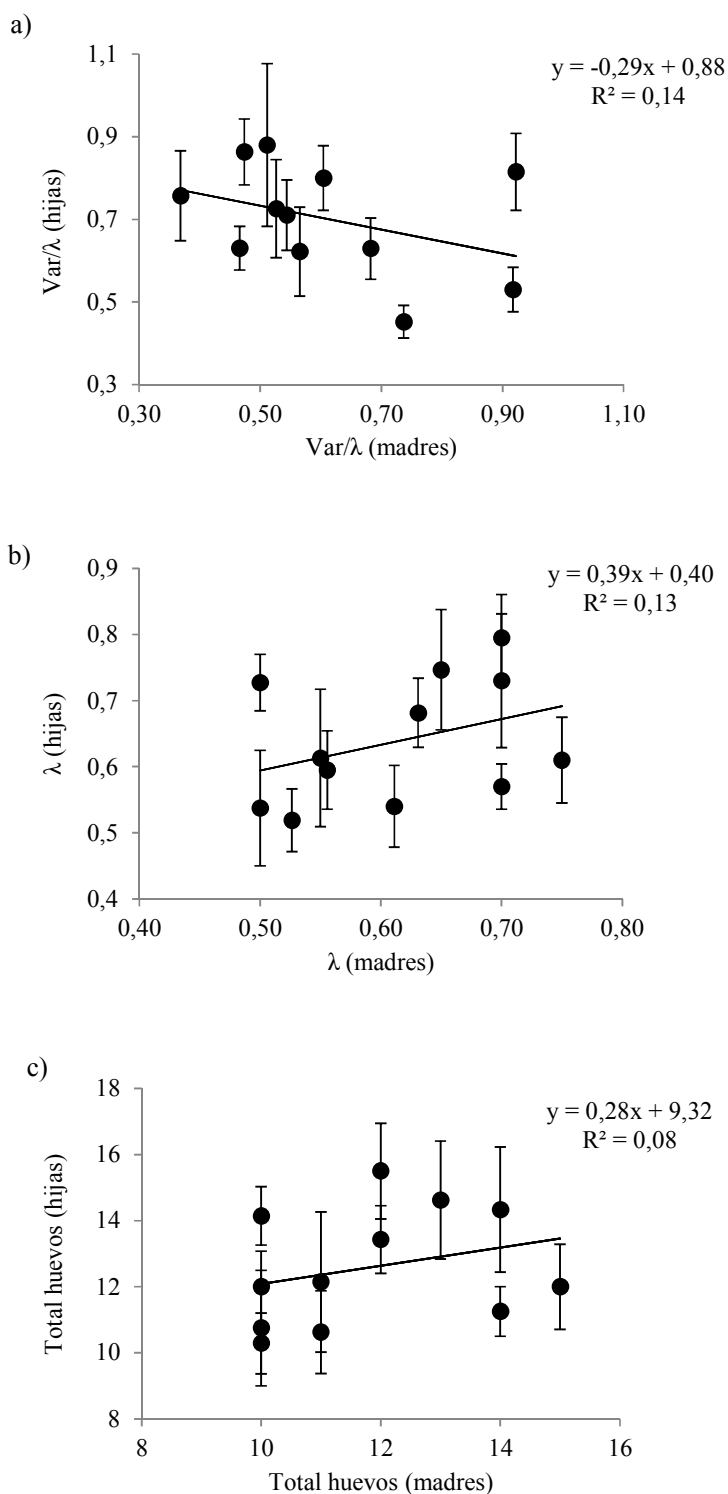


Figura 4.1. Regresiones madre-promedio de hijas para los tres parámetros bajo estudio: a)  $\text{Var}/\lambda$  (medida de ajuste de la distribución de huevos esperada por Poisson), b) promedio de huevos/hospedador (medida de la intensidad del superparasitismo) y c) total de huevos depositados por cada hembra. Se muestran las respectivas ecuaciones de regresión, coeficientes de determinación  $R^2$  y las barras de error estándar del promedio de las hijas.

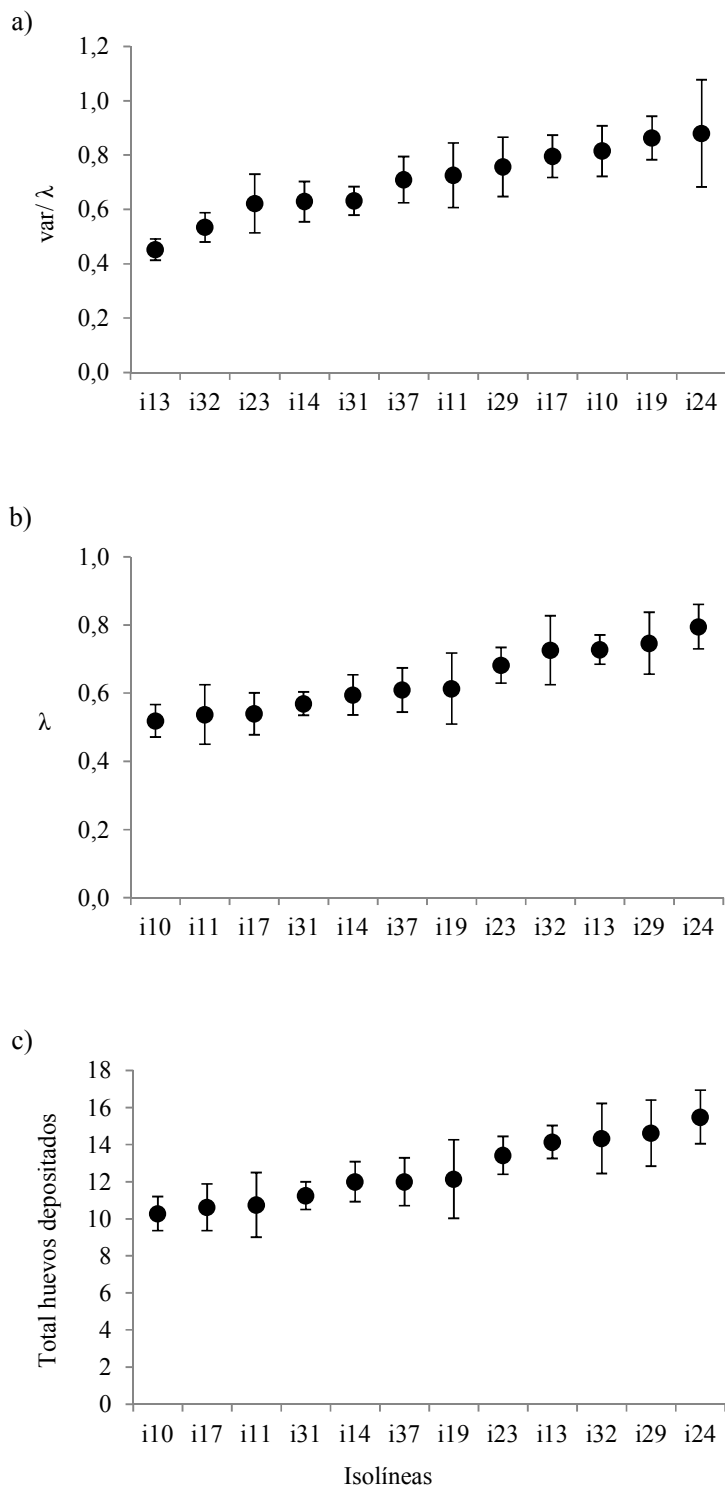


Figura 4.2. Valores promedio ( $\pm$  E.E.) de cada isolínea calculados a partir de las respectivas hijas para a)  $Var/\lambda$ , b) promedio de huevos/hospedador ( $\lambda$ ) y c) total de huevos depositados por hembra.

## Discusión

La variabilidad en el comportamiento de discriminación de hospedadores por hembras de *D. longicaudata* (Capítulo 3) no pudo ser explicada de manera determinante por efectos genéticos. Cuando las aislíneas se fundan bajo condiciones de laboratorio con una baja influencia de las variaciones ambientales, es esperable que la variación fenotípica entre ellas se deba principalmente a variaciones genéticas (Hoffman y Parsons 1988). Considerando que factores internos y externos a las hembras pueden afectar en mayor o menor medida el comportamiento de forrajeo de los insectos (en este caso el comportamiento de oviposición y superparasitismo), el protocolo empleado en los ensayos del presente Capítulo apuntó a fijar y mantener constantes esos factores que podrían introducir fuentes de variación durante la evaluación del carácter. A pesar de estos cuidados, la variabilidad observada no fue reflejada en los análisis de regresión entre las madres y el promedio de las hijas, ni en la comparación del comportamiento entre y dentro de las aislíneas. Los análisis realizados no permitieron esclarecer la herencia del carácter estudiado y, pese a la falta de evidencias, no puede descartarse la hipótesis de que la variabilidad en el comportamiento de discriminación tenga bases genéticas. Si se tratara de un rasgo muy complejo, el análisis podría ser abordado por estudios más detallados de genética cuantitativa. Evidencias relacionadas al fenómeno de superparasitismo pueden encontrarse en el trabajo de Wajnberg *et al.* (1989), en el que emplearon satisfactoriamente dos de las variables aquí analizadas ( $Var/\lambda$  y  $\lambda$ ) para evidenciar la variabilidad genética en la distribución de la descendencia en *T. maidis*, aunque agrupando las distribuciones de varias hembras [ver posibles problemas que esto acarrea en van Lenteren *et al.* (1978) y Capítulo 3]. En lo que sigue, se discuten los factores más probables que puedan haber generado los resultados de este Capítulo.

La diferenciación genética entre poblaciones de una especie en estado natural depende del balance entre el efecto homogeneizador del flujo génico y de la influencia hacia la diversificación de la deriva génica y selección natural (Slatkin 1973, Felsenstein 1976, Endler 1977). En una cría de laboratorio en la que existieran variaciones en las condiciones de exposición de sus hospedadores (*e.g.* ofrecimiento de densidades o tamaños de larvas distintos, o densidades variables de parasitoides en sus recipientes contenedores), podrían facilitarse procesos de selección estocásticos entre generaciones y/o entre individuos de una misma generación. De esta forma se estarían

exponiendo a distintos ambientes o contextos en los que la presión de selección, en el lapso de una generación, sería débil y su dirección fluctuaría entre generaciones (van Alphen *et al.* 2003), propiciando variabilidad genética. El polimorfismo podría mantenerse si existiera variabilidad genética y si, además, el promedio del éxito reproductivo del heterocigota excediera el valor de ambos homocigotas (considerando el caso más simple de en un único *locus*) (Futuyma y Peterson 1985). No obstante, este no es el escenario en la cría de la cual se obtuvieron los parasitoides utilizados en los ensayos realizados en esta Tesis, la cual se hace de manera protocolizada, manteniendo aproximadamente constantes el número de individuos por frasco, el número y duración de exposiciones semanales, la densidad de larvas obtenidas, las condiciones ambientales, entre otros. En una cría como esta, donde las condiciones son constantes a lo largo de las generaciones, con alto flujo génico y donde la presión de selección es mucho más débil que en poblaciones naturales, es posible que la frecuencia de genotipos asociados a la capacidad de discriminar se deba a fluctuaciones aleatorias de alelos implicados en ese comportamiento o por mutaciones recurrentes (Futuyma y Peterson 1985). Asimismo, la cría de *D. longicaudata* del IGEAF fue iniciada en 2001 a partir de un pie de cría cedido de material introducido en 1999 a la Argentina desde la cría masiva mantenida en México (Ovruski *et al.* 1999) dando amplias posibilidades que niveles de endocría elevados hayan conducido a pérdida de variabilidad genética (Carabajal *et al.* 2015). Finalmente, esta población de laboratorio atravesó en el IGEAF tres cuellos de botella que podrían haber ocasionado una reducción en la variabilidad genética. Todos estos aspectos podrían haber actuado, individualmente o en forma conjunta, reduciendo la variabilidad genética en rasgos comportamentales, tales como el comportamiento de oviposición.

Alternativamente podría considerarse un efecto genético estable en el comportamiento de discriminación, pero las condiciones seleccionadas para los ensayos con la intención de que esta habilidad fuera expresada por aquellos individuos que la heredaron, no hayan sido las correctas. En *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) se sabe que ciertos factores internos como la carga de huevos y la expectativa de vida pueden influenciar el comportamiento de superparasitismo (Sirot *et al.* 1997). Quizás, evaluar tanto madres como hijas en condiciones con mayor presión fisiológica (*e.g.* hembras jóvenes y con baja carga de huevos) que generen una mayor selectividad en la calidad del hospedador, puedan



revelar efectivamente la habilidad de discriminación en aquellas hembras que la hayan heredado. Por otro lado, variaciones en factores externos como la densidad de hospedadores en el parche o la presencia de conoespecíficos podrían generar efectos similares. Es por estas razones que el hecho de haber encontrado comportamientos distintos entre las madres impide descartar la hipótesis de una base heredable de la capacidad de discriminación. Algunos trabajos sugieren efectos genéticos aunque no hayan podido ser evidenciados claramente por estos métodos (Tabashnik *et al.* 1981, Singer *et al.* 1988, Wajnberg 1989).

