

Tesis Doctoral

Influencia de la calidad del hospedador y de la competencia por recursos energéticos durante la ontogenia sobre el estado fisiológico y el éxito reproductivo del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Barrantes, María Eugenia

2015-03-30

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Barrantes, María Eugenia. (2015-03-30). Influencia de la calidad del hospedador y de la competencia por recursos energéticos durante la ontogenia sobre el estado fisiológico y el éxito reproductivo del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Barrantes, María Eugenia. "Influencia de la calidad del hospedador y de la competencia por recursos energéticos durante la ontogenia sobre el estado fisiológico y el éxito reproductivo del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Influencia de la calidad del hospedador y de la
competencia por recursos energéticos durante la
ontogenia sobre el estado fisiológico y el éxito
reproductivo del parasitoide *Mallophora ruficauda*
(Diptera: Asilidae)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias
Biológicas

María Eugenia Barrantes

Director de tesis: Dra. Marcela K. Castelo
Consejero de estudios: Pablo E. Schilman

Lugar de trabajo: Grupo de Investigación en Ecofisiología de Parasitoides

Buenos Aires, 30 de marzo de 2015

RESUMEN

Influencia de la calidad del hospedador y de la competencia por recursos energéticos durante la ontogenia sobre el estado fisiológico y el éxito reproductivo del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Autor: Lic. María Eugenia Barrantes

Director: Dra. Marcela K. Castelo

Mallophora ruficauda es un ectoparasitoide solitario de larvas de coleópteros Scarabaeidae, con una alta preferencia por *Cyclocephala signaticollis*. La hembra ovipone fuera del hospedador y la larva busca, encuentra y parasita al hospedador actuando como el equivalente ecológico de la hembra adulta de los parasitoides tradicionales. En un contexto de forrajeo, las larvas pueden reconocer y orientarse a *C. signaticollis* frente a otras especies potenciales, y poseen la capacidad de discriminar a los hospedadores parasitados, sin embargo en la naturaleza el superparasitismo es frecuente. Al tener una única oportunidad de parasitismo, el *fitness* del parasitoide dependerá completamente de este evento, por lo que el costo de elegir un hospedador de baja calidad (pequeño, parasitado o estresado) es alto. Se desconoce si las larvas pueden evaluar parámetros del hospedador indicadores de su condición corporal, así como la influencia que tiene la toma de decisiones de las larvas sobre la condición o desempeño del adulto que emerge. En esta Tesis se estudió la influencia de la calidad del hospedador seleccionado y de la competencia intraespecífica de las larvas sobre el éxito reproductivo del parasitoide adulto. Se encontró que la probabilidad de ganar la competencia en larvas que están superparasitando a un hospedador son independientes del orden de llegada en que las larvas atacaron al hospedador y del tiempo transcurrido entre el aferramiento de la primera larva y la siguiente, lo que explica en parte la ocurrencia natural del superparasitismo. Al evaluar la orientación de las larvas en parches de hospedadores sanos o parasitados que diferían en tamaño y número se observó que la distribución de larvas entre hospedadores no presentó un patrón definido, a pesar que las larvas detectaron a sus coespecíficos en el parche, sugiriendo que elegir un hospedador de alta calidad en recursos energéticos carecería de importancia en interacciones prolongadas en el tiempo. Por otro lado, se encontró que las larvas pueden discriminar y seleccionar a los hospedadores en función del grado de estrés, utilizando una clave de naturaleza química, y que eligen parasitar al menos perturbado o de mejor calidad. Finalmente, el peso del hospedador y el superparasitismo serían factores importantes que tienen influencia sobre la condición corporal de los parasitoides adultos de la nueva generación.

Palabras clave: Parasitoides, Calidad del hospedador, Éxito reproductivo, Competencia intraespecífica, Estrés.

ABSTRACT

Influence of host quality and competition for energy resources during ontogeny on the physiological condition and reproductive success of the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Author: Lic. María Eugenia Barrantes

Supervisor: Dr. Marcela K. Castelo

Mallophora ruficauda is a solitary ectoparasitoid of Scarabaeidae beetle larvae, with a high preference for *Cyclocephala signaticollis*. The female oviposits outside of the host and the larva seeks, finds and parasitizes the host acting as the ecological equivalent of the adult female in traditional parasitoids. In a foraging context the larvae can recognize and orient towards *C. signaticollis* against other potential species, and possess the ability to discriminate parasitized hosts, but in nature super-parasitism is common for this species. By having a single opportunity to parasitize, parasitoid fitness depends entirely on this event, therefore the cost of choosing a host of low quality (small, parasitized, or stressed) is high. It is unknown whether larvae can evaluate parameters of the host indicative of its bodily condition, as well the influence these decisions can have on the condition when the adult emerges. In this thesis we studied the influence of the quality of the selected host and larval intraspecific competition on the reproductive success of the adult parasitoid. We found that the probability of winning the competition in larvae that are super-parasitizing a host is independent of the order of arrival, where on its body the larvae attacks the host and the time between the attachment of the first larva and the next, which explains in part the natural occurrence of super-parasitism. In assessing the orientation of larvae in patches of healthy or parasitized hosts that differed in size and number we observed no clear pattern in the distribution of larvae between hosts, even though larvae detected conspecifics in the patch, which suggests that choosing a host with high quality energy resources would be irrelevant in prolonged interactions. Furthermore, it was found that the larvae can discriminate and select the host according to its degree of stress, using a chemical cue, and choose to parasitize the least disturbed or of better quality. Finally, the weight of the host and super-parasitism would be important factors influencing the body condition of adult parasitoids of the new generation.

Keywords: Parasitoids, Host quality, Fitness, Intraspecific competition, Stress.

AGRADECIMIENTOS

A Marcela Castelo, por abrirme las puertas del labo (y del mundo de los insectos) para realizar este trabajo.

A mis compañeros del labo: José, Hernán, Gustavo, Paula, Maru y Nico. Gracias por la compañía, las charlas, los mates, los budines de prueba y el *Necronomicón Entomopándico*.

A Fran, por estar presente no solo en buena parte de este trabajo, sino también en mi vida.

A Losa: cuanto me alegra haber compartido estos últimos años con ustedes. Muy cerca o muy lejos siempre estuvieron ahí para bancarme y darme una mano. Los quiero!

A Sofi, Jose, Naty, Chechu y Rodrigo. Gracias por los almuerzos terapéuticos, los mimos y por recibirme siempre con los brazos abiertos (y llenos de cosas ricas!).

A Sol y Marian, que a su manera y a la distancia siempre estuvieron ahí para mi. Gracias chicas.

A los vecinos: Carmen, Gerardo, Pablo, Alicia y Flor. Gracias por los tererés, las discusiones de índole laboral y las predicciones tan acertadas de estos últimos años. Vamos por julio!

Al INSSOC, me alegra que me hayan permitido acoplar a tan lindo grupo en varias ocasiones a pesar de que mis hidrocarburos de cutícula diferían de los suyos.

A mi consejero de estudios, Pablo Schilman.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por la formación académica y el lugar de trabajo para realizar la Tesis.

Al Departamento de Ecología, Genética y Evolución por permitirme desarrollar las tareas de esta Tesis en sus dependencias.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Foncyt) por el subsidio PICT 2006 N°01200 que facilitó parte del financiamiento para llevar a cabo la Tesis.

Al CONICET por haberme otorgado las dos Becas de Postgrado para poder llevar adelante esta Tesis y por el subsidio PIP 2009 N°1597 a Marcela Castelo que facilitó parcialmente su financiamiento.

A la Universidad de Buenos Aires por los subsidios UBACyT 2008 N°X416 y 2011 N° 1031 a Marcela Castelo que facilitaron el financiamiento para llevar a cabo este trabajo.

A los apicultores Jorge Lucía, Luis Arenas, Javier Guillem y Jorge Sanz, a los propietarios de la Quinta Zanotti en Moreno y la familia Sola, por permitirnos realizar los muestreos necesarios con total libertad en sus colmenares.

Al Servicio de Paz y Justicia (SERPAJ) - 'Aldea de los Niños por la Paz', sede Aldea Pilar por facilitarnos lugares de muestreo desinteresadamente.

A la Dra. Adriana Salvo, al Dr. Nicolás Schweigmann y al Dr. Alejandro Sosa por participar como jurados y evaluar este trabajo.

¹There is a story, possibly apocryphal, of the distinguished British biologist, J. B. S. Haldane, who found himself in the company of a group of theologians. On being asked what one could conclude as to the nature of the Creator from a study of his creation, Haldane is said to have answered, "An inordinate fondness for beetles."

Del Hutchinson, 1959. Homage to Santa Rosalia or Why are there so many kinds of animals.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	10
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARASITOIDES	11
COMUNICACIÓN QUÍMICA ENTRE PARASITOIDES Y HOSPEDADORES	13
BÚSQUEDA, LOCALIZACIÓN Y ENCUENTRO DEL HOSPEDADOR	13
Localización del hábitat	14
Localización del hospedador	14
Evaluación y aceptación del hospedador	16
Uso del hospedador	17
EL ÉXITO REPRODUCTIVO EN LOS PARASITOIDES	18
Estimadores del éxito reproductivo	19
Calidad del hospedador	20
Competencia entre parasitoides por los recursos energéticos	23
Condición corporal del parasitoide adulto	25
LOS ASILIDOS	27
BIOLOGÍA DEL SISTEMA DE ESTUDIO	28
Biología del parasitoide <i>Mallophora ruficauda</i>	28
Biología del hospedador <i>Cyclocephala signaticollis</i>	33
Parasitismo de los hospedadores.....	35
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	36
Objetivo general.....	36
Objetivos particulares	36
Preguntas particulares y predicciones.....	37
CAPÍTULO 2	40
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	40
RECOLECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS INSECTOS	41
DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES Y PROCEDIMIENTOS	43
Condiciones experimentales.....	43
Experimentos de elección y de no elección.....	43
Experimentos de elección en olfatómetro de ambiente estacionario	44
Experimentos de elección y de no elección en parches artificiales	44
Obtención de los extractos químicos de hospedador	46
Análisis estadísticos	47
CAPÍTULO 3	48
PREFERENCIA POR EL HOSPEDADOR: ¿La intensidad de las kairomonas en el género <i>Cyclocephala</i> es la responsable de la selectividad?	48
INTRODUCCIÓN	49
MATERIALES Y MÉTODOS	52
RESULTADOS	53
DISCUSIÓN	55
CAPÍTULO 4	60
COMPETENCIA INTRAESPECÍFICA PRE-PARASITISMO: ¿Cómo se distribuyen las larvas entre los hospedadores?	60
INTRODUCCIÓN	61
MATERIALES Y MÉTODOS	64
Insectos	64
Obtención de hospedadores sanos y monoparasitados	64
Confección de los parches de hospedadores	64

Procedimientos experimentales	65
Detección de coespecíficos por las larvas parasitoides	65
Distribución del parasitoide dentro del parche en función del peso corporal y estado de parasitismo de los hospedadores, y presencia de competidores previo al parasitismo	66
Distribución de larvas parasitoides dentro del parche en función de la condición corporal (peso) y estado de parasitismo de los hospedadores y presencia de coespecíficos	67
Análisis estadísticos	68
RESULTADOS	69
Detección de coespecíficos por las larvas parasitoides	69
Distribución de larvas parasitoides dentro del parche en función de la condición corporal (peso) y estado de parasitismo de los hospedadores y presencia de competidores	70
DISCUSIÓN	72
CAPÍTULO 5	78
DETERMINACIÓN DE LAS CUALIDADES DEL HOSPEDADOR Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE EL PARASITISMO: ¿Pueden las larvas evaluar si un hospedador está perturbado?	78
INTRODUCCIÓN	79
MATERIALES Y MÉTODOS	83
Insectos	83
Obtención de hospedadores de distinta condición fisiológica.....	83
Discriminación del nivel de estrés y parasitismo en hospedadores vivos en experimentos de elección dual	84
Aceptación de hospedadores vivos con diferente nivel de estrés en experimentos de no elección	86
Discriminación de niveles de estrés del hospedador mediante extractos de claves químicas.....	86
RESULTADOS	87
Discriminación del nivel de estrés y parasitismo en hospedadores vivos en experimentos de elección dual	87
Aceptación de hospedadores vivos con diferente nivel de estrés en experimentos de no elección	88
Discriminación de niveles de estrés del hospedador mediante extractos de claves químicas.....	89
DISCUSIÓN	91
CAPÍTULO 6	95
COMPETENCIA INTRAESPECÍFICA DE LAS LARVAS SOBRE EL HOSPEDADOR: ¿Quién gana la competencia?	95
INTRODUCCIÓN	96
MATERIALES Y MÉTODOS	99
Insectos	99
Marcado de larvas de <i>M. ruficauda</i> mediante el corte de setas caudales y su influencia en la supervivencia	100
Orden de llegada de las larvas parasitoides al hospedador	100
Determinación de la condición corporal del adulto de las larvas que ganaron la competencia ...	101
Análisis estadístico	101
RESULTADOS	103
DISCUSIÓN	106
CAPÍTULO 7	114
FITNESS DEL PARASITOIDE ADULTO: ¿Cómo influye la calidad del hospedador parasitado por las larvas?	114
INTRODUCCIÓN	115
MATERIALES Y MÉTODOS	121
Tratamiento de los insectos.....	121
Cálculo de los estimadores del <i>fitness</i>	124
Cálculo del índice residual.....	124

Cálculo de la carga alar	124
Estimación de la supervivencia.....	125
Influencia de diferentes variables y procesos sobre el <i>fitness</i> de <i>M. ruficauda</i>	125
Influencia del dimorfismo sexual sobre las estimaciones del fitness	125
Influencia del grado de parasitismo.....	125
Influencia del peso del hospedador.....	126
Influencia del grado de perturbación del hospedador.....	126
Influencia del orden de llegada al hospedador.....	126
Análisis estadísticos	127
RESULTADOS	127
Cálculo del índice residual.....	128
Influencia del dimorfismo sexual sobre las estimaciones del fitness e influencia del estado de parasitismo.....	129
Influencia del peso del hospedador.....	130
Influencia del orden de llegada al hospedador.....	132
DISCUSIÓN.....	132
CAPÍTULO 8.....	136
DISCUSIÓN GENERAL.....	136
CAPÍTULO 9.....	144
BIBLIOGRAFÍA.....	144

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARASITOIDES

Los insectos parasitoides, sus hospedadores fitófagos y las plantas de las que se alimentan estos últimos, componen una proporción mayoritaria de la biodiversidad mundial (Hawkins, 1994). Los parasitoides son insectos cuyas larvas se alimentan exclusivamente del cuerpo de otro artrópodo, generalmente un insecto al que se denomina hospedador, matándolo al completar su desarrollo (Godfray, 1994). En este sentido, estos insectos deben parasitar obligadamente a su hospedador para poder dejar descendencia. Los parasitoides establecen una relación muy estrecha con sus hospedadores, lo que evolutivamente llevó a una especiación y radiación explosiva en la forma en la cual localizan, parasitan y se desarrollan sobre otros insectos. Poseen una gran diversidad de formas de vida y comportamientos adaptativos, lo cual hace que los parasitoides sean modelos interesantes para realizar estudios biológicos fundamentales (Vet et al., 2002). Por regla general, el parasitoide adulto es un insecto de vida libre, mientras que la etapa parasítica está limitada únicamente a los estados inmaduros (Vet et al., 2002).