Si bien fue posible estimar y cuantificar los componentes heredables del comportamiento de distribución de las oviposiciones respecto a otras posibles fuentes de variación, tanto la heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) como la heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ) sugieren que la base genética no es significativa para las tres variables analizadas: el índice de dispersión ( $\text{Var}/\lambda$ ), la intensidad del superparasitismo ( $\lambda$ ) y la cantidad total de huevos depositados. En comparación, Tabashnik *et al.* (1981) tampoco obtuvieron valores significativos para ambos parámetros de heredabilidad al estudiar la preferencia por distintas plantas hospederas de *Colias eurytheme* Boisduval (Lepidoptera: Pieridae). ( $H^2$  mostró un valor mayor a  $h^2$ , conformando su definición, ya que el primer parámetro se considera como un límite superior del segundo). Más allá de estos resultados, los autores sugieren que la variación intra-poblacional en ese comportamiento tiene efectivamente una base genética. Como justificación aluden al problema del bajo número de muestras, argumentando que para obtener un valor de heredabilidad ( $h^2$ ) de 0,5 se necesitarían 63 pares de datos madre-hijas en un análisis de correlación para su sistema. En los estudios con *D. longicaudata*,  $H^2$  mostró valores bajos (entre 0,14 y 0,19), sugiriendo que la variabilidad encontrada se debió principalmente a varianza no genética, siendo la variación dentro de una misma isolínea (*i.e.* entre individuos de una misma madre) proporcionalmente mayor a la variación entre isolíneas. Si bien las estimaciones de los  $h^2$  mostraron valores más altos (entre 0,55 y 0,78), estos no provienen de modelos de regresión significativos, y los errores estándar fueron tan altos como los propios estimadores. Considerando esto, los valores  $h^2$  quedaron incluidos en los correspondientes valores de  $H^2$ , sugiriendo una varianza genética aditiva que no pudo ser identificada. Como propone Tabashnik *et al.* (1981), aumentar el número de isolíneas a un número razonable podría permitir evidenciar una heredabilidad significativa, aunque ésta sea baja.

Los valores estimados de heredabilidad integran los efectos de la selección, la estructura e interrelación entre componentes de varianza (Stirling *et al.* 2002) y no son un simple reflejo de la cantidad de variación en un carácter, por lo que deben interpretarse de manera cuidadosa y está limitada a la población estudiada. Si bien la ocurrencia de variabilidad genética dentro de una misma población fue evidenciada en varios trabajos, principalmente en el género *Trichogramma* (Chassain *et al.* 1988, Wajnberg 1989, 1994, Chassain y Boulétreau 1991, Bruins *et al.* 1994, Wajnberg y Colazza 1998), no siempre las estimaciones de la heredabilidad de un mismo rasgo en un mismo sistema arrojan los mismos valores (van Oers *et al.* 2005). Es posible que diferencias no controladas (principalmente condiciones ambientales; *e.g.* Roitberg *et al.* 1993) entre el momento de evaluación de las madres y el de las hijas afecten el comportamiento, imposibilitando la identificación de la heredabilidad del carácter. Esto resulta en una restricción metodológica, ya que es imposible evaluar a las madres e hijas simultáneamente. Si quisiera hacerse, las edades (y por ende la condición fisiológica) de los individuos de cada generación serían tan distintas que posiblemente aumenten la variabilidad ambiental, imposibilitando nuevamente la detección de los componentes genéticos del comportamiento.

La falta de evidencias de heredabilidad del comportamiento de discriminación, tal vez tenga fundamentos más complejos. Como los rasgos comportamentales están gobernados por muchos genes (Ewig y Manning 1967, Barinaga 1994), la interacción entre ellos dificulta la identificación de variabilidad dentro de una aislónea. Para evitar este problema, Pompanon *et al.* (1999) utilizaron aislóneas de *Trichogramma brassicae* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) altamente homocigotas, con un alto grado de parentesco al ser mantenidas por 11 generaciones. A pesar de la dificultad general para demostrar variabilidad genética en rasgos comportamentales dentro de una población, estos autores lograron evidenciar que esa variabilidad es característica de cada familia e incluso que es transmitida entre dos generaciones consecutivas. En algunos casos, esta variabilidad puede ser muy baja para ser medida (Clark 1987, Rose *et al.* 1987, Li y Margolies 1993), pero la razón más importante es probablemente el complejo determinismo de esos rasgos (Barinaga 1994) que depende de características fisiológicas y morfológicas subyacentes (Pompanon *et al.* 1999).

En el presente Capítulo, los análisis de correlación e isolíneas no permitieron determinar la existencia de variabilidad genética asociada a la capacidad de discriminación. Sin embargo, estudios con un mayor número de isolíneas mantenidas por varias generaciones y mayor número de hijas por cada una de ellas y/o evaluaciones en distintos contextos, incluyendo análisis de genética cuantitativa, podrían permitir obtener resultados más precisos. En el marco del control biológico con insectos parasitoides, la cuantificación de la variación genética intra-poblacional en atributos biológicos podría servir de punto de partida para un programa de selección con el fin de aumentar la eficiencia en el campo (Hoy 1976, Mackauer 1976, Wajnberg 1991, 2004) en un fino balance con una óptima eficiencia en condiciones de producción masiva.

## Referencias

- Barinaga M.** 1994. From fruit flies, rats, mice: evidence of genetic influence. *Science*, 264: 1690-1693.
- Bruins E.B.A.W., Wajnberg E. y Pak G.A.** 1994. Genetic variability in the reactive distance in *Trichogramma brassicae* after automatic tracking of the walking path. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 72: 297-303.
- Carabajal L.Z. et al.** 2015. Complementary sex determination in the parasitic wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. Plos One, en prensa.
- Chassain C. y Boulétreau M.** 1987. Genetic variability in the egg-laying behaviour of *Trichogramma maidis*. *Entomophaga*, 32: 149-157.
- Chassain C. y Boulétreau M.** 1991. Genetic variability in quantitative traits of host exploitation in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Genetica*, 83: 195-202.
- Chassain C., Boulétreau M. y Fouillet P.** 1988. Host exploitation by parasitoids: local variations in foraging behaviour of females among populations of *Trichogramma* species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 48: 195-202.
- Clark A.G.** 1987. Genetic correlations: the quantitative genetics of evolutionary constraints. En: *Genetic constraints on adaptive evolution*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 25-45.
- Drent P.J., van Oers K. y van Noordwijk A.J.** 2003. Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: 45-51.
- Endler J.A.** 1977. Geographic variation, speciation, and clines (No. 10). Princeton University Press.

- Ewing A.W. y Manning A.** 1967. The evolution and genetics of insect behaviour. *Annual review of entomology*, 12: 471-494.
- Falconer D.S. y Mackay T.F.** 1996. Introduction to quantitative genetics. Harlow. UK: Longman.
- Felsenstein J.** 1976. The theoretical population genetics of variable selection and migration. *Annual review of genetics*, 10: 253-280.
- Fiske W.F.** 1910. Superparasitism: an important factor in the natural control of insects. *Journal of Economic Entomology*, 3: 88-97.
- Fox C.W.** 1993. A Quantitative Genetic Analysis of Oviposition Preference and Larval Performance on Two Hosts in the Bruchid Beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Evolution*, 47: 166-175.
- Futuyma D.J. y Peterson S.C.** 1985. Genetic variation in the use of resources by insects. *Annual review of entomology*, 30: 217-238.
- Fuyama Y.** 1976. Behavior genetics of olfactory responses in *Drosophila*. I. Olfactometry and strain differences in *Drosophila melanogaster*. *Behavior genetics*, 6: 407-420.
- González P.I., Montoya P., Pérez-Lachaud G., Cancino J. y Liedo P.** 2010. Host discrimination and superparasitism in wild and mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Hym.: Braconidae) females. *Biocontrol Science and Technology*, 20: 137-148.
- Hoffmann A.A. y Parsons P.A.** 1988. The analysis of quantitative variation in natural populations with isofemale strains. *Genetics Selection Evolution*, 20: 87-98.
- Hoy M.A.** 1976. Genetic improvement of insects: fact or fantasy. *Environmental Entomology*, 5: 833-839.
- Jia F., Margolies D.C., Boyer J.E. y Charlton R.E.** 2002. Genetic variation in foraging traits among inbred lines of a predatory mite. *Heredity*, 89: 371-379.
- Lawrence P.O., Greany P.D., Nation J.L. y Baranowski R.M.** 1978. Oviposition behavior of *Biosteres longicaudatus*, a parasite of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America*, 71: 253-256.
- Li J. y Margolies D.C.** 1993. Quantitative genetics of aerial dispersal behaviour and life-history traits in *Tetranychus urticae*. *Heredity-London*, 70: 544-544.
- Mackauer M.** 1976. Genetic problems in the production of biological control agents. *Annual review of Entomology*, 21: 369-385.
- Montoya P., Benrey B., Barrera J.F., Zenil M., Ruiz L. y Liedo P.** 2003. Oviposition behavior and conspecific host discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 683-690.
- Ovruski S.M., Cancino J.L., Fidalgo P. y Liedo P.** 1999. Nuevas perspectivas para la aplicación del control biológico contra moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en Argentina. *Manejo Integr. Plagas*, Costa Rica 54: 1-12.

- Parsons P.A.** 1980. Isofemale Strains and Evolutionary Strategies in Natural Populations. En: Hecht M. K., Steere W. C. y Wallace B. (eds.), *Evolutionary Biology*, Springer US, pp. 175-217.
- Pompanon F., Fouillet P. y Bouletreau M.** 1999. Physiological and genetic factors as sources of variation in locomotion and activity rhythm in a parasitoid wasp (*Trichogramma brassicae*), *Physiological entomology*, 24:346-357.
- Rausher M.D.** 1983. Variability for host preference in insect populations: Mechanistic and evolutionary models. *Journal of Insect Physiology*, 31: 873-889.
- Roitberg B.D., Sircom J. y Roitberg C.A.** 1993. Life expectancy and reproduction. *Nature*, 364, 108.
- Rose M.R., Service P.M. y Hutchinson E.W.** 1987. Three approaches to trade-offs in life-history evolution. *Genetic constraints on adaptive evolution*, Springer, 91-105.
- Sadeghi H. y Gilbert F.** 1999. Individual variation in oviposition preference, and its interaction with larval performance in an insect predator. *Oecologia*, 118: 405-411.
- Sezer M. y Butlin R.K.** 1998. The genetic basis of oviposition preference differences between sympatric host races of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265: 2399-2405.
- Singer M.C., Ng D. y Thomas C.D.** 1988. Heritability of oviposition preference and its relationship to offspring performance within a single insect population. *Evolution*, 977-985.
- Sirot E., Ploye H. y Bernstein C.** 1997. State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behavioral Ecology*, 8: 226-232.
- Slatkin M.** 1973. Gene flow and selection in a cline. *Genetics*, 75: 733-756.
- Spiess E.B.** 1977. *Genes in Populations*. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Stirling D.G., Réale D. y Roff D.A.** 2002. Selection, structure and the heritability of behaviour. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 277-289.
- Tabashnik B.E., Wheelock H., Rainbolt J.D. y Watt W.B.** 1981. Individual variation in oviposition preference in the butterfly, *Colias eurytheme*. *Oecologia*, 50: 225-230.
- Thompson J.N.** 1988. Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 47: 3-14
- van Alphen J.J., Bernstein C. y Driessen G.** 2003. Information acquisition and time allocation in insect parasitoids. *Trends in Ecology & Evolution*, 18: 81-87.
- van Oers K., De Jong G., Van Noordwijk A.J., Kempenaers B. y Drent P.J.** 2005. Contribution of genetics to the study of animal personalities: a review of case studies. *Behaviour*, 142: 1185-1206.
- van Lenteren J.C., Bakker K. y van Alphen J.J.M.** 1978. How to analyse host discrimination. *Ecological entomology*, 3: 71-75.

- Wajnberg E.** 1989. Analysis of variations of handling-time in *Trichogramma maidis*. *Entomophaga*, 34: 397-407.
- Wajnberg E.** 1991. Quality control of mass-reared arthropods: a genetical and statistical approach. En: Bigler F. (ed.), *Proceedings of the 5th Workshop of the Global IOBC Working Group Quality Control of Mass Reared Organisms*, Wageningen, The Netherlands. pp. 15–25.
- Wajnberg E.** 1993. Genetic variation in sex allocation in a parasitic wasp: variation in sex pattern within sequences of oviposition. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 69: 221-229.
- Wajnberg E.** 2004. Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control: why and how? En: Ehler L, Sforza R, Mateille T (eds), *Genetics, evolution and biological control*. CAB International, Wallingford, pp. 19-37.
- Wajnberg E.** 2010. Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. En: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, Springer Netherlands, pp. 149-165.
- Wajnberg E., Pizzol J. y Babault M.** 1989. Genetic variation in progeny allocation in *Trichogramma maidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 53: 177-187.
- Wajnberg E. y Colazza S.** 1998. Genetic variability in the area searched by a parasitic wasp: analysis from automatic video tracking of the walking path. *Journal of Insect Physiology*, 44: 437-444.
- Wajnberg E., Rosi M.C. y Colazza S.** 1999. Genetic variation in patch time allocation in a parasitic wasp. *Journal of Animal Ecology*, 68: 121-133.
- Wajnberg E., Curty C. y Colazza S.** 2004. Genetic variation in the mechanisms of direct mutual interference in a parasitic wasp: consequences in terms of patch time allocation. *Journal of Animal Ecology*, 73: 1179-1189.

## Capítulo 5

Quimiorreceptores y electrofisiología en el ovipositor  
de *D. longicaudata*

## Introducción

La habilidad de discriminar entre hospedadores parasitados previamente sólo puede ser posible si los parasitoides producen algún cambio en el hospedador luego de la parasitación y si son capaces, luego, de detectar ese cambio (van Lenteren 1981). Para diferenciar hospedadores parasitados de aquellos no parasitados, los parasitoides utilizan varios mecanismos que incluyen señales químicas (Vinson y Guillot 1972, Hubbard *et al.* 1987, McBrien y Mackauer 1991, Ueno y Tanaka 1996) y físicas (Takasu y Hirose 1988). En cuanto al primer tipo de señales, algunas especies depositan feromonas de marcado sobre o dentro de su hospedador. Esta señalización puede ocurrir, dependiendo de la especie, antes, durante o después de la parasitación (van Lenteren 1981). Algunos autores indican que estas señales químicas tienen un papel esencial en el reconocimiento de hospedadores parasitados por la misma hembra que depositó la señal (Hubbard *et al.* 1987, Völkl y Mackauer 1990, van Dijken *et al.* 1992, Visser 1993). En otros casos, algunas claves químicas pueden provenir de cambios en la condición del hospedador a causa de la parasitación: puede morir o quedar paralizado, puede alterar el desarrollo, puede producir alguna sustancia como reacción frente a un cuerpo extraño o simplemente el hospedador puede presentar un agujero por donde se realizó la oviposición por el cual exuda fluidos (van Lenteren 1981). Generalmente, la mayoría de los hospedadores móviles que se desarrollan en parches limitados (*e.g.* un fruto) son marcados sólo internamente, ya que una marca externa podría ser removida o transferida a hospedadores no parasitados.

Los parasitoides pueden detectar señales de feromonas con sensilas en las antenas, tarsos, ovipositor y en otras partes del cuerpo (Vilhelmsen *et al.* 2001, Wang *et al.* 2010, Obonyo *et al.* 2011) obteniendo información sobre el tamaño y calidad del hospedador [van Alphen *et al.* 2003 (Recuadro 2)]. Particularmente, se postula que las marcas internas depositadas dentro de un hospedador son detectadas por receptores específicos ubicados en el ovipositor. Esta es una estructura compleja asociada a los segmentos abdominales 8 y 9 de las hembras (Dweck *et al.* 2008) y que en endopterigotas del orden de los himenópteros (abejas y avispas) realizan múltiples funciones: depositar huevos, aplicar veneno, y localización, reconocimiento y aceptación de un hospedador para la oviposición (Papp 1974). La estructura general del ovipositor en himenópteros consta de 3 pares de valvas. El primer par (gonapófisis VIII)



es una prolongación del gonocoxito VIII del 8<sup>vo</sup> segmento abdominal y juntas forman la valva o estilete ventral. El segundo par (gonapófisis IX) es una prolongación del gonocoxito IX del 9<sup>no</sup> segmento abdominal y se fusionan para dar la valva o estilete dorsal. Por último, el tercer par (gonostilo) también es una prolongación del gonocoxito IX y componen las valvas externas que recubren a las valvas internas (las ventrales y la dorsal) (Dethier 1947, Ralec y Wajnberg, 1990). Las valvas ventrales y la valva dorsal están interconectadas y se deslizan longitudinalmente a través de un sistema de encastre (Le Ralec y Wajnberg 1990). Por el interior de esta estructura se forma un espacio por donde pasan los huevos y/o el veneno (Dweck *et al.* 2008). En himenópteros de hábitos parasitoides, esta estructura, formada por las valvas internas, rígida aunque flexible, y terminada en una punta aguda, es la que penetra al hospedador dejando al tercer par de valvas por fuera del mismo (Dethier 1947). En la mayoría de los parasitoides, el extremo distal del ovipositor (valvas internas) posee al menos uno o más tipos de receptores involucrados en la detección de estímulos tanto químicos de gustación como mecánicos (Ahmed *et al.* 2013). El hecho de que este tipo de estructuras se conserven en distintas especies sugiere funciones en común, aunque su distribución y densidad puedan variar.

Si bien muchos trabajos han estudiado la morfología externa e interna (ultraestructura) del ovipositor en distintas especies de parasitoides (*e.g.* Le Ralec y Wajnberg 1990, Brown y Anderson 1998, Dweck *et al.* 2008, Goubault *et al.* 2011, Shah 2012, Ahmed *et al.* 2013), muy pocos realizaron estudios electrofisiológicos para develar la función de los receptores allí presentes. La técnica desarrollada por Hodgson *et al.* (1955) permitió realizar estudios denominados de sensila única, en la que se estimula y registra la actividad de un único receptor. Algunos ejemplos de la utilización de esta técnica o modificaciones de ella (*e.g.* estimulación de varios receptores simultáneamente) aplicada a receptores gustativos del ovipositor pueden encontrarse en *Lucilia cuprina* Wied. (Diptera: Calliphoridae) (Rice 1976), *Rhagoletis pomonella* Walsh (Diptera: Tephritidae) (Crnjar *et al.* 1989), *Pieris brassicae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae) (Klijnstra y Roessingh 1986), *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Crambidae), *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) (Waladde *et al.* 1989), *Taeniopoda eques* Burmeister (Orthoptera: Romaleidae) (Tousson 2004), entre otros. Van Lenteren (1972) fue uno de los primeros en intentar evaluar la detección de marcas internas depositadas por un parasitoide [*Pseudeucoila*

*bochei* Weld (Hymenoptera: Cynipidae)] en larvas de *Drosophila* mediante técnicas de electrofisiología aplicadas al ovipositor. Continuando esos experimentos, Lammers y van der Starre (1978) lograron evidenciar una respuesta diferencial frente a estímulos como el agar, la levadura (medio donde se desarrolla el hospedador) y la hemolinfa de *Drosophila* estandarizando el número de receptores estimulados, aunque no pudieron detectar diferencias entre hemolinfa de larvas parasitadas y larvas no parasitadas. Más adelante, el único trabajo que buscó una respuesta diferencial a nivel de receptores periféricos fue el de van Lenteren *et al.* (2007), que utilizó como modelo al parasitoide *Leptopilina heterotoma* Förster (Hymenoptera: Figitidae), con una conocida capacidad de discriminación, incluso entre hospedadores con distinto número de huevos (van Lenteren, 1976). Si bien los receptores gustativos ubicados en las valvas internas están generalmente al mismo nivel de la cutícula o dentro de una concavidad, el ovipositor de este parasitoide presenta un receptor de gustación (denominada sensila coelocónica) en el extremo apical de una de las valvas ventrales que permite ser estimulada según la técnica de sensila única. Si bien estos autores fueron capaces de obtener respuestas mediante esta técnica, no pudieron evidenciar su funcionalidad en la discriminación.

En *Diachasmimorpha longicaudata*, Greany *et al.* (1977) describieron la morfología externa y la ultraestructura de las valvas internas del ovipositor a través de estudios de microscopía de barrido y transmisión, respectivamente. Estos autores describieron dos tipos de estructuras en el extremo terminal que corresponderían a receptores mecánicos y de gustación. Estos últimos poseen un único poro abierto al exterior, lo que impulsó la hipótesis de funciones de detección de sustancias solubles asociadas a hospedadores adecuados o inadecuados, que promuevan o eviten la oviposición, respectivamente. Greany *et al.* (1977) destacaron la necesidad de realizar estudios electrofisiológicos para corroborar esas hipótesis. Más recientemente y en la misma especie, Stuhl *et al.* (2011) determinaron una respuesta electrofisiológica positiva en sensilas del ovipositor entero frente a para-ethylacetofenona, un componente volátil propio de larvas hospedadoras, y un químico análogo al atrayente de derivado floral, acetofenona. Este compuesto logró estimular, además, la inserción del ovipositor y oviposiciones en sustratos naturales y artificiales.

En el Capítulo 3 el objetivo fue determinar la habilidad de hembras de *D. longicaudata* para discriminar entre distintas calidades de hospedadores (previamente

parasitados o no), corroborando parcialmente las hipótesis aunque con cierta variabilidad entre individuos. A partir del trabajo de Greany *et al.* (1977), en el presente Capítulo se propuso abordar el mismo aspecto desde un punto de vista morfológico y electrofisiológico a nivel de potenciales receptores gustativos en el ovipositor. Mediante microscopía electrónica de barrido se estudió la morfología externa del ovipositor y con esta información se realizaron pruebas electrofisiológicas utilizando hemolinfa de larvas parasitadas y no parasitadas de *Ceratitis capitata*.

### 5.1. Objetivos

#### Objetivo general

Evaluar el rol del ovipositor de *D. longicaudata* en la discriminación de larvas de *C. capitata* con distinto estado de parasitación.

#### Objetivos específicos

5.1. Determinar la presencia y ubicación de posibles receptores gustativos en las valvas internas del ovipositor de *D. longicaudata*.

5.2. Estudiar la respuesta electrofisiológica de órganos sensoriales ubicados en el ovipositor de *D. longicaudata* frente a claves gustativas provenientes de la hemolinfa de larvas parasitadas y no parasitadas de *C. capitata*.

## **Materiales y Métodos**

### 5.1. Insectos

Las hembras de *D. longicaudata* utilizadas para la observación del ovipositor mediante microscopía electrónica de barrido fueron obtenidas de la misma manera que en los capítulos anteriores, de la cría del IGAEF. Los especímenes utilizados para ensayos de electrofisiología fueron obtenidos de la cría mantenida en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agropecuarias (IVIA, Valencia, España), donde se utiliza *C. capitata* como hospedador. Pupas parasitadas de *C. capitata* fueron enviadas periódicamente por el Laboratorio de Control de Insectos Plaga, Laboratorios de Agricultura y Biotecnología, FAO/IAEA (Seibersdorf, Austria) al Laboratorio de Entomología de la

Universidad de Wageningen (Wageningen, Países Bajos), donde fueron acondicionadas para la emergencia de los parasitoides en cámaras a 26°C, 45% humedad relativa (HR) y rociadas con agua diariamente para evitar desecación. Luego, machos y hembras emergidos fueron mantenidos juntos en una jaula de cría (30 x 30 x 30 cm) ubicada en otra cámara a 21°C, 45% HR, rociado con agua diariamente y con fotoperíodo luz:oscuridad de 8:14 hs. Estos insectos fueron mantenidos con agua y miel. Para las imágenes de microscopía electrónica se utilizaron hembras del parasitoide de edad desconocida y las mediciones electrofisiológicas se realizaron en hembras de entre 10 y 25 días de edad.

A su vez, en ese mismo laboratorio se estableció una cría de *C. capitata* a partir del material enviado por el Laboratorio de Control de Insectos Plaga, Laboratorios de Agricultura y Biotecnología, FAO/IAEA (Seibersdorf, Austria). La dieta de larvas fue preparada con los ingredientes y protocolo utilizados en dicho laboratorio (por kg de dieta: 70 g de levadura, 2.5 g de benzoato de sodio, 2 g de nipagín, 770 ml de agua, 8 ml de HCl, 150 g de polvo de zanahoria). Los adultos fueron provistos de agua, miel y una mezcla de azúcar y levadura (en una proporción de 3:1 aproximadamente). Entre una y dos veces por semana se recolectaron huevos utilizando un envase plástico con orificios a modo de fruto artificial. Los huevos fueron burbujeados en agua por 2 días antes de ser sembrados en unidades de dieta (cajas de Petri plásticas estándar). Este material fue mantenido en cámara a 25°C, 45% HR. Las larvas no utilizadas para ensayos de electrofisiología fueron conservadas para reposición de la cría de moscas.

## 5.2. Morfología y ubicación de receptores de gustación

Se observaron valvas internas del ovipositor de *D. longicaudata* mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) con el fin de confirmar los hallazgos de Greaney *et al.* (1977) y determinar la ubicación de potenciales receptores gustativos para luego realizar mediciones electrofisiológicas. Aproximadamente 20 muestras fueron observadas con un microscopio Supra 40 (Carl Zeiss NTS GmbH, Alemania) en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA, FCEyN, UBA) y otras 10 con un microscopio XL-30 (Philips, Países Bajos) en Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia. Algunas muestras fueron observadas en el Centro de Microscopía

Electrónica de Wageningen (Universidad de Wageningen, Wageningen, Países Bajos) en un equipo Magellan 400 (FEI, EEUU), pero no dieron resultados satisfactorios.

A partir de hembras anestesiadas con CO<sub>2</sub>, las valvas internas fueron expuestas, cortadas y transferidas a una solución de alcohol etílico al 50% (EtOH 100% y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) para su deshidratación. Una vez obtenidos los ovipositores, las valvas pares y la impar de algunas de ellas fueron separadas para una mejor visibilidad de todas las superficies. Cada 15 minutos, las muestras fueron transferidas a soluciones crecientes de alcoholes (soluciones al 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% de EtOH y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Una vez finalizada la deshidratación y 24 hs después de pasar por la serie de alcoholes, las muestras fueron montadas en un porta-muestras utilizando cinta de carbono bifaz y se conservaron en un desecador hasta la realización del metalizado (revestimiento de las muestras con carbono u oro-paladio por bombardeo iónico) y observación en el microscopio. No se realizó secado a punto crítico al considerar que el ovipositor es una estructura prácticamente sólida y que no se colapsaría en el MEB.

### 5.3. Electrofisiología de receptores gustativos

#### 5.3.1. Dispositivo de registro

Los ensayos presentados se llevaron a cabo en el Laboratorio de Entomología de la Universidad de Wageningen. La Figura 5.1 muestra un esquema general del dispositivo de medición empleado y sus componentes básicos. Las mediciones electrofisiológicas se realizaron sobre una mesa anti-vibratoria de base metálica, soportando una jaula de Faraday. El dispositivo de medición, ubicado dentro de esta jaula, consta de dos electrodos que contactan con la muestra biológica y transmiten, por diferencia de potenciales, una señal eléctrica a un primer amplificador específico para procesamiento de señales emitidas por receptores gustativos (TastePROBE DTP-02, Syntech, Alemania). Desde este punto la señal llega a una PC luego de ser amplificada y filtrada por un segundo amplificador (IDAC 4, Syntech, Alemania), permitiendo una visualización de tipo osciloscopio. En ambos electrodos (Figura 5.2a) se utilizó un cable de plata (0,3 – 0,5 mm Ø) y solución salina (*buffer* fosfato salino, PBS) contenidos en un capilar de vidrio (1,5 mm Ø) para la conducción de la señal eléctrica. Los capilares se prepararon con un *Puller* (Narishige, Modelo PB-7, Japón) de forma tal de obtener uno de los extremos con un diámetro de apertura suficientemente pequeño como para

poder aplicar el estímulo con el electrodo de referencia y también poder ser insertado en el abdomen con el electrodo activo (ver explicación más adelante).