La mayoría de los parasitoides corresponden principalmente a los órdenes Hymenoptera (78%) y Diptera (20%), completando esta lista especies pertenecientes a los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Neuroptera y Strepsiptera (Godfray, 1994; Feener & Brown, 1997; Penacchio & Strand, 2006). El hábito parasítico ha evolucionado probablemente a partir de especies ancestrales con formas de vida saprófagas, depredadoras y micófagas (Eggleton & Belshaw, 1992; Vet et al., 2002). Evolutivamente, la aparición del parasitoidismo ocurrió una única vez entre los himenópteros, en contraste con los dípteros, en los que ha aparecido en repetidas ocasiones (Eggleton & Belshaw, 1992; Feener & Brown, 1997). En su revisión, Eggleton y Belshaw (1992) enumeran 22 familias de dípteros en las que aparecen especies parasitoides y han sugerido que el estilo de vida parasítico surgió más de 100 veces, dando lugar a la enorme diversidad en sus hábitos alimenticios, estrategias de búsqueda y parasitismo del hospedador, y hábitats que ocupan. Debido a esto, diferentes criterios son tenidos en cuenta para clasificar a los parasitoides, reflejando el vasto espectro de estrategias que utilizan para disponer de los recursos del hospedador. Según el estado del hospedador que parasitan, se denominan parasitoides de huevo, larva, pupa o adulto. Pueden ser clasificados, de acuerdo a la ubicación de los huevos y hábitos alimenticios de las larvas, en endoparasitoides y ectoparasitoides. Los endoparasitoides oviponen directamente dentro del cuerpo del hospedador, donde sus larvas se alimentan y se desarrollan consumiendo internamente los tejidos y/o hemolinfa. Por el contrario, los ectoparasitoides dejan sus huevos en la cercanía o sobre el cuerpo del hospedador y sus larvas perforan la cutícula y permanecen aferradas externamente mientras lo consumen (Godfray, 1994; Harvey, 2013). Otra clasificación que se utiliza respecto a la

estrategia de consumo del hospedador divide a los parasitoides en idiobiontes y koinobiontes. Los idiobiontes matan o paralizan permanentemente al hospedador al momento de la oviposición, mientras que los koinobiontes parasitan hospedadores que continúan con su alimentación y crecimiento mientras están parasitados (Godfray, 1994; Harvey, 2013). A su vez, estas estrategias de consumo del hospedador se combinan. Los idiobiontes pueden ser tanto ectoparasitoides que paralizan a sus hospedadores como endoparasitoides que atacan estados sésiles del hospedador como huevo o pupa. Por otro lado, los koinobiontes, son casi exclusivamente endoparasitoides de estados larvales de insectos, aunque existen algunos pocos ectoparasíticos (Pennacchio & Strand, 2006). Independientemente de cuál sea la estrategia de explotación del hospedador, los parasitoides pueden ser solitarios, es decir, sólo una larva puede desarrollarse exitosamente sobre o dentro de un hospedador o, por el contrario, gregarios, donde varios parasitoides pueden desarrollarse a partir de un único hospedador (Godfray, 1994; Harvey, 2013).

Otra manera de describir a los parasitoides es en función de la estrategia de búsqueda de su hospedador, la cual puede dividirse en dos grandes categorías debido a la existencia de una marcada diferencia entre casi la totalidad de los himenópteros y el resto de los parasitoides. En general, los parasitoides himenópteros suelen depositar sus huevos directamente sobre el hospedador o en su inmediata cercanía. A diferencia de esto, en el resto de parasitoides, y en unas pocas excepciones de los himenópteros, las hembras oviponen fuera del hospedador. Esta estrategia alternativa de localización del hospedador se da en dos fases, involucrando distintos estados del parasitoide. En una primera etapa las hembras adultas localizan el microhábitat del hospedador donde esparcen sus huevos o larvas. Posteriormente, en una segunda etapa, se produce el contacto físico con el hospedador y son las larvas quienes llevan a cabo esta tarea (Godfray, 1994; Feener & Brown, 1997). Han sido descritos tres mecanismos básicos mediante los cuales las larvas de estos parasitoides pueden entrar en contacto con el hospedador: el hospedador puede ingerir los huevos del parasitoide mientras se alimenta, la larva parasitoide espera al hospedador en un sustrato y lo parasita al acercarse (emboscada), o la larva parasitoide busca activamente al hospedador adecuado (Feener & Brown, 1997). En cierto sentido puede decirse que en este tipo de estrategias de búsqueda la larva se comporta como el equivalente ecológico de la hembra (Brodeur & Boivin, 2004).

COMUNICACIÓN QUÍMICA ENTRE PARASITOIDES Y HOSPEDADORES

La comunicación química entre insectos juega un rol importante a la hora de determinar el comportamiento de los parasitoides. Cualquier químico que, en un contexto natural, transporte información en una interacción entre dos individuos, evocando en el receptor una respuesta comportamental o fisiológica que resulte adaptativa ya sea para uno o ambos organismos, es denominado infoquímico (Dicke & Sabelis, 1988). Los infoquímicos están divididos en feromonas y aleloquímicos. Las feromonas median la interacción entre organismos de la misma especie y esta interacción puede resultar beneficiosa tanto para el emisor, para el receptor o ambos. Los aleloquímicos por su parte median la interacción entre dos organismos de especies distintas y, a su vez, pueden dividirse en sinomonas, kairomonas y alomonas, dependiendo para quien resulte beneficiosa la información que lleva el infoquímico. Una sinomona es un aleloquímico que evoca en el receptor una respuesta que es adaptativamente favorable tanto para el emisor como para el receptor; una kairomona evoca en el receptor una respuesta adaptativamente favorable sólo para el receptor; y una alomona evoca en el receptor una respuesta adaptativa favorable sólo para el emisor (Dicke & Sabelis, 1988). La mayoría de los parasitoides y muchos insectos predadores en general, responden a kairomonas o sinomonas volátiles en la localización a larga distancia de sus hospedadores. Además, los infoquímicos están involucrados en un amplio rango de comportamientos individuales que pueden determinar la dinámica poblacional y las interacciones de parasitismo y depredación en las redes tróficas de los ecosistemas. Por consiguiente, el estudio de las interacciones entre individuos mediadas por infoquímicos es importante en la interpretación de los procesos ecológicos y evolutivos que actúan sobre las especies (Dicke, 2006).

BÚSQUEDA, LOCALIZACIÓN Y ENCUENTRO DEL HOSPEDADOR

El parasitismo exitoso consta de una serie de pasos comportamentales sucesivos, que consisten en la búsqueda del hábitat donde reside la población de hospedadores potenciales, la localización y encuentro del hospedador adecuado, su aceptación en función de sus características, y el uso del hospedador como recurso (Godfray, 1994; Brodeur & Boivin, 2004). Todas estas actividades están comprendidas bajo lo que se conoce como “comportamiento de forrajeo” (Fellowes et al., 2005). La localización del hábitat y la posterior localización del hospedador pueden considerarse como parte de un continuo y no siempre es sencilla la distinción entre una y otra. Existen algunos patrones en cuanto a la utilización preferencial de determinado tipo de claves en cada etapa de este continuo que

es la localización del hábitat y del hospedador, los cuales serán tratados más adelante y por separado.

Localización del hábitat

El primer paso en el proceso de búsqueda que realizan los parasitoides es la localización de hábitats donde los hospedadores pueden ser potencialmente hallados. A diferencia de muchos insectos nectívoros donde las flores desarrollan estrategias de atracción, los hospedadores se encuentran bajo una fuerte presión de selección para evitar ser encontrados. Las claves utilizadas para localizar el hábitat del hospedador pueden ser visuales, acústicas u olfativas. Ciertamente, para los parasitoides, las claves olfativas son las más importantes y pueden actuar sobre largas distancias, en contraste con las visuales y acústicas que sólo pueden guiar al parasitoide hacia su hospedador a corta distancia (Fellowes et al., 2005). La baja detectabilidad de los hospedadores restringe el uso de claves que provienen directamente del hospedador, por lo que usualmente los parasitoides deben explotar claves ambientales indirectas que indiquen su presencia (Vet et al., 2002). Las principales claves químicas indirectas utilizadas por los parasitoides suelen originarse de la planta de la cual se alimenta el hospedador y de la interacción entre el hospedador y dicha planta, como por ejemplo, volátiles emitidos por la planta frente al daño ocasionado por el insecto durante la alimentación u oviposición (Godfray, 1994; Vet et al., 2002; Fellowes et al., 2005). Indudablemente, el hospedador en si mismo puede originar una clave atractiva para el parasitoide proveniente de las heces, del proceso de muda, de la saliva durante la alimentación o mediante feromonas sexuales y/o de agregación. Sin embargo, debido a la presión selectiva constante ejercida sobre los hospedadores que favorece estrategias para evitar ser detectados, no siempre resulta adaptativo para el parasitoide el uso de información directa a grandes distancias, ya que su detectabilidad suele ser limitada (Vet et al., 1995, Vet et al., 2002). En este contexto, el valor informativo de un estímulo depende de su fidelidad para indicar la presencia de hospedadores disponibles y de su detectabilidad por parte del parasitoide. Estos dos factores se suponen inversamente correlacionados (Vet et al., 1995). De esta manera, en la localización del hábitat del hospedador es muy común que el parasitoide recurra a claves indirectas menos fiables pero más detectables (Vet & Dicke, 1992; Wiskerke et al., 1993).

Localización del hospedador

Una vez detectado el hábitat potencial del hospedador, el parasitoide debe hallar el lugar preciso donde se encuentran los hospedadores dentro del parche. Al igual que en el proceso de detección del parche, la información puede provenir tanto de fuentes directas como indirectas y la naturaleza

de estas claves puede ser de naturaleza visual, auditiva y/o principalmente olfativa (Godfray, 1994; Feener & Brown 1997; Vet et al., 2002, Fellowes, 2005). Sin embargo, dentro de la transición gradual que se da en el pasaje de una búsqueda a larga distancia (localización del hábitat o parche) a una de corta distancia (localización del hospedador), generalmente se observa un cambio del uso de claves indirectas a claves directas (Vet et al., 2002).

Independientemente de los tipos de claves utilizadas para la detección y localización del hospedador, esta tarea puede ser llevada a cabo tanto por la hembra adulta como por el primer estadio larval, en el caso en que la búsqueda sea compartida, como se mencionó anteriormente. Las diversas estrategias de búsqueda del hospedador existentes reflejan las numerosas maneras en que surgió el hábito parasítico.

Dado que las feromonas median la comunicación entre coespecíficos, estas pueden ser una importante fuente de información para predadores y parasitoides, quienes podrían beneficiarse de explotar las feromonas de los hospedadores como kairomonas (Dicke & Sabelis, 1988; Zuk & Kolluru, 1998; Ruther et al., 2002; Wertheim, 2005; Wertheim et al., 2005). Las feromonas pueden tratarse de un único compuesto o una mezcla particular de sustancias (Greenfield, 2002; Wyatt, 2003; Morgan, 2004; Mori, 2010). Las respuestas de los parasitoides hacia las kairomonas parecen ser hospedador-específicas, ya que responden a feromonas de sus hospedadores naturales, pero no a aquellas pertenecientes a hospedadores menos relacionados (Yong et al., 2007). La composición cuantitativa de la mezcla de la clave y la concentración en la cual esta es liberada, puede informar a los parasitoides sobre la identidad de una especie de hospedador entre distintas especies pertenecientes a un mismo género. Symonds y Elgar (2008) han planteado que las feromonas podrían evolucionar gradualmente involucrando pequeños cambios en sus componentes, como la pérdida o ganancia de un compuesto, un grupo funcional, o un cambio en la proporción relativa de los componentes a lo largo del tiempo evolutivo, lo que se vería reflejado con una composición de feromonas similar o incluso idéntica en las especies más cercanamente relacionadas (Roelofs & Brown, 1982; Symonds & Elgar, 2008). Este hecho podría explicar parcialmente el parasitismo sobre distintas especies de hospedadores, pero filogenéticamente relacionadas, por aquellos parasitoides oligófagos o que tienen cierta flexibilidad en la selectividad de hospedadores (Yong et al., 2007). Desde el punto de vista ecológico, la búsqueda de distintos hospedadores basada en una misma feromona, o en una parte de ella, es de gran relevancia para los parasitoides, debido al consecuente ahorro de recursos energéticos durante el proceso de búsqueda y a la mayor probabilidad de encuentro de un hospedador en el proceso.

Evaluación y aceptación del hospedador

Una vez que el parasitoide ha localizado al hospedador, lo evalúa y decide si lo parasita. Esta decisión de concretar el ataque estará basada en la combinación de diversas condiciones o parámetros ecológicos y fisiológicos, así como en las consecuencias que estas decisiones tendrán sobre el éxito en dejar descendencia (Godfray, 1994; Harvey et al., 2013). Respecto a los parámetros fisiológicos, se ha demostrado que diversos factores tienen influencia sobre los comportamientos del parasitoide, como ser su esperanza de vida, estado nutricional y la carga de huevos en el caso de las hembras (Sirot & Bernstein, 1997; Sirot et al., 1997; Vet et al., 2002; Bernstein & Jervis, 2008). Las modificaciones en el comportamiento de un parasitoide en función de su estado interno o fisiológico es lo que se conoce como dependencia de estado (Mangel & Clark, 1988; Clark & Mangel, 2000; Roitberg & Benhard, 2007). Dentro de los parámetros ecológicos o ambientales que podrían estar condicionando las decisiones del insecto podemos destacar distintas características del hábitat como el tamaño del parche, la abundancia y calidad de hospedadores (cantidad y calidad de nutrientes, grado de parasitismo, grado de estrés), así como el nivel de competencia intra- o interespecífica por el hospedador (Goubault et al., 2004; Amarasekare et al., 2010; Bezemer et al., 2010).

El superparasitismo y multiparasitismo, es decir, la deposición de un huevo por parte de un parasitoide en un hospedador que ya ha sido previamente parasitado por un coespecífico o por un individuo de otra especie, respectivamente, han sido registrados frecuentemente en la naturaleza (Fisher, 1961; Dijken & Waage, 1987; Mackauer, 1990). La habilidad de las hembras adultas parasitoides de distinguir hospedadores parasitados de los no parasitados, es decir su estado de parasitismo, es lo que se conoce como discriminación del hospedador (Roitberg & Mangel, 1988). Muchos de los parasitoides estudiados poseen esta habilidad, sin embargo es frecuente observar que oviponen sobre o dentro de hospedadores que han sido previamente parasitados, lo que durante muchos años fue considerado como un error por parte del parasitoide (van Lenteren, 1981). Actualmente, tanto el superparasitismo como su evitación son considerados procesos que derivan de comportamientos adaptativos que se dan bajo un amplio rango de condiciones (van Alphen & Visser, 1990).

La discriminación del hospedador ha sido estudiada principalmente en especies donde la hembra adulta del parasitoide busca activamente al hospedador y evalúa su condición. La estrategia en dos fases, en la cual la hembra busca el hábitat y la larva presenta un comportamiento de búsqueda activo del hospedador dentro de este hábitat, rara vez ha sido estudiada en profundidad (Feener &

Brown, 1997; Brodeur & Boivin, 2004). Presumiblemente, la escasez de estudios sobre la discriminación del hospedador cuando la larva lleva a cabo activamente la búsqueda, se deba a que ha sido considerada irrelevante, ya que la tasa de encuentro es baja debido a la capacidad de dispersión limitada por parte del estado inmaduro dentro del hábitat (Feener & Brown, 1997). Sin embargo, en las especies que parasitan hospedadores con distribución espacial agregada, contar con la capacidad de discriminar la calidad de los hospedadores puede ser de gran ventaja, ya que en estos casos el parasitoide tiene la posibilidad de encontrar y evaluar más de un hospedador durante su vida y puede seleccionar y parasitar al que incrementa en mayor medida su éxito reproductivo (Feener & Brown, 1997; Vet et al., 2002; Brodeur & Boivin, 2004). Existen unos pocos estudios sobre el tema que se han realizado con parasitoides pertenecientes a la especie *Aleochara bilineata* Gyllenhal (Coleoptera: Staphilinidae). Las larvas de este insecto son capaces de discriminar a sus hospedadores respecto a su estado de parasitismo (Royer et al., 1999; Lizé et al., 2006). La discriminación del hospedador en esta especie está basada principalmente en claves químicas y parcialmente en claves físicas relacionadas con el agujero de entrada al pupario (Royer et al., 1999; Brodeur & Boivin, 2004). Asimismo, se ha determinado que las larvas de *A. bilineata* evitan el superparasitismo de hospedadores parasitados por individuos hermanos y primos cuando la relación genética proviene del lado paterno pero no así del lado materno (Lizé et al., 2006, 2007).