Cada electrodo se fijó a un micromanipulador (Syntech, Alemania) por medio de la varilla metálica (Figura 5.2a) permitiendo una aproximación y movimientos precisos. Ambos electrodos se conectaron a tierra y el electrodo activo, además, al TastePROBE. En este equipo se establecieron parámetros de configuración para un correcto registro de la señal, principalmente la duración de captura de la señal y el umbral de detección, dejando el resto de las opciones por defecto. La diferencia de potenciales registrada fue importada a través del amplificador/controlador IDAC 4, conectado vía USB a una computadora. El sistema incorpora un pedal que, al accionarlo, indica en el visor del

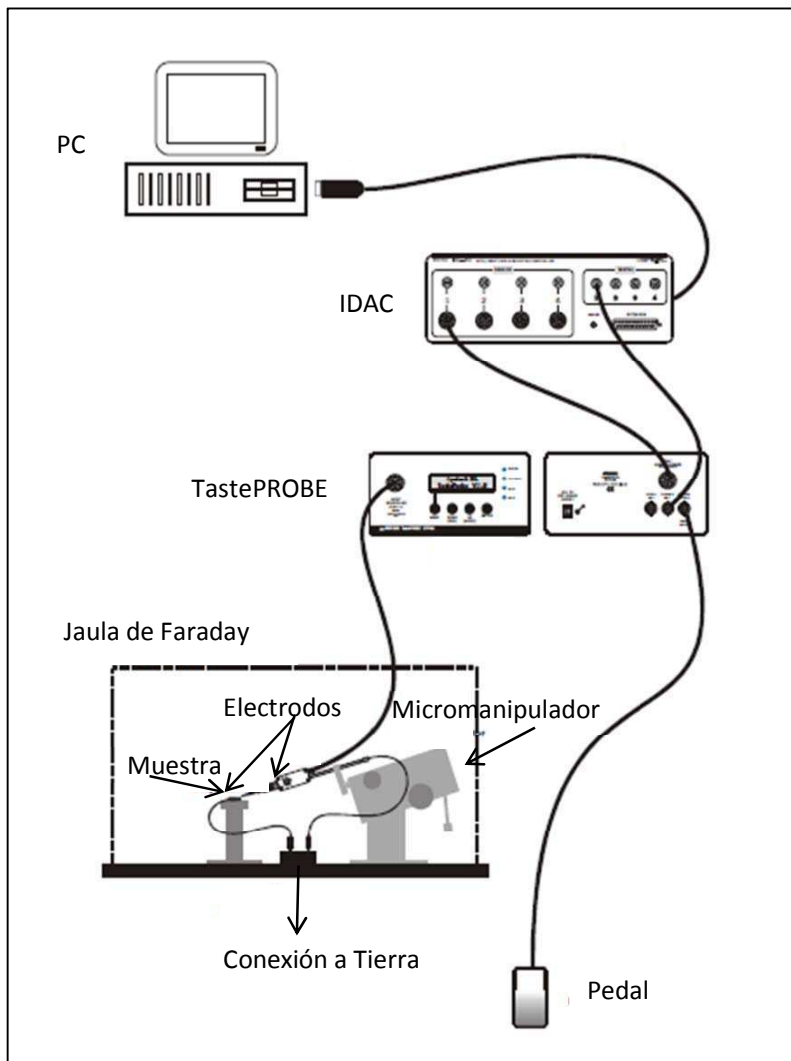


Figura 5.1. Esquema general del equipo de medición de señales gustativas. La muestra es contactada por un electrodo de referencia y por otro con un estímulo disuelto en PBS. La diferencia de potenciales eléctricos es capturada por el TastePROBE y amplificada por el IDAC. La información es procesada y visualizada en una computadora de escritorio. El inicio de la grabación de la actividad neuronal es activado por un pedal.

Adaptado de <http://www.syntech.nl/manuals/TastePROBE.pdf>

TastePROBE que el sistema está listo para iniciar el registro eléctrico al realizar el contacto con la muestra. Se utilizó el software Autospike v.3.7 (Syntech) como interface para el registro y análisis de las señales.



Figura 5.2. a) Soportes para electrodo de referencia y electrodo activo. Éste último, provisto de un pre-amplificador de la señal. b) Conexión del electrodo activo al equipo de registro de señales TastePROBE DTP-02. c) Amplificador y filtro IDAC 4.

### 5.3.2. Procedimiento para el registro de la señal electrofisiológica

Las estructuras estudiadas fueron las valvas internas del ovipositor de hembras de *D. longicaudata*. Específicamente, el interés estuvo enfocado en los receptores gustativos descritos por Greany *et al.* (1977).

Para la preparación de cada muestra biológica, se tomó una hembra de la jaula de cría y se la disecó bajo lupa (65X) (WILD M3C, Heerbrugg, Suiza): se separó el abdomen e inmediatamente, desde el extremo abierto se realizaron pequeñas incisiones en su interior con una tijera entomológica con el fin de cortar músculos y evitar contracciones y movimientos espásticos (que podían durar hasta por varios minutos) del ovipositor al momento del registro. Luego, las valvas externas fueron cortadas y retiradas para exponer las internas. La muestra fue ubicada por la sección transversal abierta del abdomen en el electrodo activo (aunque indistintamente también podría haberse ubicado en el electrodo de referencia) conteniendo solución salina (Figura 5.3).

De esa manera, la muestra quedaba lista para que se le aplicaran los siguientes estímulos: hemolinfa de larva L3 de *C. capitata* no parasitada (LNP) extraída de la dieta; hemolinfa de larva parasitada con una anterioridad de 24hs (LP24); hemolinfa de larva parasitada momentos previos (aún paralizada) al comienzo del registro (LP0). Las larvas LP fueron obtenidas a partir de la parasitación de otras hembras no evaluadas.

Para la obtención de cada estímulo, las larvas fueron lavadas con agua desmineralizada, realizando luego un corte con tijera entomológica. Una pequeña cantidad de hemolinfa era incorporada en el capilar de referencia que ya contenía solución salina. El estímulo fue incorporado en el electrodo de referencia en el instante previo al inicio del registro de la actividad neuronal. Todo el procedimiento, desde la disección del parasitoide, obtención de la hemolinfa y hasta el inicio del registro de la señal, se realizó lo más rápido posible para evitar el deterioro del material biológico, nunca superando los 5 minutos. Inmediatamente después de la preparación del estímulo, empleando el micromanipulador se aproximó el electrodo hacia el extremo distal del ovipositor. Se presionó el pedal para preparar el inicio del registro que comenzaría al contactar un receptor gustativo con el estímulo.

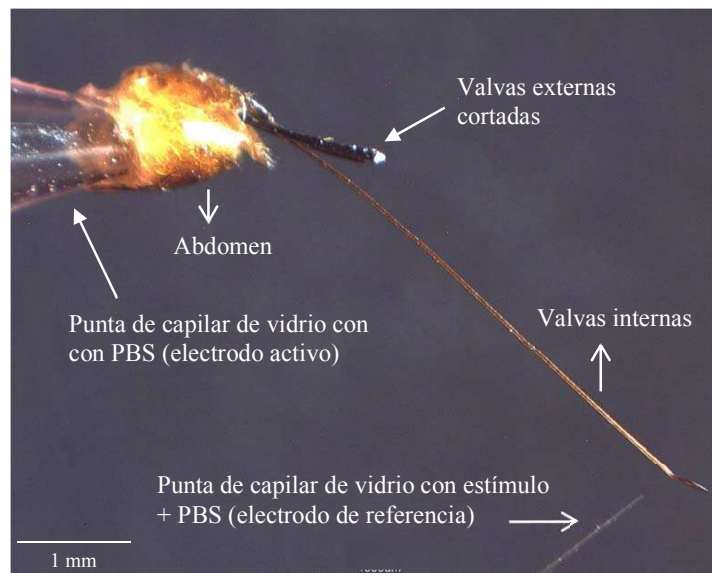


Figura 5.3. Montaje del abdomen al capilar de vidrio conteniendo el electrodo activo (no se muestra) con valvas internas expuestas para su estimulación mediante el segundo capilar conteniendo el electrodo de referencia.

Según Greany *et al.* (1977), la mayor densidad de quimiorreceptores parece encontrarse en la valva dorsal (o impar), en el extremo distal, pero luego de varios intentos fallidos de estimular esta región del ovipositor, se decidió realizar las mediciones en receptores de las valvas ventrales, ya que habían mostrado mejores resultados durante la puesta a punto. Con la intención de repetir la metodología de van



Lenteren *et al.* (2007) de emplear la técnica de sensilla única (Hodgson *et al.* 1956) en la que sólo un receptor es estimulado, el diámetro del extremo del capilar con el que se aplicó el estímulo era varias veces menor que el diámetro del ovipositor (considerando solo valvas internas). Comenzando por el extremo distal, el contacto se realizó de manera perpendicular a lo largo del ovipositor y se recorrió la superficie de una de las valvas ventrales, considerando que ambas generan la misma respuesta. La visualización de la actividad eléctrica en la PC indicó el correcto contacto con un receptor y a partir de ese momento se dejó de mover el micromanipulador. La duración de cada registro fue de 5 segundos.

Cada ovipositor fue evaluado sólo con un par de estímulos aplicados en un orden secuencial: 1) LNP vs. LP0; 2) LNP vs. LP24. El orden de aplicación del par de estímulos fue aleatorizado para cada ovipositor evaluado, obteniendo efectivamente un total de 8 réplicas para LNP-LP0; 7 réplicas para LP0-LNP; 7 réplicas para LNP-LP24; 11 réplicas para LP24-LNP. Como control negativo se realizaron estimulaciones con solución salina PBS (5 réplicas; *i.e.* 5 ovipositores). Para cada estímulo se registró una serie de 3 mediciones (pseudoréplicas) y en cada una de ellas, el tipo de hemolinfa correspondiente fue renovada tomándola con el mismo capilar a partir de una misma larva. Antes de continuar con el segundo estímulo, el extremo distal del ovipositor (aún montado en el electrodo) fue sumergido en un capilar con agua desmineralizada y secado suavemente con un papel de filtro. A su vez, el capilar de referencia fue reemplazado por otro con PBS limpio, incorporándose luego el estímulo correspondiente. Al finalizar con la evaluación de un ovipositor determinado, éste era descartado (eventualmente también se renovó el capilar del electrodo activo) y se cambiaba el capilar del electrodo de referencia con PBS limpio. Al desconocer cómo puede afectar el tiempo de vida del preparado y la aplicación de un primer estímulo frente al segundo en la respuesta electrofisiológica, esta metodología permitió analizar los registros de manera pareada o, de corroborar ese efecto o un decaimiento por muerte celular, solamente el primer registro (promediando las 3 pseudoréplicas).

#### *Análisis de datos*

Previo a la comparación entre la respuesta electrofisiológica frente a los distintos estímulos se evaluó el decaimiento de la respuesta de los receptores con el transcurso de tiempo desde el inicio de la estimulación. Aprovechando la aplicación de estímulos de a

pares, mediante una prueba de t pareada se comparó la frecuencia de potenciales de acción (PAs). Se comparó la frecuencia de PAs tomando el primer segundo de estimulación entre la respuesta ante LNP aplicada como primer estímulo y la respuesta ante LP aplicada como segundo estímulo y viceversa (realizando el mismo análisis para los pares LP0-LNP y LP24-LNP). Se comprobó el supuesto de normalidad de los residuos.

Alternativamente y siguiendo la metodología de van Lenteren *et al.* (2007), se comparó la frecuencia de PAs mediante una prueba de t considerando solamente el primer estímulo aplicado, promediando las frecuencias de PAs de los registros de la serie (pseudoréplicas) que hayan podido ser procesados correctamente por el conteo confiable de los PAs. Se comprobó el supuesto de normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas entre grupos.

Para evaluar el fenómeno de adaptación al estímulo, se observó la curva de decaimiento en el tiempo de las frecuencias de PAs para cada tipo de estímulo aplicado en primer o segundo orden.

## Resultados

### 5.1. Morfología y ubicación de receptores

La Figura 5.4 muestra imágenes de MEB de las valvas internas del ovipositor de *D. longicaudata*. La estructura general formada por las valvas internas es de forma aguzada y con protuberancias transversales en ambos pares de valvas que posiblemente cumplan con un rol de sujeción al hospedador (obs. pers, Le Ralec and Wajnberg 1990, Brown and Anderson 1998, Cónsoli *et al.* 1999, Dweck *et al.* 2008, Nacro and Nenon 2009, Wang *et al.* 2010) (Figura 5.4.a). Pudo corroborarse la presencia de estructuras que coinciden con las descritas por Greaney *et al.* (1977). Se encontró una alta densidad de estos receptores en el borde apical de la valva interna dorsal, haciéndose menos abundantes hacia la zona basal, hasta la primera protuberancia (Figuras 5.4.c y d). Ambas valvas ventrales son idénticas, aserradas (protuberancias) y con sólo un receptor entre cada protuberancia (Figura 5.4.b). La presencia de un único poro en el centro de la

concavidad de cada receptor, tanto en valva dorsal (Figura 5.5.a) como en las ventrales (Figura 5.5.c y d), sugieren una función quimiorreceptora (van Loon, com. pers.).

## 5.2. Electrofisiología

El control negativo de estimulación con PBS no generó PAs distinguibles, comparando el tipo de señal obtenido para la estimulación con cualquiera de los tipos de hemolinfa empleados (Figura 5.6.a). La Figura 5.6.b muestra un ejemplo exitoso del registro de PAs tras la estimulación con hemolinfa de *C. capitata*.