Uso del hospedador

La primera línea de defensa de un hospedador es evitar ser descubierto por el parasitoide. Cuando esto falla, la resistencia directa que ofrece el hospedador hacia el parasitoide puede expresarse a través de defensas morfológicas y comportamentales en primer lugar y posteriormente por defensas fisiológicas (Fellowes, 2005). Las defensas morfológicas y comportamentales no han sido tan estudiadas como las fisiológicas pero existen varios ejemplos documentados. Morfológicamente se han descrito diversas características del huevo, larva o pupa, como la presencia de pelos, espinas o dureza del corion o integumento que impiden u obstaculizan la oviposición o aferramiento de la larva parasitoide al hospedador (Gross, 1993). Los estados inmaduros móviles (larva y pupa) pueden mostrar comportamientos evasivos como el enrollamiento, retorcimiento o alejamiento frente a la presencia del parasitoide (Lefèvre et al., 2011). Algunos ejemplos de comportamientos agresivos por parte del hospedador incluyen ahuyentar o incapacitar al adulto y remover o destruir huevos o larvas parasitoides (Gross, 1993; Braendle & Weisser, 2001; Castelo & Crespo, 2012). Dentro de las defensas fisiológicas el principal ataque es la respuesta inmune innata del hospedador, que, en el caso de los endoparasitoides implica que el huevo o la larva del parasitoide sea encapsulado y en el caso de los ectoparasitoides, estos se ven afectados por la coagulación de la

hemolinfa y la cicatrización de la herida (Godfray, 1994; Richards & Edwards, 2002; Rivers et al., 2002; Fellowes, 2005). Como contrapartida, los parasitoides han desarrollado una variedad de estrategias para superar las defensas del hospedador que bien pueden clasificarse como una evitación pasiva o un ataque activo. La evitación pasiva puede ser, en el caso de los endoparasitoides evitar el encapsulamiento oviponiendo en determinados órganos o tejidos o poseer una cubierta protectora que imita las propiedades de la superficie del hospedador, oviposición de varios huevos donde al menos uno sobrevive (Vinson, 1990; Pennachio & Strand, 2006); y en el caso de los ectoparasitoides implica un ataque imperceptible, o el abordaje del hospedador por zonas corporales accesibles (Godfray, 1994; Crespo & Castelo, 2012). En el caso de un ataque activo, las hembras de ciertos endo- y ectoparasitoides pueden inyectar venenos, teratocitos o polidnavirus que comprometen de distintas maneras al sistema inmune del hospedador, generalmente inhibiendo activamente la respuesta inmune (Richards & Edwards, 2002; Pennachio & Strand, 2006; Danneels et al., 2010; Kryukova et al., 2011).

Además de tener que enfrentarse con las defensas del hospedador, muchas veces el parasitoide también debe competir por obtener los recursos del hospedador. Las interacciones competitivas entre estados inmaduros de múltiples parasitoides en desarrollo en un único hospedador se conocen como competencia intrínseca, en contraste con las interacciones competitivas a nivel de localización del hospedador por parte de los parasitoides adultos que refieren a la competencia como extrínseca (de Moraes et al., 1999; Godfray, 1994). En un principio, se pensó que en ambientes apropiados para la oviposición, la mayoría de las hembras colocan sus huevos sin tener en cuenta la presencia de otros huevos sobre el hospedador, con los cuales su progenie deberá competir en el futuro próximo. Desde hace unas décadas se sabe que las hembras oviponen de forma de evitar la competencia entre sus progenies, cuando encuentran hospedadores con larvas o huevos supernumerarios, mediante la distinción entre hospedadores sanos y parasitados (Salt, 1961). Sin embargo, el conocimiento acerca de la competencia y de la evitación del parasitismo por parte de las larvas que buscan activamente a sus hospedadores hasta el momento es escaso e incompleto.

EL ÉXITO REPRODUCTIVO EN LOS PARASITOIDES

El éxito reproductivo o *fitness* puede definirse como una medida de los genes contribuidos por un individuo a la siguiente generación, generalmente establecido en términos de número de descendencia producida por ese individuo que sobrevive hasta la reproducción (Alcock, 1998). Es un concepto utilizado en biología para describir cuan bueno es el desempeño de un individuo dentro

de una población (Roitberg et al., 2001). El *fitness* considera la habilidad relativa de los individuos o de su progenie para sobrevivir bajo varias restricciones/limitaciones impuestas por el ambiente abiótico y biótico en el cual se encuentran, y es determinado por el éxito individual para encontrar y utilizar hábitats y recursos (Speight et al., 2008). El *fitness* también es entendido como eficacia o adecuación biológica, la cual es el proceso (y resultado) de la evolución natural de un organismo a través de la Selección Natural, que puede ser expresado en una estructura anatómica, un proceso fisiológico o un comportamiento específico (ver Roitberg et al., 2001).

Más allá de estas definiciones, el comportamiento como factor intrínseco de un individuo puede afectar el éxito reproductivo en los insectos y otros animales. La capacidad de un parasitoide para seleccionar un hospedador y las consecuencias a nivel de éxito reproductivo han sido en general abordadas desde la perspectiva de los insectos adultos. Si bien la larva deberá enfrentar restricciones ecológicas que difieren de aquellas que enfrentan las hembras adultas, en todos los casos el *fitness* dependerá de su capacidad para elegir el mejor hospedador disponible. Por consiguiente, las predicciones de los modelos desarrollados para parasitoides adultos pueden ser evaluadas, asumiendo que el primer estadio de las larvas buscadoras es el equivalente ecológico de una hembra con una esperanza de vida reducida, baja movilidad y únicamente un huevo para oviponer (Brodeur & Boivin, 2004). No obstante, nos encontramos con unos pocos datos disponibles sobre la capacidad de los estadios larvales de seleccionar un hospedador con determinadas características físicas o fisiológicas (Royer et al., 1999; Lizé et al., 2006; Crespo & Castelo, 2009; Lizé et al., 2010). Sin embargo, si se tienen en cuenta los parasitoides que poseen una estrategia de búsqueda del hospedador compartida, el estado inmaduro tienen una única oportunidad de parasitar un hospedador y su éxito reproductivo dependerá completamente de éste. Por este motivo, el costo de elegir un hospedador de baja calidad es alto y en consecuencia es probable que este comportamiento este bajo fuertes presiones de selección (Brodeur & Boivin, 2004).

Estimadores del éxito reproductivo

Para la mayoría de los organismos el vínculo entre comportamiento y *fitness* es complejo y no resulta sencillo determinarlo experimentalmente. En este contexto, los insectos parasitoides proveen una excelente oportunidad para explorar la conexión directa entre el éxito reproductivo y sus estimadores. En su trabajo de 1994, Godfray señaló la conexión directa entre el parasitismo y el *fitness*. No obstante, en muy pocos estudios se ha medido el *fitness* de manera directa (Hoffman, 1994). En vez de esto, la mayoría de los investigadores han recurrido a estimadores indirectos como

por ejemplo: tamaño corporal, fecundidad o longevidad (Bernal et al., 1999; Roitberg et al., 2001; Kant et al., 2012). Se debe tener cuidado cuando se aplican dichos estimadores, especialmente cuando sólo existe una conexión distante entre los estimadores y el éxito reproductivo. En la revisión de Roitberg y colaboradores (2001) los estimadores de *fitness* fueron asignados dentro de dos categorías: estimadores primarios y de ponderación. Los estimadores primarios pueden ser utilizados por si solos debido a su relación directa con el *fitness* (fecundidad, tasa de desarrollo, longevidad, etc.). Los estimadores de ponderación, cuyo principal efecto es modificar las relaciones directas, deberían ser utilizados en conjunción con estimadores primarios (proporción de sexos, supervivencia de la progenie, vagilidad, etc.). Algunos estimadores de ponderación, como el tamaño, pueden ser utilizados como primarios cuando previamente se conoce su relación con otro estimador primario como la fecundidad o longevidad. En el caso particular del tamaño, este suele tener una relación positiva (Roitberg et al., 2001).

Un caso particular corresponde a los índices de condición corporal (CI por sus siglas en inglés). La condición corporal se cree íntimamente relacionada a la calidad o la salud de un animal y ha sido ampliamente reivindicada como un determinante importante del *fitness* (Peig & Green, 2010). Se han propuesto como índices de condición un amplio rango de medidas que pueden ser morfológicas, bioquímicas o fisiológicas (Peig & Green, 2010). Los métodos estándar para estimar el CI califican o puntúan el contenido de grasa o se basan en la razón de la masa corporal relativizada por alguna medida de tamaño, generalmente una dimensión lineal como puede ser el largo del ala, largo de un artejo o el largo total del cuerpo (Stevenson & Woods, 2006). Por lo general, valores altos de estos índices son interpretados como que el animal posee una gran reserva de energía (Stevenson & Woods, 2006). Sin embargo, actualmente no existe un consenso sobre el método para estimar el CI más apropiado y diferentes metodologías han sido establecidas dentro de subdisciplinas (Peig & Green, 2010). Para los artrópodos, los CI más adecuados son los que consideran la medición de partes corporales duras como estimadores de tamaño, debido a que son invariantes con respecto al contenido de agua, estiramiento de las membranas intersegmentales, etc. (Jakob et al., 1996).

Calidad del hospedador

Las interacciones hospedador-parasitoide tienden a ser extremadamente fuertes ya que el hospedador representa el único recurso requerido para el desarrollo del parasitoide (Godfray, 1994; Caron et al., 2010; Böckmann et al., 2012). Por ende, la calidad del hospedador puede afectar a futuro la tasa de oviposición, la longevidad, la proporción de sexos, tamaño corporal y fecundidad,

entre otros atributos del parasitoide (King, 2000; Silva-Torres & Matthews, 2003; Silva-Torres et al., 2009). En otras palabras, el *fitness* de un parasitoide estará fuertemente ligado a la disponibilidad y calidad del hospedador (Godfray, 1994; Caron et al., 2010). La calidad del hospedador puede variar de acuerdo a varios parámetros como la especie (Harvey, 2000; Mohamed et al., 2006), el tamaño corporal (Wang & Messing, 2004; Silva-Torres et al., 2009), el estadio larval o estado de desarrollo del mismo (Mohamed et al., 2007; Li & Sun, 2011; Veena & Manjunath, 2011; Kant et al., 2012). Otros factores fundamentales que definen la calidad del hospedador son los eventos previos de parasitismo, ya que suponen de antemano la competencia por el recurso (van Alphen & Visser, 1990; Godfray, 1994; Brodeur & Boivin, 2004). Frecuentemente, algunos de estos parámetros suelen estar relacionados entre sí, por lo que al referirnos a uno de ellos nos estaremos refiriendo a otro. Así, por ejemplo, el estadio larval y la edad suelen estar relacionados positivamente con el tamaño del individuo, por lo que al ir avanzando en el desarrollo larval se irá incrementando el tamaño del insecto. Todos estos aspectos contribuyen a conformar la condición corporal del hospedador, la cual puede ser definida como un evaluador del estado nutricional o estado de calidad del hospedador, y es un parámetro que los ecólogos pueden estimar en forma experimental (Jakob et al., 1996).

El estadio (edad/tamaño) del hospedador puede ser una variable muy importante para los parasitoides en términos de calidad debido a que completan su desarrollo larval en o sobre un único hospedador. De esta manera los recursos son restringidos y el tamaño del parasitoide adulto que emerge suele estar fuertemente influenciado por esta variable (King, 1989; Godfray, 1994; Harvey et al., 1994; Ellers et al., 1998). Los modelos de optimalidad asumen que la calidad del hospedador se incrementa como función de la edad (tamaño) del hospedador al momento del parasitismo, dado que un mayor tamaño del hospedador se traduce en una mayor cantidad de alimento para el desarrollo de la progenie (Amarasekare et al., 2010). Por este motivo se espera visualizar una preferencia en la selección de hospedadores con una tendencia hacia los de mayor tamaño. Sin embargo, esto puede no ser cierto en todas las situaciones y las excepciones al caso deben ser tenidas en cuenta. Existen varios ejemplos donde los hospedadores correspondientes a los primeros estadios larvales son elegidos por sobre los más avanzados en el desarrollo. Esto está relacionado con el hecho que insectos de mayor tamaño pueden equivaler a una defensa física o inmune más fuerte o intensa por parte del hospedador, la cual repercute directamente en la supervivencia de huevos, larvas e inclusive la hembra que está oviponiendo (Harvey et al., 2013). Además, al tener en cuenta el tipo de desarrollo del parasitoide no se puede obviar que esta relación directa no es necesariamente cierta en el caso de los koinobiontes. Recordemos que los koinobiontes atacan recursos que pueden ser altamente dinámicos, por lo cual el tamaño final del hospedador puede

llegar ser varias veces mayor que el tamaño inicial del hospedador al momento de la oviposición. En estos casos, la calidad del hospedador será más difícil de definir y dependerá de su tasa de crecimiento luego del parasitismo y de su tamaño final, cuando es consumido por el parasitoide (Harvey, 2005).

Además, los hospedadores, al igual que otros insectos, se pueden encontrar con estresores en el ambiente que pueden incluir infecciones y lesiones, o factores abióticos como fluctuaciones en la temperatura y cambios en la disponibilidad de nutrientes, que pueden afectar su estado fisiológico y en consecuencia su calidad como recurso alimenticio (Holmstrup et al., 2010; Browne et al., 2014). En otras palabras, un estresor es cualquier factor que desafía al mantenimiento de la homeostasis de cualquier organismo vivo (Selye, 1976; Morgan & Tromborg, 2006; Johnson & White, 2009; Zhao et al., 2014). La respuesta a este desafío es lo que se define como estrés. Es decir, el estrés es la respuesta inespecífica del organismo, ya sea comportamental y/o fisiológica, en la cual entran en juego mecanismos para afrontar una situación que se percibe como amenazante ante cualquier demanda incrementada del ambiente (Selye, 1976; Johnson & White, 2009; Holmstrup et al., 2010; Zhao et al., 2014). En otras palabras, el estrés es considerado como una reacción natural y necesaria para la supervivencia. Existen en mamíferos numerosos estudios sobre mecanismos fisiológicos de estrés que han sido estudiados a través del comportamiento y la fisiología. Más precisamente, no existen distintos tipos de respuestas fisiológicas al estrés, sino que es un mismo tipo de respuesta frente a distintos estresores, independientemente de la naturaleza o identidad del estresor. Si bien los primeros trabajos sobre la respuesta de estrés se realizaron en vertebrados, especialmente en mamíferos, en los últimos años se han incorporado a la literatura trabajos abarcando diversos seres vivos, vertebrados e invertebrados, donde los tipos de respuestas de estrés pueden ser evidenciados a nivel fisiológico, celular y comportamental (Esch, 1975; Lafferty & Kuris, 2005; Lukowiak et al., 2008; Lee et al., 2012; Hopper et al., 2013). En el caso de los insectos, las respuestas fisiológicas y celulares al estrés se dan a nivel sistémico a través de la producción de aminas biogénicas, neuropéptidos, hormonas metabólicas, proteínas antioxidantes y proteínas de shock térmico (HSP) (Pfaff, 2009; Even et al., 2012). Las respuestas comportamentales de estrés han sido ampliamente estudiadas en mamíferos y en menor medida en invertebrados, y suelen incluir comportamientos o respuestas rápidas, caracterizadas por “defensa o escape”.

Los insectos y, en particular aquellos que actuarán como hospedadores, pueden sufrir diferentes tipos de estresores bióticos y/o abióticos como cualquier otro ser vivo. Por ejemplo, cambios en los niveles de nicotina en la dieta de *Manduca sexta* L. se ven reflejados en el peso de sus pupas (Harvey et al., 2007). Para el caso de langostas y cucarachas sometidas a estrés, éstas producen un

aumento de los niveles de neurohormonas, con consecuencias sobre la modulación de los comportamientos de defensa y vuelo (Davenport & Evans, 1984). En *Drosophila* Fallén se ha observado que el estrés mecánico produce cambios fisiológicos en la actividad cardíaca (Sénatore et al., 2010).