Tomando los datos en los que se comparó la respuesta ante los estímulos LNP y LP0 se determinó que el orden de aplicación del estímulo es importante, seguramente por la decadencia de la vida de la muestra (ovipositor): cuando LNP fue aplicado primero, la frecuencia de PAs fue mayor a la registrada al aplicar LP0 como segundo estímulo (Prueba t pareada:  $t = 4,04$ ; g.l. = 7;  $P = 0,005$ ) (Figura 5.7.a); cuando LNP fue aplicado como segundo estímulo, las frecuencias de PAs fueron menores (aunque no estadísticamente significativas) respecto a los valores obtenidos al aplicar LP0 como primer estímulo (Prueba t pareada:  $t = 2,02$ ; g.l. = 6;  $P = 0,089$ ) (Figura 5.7.b). De manera similar, al analizar los casos estimulados con LNP y LP24, se encontraron resultados con la misma tendencia anterior: el primer estímulo generó una mayor frecuencia que el segundo estímulo, independientemente de cuáles fueran estos (Pruebas de t pareadas: 1° LNP - 2° LP24:  $t = 8,21$ ; g.l. = 6;  $P < 0,001$ . 1° LP24 - 2° LNP:  $t = 4,65$ ; g.l. = 10;  $P < 0,001$ ) (Figuras 5.8.a y b).

El análisis agrupado de los datos para cada combinación (LNP-LP0 ó LNP-LP24), independientemente del tipo de estímulo que haya sido aplicado y considerando solamente el orden de aplicación, confirmó la tendencia antes mencionada en la que siempre el primer estímulo genera una mayor frecuencia de PAs que el segundo estímulo aplicado (Pruebas de t pareadas: LNP-LP0:  $t = 4,16$ ; g.l. = 14;  $P < 0,001$ . LNP-LP24:  $t = 7,60$ ; g.l. = 17;  $P < 0,001$ ) (Figura 5.9).

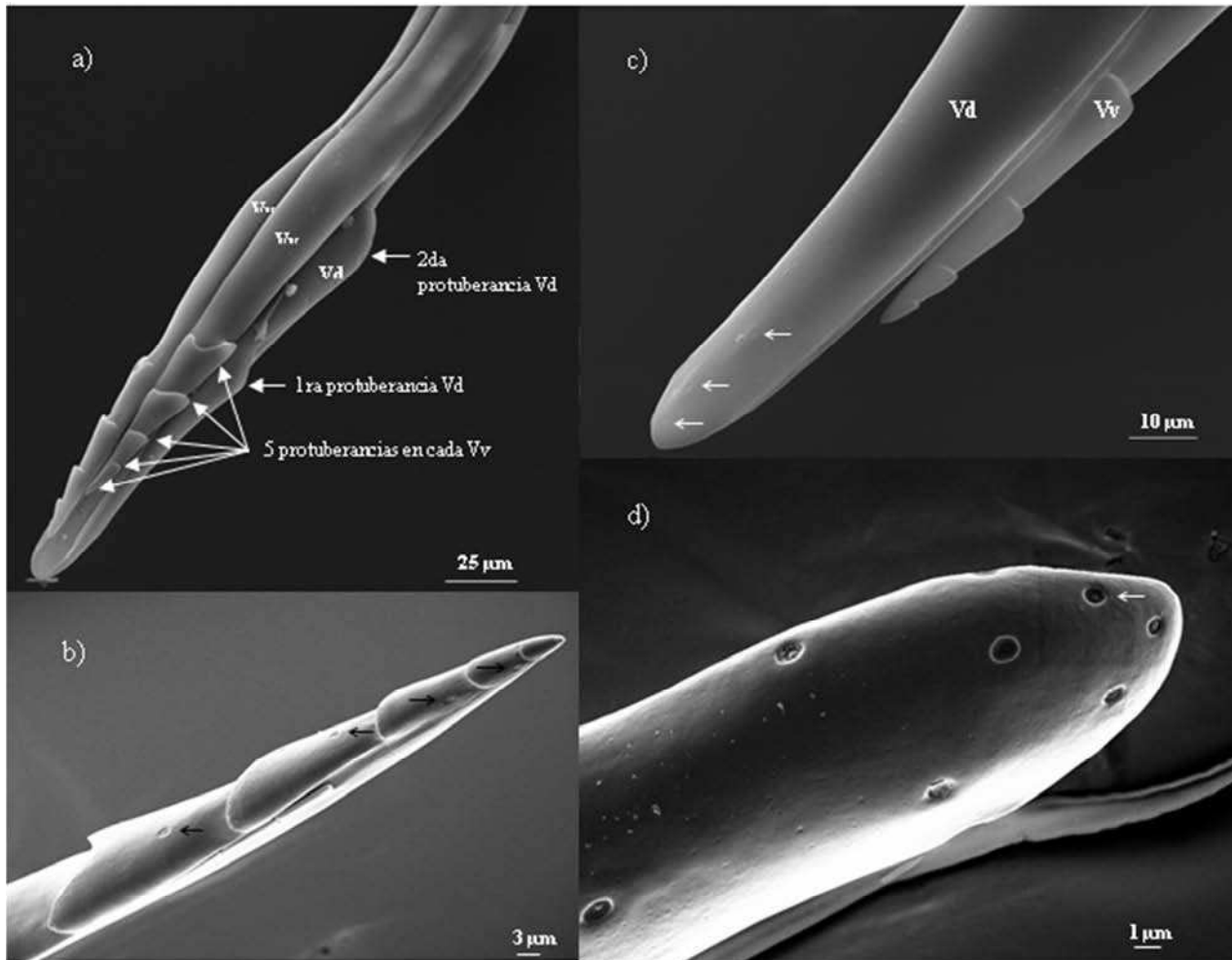


Figura 5.4. Imágenes de MEB del ovipositor de *Diachasmimorpha longicaudata*. a) Estructura general del extremo distal en vista ventral; b) Lado interno de una valva ventral; c) Extremo distal en vista lateral; d) Vista dorsal de la punta de la valva dorsal.  $V_v$  = valva ventral;  $V_d$  = valva dorsal; las flechas en b), c) y d) indican la posición de receptores.

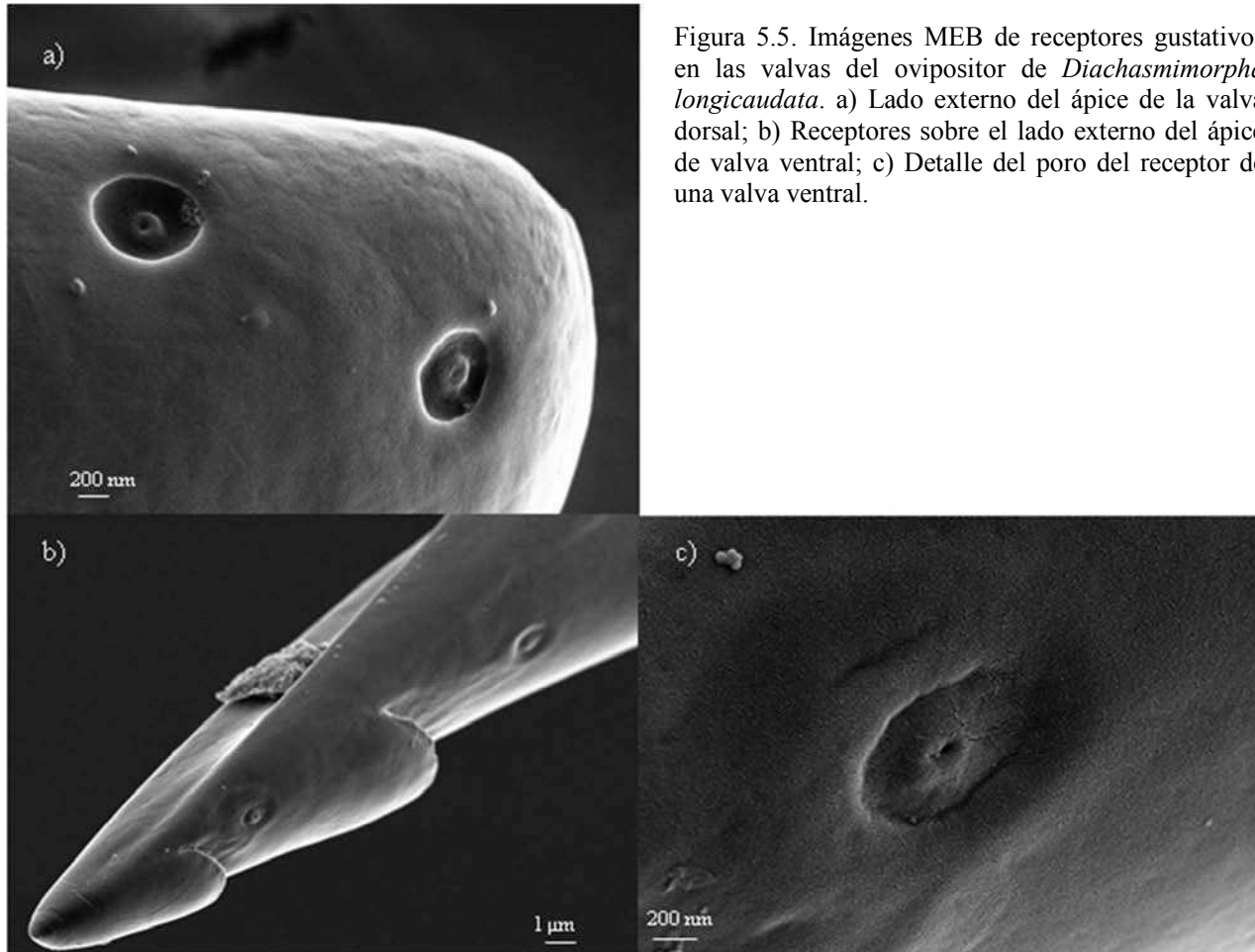


Figura 5.5. Imágenes MEB de receptores gustativos en las valvas del ovipositor de *Diachasmimorpha longicaudata*. a) Lado externo del ápice de la valva dorsal; b) Receptores sobre el lado externo del ápice de valva ventral; c) Detalle del poro del receptor de una valva ventral.

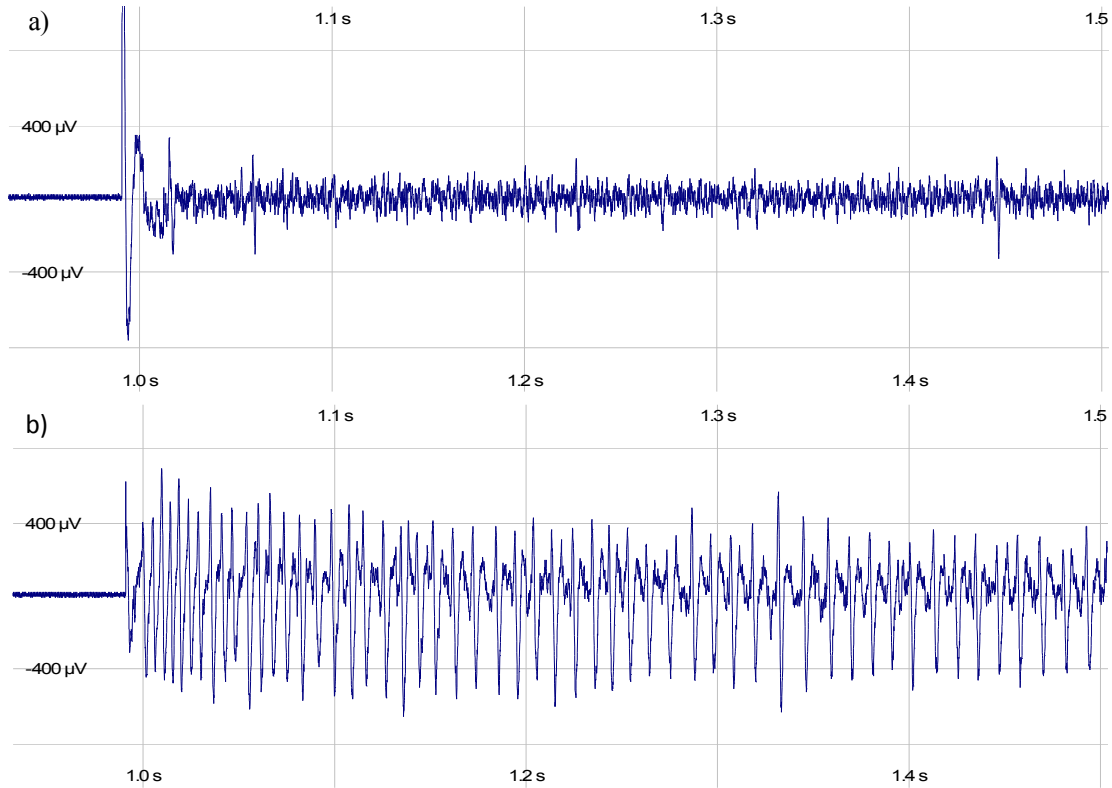


Figura 5.6. Ejemplos de señales electrofisiológicas de receptores gustativos del ovipositor de *Diachasmimorpha longicaudata* al estimular con a) solución salina y b) solución salina + hemolinfa de larva de *Ceratitis capitata*.

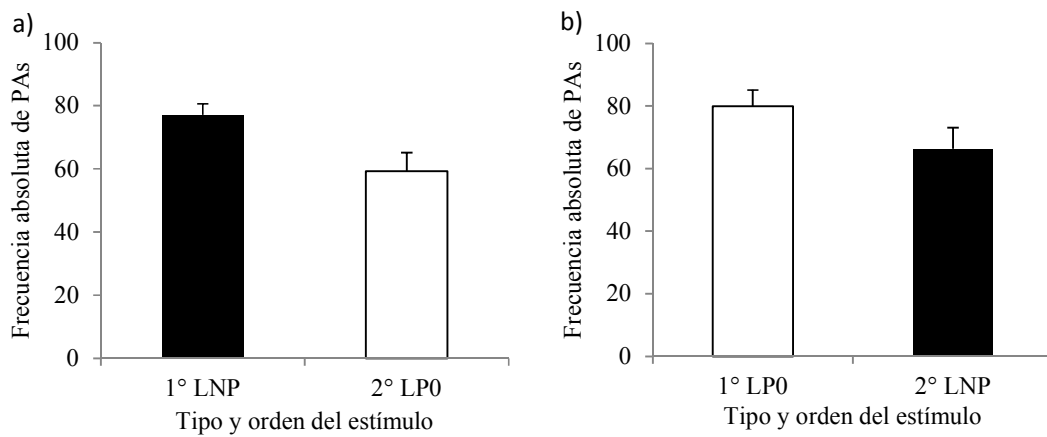


Figura 5.7. Promedio del número de potenciales de acción (PAs) obtenidos tras la aplicación de dos estímulos a un mismo ovipositor. a) Casos donde hemolinfa de larva no parasitada (LNP) fue aplicada como primer estímulo y hemolinfa de larva parasitada minutos antes del ensayo (LP0) como segundo estímulo. b) Casos con aplicación de estímulos en orden inverso a a). Las barras indican el error estándar del promedio.

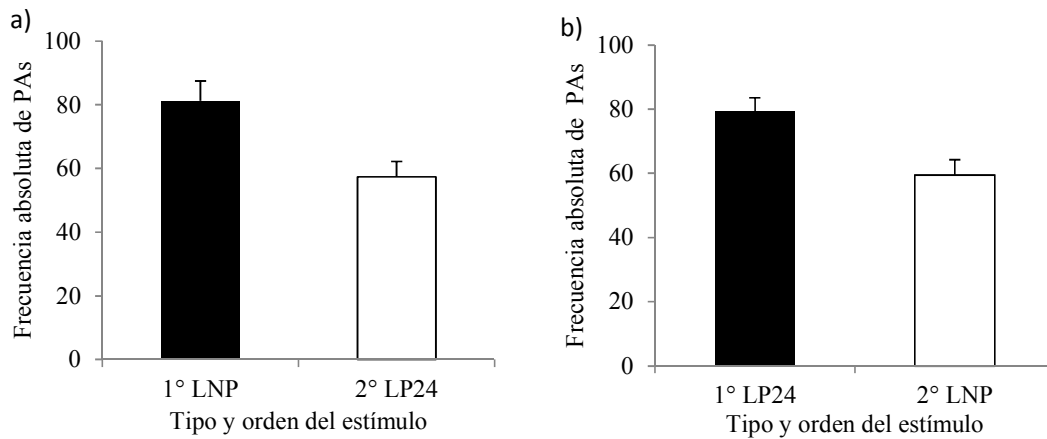


Figura 5.8. Promedio del número de potenciales de acción (PAs) obtenidos tras la aplicación de dos estímulos a un mismo ovipositor. a) Casos donde hemolinfa de larva no parasitada (LNP) fue aplicada como primer estímulo y hemolinfa de larva parasitada 24 hs antes del ensayo (LP24) como segundo estímulo. b) Casos con aplicación de estímulos en orden inverso a a). Las barras indican el error estándar del promedio.

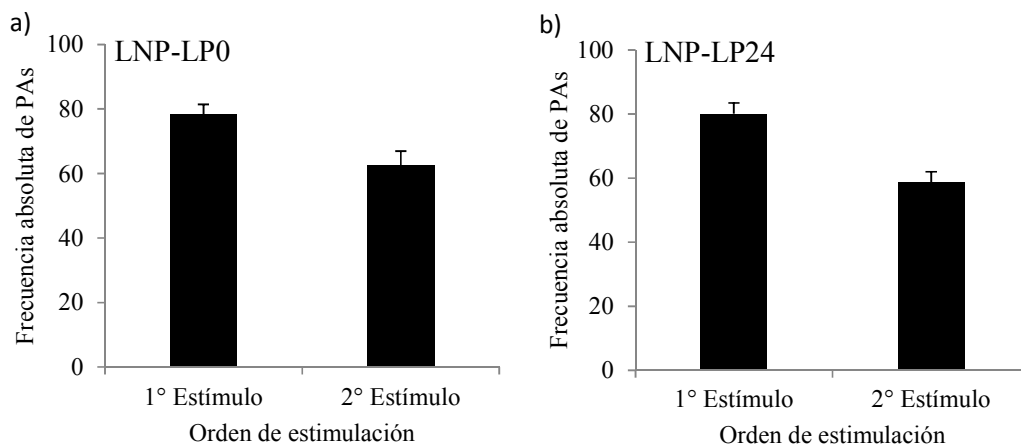


Figura 5.9. Número promedio de potenciales de acción (PAs) obtenidos de la aplicación de dos estímulos a un mismo ovipositor. a) Hemolinfa de larva no parasitada (LNP) ó parasitada minutos antes del ensayo (LP0) aplicados como primer estímulo comparados con LNP ó LP0 aplicados como segundo estímulo. b) ídem, utilizando hemolinfa de larva parasitada 24hs antes del ensayo (LP24). Las barras indican el error estándar del promedio.

Estos resultados demostraron un decaimiento en el tiempo del estado del preparado, haciendo que las primeras estimulaciones tuvieran una mayor respuesta que las siguientes, independientemente del estímulo aplicado. Por lo tanto, se consideraron como únicos resultados electrofisiológicos válidos a las respuestas ante los primeros estímulos aplicados descartando la segunda serie de registros. No se encontraron diferencias en la frecuencia de PAs generados en el primer segundo entre ninguno de los tres estímulos utilizados (ANOVA:  $F_{(2,40)} = 0,142$ ,  $P = 0,868$ ) (Figura 5.10).

Se observó un fenómeno de adaptación en los receptores gustativos del ovipositor de *D. longicaudata*, es decir, una fuerte caída de la frecuencia de PAs entre los 100 y 300 mseg tras el contacto con el estímulo, seguido de una frecuencia de disparo casi constante durante la continua estimulación durante el primer segundo de estimulación. Esto ocurrió en todas las combinaciones de estímulos y orden de aplicación (Figuras 5.6.b y 5.11).

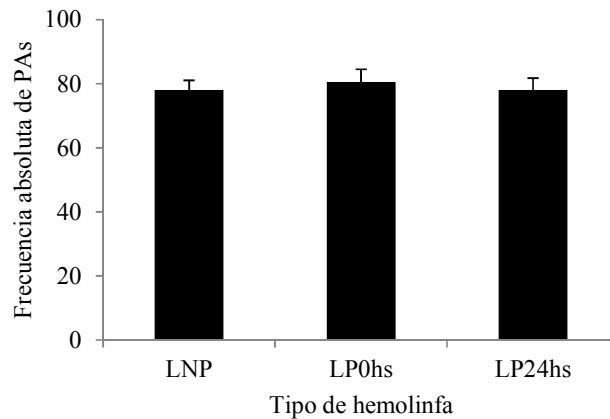


Figura 5.10. Frecuencia absoluta de PAs generados durante la primera serie de estimulaciones con hemolinfa de larva no parasitada (LNP); parasitada inmediatamente antes del registro (LP0); parasitada 24hs antes del registro (LP24). Las barras indican el error estándar del promedio.



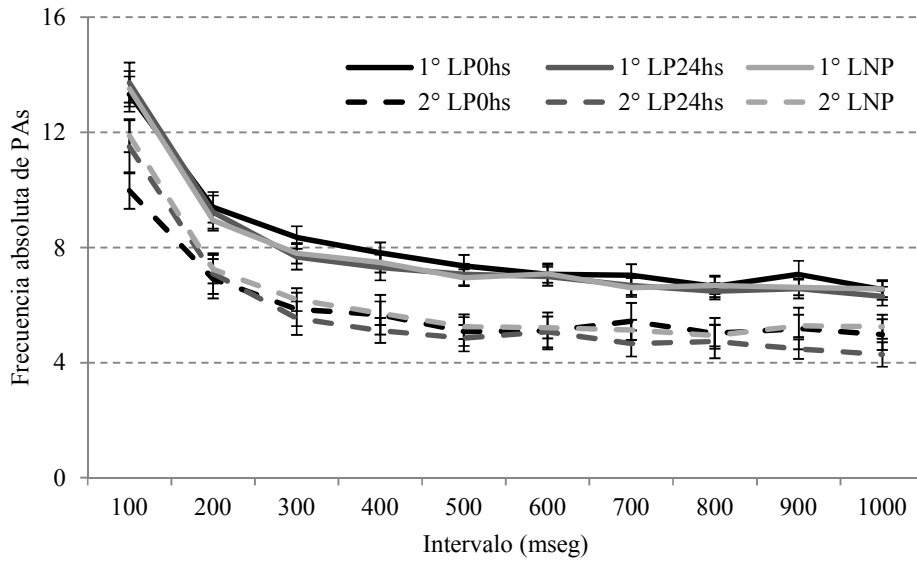


Figura 5.11. Fenómeno de adaptación luego de la aplicación del estímulo, indicando la el número de PAs en intervalos de 100 mseg. Se muestra el promedio del número de PAs generados por cada estímulo (LNP, LP0 y LP24), aplicados primero (1°) o a continuación de otro estímulo (2°). Las barras indican el error estándar del promedio.

## Discusión

Las imágenes de MEB evidenciaron la presencia de al menos un tipo de receptor en la zona distal del ovipositor (valvas internas) de *D. longicaudata*, confirmando y mejorando la calidad de las imágenes obtenidas por Greany *et al.* (1977). La mayor densidad de receptores se ubicó en el ápice de la valva dorsal. Si bien no fueron contabilizados, la morfología a este nivel también es característica de la especie (Ruschioni, com. pers.). En cada una de las valvas ventrales se observaron receptores del mismo tipo, uno entre cada protuberancia. Greany *et al.* (1977) denominaron a estos receptores como sensilas en forma de domo (dome-shape sensila en inglés) por conformarse de una pequeña protuberancia inmersa en una concavidad respecto a la superficie cuticular. La distribución y tipo de sensilas halladas muestra correspondencia con lo descrito para otros braconídeos de hábito endoparasitoide. Por ejemplo, el endoparasitoide poliembriónico *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae) posee a lo largo de las dos terceras partes de las valvas ventrales y a lo largo de la mayor parte de la valva dorsal sensilas coelocónicas [con igual morfología

que las llamadas sensilas en forma de domo por Greany *et al.* (1977)], incluso más densamente distribuidas en el ápice de la valva dorsal (Ahmed *et al.* 2013). Comparativamente, en la figura 10 del trabajo de Dweck *et al.* (2008) pueden observarse receptores en la valva dorsal del ectoparasitoide larval *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) en una densidad y ubicación muy semejante a las encontradas en *D. longicaudata*. Estos receptores, denominados sensilas campaniformes, fueron los únicos hallados en las valvas internas del ovipositor y no poseen apertura al exterior. Receptores de este tipo fueron también descritos en *Trichogramma brassicae* (= *maidis*) Westwood (LeRalec y Wajnberg 1990), *T. galloi* Zucchi y *T. pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Cónsoli *et al.* 1999), y *Anagrus breviphragma* Soyka (Hymenoptera: Mymaridae) (Chiappini y Solinas 2002) y se sugiere que su función es la de percibir claves estrictamente táctiles asociadas a la discriminación de distintos estados larvales de una misma especie hospedadora (Dweck *et al.* 2008). La descripción de una única apertura al exterior coincide con aquella realizada por Greany *et al.* (1977) mediante microscopía electrónica de transmisión y los resultados morfológicos del presente estudio (Figura 5.5). Asimismo, este tipo de estructuras han sido descritas en los parasitoides *Trybliographa rapae* Westwood (Hymenoptera: Figitidae) (Brown y Anderson, 1998), *L. heterotoma* (van Lenteren *et al.* 2007), *Aprostocetus procerae* Risbec (Hymenoptera: Eulophidae) (Nacro y Nenon 2009), *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Shah 2012) y *Ampulex compressa* Fabricius (Hymenoptera: Ampulicidae) (Gal *et al.* 2014) y parecieran estar involucradas en percibir estímulos táctiles (Ahmed *et al.* 2013), pero también son consideradas como quimiorreceptores y termo-higro receptores (Altner y Prillinger 1980, van Lenteren 1981).

En cuanto a la función biológica evaluada en *D. longicaudata* se destaca el hecho de haber logrado la estimulación individual en distintos receptores (aunque sólo en valvas ventrales) con hemolinfa de larvas de *C. capitata*, permitiendo confirmar su función gustativa y de detección de fluidos de ese hospedador. Esta es la primera vez que se registra la actividad de dichos receptores en *D. longicaudata* y, además, de manera individual. Este tipo de estimulación de sensila única evidenció, en el patrón de PAs, la actividad de una única neurona por receptor. Esto concuerda y se suma a lo descrito por Greany *et al.* (1977), quienes postularon que solo una neurona quimiorreceptora inervaba estas estructuras sobre la base de las imágenes de

transmisión. Los resultados sugieren que estos receptores, aún cuando responden a la hemolinfa de su hospedador, no estarían involucrados en la discriminación entre larvas parasitadas y no parasitadas. La similitud en las curvas de adaptación al estímulo aplicado, independientemente del tipo de hemolinfa que fuera, sugieren que una posible función de estos receptores sea la de determinar la posición del ovipositor dentro del hospedador al penetrar el fruto donde éste se encuentra. Alternativamente, la función de estos receptores podría ser la de distinguir entre larvas de especies hospedadoras y otras especies o el estado de desarrollo (Dweck *et al.* 2008). Estos resultados se asemejan a aquellos publicados por van Lenteren *et al.* (2007) en el ovipositor de *L. heterotoma* utilizando hemolinfa de su hospedador natural, larvas de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). Este es un endoparásitoide solitario que tiene la capacidad comportamental de discriminar el estado de parasitación, supuestamente con información adquirida a través de receptores ubicados en su ovipositor (van Lenteren y Bakker 1975, van Lenteren 1976, 1981), más específicamente mediante receptores gustativos (van Lenteren 1981). Esta especie tiene alrededor de 110 sensilas en su ovipositor, 7 de las cuales son presuntamente quimiorreceptores que, además, están concentrados en el extremo distal (van Battum 1972). van Lenteren *et al.* (2007) estimularon con hemolinfa de larvas parasitadas y no parasitadas una única sensila coelocónica en la punta de una de las valvas ventrales con una técnica similar a la empleada en este Capítulo, sin poder concluir satisfactoriamente sobre su función en la discriminación del estado de parasitación del hospedador. Más investigación es necesaria para poder revelar la función específica de estos receptores en *D. longicaudata*. Estos ensayos evaluaron la actividad a nivel periférico, desconociéndose por lo tanto la forma en que se integrará luego la información obtenida en el sistema nervioso central (Frazier y Hanson 1986).