Competencia entre parasitoides por los recursos energéticos

En los casos en que ocurre super- o multiparasitismo, dos o más individuos compiten por los recursos, es decir, el hospedador. En los parasitoides solitarios sólo un único organismo sobrevive hasta la adultez, por lo que el superparasitismo podría suponer entonces la muerte de todos menos un individuo de los que se hallan parasitando al hospedador (Godfray, 1994). En los parasitoides gregarios, el superparasitismo implica una reducción en los recursos disponibles por parasitoide (van Alphen & Visser, 1990; Dorn & Beckage, 2007). En consecuencia, el *fitness* también dependerá de la habilidad del parasitoide para identificar un hospedador adecuado y del proceso de selección del hospedador durante el cual su calidad es evaluada (Hassell, 2000; Caron et al., 2010). Sin embargo, a pesar de parecer poco adaptativo, el superparasitismo puede resultar ventajoso bajo ciertas circunstancias, como por ejemplo la escasez de hospedadores sanos (Sirot & Bernstein, 1997). La principal razón se relaciona con que el parasitoide que acepta superparasitar tendrá una probabilidad finita de ganar la competencia por los recursos del hospedador, por lo que en ausencia de hospedadores sanos el superparasitismo resultará adaptativo (Wajnberg et al., 2008). En otras palabras, en los parasitoides solitarios, la retribución de oviponer en un hospedador de menor calidad (previamente parasitado) es que existe la probabilidad de que ese huevo pueda ganar la competencia por el hospedador y subsecuentemente desarrollarse en un parasitoide adulto (Visser et al., 1992). Se ha documentado que existe un período justo después de que el hospedador es parasitado por primera vez, en el cual, el segundo o posterior huevo o larva tiene una probabilidad positiva de ganar la competencia (Field et al., 1997; van Baalen & Hemerik, 2008). Si bien numerosos factores pueden definir el resultado de la competencia como las diferencias en las tasas de desarrollo o la cantidad de huevos o larvas que compiten, muchos trabajos han reportado que el éxito en la competencia entre parasitoides que atacan un mismo hospedador es fuertemente dependiente del tiempo (Tillman & Powell, 1992; De Moraes & Mescher, 2005; Harvey et al., 2013). Donde existen intervalos temporales entre la primera y la segunda oviposición, el primer parasitoide que ovipuso o que atacó en primer lugar generalmente deja fuera de competencia a los parasitoides que aparecieron posteriormente (Tillman & Powell, 1992; Marktl et al., 2002; De Moraes & Mescher, 2005; Tian et al., 2008).

Los parasitoides son excelentes organismos/ejemplos para poner a prueba la teoría de forrajeo en los casos donde ocurre selección del hospedador (Ueno, 1999). Inicialmente los trabajos con parasitoides se enfocaron sobre cómo se modificaba el comportamiento de selección del hospedador en respuesta a variables ambientales (calidad del hospedador, densidad de coespecíficos, etc.) (Godfray, 1994; Ueno, 1999). En los últimos años se acrecentaron los trabajos en los que se evalúan diversos comportamientos, como la búsqueda y selección del hospedador, en respuesta al estado fisiológico del parasitoide. Actualmente, está ampliamente aceptado que la modificación de las estrategias comportamentales por parte de los parasitoides en función del estado fisiológico es un hecho frecuente y es lo que se conoce a como estado-dependencia (Mangel & Clark, 1988; Clark & Mangel, 2000; Roitberg & Bernhard, 2007). Las limitaciones fisiológicas más frecuentes que modulan los comportamientos de selección del hospedador suelen ser la esperanza de vida o la carga de huevos en el caso de las hembras, caracterizando a las especies de parasitoides en función de estos parámetros en *time-limited* o *egg-limited*, respectivamente (Sirot et al., 1997; Desouhant et al., 2005; Wajnberg et al., 2006). Por ejemplo, en el caso de *Venturia canescens* Gravenhorst se ha demostrado una fuerte influencia de la esperanza de vida en la decisión de rechazar o aceptar el superparasitismo (Sirot & Bernstein, 1997). Este mismo parasitoide ha mostrado que las decisiones de alimentación dependen de su estado nutricional (Desouhant et al., 2005). Otro ejemplo es el mimárido *Anaphes victus* Huber, donde el tiempo de residencia en un parche puede estar influenciado por la edad del parasitoide, por lo que al acercarse al final de su vida, las hembras permanecen más tiempo en el parche de hospedadores (Wajnberg et al., 2006). Recordemos que en algunas circunstancias donde la búsqueda del hospedador es mixta, la larva parasitoide actúa como un equivalente ecológico de la hembra, puesto que es ésta la que lleva a cabo los últimos pasos del forrajeo (Brodeur & Boivin, 2004). Por este motivo, la decisión de aceptar o rechazar un determinado hospedador recaerá sobre la larva y estas decisiones también pueden ser modeladas por su estado interno (Royer et al., 1999). Si bien los ejemplos de estado dependencia en parasitoides con estrategia de búsqueda mixta son escasos, existen evidencias de que las larvas modifican su comportamiento de selección del hospedador en función de su estado fisiológico. Por ejemplo, el primer estadio larval del estafilínido *A. bilineata* parasita pupas de varios dípteros, y se ha observado que al disminuir la cantidad de tiempo para encontrar un hospedador sano, es decir, al incrementarse la edad de las larvas parasitoides, se incrementa la aceptación de hospedadores ya parasitados (Royer et al., 1999). Es decir, que un hospedador resulte adecuado y que sea parasitado va a depender tanto de factores intrínsecos de la historia de vida de cada individuo particular como del estado interno del parasitoide en el momento de encuentro con un hospedador potencial.

La competencia entre parasitoides por los recursos energéticos del hospedador hace que se produzcan una serie de sucesos que contribuyen a definir que parasitoide será el ganador de dicha competencia. Estos sucesos ocurren a diferentes escalas de acción, desde la localización de hospedadores en el hábitat hasta el uso de los nutrientes sobre el cuerpo mismo del hospedador (Godfray, 1994). A través de distintos comportamientos, los parasitoides intentan minimizar los conflictos en las situaciones de competencia, de modo de que cada uno de ellos pueda acceder a un hospedador sano y obtener el mayor *fitness* posible, lo cual no sucede cuando el recurso hospedador es limitante. Entre los procesos que se dan en los parasitoides de manera de evitar o atenuar la competencia se destacan la distribución equitativa de parasitoides entre los hospedadores disponibles en el hábitat, lo que se conoce como Distribución Libre e Ideal (Fretwell & Lucas, 1970). Además, la competencia puede ser evitada o disminuida en función del orden de llegada y ataque al hospedador, y de las contiendas fisiológicas o comportamentales (físicas o de lucha) que se producen durante el superparasitismo (Godfray, 1994). En la competencia post-ataque del hospedador, el estado fisiológico y corporal de las larvas parasitoides juega un papel crucial en la definición de las interacciones entre ellas y de quien gana la competencia (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1996; De Moraes et al., 1999; Harvey et al., 2013). Sin embargo, aun no se ha estudiado cómo influyen estos atributos en la competencia pre-parasitismo en los parasitoides con larvas que activamente buscan a sus hospedadores.

Condición corporal del parasitoide adulto

Recientemente se han enumerado diversas características que describen la calidad de un hospedador como recurso para un parasitoide. Ahora bien, ¿Cómo repercute la calidad sobre el adulto que se desarrolla en este hospedador? Si bien existen muchos matices dependiendo de las características de vida del parasitoide, se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a la influencia que tendrán determinados atributos del hospedador sobre el desarrollo del parasitoide. Por ejemplo, en lo que respecta al tamaño del hospedador se ha observado que frecuentemente, este atributo se relaciona positivamente con los parámetros representativos del *fitness* de los parasitoides (Godfray, 1994; Harvey, 2000; Mackauer & Chau, 2001). Es decir, de un hospedador de mayor tamaño emergerán parasitoides de mayor tamaño (Mackauer & Chau, 2001; Li & Sun, 2011; Koyama et al., 2013), un desarrollo más veloz hasta alcanzar la madurez (Harvey, 2000; Li & Sun, 2011; Kant et al., 2012), una mayor supervivencia de la progenie y mayor longevidad en los adultos (Bernal et al., 1999; Wang et al., 2008) y una progenie sesgada hacia las hembras (Amarasekare et al., 2010; Pekas et al., 2010). En lo que respecta al estado fisiológico del hospedador o su grado de perturbación, se han observado que diferentes estresores sobre hospedadores o las plantas de las cuales estos se

alimentan pueden verse reflejados en los parasitoides e incluso en los hiperparasitoides. Para distintas perturbaciones ambientales se han registrado variaciones negativas en el tamaño y supervivencia de los adultos, la carga de huevos inicial de las hembras, la cantidad de prole que se desarrolla y la proporción de sexos (Teder & Tammaru, 2002; Harvey et al., 2007; Moon & Moon, 2010).

Los encuentros o interacciones entre las larvas parasitoides pueden afectar el desarrollo del competidor que resulte ganador. En numerosas ocasiones se ha planteado que la larva sobreviviente sufre costos indirectos relacionados con el *fitness* al eliminar las larvas supernumerarias (Harvey et al., 2013). Varios trabajos han demostrado que la influencia del superparasitismo sobre el tamaño del parasitoide que se desarrolla hasta la adultez varía según la especie. No existe hasta hoy una tendencia clara en los resultados disponibles, ya que se han encontrado relaciones tanto positivas como negativas entre estos dos parámetros. En algunos himenópteros se ha observado que los adultos desarrollados a partir de hospedadores superparasitados suelen tener un mayor peso o tamaño respecto a aquellos desarrollados sin competencia (Bai & Mackauer, 1992; Gu et al., 2003; Mackauer & Chow, 1012). Algunos autores han sugerido que este mayor crecimiento potencial de los parasitoides se debe a un aumento en el consumo de alimento por parte del hospedador superparasitado frente a uno monoparasitado o no parasitado, en ese orden (Bai & Mackauer, 1992; Mackauer & Chau, 2001). En contraste, algunos casos han evidenciado que el superparasitismo tiene un efecto negativo sobre el tamaño del parasitoide que se desarrolla, el cual decrece con el aumento de larvas sobre el hospedador (Eller et al., 1990; Ozkan, 2006; Silva-Torres et al., 2009). Respecto al tiempo de desarrollo también se encuentran patrones opuestos. En varios casos el desarrollo de la larva ganadora proveniente de un hospedador super- o multiparasitado se extiende con respecto al de un parasitoide que se desarrolla solo (Harvey et al., 2009a; Tunca & Kiliçer, 2009). No obstante, Caron y colaboradores (2010) encontraron que el desarrollo se acelera para la larva ganadora que proviene de un hospedador superparasitado. Asimismo, la supervivencia del parasitoide puede verse reducida cuando la larva se cria en situación de competencia (Harvey et al., 1993; Tunca & Kiliçer, 2009) o, por el contrario puede ser mayor en estas condiciones (Khafagi & Hegazi, 2008; Zhang et al., 2010). También, se ha estudiado la influencia del superparasitismo sobre otras medidas de *fitness* como la proporción de sexos. Por ejemplo, *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead tiene un sesgo hacia las hembras que se asocia positivamente con la intensidad de superparasitismo en *Anastrepha ludens* Loew (Montoya et al., 2010). Por consiguiente, en los casos de superparasitismo, no se puede esperar que surja un patrón definido respecto al *fitness* del parasitoide adulto que se desarrolla bajo estas circunstancias. El *fitness*

dependerá de los rasgos de historia de vida del parasitoide, y para conocerlo es necesario estudiar cada interacción en particular.

LOS ASILIDOS

Los dípteros parasitoides actuales están representados por numerosos linajes evolutivos, lo que se evidencia a través de rangos taxonómicos de hospedadores muy amplios (Eggleton & Belshaw, 1993). Un rasgo de este grupo de parasitoides es que las hembras, en su mayoría, carecen de ovipositor, por lo que no suelen tener un contacto directo con el hospedador y la estrategia de parasitismo en dos fases o mixta es la más común (Feener & Brown, 1997). Por otro lado, los dípteros son considerados en su totalidad como koinobiontes, es decir que permiten el desarrollo del hospedador luego de haberlo parasitado, en contraposición de los idiobiontes, quienes paralizan al hospedador previo al parasitismo (Feener & Brown, 1997). Sin embargo, la dicotomía idiobiosis-koinobiosis ha sido cuestionada y algunos autores han sugerido que debería utilizarse únicamente en himenópteros, para los cuales esta clasificación fue establecida originalmente (Askew & Shaw, 1986; Belshaw, 1994; Dindo, 2011). Otra característica de los dípteros parasitoides es que son principalmente endoparasitoides, pero existen dos familias de Asiloidea que cuentan con representantes ectoparasitoides: Bombyliidae y Asilidae (Musso, 1983; Yeates & Greathead, 1997).

Los Asilidae son dípteros llamados comúnmente moscas ladronas (*robber flies*; Ruiz, 1925). Comprende una de las mayores y más abundantes familias de insectos actuales. Se distribuyen mundialmente incluyendo unos 530 géneros que engloban unas 7003 especies (Asilidae website: <http://www.geller-grimm.de> Geller-Grimm, 2010; Artigas, 1970; De Santis, 1989; De Santis & Cornejo, 1990; Artigas et al., 1991). Los adultos son, con unas pocas excepciones, moscas activas de tamaño considerable. Tanto machos como hembras son notorios por sus ataques rapaces hacia otros insectos, incluyendo aquellos con aguijón como abejas y avispas. Generalmente se posan en zonas abiertas y soleadas donde se presume que disponen de una buena vista (panorama/perspectiva) de los insectos que pasan, y luego vuelan para atrapar una presa adecuada (Wood, 1981). Dado que los estadios inmaduros de los asílidos son crípticos y viven en el suelo o en madera en descomposición, muy pocos especímenes inmaduros de las más de 7000 especies han sido encontrados y estudiados (Wood, 1981). Sin embargo, existe cierto consenso en que las larvas de los asílidos suelen ser predatoras de los estados inmaduros de varios insectos, en general, presentando una notoria preferencia hacia las larvas de Coleoptera y, particularmente hacia larvas de la familia Scarabaeidae (Knutson, 1972; Musso, 1983; Wei et al., 1995). Los asílidos cuentan

con unas pocas especies que son ectoparásitas, es decir, la larva permanece aferrada a su hospedador durante un tiempo que puede prolongarse varias semanas alimentándose de éste sin causar su muerte, luego puede desprenderse y actuar como un predador de vida libre (Clements & Bennett, 1969; Knutson, 1972; Musso, 1983). Hasta el momento sólo se han registrado unos pocos casos de hábito parasitoide koinobionte. En estos casos las larvas se aferran externamente a la cutícula y, si bien el hospedador continúa con vida por un tiempo más o menos prolongado, muere al finalizar el proceso y como resultado se desarrolla el parasitoide. Los asílidos parasitoides descritos hasta el momento pertenecen únicamente al género *Mallophora* (Copello, 1922, 1927, 1942; Clements & Bennett, 1969; Musso, 1978, 1983; Castelo & Capurro, 2000; Castelo, 2003).

BIOLOGÍA DEL SISTEMA DE ESTUDIO

Biología del parasitoide *Mallophora ruficauda*

El moscardón cazador de abejas, *Mallophora ruficauda* Wiedemann 1828, es una especie endémica de la Región Pampeana argentina que habita hasta los 38° S (Rabinovich & Corley, 1997). Hacia el norte se extiende abarcando Paraguay, Uruguay y el sur de Brasil, y también se encuentra en el sur de México y Centroamérica (Artigas & Angulo, 1980). Es ectoparasitoide solitario de los gusanos blancos del suelo (larvas de Coleoptera: Scarabaeidae), preferentemente de la especie *Cyclocephala signaticollis* Burmeister, y en estado adulto es depredador de insectos voladores, tales como abejas melíferas, otros himenópteros y dípteros (Copello, 1922, 1927, 1942; Werthein, 1981; Rabinovich & Quiroga, 1995; Castelo, 2002, 2003; Castelo & Corley, 2010).

Mallophora ruficauda presenta una dualidad biológica, es parasitoide y depredador a la vez, y esta característica lo hace particularmente interesante como modelo de estudio en ecología. En cuanto a su fase depredadora, el incremento en las poblaciones de *M. ruficauda* en los últimos años, ha aumentado el daño principalmente en los colmenares, afectando seriamente la explotación apícola en la producción de miel (Rabinovich, 1994). Esta especie es una plaga cíclica, que afecta alternativamente distintas localidades por períodos aproximados de cuatro años donde el ataque es severo, luego permanece sin provocar daños por un par de años hasta que su densidad se incrementa nuevamente (M. Castelo, observación personal). Argentina es el tercer exportador mundial de miel y la provincia de Buenos Aires genera aproximadamente el 50% del volumen de miel nacional (Blengino, 2013). Se estima que las pérdidas ocasionadas sobre la producción de miel y otros productos de la colmena debidos solamente al problema del moscardón cazador de abejas en la

Región Pampeana rondan los 2 a 3 millones de dólares (Rabinovich & Corley, 1997). *Mallophora ruficauda* además de afectar directamente a la explotación apícola en la producción de miel, afecta indirectamente la producción de semillas oleaginosas como el girasol, ya que el moscardón caza a las abejas en vuelo antes de que éstas lleguen al capítulo floral y contribuyan con el proceso de polinización. Se estima que la utilización de abejas para la polinización de cultivos deja beneficios cercanos a los 1.000 millones de dólares por año (Mayoral, 1999). De esta manera, la reducción de esta plaga es de gran importancia para los ámbitos apícola y agrícola. Una de las aproximaciones para realizar un programa de control sobre *M. ruficauda* es enfocar los estudios a entender diversos aspectos biológicos y ecológicos de este insecto. Debido a que la calidad del hospedador es uno de los parámetros que definen el éxito reproductivo del parasitoide adulto, y que los procesos de búsqueda, localización, selección y uso del hospedador dependen en gran parte del comportamiento de las larvas, es importante conocer cómo se llevan a cabo estos procesos y cuales serán los parámetros del hospedador que tendrán influencia sobre la elección de las larvas y que efecto tendrán a futuro en la *performance* del adulto que se desarrolle.

Mallophora ruficauda posee un ciclo de vida anual en el cual los adultos aparecen durante el verano, abarcando esta estación la temporada reproductiva. Desde su nacimiento pasa por cinco estadios larvales a lo largo del año y empupa ya avanzada la primavera. Los adultos de *M. ruficauda* comienzan a aparecer a fines de diciembre y la emergencia continúa hasta mediados de marzo (Figura 1.1.g). Poseen hábitos diurnos y desarrollan todas sus actividades entre las 9 y 19 hs. La alimentación es máxima entre las 15-18 hs observándose una disminución entre las 11-14 hs, que se corresponde con un aumento de los comportamientos relacionados con la reproducción. La actividad de cortejo es máxima entre las 10-12 hs, las cópulas se producen mayoritariamente entre las 11-13 hs (Figura 1.1.h) y la oviposición se produce entre las 10-17 hs con un pico entre las 11-13 hs (Nussenbaum, 2007). Las hembras de *M. ruficauda* poseen una estrategia de producción de huevos sinovigénica extrema, es decir, emergen con todos los oocitos inmaduros, y la maduración se produce durante su vida reproductiva. El índice de ovigenia fue calculado para las hembras vírgenes emergidas en laboratorio y es, en promedio, de 0,084 y el número promedio de ovariolas por hembra es de 514,9. El número promedio de oocitos maduros en hembras capturadas a campo de edad desconocida es de 330,5. Además, el número de oocitos totales y el número de ovariolas de la hembra están correlacionados positivamente con el tamaño corporal (Nussenbaum, 2007; M. Castelo, en preparación).

La estrategia de oviposición de las hembras se produce en dos fases que tienen lugar a dos escalas distintas. En primer lugar las hembras localizan el hábitat de los hospedadores potenciales a escala

de pastizal. Luego, a nivel del microhábitat del hospedador, la hembra selecciona la altura de oviposición ya que los sustratos elevados que rondan o superan los 1,25 m favorecen la dispersión por el viento de las larvas, maximizando el monoparasitismo y minimizando el superparasitismo de los hospedadores (Castelo & Capurro 2000; Castelo, 2003; Castelo & Corley, 2004a; Castelo et al., 2006). Posteriormente, se ha sugerido que la elección del lugar particular de oviposición que realiza la hembra sobre la planta podría estar mediada por quimiorreceptores de contacto presentes en un área particular de las antenas. Al considerar las características morfológicas de la antena de los adultos, Groba y colaboradores (2014) sugirieron que la distribución de los quimiorreceptores olfativos y de las estructuras cuticulares en la antena podrían contribuir a un mecanismo de detección de olores en los adultos del parasitoide, por lo que la hembra podría detectar la presencia de claves químicas en el aire vinculadas con el hospedador.

En cuanto a los patrones de parasitismo de los hospedadores, se ha observado que cambian con la escala de acción del parasitoide. Si bien se ha establecido que las hembras tendrían la capacidad de detectar y encontrar a gran escala los ambientes con hospedadores (Nussenbaum, 2007; M. Castelo, en preparación), una vez dentro del parche las hembras parecerían cambiar su estrategia de búsqueda. Luego de ser dispersadas, las larvas producen a gran escala (pastizal) un patrón de denso-independencia en el parasitismo, sugiriendo que las hembras no tendrían la capacidad de detectar donde están los hospedadores dentro del parche al momento de depositar sus huevos. En cambio, a pequeña escala (microhábitat) se produce un patrón de parasitismo denso-dependiente inverso, que indica que a medida que se incrementa el número de hospedadores la proporción de ellos que es parasitada por las larvas que forrajean en el suelo es menor. Este patrón producido a menor escala sugiere que *M. ruficauda* posee un potencial limitado como regulador de las poblaciones de gusanos blancos, y no sería un agente de control biológico eficiente (Castelo & Corley, 2004b; Castelo & Corley, 2009).

Respecto a la búsqueda activa del hospedador, la llevan a cabo las larvas, pero se han observado peculiaridades que hasta el momento se dan únicamente en este insecto. Durante el verano, las hembras depositan sus desoves en sustratos naturales y artificiales altos (Figura 1.1.a). Los huevos eclosionan y las larvas I, que miden 1,35 mm de largo y 0,32 de ancho (Castelo, 2003) son dispersadas por efecto del viento, cayendo al suelo donde se entierran. Se ha observado que las larvas del estadio I de *M. ruficauda* pueden detectar la presencia del hospedador y poseen cierta motivación a iniciar movimiento de locomoción, pero no se orientan hacia los gusanos blancos y carecerían de las estructuras bucales de anclaje necesarias para aferrarse a su tegumento. Estos movimientos basales no estarían directamente relacionados con la búsqueda del hospedador, sino

con la búsqueda de su microambiente y estarían asociados con comportamientos posteriores a la eclosión, como desprenderse del corion del huevo, huir de la luz solar, evitar la desecación y enterrarse en el suelo rápidamente (Crespo & Castelo, 2008, 2010). El primer estadio larval muda al segundo dentro de una estrecha ventana temporal en la que aparentemente no se alimenta. Se cree que esta etapa estaría vinculada con la preparación fisiológica antes de comenzar la búsqueda y parasitación del hospedador (Crespo, 2007; Crespo & Castelo, 2010). El verdadero encuentro entre parasitoide y hospedador es llevado a cabo por las larvas de estadio II (Figura 1.1.b). Durante este período muestran una activa orientación hacia su hospedador independientemente de la edad, utilizando claves químicas liberadas por el gusano blanco (Castelo & Lazzari, 2004; Crespo & Castelo, 2008). Puntualmente, las claves atractivas para la larva II del parasitoide provienen de la cámara de fermentación (proctodeo) de su hospedador y también resultan atractivas para las larvas III de *C. signaticollis*, por lo que podría tratarse de un caso de explotación del sistema de comunicación química del gusano blanco por parte de *M. ruficauda* (Groba & Castelo, 2012). La manera en que la larva del parasitoide detecta y se orienta hacia estas claves químicas es mediada por quimiosensilias ubicadas en los palpos maxilares (Crespo et al., 2011; Groba, 2014). Crespo y colaboradores (2011) encontraron que el parasitoide continúa detectando y orientándose hacia su hospedador incluso con un único palpo maxilar funcional, no así cuando ambos palpos dejan de ser funcionales mediante su ablación. Esto indica que el mecanismo de orientación sería una klinotaxia (Crespo et al., 2011). Además en este trabajo se muestra que la cápsula cefálica, incluyendo las estructuras sensoriales (antenas y palpos maxilares) de la larva I están mucho menos desarrolladas y esclerotizadas que en el segundo estadio larval. Estos resultados concuerdan con la idea de que la capacidad de búsqueda activa del hospedador se adquiere luego de mudar al segundo estadio, momento en que las larvas de Asilidae sufren varias modificaciones morfológicas, principalmente en las piezas bucales y los apéndices cefálicos (Musso, 1981; Groba, 2014). Este hecho es único entre los parasitoides y sumamente peculiar, no registrándose hasta el momento otros casos similares en la bibliografía.

Respecto a la duración de los distintos estadios larvales, se ha observado que en condiciones de laboratorio, las larvas permanecen como estadio I durante aproximadamente 7 días y luego mudan al siguiente estadio. Se ha estimado la longevidad del estadio II en ausencia de su hospedador, siendo en promedio de 32 días y alcanzando un máximo de 144 días (Crespo & Castelo, 2010). Luego de parasitar a su hospedador, el segundo estadio larval es el más largo y más variable respecto a la supervivencia comparado con el resto de los estadios larvales, pudiendo permanecer en este estadio en promedio 109 días (Figura 1.1.c) (Crespo & Castelo, 2010). No se ha registrado la muda al tercer estadio en ausencia del hospedador, lo que indica que encontrarlo antes de terminar



Figura 1.1. Ciclo de vida del moscardón cazador de abejas, *Mallophora ruficauda*. **a.** Huevos sobre sustrato natural, **b.** Larva II de vida libre, **c.** Larva II sobre *C. signaticollis* de estadio III, **d.** Larva III sobre un hospedador en transición al estado pupal (prepupa), **e.** Larva V y restos del hospedador, **f.** Pupa, **g.** Moscardón adulto con una presa (abeja melífera), **h.** Adultos en cópula. Fotografías: ME Barrantes, JE Crespo y MK Castelo.

el segundo estadio es crucial para el desarrollo del parasitoide. Durante la coexistencia en el proceso de parasitismo, el hospedador y el parasitoide transitan un estado de letargo durante el invierno, y a fines de la estación invernal, cuando comienza a incrementarse la temperatura, el gusano blanco se activa y empieza a alimentarse preparándose para sufrir la transformación al estado de pupa. Es en ese momento cuando la larva de *M. ruficauda* comienza a crecer con rapidez y el pasaje por los estadios III, IV y V sucede relativamente rápido, en un período de pocos días, consumiendo totalmente al hospedador y transformándose en pupa (Figuras 1.1.d, e y f). Dado que la larva parasitoide transita un estado de letargo en las primeras instancias del parasitismo y parece activarse en el momento de transición del hospedador desde el estado larval al pupal, éste parecería ser un momento clave para la definición de la competencia. Hay que mencionar, además, que sin importar la época del año en que se realicen los muestreos, siempre se hallan gusanos blancos

superparasitados, lo que también sugiere que el momento de definición de la competencia ocurriría más avanzado el proceso de parasitismo. No obstante, es necesario un registro más exhaustivo para aclarar este punto. Las larvas de los estadios III y IV son dependientes del hospedador vivo, es decir no pueden continuar su desarrollo al estadio siguiente en ausencia del mismo. Durante el estadio IV, la larva mata al hospedador pero continua alimentándose de sus restos, proceso que se prolonga durante el estadio V hasta que empupa (Crespo & Castelo, 2010). El estado de pupa se extiende en promedio unos 24 días y finalmente al principio del verano emergen los adultos, completando así este complejo ciclo.

Si bien el parasitoide ha mostrado ser altamente específico hacia el escarabeido de la especie *C. signaticollis* (Castelo & Capurro, 2000; Castelo & Lazzari, 2004; Crespo & Castelo, 2008), se ha evidenciado cierta flexibilidad hacia otras especies del mismo género bajo condiciones de campo (Castelo & Corley, 2010). Se ha sugerido que esta flexibilidad puede estar relacionada con factores intrínsecos del parasitoide, como la edad de la larva en el momento en que ocurre el parasitismo, donde larvas más longevas y con una esperanza de vida menor respecto a las más jóvenes, aceptan otras especies como hospedadoras (Barrantes, 2009). Así también, factores extrínsecos como las defensas comportamentales que presentan cada una de las potenciales especies de hospedadores pueden moldear la aceptación por parte del parasitoide (Castelo & Crespo, 2012). Es frecuente, además, encontrar *C. signaticollis* superparasitados a campo. Este proceso parece estar relacionado con la presencia de competidores, previo a que se produzca el parasitismo. Se ha registrado recientemente que la competencia intraespecífica previa a que se produzca el parasitismo es un factor denso-dependiente que modifica la selectividad hacia los hospedadores (Martínez et al., en preparación). En este díptero, no sólo el proceso de aceptación del hospedador ha demostrado ser sensible a factores extrínsecos, también el proceso de orientación al hospedador puede verse influenciado por la presión atmosférica (Crespo & Castelo, 2012).

Biología del hospedador *Cyclocephala signaticollis*

Los gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae) son larvas de escarabajos de régimen fitófago y pasan la etapa inmadura de su ciclo de vida bajo tierra. Estas larvas producen grandes daños en las raíces y semillas de las plantas por la acción de sus mandíbulas, causando enormes pérdidas económicas, por lo que son consideradas una importante plaga de los cultivos comerciales y áreas verdes de recreación en diferentes partes del mundo (Remedi de Gavoto, 1964; Alvarado, 1983; Cranshaw & Zimmerman, 1998; Cherry & Schueneman, 1998; Potter, 1998). Se han detectado nueve especies de gusanos blancos rizófagos en la provincia de Buenos Aires: *Anomala*

testaceipennis Blanchard, *Archophileurus vervex* Burmeister, *Bothynus striatellus* Fairmaire, *Cyclocephala signaticollis* Burmeister, *C. modesta* Burmeister, *C. putrida* Burmeister, *Diloboderus abderus* Sturm, *Heterogeniates bonariensis* Ohaus, *Philochloenia bonariensis* Bruch (Alvarado, 1980). Estos gusanos son hospedadores potenciales de *M. ruficauda* (Crouzel, 1965) en especial *C. signaticollis*, el cual ha sido observado como el hospedador más seleccionado a campo (Remedi de Gavotto, 1964; Dennis & Knutson, 1988; Castelo & Capurro, 2000; Castelo & Corley, 2004b; Castelo & Corley, 2009). *Cyclocephala signaticollis* posee un ciclo de vida anual que se caracteriza por la presencia de tres estadios larvales (Figura 1.2.a-d). Los adultos emergen a mediados de noviembre y las hembras prontamente comienzan a depositar huevos en forma aislada en terrones muy pequeños dentro del suelo. Las larvas de tercer estadio comienzan a aparecer hacia fines de febrero, y son del tipo escarabeiforme, en forma de “C”, con la cabeza quitinizada y el cuerpo blando y de color blanco cremoso alcanzando un máximo de 25-30 mm de longitud. Se hallan entre 5 y 15 centímetros de profundidad en el suelo y pasan el invierno en el interior de una celda en la tierra como larva invernante. Se alimentan de raíces de trigo, maíz, cebada, lino, alfalfa, girasol y productos hortícolas como lechuga, papa y zanahoria. Por este motivo, al igual que otras larvas de escarabeidos, son consideradas una importante plaga de los cultivos comerciales y áreas verdes de recreación en diferentes partes del mundo (Remedi de Gavotto, 1964; Alvarado, 1983; Ali & Harivandi, 1987; Crutchfield & Potter, 1995; Smitley, 1996; Salvadori, 1997; Cherry & Schueneman, 1998; Cranshaw & Zimmerman, 1998; Potter, 1998; Redmond & Potter, 2010). Esta especie es autóctona y se encuentra en la República Argentina en las provincias de Buenos Aires, este de Córdoba, sur de Santa Fe, Entre Ríos y nordeste de La Pampa (López et al., 1994). Los cultivos más afectados en nuestro país por esta plaga son los cereales, plantas forrajeras y hortalizas (Remedi de Gavotto, 1964; Alvarado et al., 1981; Alvarado, 1983; Álvarez Castillo et al., 1993; Carmona et al., 1994).

Al igual que muchos otros coleópteros e insectos holometábolos en general, *C. signaticollis* presenta un período de transición del estado larval al pupal, conocido como prepupa o premetamorfosis, caracterizado por la pérdida de la forma típica escarabeiforme y de la movilidad de apéndices torácicos e interrupción de la alimentación, llevando a una reducción en el peso del insecto y un vaciamiento del tracto digestivo (Chapman, 1998; Gardiner, 1953; López et al., 1994; Soltani et al., 2008). Luego de unos 20 días de estado pupal, el adulto reproductivo emerge, completando el ciclo. En general, el último estadio larval (premetamórfico) de los insectos holometábolos está marcado por cambios bioquímicos drásticos que no ocurren durante las mudas entre los estadios larvales tempranos (Lawrence, 1990).