Dado que esta especie ataca hospedadores ocultos dentro de unidades discretas (*i.e.* frutos), la detección del mismo y la evaluación de su estado o calidad deberían ocurrir al insertar el ovipositor. Los resultados obtenidos confirman que las estructuras descritas por Greany *et al.* (1977) tienen función de quimiorreceptores y que están asociadas a la detección de larvas hospedadoras, aunque no se obtuvieron evidencias de que participaran de la discriminación entre larvas parasitadas y no parasitadas. Sería interesante continuar aplicando esta técnica para comparar larvas de distintas especies de dípteros (hospedadores y no hospedadores) o bien hospedadores en distinto estadio

de desarrollo, como una forma de profundizar en el conocimiento de su función específica. Cabe destacar, que este estudio consideró únicamente los receptores de las valvas ventrales. Esto respondió, en primer lugar, a que estos fueron los receptores estudiados por van Lenteren *et al.* (2007), único antecedente en el tema. Asimismo, intentos preliminares de repetir el procedimiento en los receptores ubicados en la valva dorsal resultaron en registros en los que no fue posible identificar PAs. Esto podría deberse a que la ubicación demasiado cercana entre las estructuras sensoriales halladas en la valva dorsal (ver resultados MEB) dificultara la estimulación y registro de una única sensila. No obstante, estos receptores podrían tener un rol en la discriminación de hospedadores, por lo que se debería continuar su estudio aplicando otra técnica de estimulación.

## Referencias

- Ahmed T., Zhang T.T., He K.L., Bai S.X. y Wang Z.Y.** 2013. Sense organs on the ovipositor of *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae): their probable role in stinging, oviposition and host selection process. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16: 343-348.
- Altner H. y Prillinger L.** 1980. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *International Review of Cytology*, 67: 69-139.
- Brown P.E. y Anderson M.** 1998. Morphology and ultrastructure of sense organs on the ovipositor of *Trybliographa rapae*, a parasitoid of the cabbage root fly. *Journal of insect physiology*, 44: 1017-1025.
- Chiappini E. y Solinas C.** 2002. Ovipositor sensory structures of *Anagrus breviphragma* Soyka and their possible significance. En: Melika G. (ed.), *Parasitic wasps: Evolution, systematics, biodiversity and biological control*, pp. 267-271.
- Cónsoli F.L., Kitajima E.W. y Parra J.R.P.** 1999. Sensilla on the antenna and ovipositor of the parasitic wasps *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). *Microscopy Research and Technique*, 45: 313-324.
- Crnjar R., Angioy A., Pietra P., Stoffolano Jr J.G., Liscia A. y Barbarossa I.T.** 1989. Electrophysiological studies of gustatory and olfactory responses of the sensilla on the ovipositor of the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* Walsh. *Italian Journal of Zoology*, 56: 41-46.
- Dethier V.G.** 1947. The response of hymenopterous parasites to chemical stimulation of the ovipositor. *Journal of Experimental Zoology*, 105: 199-207.
- Dweck H.K., Gadallah N.S. y Darwish E.** 2008. Structure and sensory equipment of the ovipositor of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). *Micron*, 39: 1255-1261.

- Frazier J.L. y Hanson F.E.** 1986. Electrophysiological Recording and Analysis of Insect Chemosensory Responses. En: Miller J.R y Miller T.A. (eds.), *Insect – Plant interactions*, Springer Series in Experimental Entomology, Springer-Verlag New York Inc., pp. 285-330.
- Gal R., Kaiser M., Haspel G. y Libersat F.** 2014. Sensory arsenal on the stinger of the parasitoid jewel wasp and its possible role in identifying cockroach brains. *PloS one*, 9(2): e89683. doi:10.1371/journal.pone.0089683
- Goubault M., Cortesero A.M., Paty C., Fourrier J., Dourlot S. y Ralec A.L.** 2011. Abdominal sensory equipment involved in external host discrimination in a solitary parasitoid wasp. *Microscopy Research and Technique*, 74: 1145-1153.
- Greany P.D., Hawke S.D., Carlyle T.C. y Anthony D.W.** 1977. Sense organs in the ovipositor of *Biosteres (Opius) longicaudatus*, a parasite of the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America*, 70: 319-321.
- Hodgson E.S., Lettvin J.Y. y Roeder K.D.** 1955. Physiology of a primary chemoreceptor unit. *Science*, 122: 417-418.
- Hubbard S.F., Marris G., Reynolds A. y Rowe G.W.** 1987. Adaptive patterns in the avoidance of superparasitism by solitary parasitic wasps. *The Journal of Animal Ecology*, 56: 387-401.
- Klijnstra J.W. y Roessingh P.** 1986. Perception of the oviposition deterring pheromone by tarsal and abdominal contact chemoreceptors in *Pieris brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 40: 71-79.
- Lammers J. y van der Starre H.** 1978. Electrophysiological responses of chemoreceptors on the ovipositor of the parasitic wasp *Pseudocoila bochei*, involved in host discrimination. En: *Proceedings of 3rd ECRO Congress*, p. 115.
- Le Ralec A. y Wajnberg E.** 1990. Sensory receptors of the ovipositor of *Trichogramma maidis* [Hym.: Trichogrammatidae]. *Entomophaga*, 35: 293-299.
- McBrien H. y Mackauer M.** 1991. Decision to superparasitize based on larval survival: competition between aphid parasitoids *Aphidius ervi* and *Aphidius smithi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 59: 145-150.
- Nacro S. y Nénon J.P.** 2009. Comparative Study of the Morphology of the Ovipositor of *Platygaster diplosisae* (Hymenoptera: Platygasteridae) and *Aprostocetus procerae* (Hymenoptera: Eulophidae) Two Parasitoids Associated with the African Rice Gall Midge, *Orseolia oryzivora* (Diptera: Cecidomyiidae). *Psyche*, vol. 2009, Article ID 675242, 7 p. doi:10.1155/2009/675242
- Obonyo M., Schulthess F., Chimtawi M., et al.** 2011. Sensilla on antennae, ovipositor and tarsi of the larval parasitoids, *Cotesia sesamiae* (Cameron 1906) and *Cotesia flavipes* Cameron 1891 (Hymenoptera: Braconidae): a comparative scanning electron microscopy study. In: *Annales De La Societe Entomologique De France*, Taylor & Francis Group, 47: 119-127.
- Papp J.** 1974. Study on the systematics of Braconidae (Hymenoptera). *Folia Entomologica Hungarica*, 109-133.

- Rice M.J.** 1976. Contact Chemoreceptors on the Ovipositor of *Lucilia cuprina* (Wied.), The Australian Sheep Blowfly. *Australian Journal of Zoology*, 24: 353-360.
- Shah Z.A.** 2012. Morphology, ultrastructure, and probable functions of the sense organs on the ovipositor stylets of the hymenopteran parasitoid, *Venturia canescens* (Gravenhorst). *Microscopy research and technique*, 75: 876-883.
- Stuhl C., Sivinski J., Teal P., Paranhos B. y Aluja M.** 2011. A compound produced by frugivorous Tephritidae (Diptera) larvae promotes oviposition behavior by the biological control agent *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental entomology*, 40: 727-736.
- Takasu K. y Hirose Y.** 1988. Host discrimination in the parasitoid *Ooencyrtus nezarae*: the role of the egg stalk as an external marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 47: 45-48.
- Tousson E.** 2004. Neuroanatomical and electrophysiological studies of identified contact chemoreceptors on the ventral ovipositor valve of 3rd instar larvae of lubber grasshoppers (*Taeniopoda eques*). *Zoology*, 107: 65-73.
- Ueno T. y Tanaka T.** 1996. Self-host discrimination by a parasitic wasp: the role of short-term memory. *Animal behaviour*, 52: 875-883.
- van Alphen J.J., Bernstein C. y Driessen G.** 2003. Information acquisition and time allocation in insect parasitoids. *Trends in Ecology & Evolution*, 18: 81-87.
- van Battum K.E.** 1972. Anatomy and Histology of the Ovipositor and Abdomen of Females of *Pseudeucoila bochei* (Weld) (Hymenoptera: Cynipidae). *M.Sc thesis*, Leiden University.
- van Dijken M.J., van Stratum P. y van Alphen J.J.** 1992. Recognition of individual-specific marked parasitized hosts by the solitary parasitoid *Epidinocarsis lopezi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30: 77-82.
- van Lenteren J.C.** 1972. Contact-chemoreceptors on the ovipositor of *Pseudeucoila bochei* Weld (Cynipidae). *Netherlands Journal of Zoology*, 22: 347-350.
- van Lenteren J.C.** 1976. The development of host discrimination and the prevention of superparasitism in the parasite *Pseudeucoila bochei* Weld (Hym.: Cynipidae). *Netherlands journal of zoology*, 26: 1-83.
- van Lenteren J.C.** 1981. Host discrimination by parasitoids. En: *Semiochemicals: their role in pest control*. Wiley, New York, pp. 153-179.
- van Lenteren J.C., Bakker K.** 1975. Discrimination between parasitised and unparasitised hosts in the parasitic wasp *Pseudeucoila bochei*: a matter of learning. *Nature*, 254: 417-419.
- van Lenteren J.C., Ruschioni S., Romani R., et al.** 2007. Structure and electrophysiological responses of gustatory organs on the ovipositor of the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Arthropod Structure & Development*, 36: 271-276.
- Vilhelmsen L., Isidoro N., Romani R., Basibuyuk H.H. y Quicke D.L.** 2001. Host location and oviposition in a basal group of parasitic wasps: the subgenital organ, ovipositor apparatus and associated structures in the Orussidae (Hymenoptera, Insecta). *Zoomorphology*, 121: 63-84.

**Vinson S.B. y Guillot F.S.** 1972. Host marking: source of a substance that results in host discrimination in insect parasitoids. *Entomophaga*, 17: 241-245.

**Visser M.E.** 1993. Adaptive self-and conspecific superparasitism in the solitary parasitoid *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Eucoilidae). *Behavioral Ecology*, 4: 22-28.

**Völkl W. y Mackauer M.** 1990. Age-specific pattern of host discrimination by the aphid parasitoid *Ephedrus californicus* Baker (Hymenoptera: Aphidiidae). *The Canadian Entomologist*, 122: 349-361.

**Waladde S.M., Hassanali A. y Ochieng S.A.** 1989. Taste sensilla responses to limonoids, natural insect antifeedants. *International Journal of Tropical Insect Science*, 10: 301-308.

**Wang X.Y., Yang Z.Q. y Gould J.R.** 2010. Sensilla on the antennae, legs and ovipositor of *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the emerald ash borer *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). *Microscopy research and technique*, 73: 560-571.

# Capítulo 6

Conclusiones finales



## Conclusiones finales

En esta tesis se evaluó el comportamiento de oviposición en hembras del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*, haciendo hincapié en el fenómeno de superparasitismo y utilizando principalmente al hospedador *Ceratitis capitata*. Este fenómeno ocurre tanto en la naturaleza como en las crías artificiales establecidas para programas de control biológico y fue considerado inicialmente como un evento perjudicial para las propias hembras. Sin embargo, a lo largo de varios estudios esta concepción fue cambiando y actualmente se considera que puede ser beneficioso, tanto para la propia especie como para su cría masiva. En esta tesis se determinó la prevalencia del superparasitismo en la cría del IGEAF (INTA, Castelar) y se abordaron aspectos comportamentales, genéticos y electrofisiológicos en condiciones de laboratorio que intentaron profundizar el conocimiento de las bases biológicas de este fenómeno.

Las principales conclusiones son:

- 1- El superparasitismo es un evento frecuente bajo los protocolos de cría del IGEAF, incluso al ofrecer una cantidad excesiva de larvas hospedadoras. En un aspecto aplicado, esto representa una disminución en la tasa de parasitismo alcanzada, siendo que esos huevos supernumerarios podrían ser depositados en larvas no parasitadas.
- 2- Las larvas parasitoides supernumerarias son eliminadas durante el primer estadio larval, presuntamente por medio de sus fuertes mandíbulas oponibles. Niveles intermedios de superparasitismo producen un retraso en esta eliminación y en alcanzar el segundo estadio larval; mientras que niveles elevados conducen a la muerte de todas las larvas que comparten el hospedador.
- 3- A pesar del retraso en el desarrollo en las primeras etapas, el tiempo de desarrollo total (huevo-adulto) no se ve afectado por los niveles de superparasitismo (NSPs) en aquellos individuos que logran emerger, los cuales tampoco parecen tener menor éxito reproductivo que los individuos provenientes de larvas no parasitadas.

- 4- La proporción de sexos se ve fuertemente sesgada hacia hembras con el aumento del NSP.
- 5- El diseño experimental seleccionado para la evaluación de la capacidad de discriminar entre hospedadores parasitados y no parasitados en el marco de los métodos directos, no permitió una conclusión contundente y podría ser un método no muy apropiado para este sistema. Sin embargo, los métodos indirectos permitieron revelar una variabilidad comportamental a nivel individual al mostrar que algunas hembras depositan sus huevos al azar y otras evitan el superparasitismo.
- 6- No se encontraron evidencias de que la variabilidad en el comportamiento de oviposición tenga una base genética fuerte, aunque estos estudios son incipientes.
- 7- El estudio de la morfología externa de las valvas internas del ovipositor permitió confirmar la presencia de receptores, cuya función gustativa fue confirmada mediante mediciones electrofisiológicas. Sin embargo, no se encontraron evidencias concluyentes en la función de discriminación de larvas con distinto estado de parasitación.