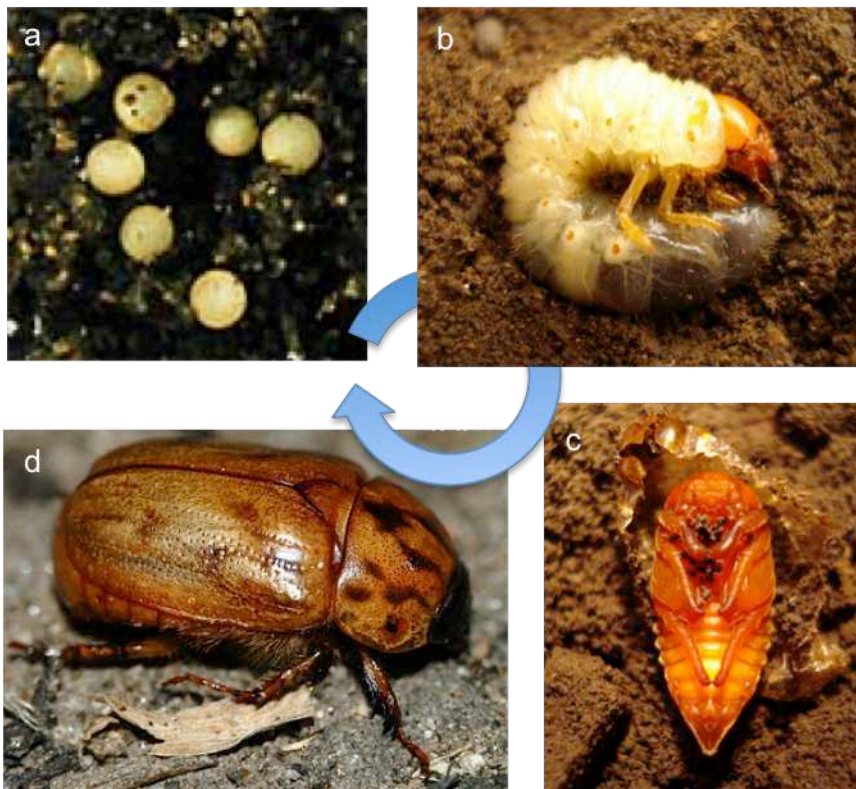


Figura 1.2. Ciclo de vida de *Cyclocephala signaticollis*, hospedador del moscardón cazador de abejas, *M. ruficauda*. **a.** Huevos, **b.** Larva del tercer estadio, **c.** pupa y **d.** adulto. La larva III corresponde al estadio susceptible al parasitismo de *M. ruficauda*. Fotografías: autores varios.

Parasitismo de los hospedadores

En sucesivos muestreos de campo en diferentes localidades de la Región Pampeana, Castelo y Corley (2009) determinaron el grado de especificidad de *M. ruficauda* sobre las 9 especies de gusanos blancos presentes en su área de distribución. Las frecuencias de parasitismo observadas indican que *M. ruficauda* prefiere a *C. signaticollis* como hospedador, ya que la frecuencia relativa de ataques sobre esta especie es la mayor encontrada en el campo (86,60%). En otras especies de gusanos blancos pertenecientes al mismo género, las frecuencias relativas de parasitismo son menores, siendo de 6,70% para *C. modesta* y 1,44% para *C. putrida*. Luego, para *P. bonariensis* se encontró un porcentaje de parasitismo de 3,35%. En el caso de *D. abderus*, *A. testaceipennis*, *A. vervex*, *H. bonariensis* y *B. striatellus*, los valores son muy bajos o nulos, siendo de 0,96%, 0,48%, 0,48%, 0% y 0%, respectivamente. Al estudiar la especificidad de hospedadores a microescala espacial, donde las larvas de *M. ruficauda* son las que eligen y aceptan a los hospedadores, se detectó que los individuos de *C. signaticollis* son preferentemente parasitados cuando se encuentran junto con individuos de otras especies hospedadores en la misma porción de suelo. En cambio, para el resto de las especies de gusanos blancos se encontró que la probabilidad de ser parasitado es significativamente más baja cuando *C. signaticollis* está presente (Castelo & Corley, 2010). Estos datos muestran que *M. ruficauda* tendría cierta flexibilidad para utilizar distintos hospedadores y no

sería estrictamente especialista, pero sin embargo prefiere a *C. signaticollis*. No obstante, dada la magnitud geográfica y temporal de este trabajo, los datos de campo obtenidos fueron evaluados en forma global y no teniendo en cuenta la situación particular de cada sitio muestreado a escala local, en referencia a la abundancia relativa de las distintas especies de larvas de Scarabaeidae y al estado fisiológico de las larvas de *M. ruficauda* que se encontraron parasitando estos gusanos. Por lo tanto, aún queda pendiente conocer si las larvas parasitoides poseen la capacidad de orientarse, aferrarse y establecer un ataque exitoso en distintos escenarios de estado fisiológico tanto del hospedador como del parasitoide.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Determinar la influencia de la calidad del hospedador y de la competencia por los hospedadores durante la etapa larvaria sobre el éxito reproductivo del parasitoide adulto.

Objetivos particulares

1. Determinar si factores como la intensidad de las kairomonas provenientes de hospedadores de diferentes especies pertenecientes al género *Cyclocephala*, son responsables de la especificidad encontrada hacia la especie *C. signaticollis* (Capítulo 3).

2. Determinar los efectos que tienen sobre el proceso de elección del hospedador y el éxito reproductivo potencial (peso, tamaño, condición corporal) y estado fisiológico (sobrevida) del parasitoide adulto los siguientes factores:
 - 2.1. La competencia intraespecífica pre-parasitismo (durante el estado libre) de las larvas de *M. ruficauda* por el hospedador como determinante de la distribución del parasitismo en un parche de diferente calidad de hospedadores (Capítulos 4 y 7).
 - 2.2. La condición corporal y fisiológica del hospedador *C. signaticollis* (peso corporal, estado de parasitismo y grado de estrés) (Capítulos 4, 5 y 7).
 - 2.3. La competencia intraespecífica post-parasitismo (tras el ataque) de las larvas de *M. ruficauda* por los recursos alimenticios sobre un hospedador superparasitado (Capítulos 6 y 7).

Preguntas particulares y predicciones

Pregunta 1: ¿La selectividad de las larvas de *M. ruficauda* hacia otras especies del género *Cyclocephala*, diferentes a la especie *C. signaticollis*, está influenciada por la intensidad de las kairomonas? (Capítulo 3).

Hipótesis 1: La intensidad de las claves químicas de especies del género *Cyclocephala* que no pertenecen a la especie *C. signaticollis* tiene influencia en la orientación de las larvas de *M. ruficauda* hacia el hospedador.

Predicción 1: Al aumentar la concentración de las claves químicas provenientes de hospedadores de otras especies del género *Cyclocephala*, habrá una orientación positiva hacia dichas kairomonas.

Pregunta 2: ¿La calidad de los hospedadores y la presencia de coespecíficos tienen influencia sobre la distribución de los parasitoides dentro del parche? (Capítulo 4).

Hipótesis 2.1: Las larvas parasitoides son capaces de discriminar los hospedadores dentro de un parche en función de su condición corporal (peso) y detectarán la presencia de coespecíficos.

Predicción 2.1.: Las larvas se distribuirán de manera desigual entre hospedadores de igual estado parasitismo (sanos o monoparasitados) y de diferente condición corporal, parasitando en mayor proporción a aquellos de mayor peso corporal, en ausencia o presencia de otras larvas parasitoides.

Hipótesis 2.2: Las larvas parasitoides son capaces de detectar a otras larvas de su misma especie.

Predicción 2.2.: Las larvas parasitoides mostrarán un comportamiento de evitación frente a sus coespecíficos.

Pregunta 3: ¿Son las larvas II de *M. ruficauda* capaces de discriminar al hospedador *C. signaticollis* en función de su condición fisiológica? (Capítulo 5).

Hipótesis 3: Las larvas II de *M. ruficauda* son capaces de discriminar al hospedador *C. signaticollis* en función de su nivel de estrés.

Predicción 3: Las larvas II de *M. ruficauda* parasitarán en mayor proporción a los hospedadores que posean un nivel de perturbación o estrés relativamente menor.

Pregunta 4: ¿Hay influencia de los tiempos relativos de parasitismo de larvas que se encuentran superparasitando a un hospedador sobre el resultado de la competencia intraespecífica? (Capítulo 6).

Hipótesis 4: La probabilidad de ganar la competencia intraespecífica está influenciada por el orden en que las larvas del parasitoide colonizan al hospedador (tiempos relativos de parasitismo).

Predicción 4.1: La primera larva que parasite al hospedador ganará la competencia frente a aquellos coespecíficos que superparasiten.

Predicción 4.2: A medida que el tiempo relativo de parasitismo (transcurrido entre el ataque de la primera larva y la siguiente) se incrementa, mayor será la probabilidad de la primera larva que colonizó al hospedador de ganar la competencia.

Predicción 4.3: Los adultos que emerjan de las larvas que colonizaron en primer lugar al hospedador tendrán mayor éxito reproductivo potencial, manifestándose en una mejor condición corporal.

Pregunta 5: ¿La competencia intraespecífica entre larvas de *M. ruficauda* se define en una etapa particular del desarrollo del hospedador? (Capítulo 6).

Hipótesis 5: La competencia intraespecífica se define en una etapa particular del desarrollo del hospedador.

Predicción 5: La resolución de la competencia entre dos larvas de *M. ruficauda* ocurrirá en mayor proporción en el estado premetamórfico de su hospedador.

Pregunta 6: ¿Qué influencia tiene la calidad (condición corporal y fisiológica) del hospedador sobre el *fitness* del adulto de *M. ruficauda*? (Capítulos 4, 5, 6 y 7).

Hipótesis 6: La calidad de los adultos de *M. ruficauda* está influenciada por la condición corporal del hospedador.

Predicción 6.1: La condición corporal y la supervivencia de los adultos del parasitoide serán mayores cuanto mayor sea el peso corporal del hospedador.

Predicción 6.2: La condición corporal y la supervivencia de los adultos del parasitoide serán mayores cuando emerjan de hospedadores monoparasitados, es decir que no se hayan desarrollado en presencia de competidores.

Predicción 6.3: La condición corporal y la supervivencia de los adultos del parasitoide serán mayores cuanto menor sea el nivel de estrés del hospedador.

De manera resumida y gráfica, en la Figura 1.3 se exponen los procesos y factores que se van a estudiar para determinar si la calidad del hospedador y la competencia por los hospedadores durante la etapa larvaria tienen influencia sobre el éxito reproductivo potencial del parasitoide adulto.

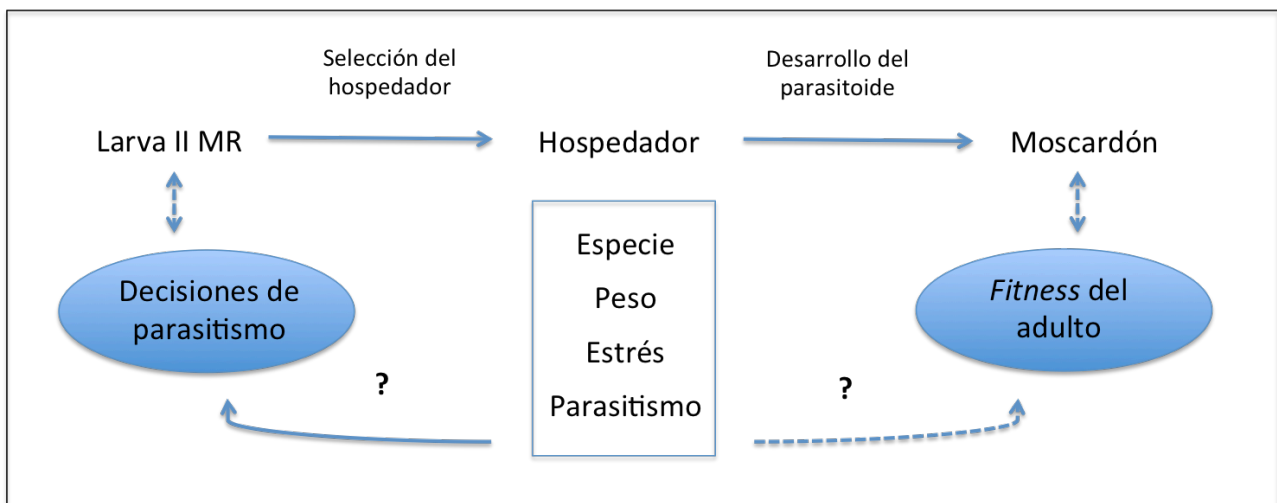


Figura 1.3. Esquema de los interrogantes que se van a responder en esta Tesis, relacionados con la calidad del hospedador durante la etapa larvaria y su influencia sobre el éxito reproductivo potencial del parasitoide adulto.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

RECOLECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS INSECTOS

La recolección a campo de los insectos que se utilizaron durante la realización de este trabajo se efectuó en las inmediaciones de apiarios en distintas localidades de la provincia de Buenos Aires, tales como Moreno (34° 46' S, 58° 55' O), Mercedes (34° 40' S, 59° 26' O) y Pilar (34° 28' S, 58° 25' O) (Figura 2.1, apiarios o pastizales). En los experimentos se utilizaron larvas del segundo estadio de *M. ruficauda* (LII) y larvas del tercer estadio tanto del hospedador preferido, *C. signaticollis* (CS), así como de otros hospedadores potenciales, *C. modesta* y *C. putrida*.

Las larvas de *M. ruficauda* fueron obtenidas a partir de desoves colectados durante los veranos, desde el año 2009 hasta el 2013. Para ello se cortó la rama o soporte donde se encontraban y se los colocó individualmente en tubos tipo Falcon de 30 ml en los que fueron llevados al laboratorio. Los desoves fueron mantenidos en condiciones ambientales de laboratorio y observados diariamente para registrar el momento de la eclosión de los huevos. Una vez que las larvas nacieron se las dispuso, en forma grupal, en frascos de vidrio con una cuarta parte de tierra negra de uso comercial para jardinería, aproximadamente a una densidad de 3 a 7 larvas por cm² (Figura 2.2). Los recipientes fueron mantenidos en completa oscuridad y a temperatura y humedad controladas (24 - 26°C y 45 - 70%, respectivamente) hasta el momento de la utilización de las larvas en los ensayos comportamentales.

Los hospedadores, gusanos blancos de la especie *C. signaticollis*, fueron recolectados como larvas de tercer estadio del suelo de los pastizales asociados a distintos apiarios durante el otoño de los años 2009 a 2013. Fueron obtenidos realizando pozos de 30 cm de profundidad, debido a que la mayoría de los individuos de todas las especies se hallan a profundidades de entre 0 y 15 cm, pudiendo llegar hasta los 30 cm (Guppy & Harcourt 1973; Carmona et al., 1994). En el laboratorio, cada espécimen fue identificado a nivel de especie con ayuda de la clave taxonómica de Alvarado (1980). Se mantuvieron individualmente en recipientes de plástico opaco de 30 ml de capacidad con tierra negra comercial y porciones de alimento (zanahoria). Semanalmente se realizó la aireación y limpieza de los recipientes y se repuso el alimento (Figura 2.3).



Figura 2.1. Uno de los lugares de recolección de los insectos, apiario Quinta Zanotti, ubicado en la localidad de Moreno, provincia de Buenos Aires. **a.** Colmenas, **b.** Pastizal. Fotografías: ME Barrantes.

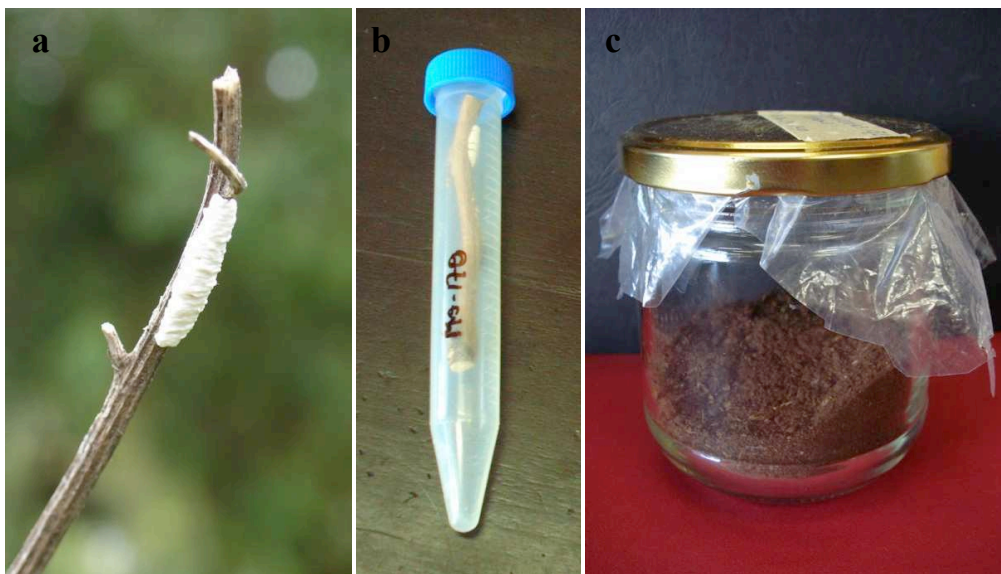


Figura 2.2. Metodología de recolección y mantenimiento de los parasitoides: **a.** Desove de *M. ruficauda* sobre sustrato vegetal seco, **b.** Método empleado para el almacenamiento de los huevos en el laboratorio, **c.** Dispositivo de almacenamiento de las larvas. Fotografías: ME Barrantes.



Figura 2.3. Recolección de los hospedadores: **a.** Búsqueda de los gusanos dentro del parche de suelo, **b.** Recolección, **c.** Dispositivo de almacenamiento de los insectos. Fotografías: a. MK Castelo, b y c. ME Barrantes.

DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES Y PROCEDIMIENTOS

En los siguientes puntos se detallan las generalidades sobre los dispositivos utilizados y los ensayos realizados en el transcurso de esta Tesis. Las particularidades de cada experimento y de sus dispositivos se explicarán en detalle en la sección “*Materiales y Métodos*” de cada capítulo.

Condiciones experimentales

El tiempo de explotación de un parche de hospedadores por parte de los parasitoides está influenciado por las condiciones ambientales. Una de esas condiciones es la temperatura ambiental, que actúa como clave indicadora de las condiciones meteorológicas y puede modular el tiempo de forrajeo de un parche en los parasitoides. La disminución de la temperatura indica el advenimiento de condiciones desfavorables y riesgo de limitación de tiempo para efectuar el parasitismo (Amat et al., 2006). Se ha observado también que una disminución en la presión atmosférica aumenta el tiempo de explotación de un parche de hospedadores y el uso de hospedadores ya parasitados, lo cual está relacionado con el advenimiento de una tormenta y con condiciones ambientales adversas (Roitberg et al., 1992). Recientemente se ha estudiado la influencia de la presión atmosférica sobre el comportamiento de localización del hospedador por parte de la larva de *M. ruficauda*. El modelo elaborado en el trabajo de Crespo y Castelo (2012) sugiere que al ocurrir una caída en la presión atmosférica mayor o igual a 0,85 hPa/1,5 h la actividad de búsqueda del hospedador no es llevada a cabo por el parasitoide. De esta manera, como las condiciones ambientales pueden interferir en el comportamiento de búsqueda de *M. ruficauda*, los ensayos comportamentales fueron efectuados bajo condiciones controladas o semi-controladas de temperatura, presión atmosférica y humedad relativa ambiente. En el caso de los experimentos de preferencia realizados en olfatómetro de ambiente estacionario (descripción más adelante), los ensayos se realizaron entre las 10:00 y 17:00 hs bajo condiciones ambientales de laboratorio (T: 24 - 30°C, HR: 45 - 70%) y en días con presión atmosférica entre 1008 y 1021 hPa y sin descensos de presión mayores a 0,5 hPa/h. Para el caso de los experimentos que se extendieron durante varios días (preferencia o no elección en parches artificiales), los dispositivos conteniendo los insectos fueron almacenados en una cámara a 24 - 26 °C y 45 - 70 % de humedad relativa.

Experimentos de elección y de no elección

En varios capítulos de esta Tesis se realizaron experimentos donde se midió la respuesta de orientación y/o aceptación de una LII cuando fue expuesta simultáneamente a diversas opciones de

estímulos o a un único estímulo. Dependiendo de cuál era la pregunta que se deseaba contestar en cada una de las secciones o capítulos, estos estímulos provenían tanto de hospedadores como de coespecíficos y podían presentarse tanto vivos como en forma de extracto químico.

Experimentos de elección en olfatómetro de ambiente estacionario

Para los ensayos de olfatometría de los Capítulos 3, 4 y 5 se utilizó un dispositivo denominado olfatómetro de ambiente estacionario, similar al empleado por Crespo y Castelo (2008). El mismo consiste en una caja de polipropileno de 9 x 6 x 1 cm con tapa, en la cual se definen tres zonas de igual área a lo largo del eje de la caja (laterales y zona central). En cada extremo de las zonas laterales se colocan los estímulos (Figura 2.5). Dependiendo de la pregunta a contestar, los estímulos utilizados fueron extractos químicos de hospedadores o LII vivas. Los estímulos químicos se presentaron en un papel de filtro de 2 x 1 cm embebido con 10 µl de una solución de homogenato de gusano blanco que posee un determinado olor, o el solvente que se utilizó para confeccionarlo (ver más adelante). Para el caso en que los insectos vivos fueron utilizados como estímulo, se los confinó adecuadamente para evitar que deambularan y su presencia se limitara a la zona correspondiente de la arena (ver detalle en el Capítulo 5). En el lado interno de la tapa se colocó papel de filtro humedecido para evitar la desecación de los individuos y preservar su buen estado fisiológico durante el ensayo. Cada caja experimental fue sellada para minimizar el escape de la larva experimental con una tela de polipropileno. Finalmente la larva parasitoide fue liberada en la zona central de la arena experimental. Las arenas experimentales fueron colocadas dentro de cajas grandes de cartón en oscuridad total, intercalando la posición del estímulo y control de cada arena para balancear eventuales efectos de desnivelación. Luego de transcurrido el tiempo de experimentación se consideró terminado cada ensayo y se procedió a registrar la posición de las larvas dentro de la arena. De esta manera se obtuvieron tres respuestas posibles: elección por el estímulo (E), por el control (C) o no elección (NE). Los individuos inmóviles o muertos durante el ensayo, o no encontrados dentro de la arena al finalizar el tiempo de experimentación, fueron excluidos del análisis.

Experimentos de elección y de no elección en parches artificiales

Los ensayos donde la larva parasitoide era enfrentada a hospedadores vivos que variaban en calidad en función de distintos parámetros, se realizaron en parches artificiales de hospedadores (Capítulos 4 y 5). Los parches se confeccionaron con recipientes de Telgopor cilíndricos de 1600 ml (20 cm

diámetro x 7,9 cm altura) con tapa a los que se los rellenó con tierra negra de uso comercial (Fig. 2.4).

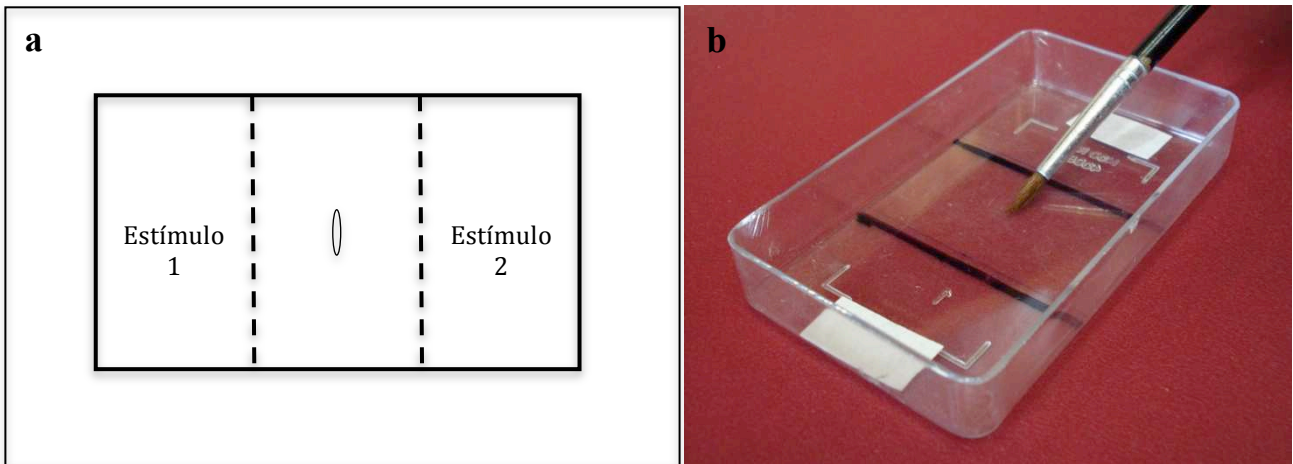


Figura 2.5. Olfatómetro de ambiente estacionario utilizado para ensayos de preferencia en los Capítulos 3, 4 y 5. **a.** Esquema mostrando las tres zonas: dos laterales donde se colocan los diferentes estímulos y la zona central donde se libera la LII experimental, **b.** En la fotografía se muestra el dispositivo siendo utilizado con estímulos químicos (Capítulos 3 y 5). Fotografía: ME Barrantes.

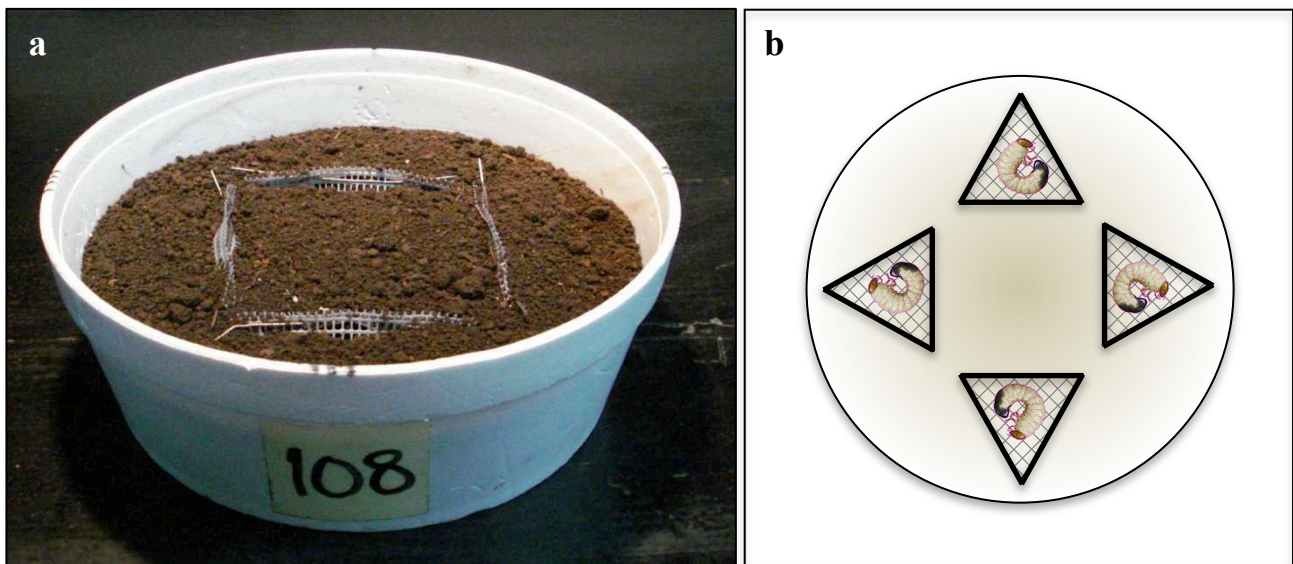


Figura 2.4. Parche artificial utilizado para ensayos de preferencia y no elección en los Capítulos 4 y 5. **a.** Fotografía de un parche de elección múltiple utilizado en el Capítulo 4, **b.** Esquema de parche de elección múltiple mostrando la disposición de los hospedadores. Fotografía: ME Barrantes.

Dependiendo de la pregunta a contestar, dentro de estos recipientes se colocaron de manera equidistante dos o cuatros gusanos blancos (elección dual o múltiple, respectivamente) o un único

gusano blanco (no elección), los cuales habían sido previamente confinados en jaulas individuales para fijar su posición y evitar que deambularan dentro del parche. Las jaulas fueron confeccionadas con una malla plástica de mosquitero que permitía el libre acceso de las larvas parasitoides a través de ella. Dos tipos de jaulas fueron utilizadas en distintos experimentos y sus detalles se mencionan en la sección “*Materiales y Métodos*” de los Capítulos 4 y 5. Asimismo, dentro de las jaulas se colocó tierra de uso comercial y se suministró una porción de alimento para el hospedador. En la zona central del parche se colocaron la o las larvas experimentales y luego de transcurridos los días de experimentación se procedió a revisar con ayuda de una lupa estereoscópica a cada uno de los hospedadores en busca de los parasitoides aferrados.

Obtención de los extractos químicos de hospedador

El procedimiento para la obtención de cada uno de los estímulos utilizados en los experimentos comportamentales de olfatometría consistió en la realización de extractos a partir de los hospedadores vivos. Para ello se utilizó la metodología de Castelo y Lazzari (2004), con ligeras modificaciones en algunos casos que se detallarán en la sección correspondiente. Individualmente, las larvas del tercer estadio de los hospedadores fueron limpiadas con pincel y dispuestas en recipientes plásticos de 30 ml durante 30 minutos en freezer para su adormecimiento y posterior manipulación. Una vez que los individuos fueron enfriados, se colocó en un mortero de vidrio la región corporal de la cual se deseaba extraer la clave química (cuerpo entero o mitad posterior, según corresponda; Figura 2.5) y se la homogeneizó utilizando hexano como solvente. Se utilizó este solvente apolar debido a la naturaleza química de los infoquímicos involucrados en este sistema parasitoide – hospedador (Castelo & Lazzari, 2004). De este homogenato se tomó al sobrenadante como extracto de hospedador, debido a que es la porción que retiene las moléculas del olor. Posteriormente se trasladó el sobrenadante a un vial de vidrio, y se agregó o evaporó solvente para que la solución resultante tuviera la concentración final requerida de gusanos blancos/ml para el experimento, y de este modo poder garantizar la ocurrencia de las respuestas comportamentales de las larvas parasitoides (Crespo & Castelo, 2008). Los extractos fueron mantenidos en el freezer a -12 °C para evitar su degradación, mantener su cualidades y para impedir la evaporación del solvente y el consecuente incremento de la concentración. Se utilizaron varios gusanos blancos por homogenato para contemplar la variabilidad de los individuos y diluir los posibles efectos dependientes del estado fisiológico de los insectos que puedan afectar a las claves químicas.

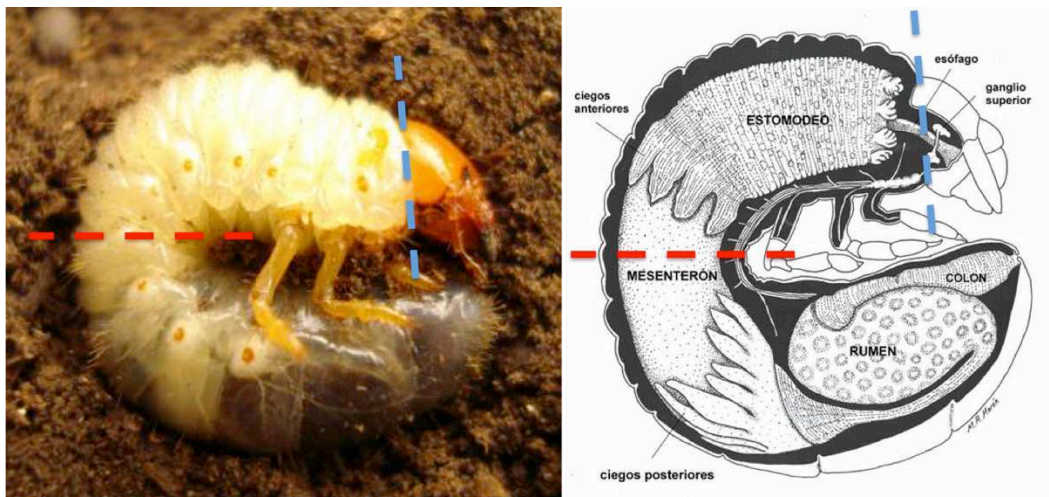


Figura 2.5. Foto y esquema de gusano blanco indicando las regiones donde se practicaron los cortes para la elaboración de los extractos. La línea de trazo roja muestra el lugar donde se efectuó el corte para realizar los extractos con la parte posterior del insecto (Capítulo 3). La línea de trazo azul muestra la zona donde se efectuó el corte para realizar los extractos que fueron utilizados en el Capítulo 5. Fotografía: ME Barrantes. Esquema realizado por MA Morón-Ríos.