En resumen, el superparasitismo a niveles intermedios (hasta NSP 5) no pareciera ser perjudicial para *D. longicaudata*, siempre y cuando se considere que el costo energético de producción de cada huevo y la energía destinada al encuentro de hospedadores son despreciables. Sus efectos en etapas del desarrollo no se vieron reflejadas en los adultos, por lo que no se espera una fuerte presión de selección que favorezca una capacidad por discriminar larvas parasitadas, al menos como resultado de un proceso evolutivo impulsado por costos asociados a una reducción de la fecundidad o la supervivencia del adulto. En cuanto al aspecto aplicado, el superparasitismo podría resultar beneficioso, ya que produce un sesgo importante hacia la producción de hembras que son las de mayor impacto en la supresión de la plaga.

## ANEXO

Tabla suplementaria 1. Distribución de huevos de cada hembra en larvas de *Ceratitis capitata* y ajuste a las frecuencias esperada por azar. En cada análisis se consideraron las categorías NSP 0, 1 y  $>1$ , con 2 grados de libertad. NSP = nivel de superparasitismo;  $\lambda$  = promedio del número de huevos por hospedador;  $\text{Var}/\lambda$  = varianza del número de huevos por hospedador/ $\lambda$ ; es una medida del ajuste a Poisson siendo un ajuste perfecto cuando  $\text{Var}/\lambda = 1$ .  $\chi^2$ : valor del estadístico obtenido de la comparación de la distribución de frecuencias observadas con las esperadas por Poisson. Valor P: significancia de la prueba estadística.

Caso	Larvas NSP 0	Larvas NSP 1	Larvas NSP 2	Larvas NSP 3	Larvas NSP 4	Larvas NSP 5	Total larvas disecadas	Huevos depositados	$\lambda$	$\text{Var}/\lambda$	$\chi^2$	Valor P
1	14	3	1	0	0	0	18	5	0,28	1,19	0,48	0,787
2	15	6	0	0	0	0	21	6	0,29	0,75	1,24	0,538
3	14	6	0	0	0	0	20	6	0,30	0,74	1,33	0,513
4	14	5	1	0	0	0	20	7	0,35	0,98	0,00	0,999
5	18	5	1	0	0	0	24	7	0,29	1,04	0,04	0,98
6	12	8	0	0	0	0	20	8	0,40	0,63	2,68	0,262
7	11	9	0	0	0	0	20	9	0,45	0,58	3,60	0,165
8	13	9	0	0	0	0	22	9	0,41	0,62	6,64	0,036
9	20	5	2	0	0	0	27	9	0,33	1,15	0,88	0,644
10	11	6	2	0	0	0	19	10	0,53	0,92	0,01	0,995
11	10	10	0	0	0	0	20	10	0,50	0,53	4,72	0,094
12	10	10	0	0	0	0	20	10	0,50	0,53	4,72	0,094
13	11	8	1	0	0	0	20	10	0,50	0,74	1,07	0,584
14	9	8	1	0	0	0	18	10	0,56	0,68	1,50	0,472
15	18	10	0	0	0	0	28	10	0,36	0,67	2,82	0,244
16	19	10	0	0	0	0	29	10	0,34	0,68	2,70	0,259
17	8	9	1	0	0	0	18	11	0,61	0,6	2,56	0,279
18	12	5	3	0	0	0	20	11	0,55	1,05	0,68	0,712
19	9	11	0	0	0	0	20	11	0,55	0,47	6,07	0,048
20	8	11	0	0	0	0	19	11	0,58	0,45	6,65	0,036
21	20	9	1	0	0	0	30	11	0,37	0,84	0,50	0,779
22	20	9	1	0	0	0	30	11	0,37	0,84	0,50	0,779
23	8	10	1	0	0	0	19	12	0,63	0,57	3,40	0,183
24	9	10	1	0	0	0	20	12	0,60	0,51	2,87	0,239
25	11	8	2	0	0	0	21	12	0,57	0,8	0,34	0,842
26	12	12	0	0	0	0	24	12	0,50	0,52	5,67	0,059
27	17	12	0	0	0	0	29	12	0,41	0,61	4,21	0,122
28	7	13	0	0	0	0	20	13	0,65	0,37	9,58	0,008
29	7	13	0	0	0	0	20	13	0,65	0,37	9,58	0,008

30	17	11	1	0	0	0	29	13	0,45	0,73	1,64	0,44
31	7	12	1	0	0	0	20	14	0,70	0,47	5,97	0,05
32	9	9	1	1	0	0	20	14	0,70	0,92	1,09	0,579
33	8	8	3	0	0	0	19	14	0,74	0,73	0,39	0,823
34	10	14	0	0	0	0	24	14	0,58	0,43	8,56	0,014
35	14	14	0	0	0	0	28	14	0,50	0,52	6,63	0,036
36	8	9	3	0	0	0	20	15	0,75	0,68	0,80	0,671
37	7	11	2	0	0	0	20	15	0,75	0,54	3,41	0,182
38	6	12	0	1	0	0	19	15	0,79	0,64	6,60	0,037
39	15	15	0	0	0	0	30	15	0,50	0,52	7,09	0,029
40	9	14	1	0	0	0	24	16	0,67	0,48	6,71	0,035
41	5	13	2	0	0	0	20	17	0,85	0,41	7,13	0,028
42	14	15	1	0	0	0	30	17	0,57	0,57	5,13	0,077
43	11	17	0	0	0	0	28	17	0,61	0,41	11,14	0,004
44	6	11	2	1	0	0	20	18	0,90	0,69	2,94	0,23
45	7	11	2	1	0	0	21	18	0,86	0,73	2,36	0,307
46	10	5	3	1	0	1	20	19	0,95	0,58	1,42	0,492
47	5	8	6	0	0	0	19	20	1,05	0,43	0,62	0,734
48	10	18	1	0	0	0	29	20	0,69	0,5	10,37	0,006
49	5	11	5	0	0	0	21	21	1,00	0,74	2,41	0,299
50	6	12	3	2	0	0	23	24	1,04	1,83	2,36	0,307
<b>Total</b>	<b>556</b>	<b>500</b>	<b>56</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1120</b>	<b>638</b>	<b>0,60</b>	<b>0,86</b>	<b>93,10</b>	<b>0,00</b>

Tabla suplementaria 2. Evaluación del comportamiento de oviposición de hembras descendientes de cada isolínea fundada y ajuste a las frecuencias esperadas por azar. En cada análisis se consideraron las categorías NSP 0, 1 y >1, con 2 grados de libertad. NSP = nivel de superparasitismo = cantidad de huevos/larva;  $\lambda$  = promedio del número de huevos/larva = NSP promedio;  $\text{Var}/\lambda$  = varianza del número de huevos por hospedador/ $\lambda$ .  $\chi^2$ : valor del estadístico obtenido de la comparación de la distribución de frecuencias observadas con las esperadas por Poisson. Valor P: significancia de la prueba estadística. Las isolíneas subrayadas corresponden a aquellas fundadas por madres que mostraron tendencia a superparasitar ( $P < 0,05$  en análisis de frecuencias) y que fueron consideradas en los análisis.

Isolínea	Larvas NSP 0	Larvas NSP 1	Larvas NSP 2	Larvas NSP 3	Larvas NSP 4	Larvas NSP 5	Total larvas disecadas	Huevos depositados	$\lambda$	$\text{var}/\lambda$	$\chi^2$	Valor P
17	6	11	3	0	0	0	20	17	0,85	0,53	3,01	0,22
	9	10	1	0	0	0	20	12	0,60	0,60	2,96	0,23
	12	6	0	0	0	0	18	6	0,33	0,71	1,56	0,46
	8	9	2	0	0	0	19	13	0,68	0,66	1,43	0,49
	14	4	2	0	0	0	20	8	0,40	1,16	0,85	0,65
	10	8	2	0	0	0	20	12	0,60	0,77	0,47	0,79
	13	5	2	0	0	0	20	9	0,45	1,05	0,26	0,88
	13	6	1	0	0	0	20	8	0,40	0,89	0,13	0,94
31	9	10	0	0	0	0	19	10	0,53	0,5	5,11	0,08
	9	10	1	0	0	0	20	12	0,60	0,60	2,96	0,23
	9	9	2	0	0	0	20	13	0,65	0,69	1,13	0,57
	11	8	1	0	0	0	20	10	0,50	0,74	1,07	0,58
37	8	9	1	0	0	0	18	11	0,61	0,60	2,56	0,28
	8	9	2	0	0	0	19	13	0,68	0,66	1,43	0,49
	9	7	4	0	0	0	20	15	0,75	0,82	0,11	0,95
	11	8	2	0	0	0	21	12	0,57	0,80	0,34	0,84
	12	7	1	0	0	0	20	9	0,45	0,81	0,49	0,78
	4	15	1	0	0	0	20	17	0,85	0,28	13,06	0,00
	14	5	1	0	0	0	20	7	0,35	0,98	0,00	1,00
32	2	13	4	0	0	0	19	21	1,11	0,29	8,72	0,01
	5	13	1	1	0	0	20	18	0,90	0,57	7,04	0,03
	10	10	0	0	0	0	20	10	0,50	0,53	4,72	0,09
	11	9	0	0	0	0	20	9	0,45	0,58	3,60	0,17
	7	11	2	0	0	0	20	15	0,75	0,54	3,41	0,18
	9	9	2	0	0	0	20	13	0,65	0,69	1,13	0,57
19	11	8	0	0	0	0	19	8	0,42	0,61	2,91	0,23
	14	4	2	0	0	0	20	8	0,40	1,16	0,85	0,65
	5	9	5	1	0	0	20	22	1,10	0,66	0,80	0,67

	10	6	3	1	0	0	20	15	0,75	1,11	0,28	0,87
	8	8	4	0	0	0	20	16	0,80	0,74	0,21	0,90
	12	6	1	0	0	0	19	8	0,42	0,88	0,19	0,91
	13	6	1	0	0	0	20	8	0,40	0,89	0,13	0,94
10	7	13	0	0	0	0	20	13	0,65	0,37	9,58	0,01
	13	7	0	0	0	0	20	7	0,35	0,68	1,93	0,38
	9	8	2	0	0	0	19	12	0,63	0,74	0,64	0,73
	11	7	1	1	0	0	20	12	0,60	1,12	0,10	0,95
	11	7	2	0	0	0	20	11	0,55	0,86	0,09	0,95
	12	6	2	0	0	0	20	10	0,50	0,95	0,02	0,99
	14	5	1	0	0	0	20	7	0,35	0,98	0,00	1,00
11	8	12	0	0	0	0	20	12	0,60	0,42	7,68	0,02
	8	9	3	0	0	0	20	15	0,75	0,68	0,80	0,67
	12	7	1	0	0	0	20	9	0,45	0,81	0,49	0,78
	14	5	1	0	0	0	20	7	0,35	0,98	0,00	1,00
23	3	16	0	0	0	0	19	16	0,84	0,17	19,25	0,00
	8	11	0	0	0	0	19	11	0,58	0,44	6,63	0,04
	9	11	0	0	0	0	20	11	0,55	0,47	6,07	0,05
	9	10	1	0	0	0	20	12	0,60	0,6	2,96	0,23
	7	9	3	1	0	0	20	18	0,90	0,81	0,61	0,74
	10	6	4	0	0	0	20	14	0,70	0,92	0,38	0,83
	11	6	3	0	0	0	20	12	0,60	0,95	0,19	0,91
24	5	14	0	0	0	0	19	14	0,74	0,28	12,97	0,00
	3	10	7	0	0	0	20	24	1,20	0,40	2,59	0,27
	9	8	1	0	0	0	18	10	0,56	0,68	1,50	0,47
	10	5	5	0	0	0	20	15	0,75	0,96	1,33	0,51
	10	6	1	0	0	1	18	13	0,72	2,09	0,49	0,78
	10	6	3	1	0	0	20	15	0,75	1,11	0,28	0,87
	8	8	5	0	0	0	21	18	0,86	0,73	0,17	0,92
	8	7	4	0	0	0	19	15	0,79	0,79	0,10	0,95
13	4	15	1	0	0	0	20	17	0,85	0,28	13,06	0,00
	6	13	1	0	0	0	20	15	0,75	0,40	7,93	0,02
	8	11	0	0	0	0	19	11	0,58	0,44	6,63	0,04
	7	12	1	0	0	0	20	14	0,70	0,47	5,97	0,05
	6	12	2	0	0	0	20	16	0,80	0,47	5,08	0,08
	5	11	2	0	0	0	18	15	0,83	0,46	4,87	0,09
	9	9	1	0	0	0	19	11	0,58	0,64	2,20	0,33
14	7	12	1	0	0	0	20	14	0,70	0,47	5,97	0,05
	11	9	0	0	0	0	20	9	0,45	0,58	3,60	0,17
	8	10	0	1	0	0	19	13	0,68	0,82	3,27	0,20
	11	10	1	0	0	0	22	12	0,55	0,65	2,29	0,32

<u>29</u>	6	13	1	0	0	0	20	15	0,75	0,4	7,93	0,02
	7	12	1	0	0	0	20	14	0,70	0,47	5,97	0,05
	9	10	1	0	0	0	20	12	0,60	0,60	2,96	0,23
	5	9	4	0	0	0	18	17	0,94	0,56	1,48	0,48
	10	5	3	2	0	0	20	17	0,85	1,27	1,12	0,57
	11	5	3	0	0	0	19	11	0,58	1,02	0,53	0,77
	5	8	5	2	0	0	20	24	1,20	0,75	0,26	0,88
	14	5	1	0	0	0	20	7	0,35	0,98	0,00	1,00