Análisis estadísticos

En los experimentos donde se evaluó la respuesta comportamental de las larvas de *M. ruficauda* mediante ensayos de elección dual, se utilizó la misma metodología de análisis de datos en todos los capítulos. En cada experimento se cuantificó la preferencia de los insectos por una de las dos opciones ofrecidas en la arena experimental, comparando la distribución en ambas zonas con una distribución al azar mediante una prueba de bondad de ajuste de Chi-cuadrado (Zar, 2010).

Para el resto de los procedimientos y experimentos, los análisis estadísticos utilizados se describen en detalle en la sección correspondiente de cada capítulo experimental de la Tesis. Los análisis estadísticos se realizaron manualmente o utilizando el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2014). Para la realización de gráficos se utilizó el programa SigmaPlot 10.0 de Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.sigmaplot.com.

CAPÍTULO 3

PREFERENCIA POR EL HOSPEDADOR: ¿La intensidad de las kairomonas en el género *Cyclocephala* es la responsable de la selectividad?

Este capítulo dio origen a parte de la siguiente publicación: Barrantes ME & MK Castelo (2014). Host specificity in the host-seeking larva of a dipteran parasitoid *Mallophora ruficauda* and the influence of age on parasitism decisions. Bulletin of Entomological Research, 104: 295-306.

INTRODUCCIÓN

Los insectos parasitoides emplean una jerarquía de comportamientos que les permiten localizar y elegir a su hospedador, que consiste en la búsqueda del hábitat donde reside la población de hospedadores potenciales, la localización y encuentro del hospedador adecuado, su aceptación en función a sus características, la regulación de su metabolismo y el desarrollo tras haber sido parasitado (van Alphen & Vet, 1986; Brodeur & Boivin, 2004; Fellowes et al., 2005). En los parasitoides que presentan una estrategia de localización del hospedador mixta, donde un estadio larval lleva a cabo la búsqueda del hospedador dentro del microhábitat, el éxito reproductivo proviene completamente de un único hospedador por lo que será de crucial importancia para el parasitoide evaluar la calidad del hospedador (Royer et al., 1999; Brodeur & Boivin, 2004; Castelo & Crespo, 2012). Sin embargo, incluso cuando los parasitoides pueden evaluar la calidad del hospedador eficientemente, los hospedadores de baja calidad o subóptimos no siempre son rechazados (Heimpel et al., 2003). El estado fisiológico puede influenciar la aceptación de hospedadores de baja calidad (Fletcher et al., 1994; Sirot et al., 1997; Javoš & Tammaru, 2006) y cómo el animal modifica sus decisiones comportamentales a lo largo de su vida en respuesta a su estado fisiológico y reproductivo es lo que se conoce como dependencia de estado (o estado-dependencia) (Mangel & Clark, 1988; Clark & Mangel, 2000; Roitberg & Bernard, 2007; Bernstein & Jervis, 2008).

Otro aspecto importante para que el parasitismo resulte exitoso es la capacidad del parasitoide de atacar una o más especies de hospedadores. El rango de hospedadores (*host range*), es decir, el número y diversidad taxonómica de especies en las cuales el parasitoide es capaz de desarrollarse define la especificidad de hospedador (Futuyma & Moreno, 1988; Desneux et al., 2009). Esta especificidad es afectada por el estado fisiológico y valor nutricional del hospedador, las defensas comportamentales del hospedador y la presencia de enemigos naturales (Slansky, 1986; Brodeur et al., 1996). Debido a que la orientación hacia el hospedador representa uno de los pasos jerárquicos dentro del comportamiento de forrajeo del parasitoide, puede ser utilizada como un indicador confiable de la especificidad de hospedador (Brodeur et al., 1996; Fellowes et al., 2005). Sin embargo, la influencia de factores internos como la edad del parasitoide en los pasos comportamentales durante la búsqueda del hospedador pueden influenciar el éxito en el parasitismo debido a los efectos de estado-dependencia en el proceso.

La intensa presión de selección en los parasitoides en la localización de sus hospedadores está bien ilustrada por una variedad de claves y estrategias en la búsqueda del hospedador (Wang et al., 2010;

Joyce et al., 2011; Colazza et al., 2013; Uefune et al., 2013). Las claves utilizadas por estos organismos para la detección del potencial hospedador pueden ser acústicas o visuales, pero en particular son los estímulos químicos los que cumplen un rol fundamental en la localización del hospedador (Godfray, 1994; Vet et al., 2002; Jervis, 2005; Gray et al., 2007). A su vez, las fuentes de estímulo utilizadas por los parasitoides pueden ser producidas directamente por su víctima, ser productos derivados de su actividad en el ambiente, como heces y exuvias, o ser producidas de manera indirecta por las plantas de las cuales el hospedador fitófago se alimenta (Lewis & Martin, 1990; Vet & Dicke, 1992; Godfray, 1994; Stowe et al., 1995; Vet et al., 1995; Bottrell et al., 1998; Steidel & van Loon, 2003; Colazza et al., 2013; Uefune et al., 2013). Las plantas hospedadoras son importantes productoras de volátiles que atraen a los enemigos naturales, como mecanismo de defensa frente a la herbivoría (Turlings et al., 1995; Guerrieri et al., 1999; Fritzsche Hoballah et al., 2002; Guerrieri et al., 2002; Sabelis et al., 2002; Steidle & Van Loon, 2003; Turlings & Wäckers, 2004; Marín-Loaiza & Céspedes, 2007; Orre et al., 2010; Ichiki et al., 2012). Si bien estas claves son altamente detectables debido a su gran volumen en el ambiente, pueden presentar una baja precisión al momento de informar la presencia e idoneidad de la presa en el ambiente. Por el contrario, los productos derivados de la actividad de los hospedadores en el ambiente son de baja intensidad (concentración) por ser los emisores de tamaño pequeño, sin embargo son más confiables al momento de informarle al enemigo natural sobre la presencia, identidad, densidad e idoneidad de las presas (Vet et al., 1991; Vet & Dicke, 1992; Stowe et al., 1995). Si bien evolutivamente resulta adaptativo para los individuos permanecer inconspicuos frente a sus enemigos naturales, no es posible que impidan la emisión de señales químicas, en especial cuando este tipo de señales son relevantes en el ciclo de vida de las presas u hospedadores, como lo son las feromonas (Stowe et al., 1995). Como ya se ha mencionado, dado que las feromonas median la comunicación entre coespecíficos, pueden ser una fuente importante de información para predadores y parasitoides que pueden beneficiarse de la explotación de feromonas usándolas como kairomonas (Dicke & Sabelis, 1988; Zuk & Kolluru, 1998; Ruther et al., 2002; Wertheim, 2005; Weirtheim et al., 2005).

Se ha encontrado que la mayoría de las feromonas de insectos se componen por un número de diferentes compuestos que actúan en sinergia cuando están combinados en una proporción particular (Wyatt, 2003). Las respuestas de parasitoides a feromonas del hospedador como kairomonas parecen ser hospedador específicas, dado que responden a feromonas de hospedadores naturales, pero no a aquellas especies de hospedadores potenciales menos relacionados (Yong et al., 2007). Esto es, la composición cuantitativa de una clave y la concentración en la cual es liberada puede informar a los parasitoides sobre la identidad de una especie de hospedador entre especies pertenecientes al mismo género. Por esta razón, es posible que la especificidad de un parasitoide

hacia su hospedador, cuando potencialmente puede parasitar a un rango de especies muy emparentadas, responda a la detección cuantitativa de una molécula o grupo funcional de ella, la cual funciona como clave (Steidle et al., 2001, 2003). La detección de la intensidad de la clave química podría entonces ser indicadora de la especie de hospedador, la cual está vinculada con su calidad. De esta forma, la intensidad de la clave química podría contribuir a la selección que el parasitoide hace de su hospedador, discriminando entre hospedadores óptimos y subóptimos.

Previamente, se han realizado estudios sobre la especificidad y estado-dependencia (edad-dependencia) de las larvas de *M. ruficauda* hacia las tres especies de escarabeidos pertenecientes al género *Cyclocephala*. En general, en experimentos de laboratorio, las larvas de este parasitoide aceptan a las tres especies como hospedadores en valores superiores al 88% (Barrantes & Castelo, 2014). Las larvas II de *M. ruficauda* con una alta esperanza de vida se orientan únicamente hacia claves químicas pertenecientes a *C. signaticollis* y no lo hacen hacia las claves de otras especies del mismo género, *C. modesta* y *C. putrida* (Barrantes, 2009). Al incrementar la edad de las larvas II y disminuir su esperanza de vida (inferior al 55%) se encuentra nuevamente una respuesta de orientación positiva hacia *C. signaticollis* pero ahora también hacia *C. modesta*. Es probable que el cambio en el patrón de orientación de las larvas hacia los extractos de *C. modesta* esté relacionado con el estado fisiológico del parasitoide o estado-dependencia. Este hecho a su vez introduce la sospecha que *C. signaticollis* sería la especie de hospedador óptimo y *C. modesta* un hospedador subóptimo. Es decir, las claves químicas de *C. modesta* pueden ser detectadas e informar al parasitoide sobre la presencia de un hospedador subóptimo, pero debido a que las larvas parasitoides son jóvenes y poseen una probabilidad de supervivencia relativamente alta, pueden rechazar este hospedador y seguir en la búsqueda de uno de mejor calidad. Sin embargo, cuando su probabilidad de supervivencia disminuye drásticamente, el umbral de optimalidad puede reducirse y en ausencia de una mejor opción, esta especie que representaba un hospedador subóptimo pasar a ser un hospedador óptimo. No obstante, también surge el interrogante sobre si las diferencias observadas en los patrones de orientación de las larvas jóvenes hacia *C. modesta* y *C. signaticollis* están relacionadas con la cantidad de clave atractiva que podría estar contenida en los distintos extractos. Estas dos especies difieren notablemente en tamaño de sus larvas, siendo sus pesos promedio de 0,320 g y 0,745 g, respectivamente, por lo que una larva de *C. signaticollis* equivale a 2,3 *C. modesta* en peso (Castelo & Crespo, 2012). En el caso de *C. putrida*, su peso es de 0,649, cercano al de *C. signaticollis* (Figura 3.1). Existe la posibilidad que la clave atractiva de *C. signaticollis* y *C. modesta* fuera la misma o muy similar en ambas especies de gusano blanco y, al realizar los extractos con una concentración final de 2,5 gusanos blancos/ml, la cantidad de moléculas contenidas en el homogenato de *C. modesta* sea menor que la contenida en el realizado

con *C. signaticollis*. Entonces, si la clave química fuera la misma, las larvas de *M. ruficauda* estarían percibiendo una menor intensidad de olor en el extracto de *C. modesta*. Bajo este escenario, se espera que la respuesta cambie cuando las larvas jóvenes de *M. ruficauda* sean expuestas a altas concentraciones de extracto de *C. modesta* dado que estarían percibiendo una clave similar a la del hospedador preferido.

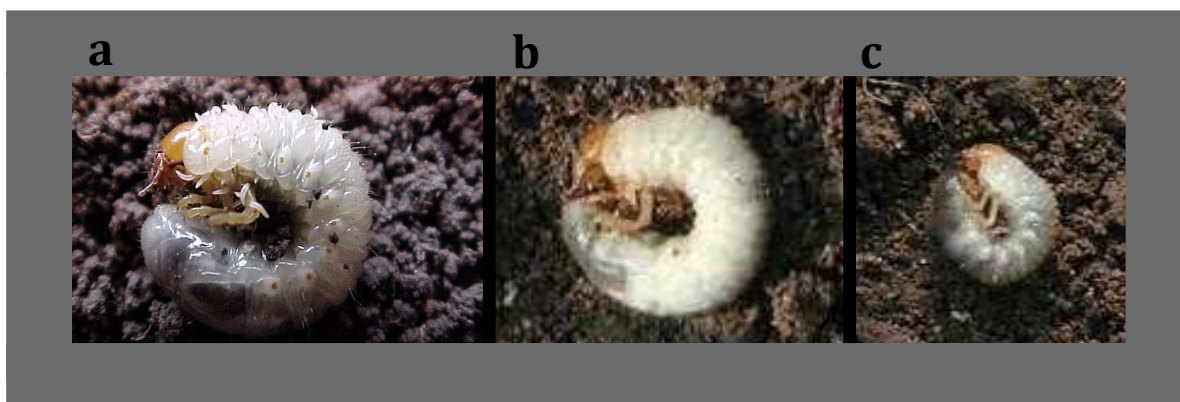


Figura 3.1. Gusanos blancos pertenecientes a las tres especies del género *Cyclocephala* utilizadas en este capítulo. **a.** *C. signaticollis*, superparasitado, **b.** *C. putrida*, **c.** *C. modesta*. Nótese la diferencia en el tamaño asociado a cada especie. La escala es la misma para los tres paneles. Fotografías: MK Castelo.

El objetivo de este capítulo fue dilucidar, en un contexto comportamental, si la interpretación de la identidad del hospedador por parte de las larvas de *M. ruficauda* entre especies de hospedadores potenciales del género *Cyclocephala* se debe a diferencias en la concentración de las claves químicas del hospedador a la que es expuesto el parasitoide y si existe, además, una influencia de la esperanza de vida del parasitoide en la respuesta de orientación hacia las distintas claves. De este modo se espera que al aumentar la concentración, la orientación de las larvas del parasitoides hacia *C. modesta* y *C. putrida* sea similar a la encontrada hacia *C. signaticollis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objeto de determinar si la especificidad de las larvas de *M. ruficauda* es influenciada por la intensidad del estímulo, se observó el comportamiento de orientación de las LII hacia extractos químicos con cantidades ascendentes de claves químicas de hospedadores del género *Cyclocephala*. Además se evaluó si en este contexto de búsqueda del hospedador el estado fisiológico del parasitoide tiene influencia en la selección del hospedador.

Para ello se realizó en el laboratorio un experimento de elección dual utilizando un olfatómetro de ambiente estacionario como el descrito en la sección “*Experimentos de elección en olfatómetro de ambiente estacionario*” del Capítulo 2. Se utilizaron 4 concentraciones de extracto químico de cada una de las especies de hospedador evaluadas: 2,5, 5, 7,5 y 10 gusanos blancos/ml de hexano (gb/ml) de *C. signaticollis*, *C. putrida* y *C. modesta*. Se realizaron según el protocolo descrito previamente en la sección “*Obtención de los extractos químicos del hospedador*” del Capítulo 2. Para evaluar la influencia del estado fisiológico de las larvas del parasitoide sobre la orientación, se utilizaron larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* que diferían notoriamente en la edad: larvas jóvenes, entre 17 y 28 días de edad, que mudaron recientemente al segundo estadio y poseen una alta expectativa de vida, y larvas longevas con más de 58 días de edad, con una baja probabilidad de supervivencia (Crespo & Castelo, 2010). Se realizaron experimentos combinando especies de hospedador, concentración del extracto y edad de las larvas parasitoides (24 tratamientos). El diseño experimental y el número de réplicas para cada tratamiento se muestran en la Tabla 3.1. Los datos pertenecientes a los 6 tratamientos realizados con la concentración de 2,5 gb/ml de hexano pertenecen al trabajo de Barrantes y Castelo (2014) y corresponden a los controles de las series experimentales de mayor concentración realizadas en este capítulo.

RESULTADOS

En este capítulo se evaluó el efecto de la concentración de la clave química de distintas especies de hospedadores del género *Cyclocephala* y de la edad de las LII de *M. ruficauda* en la respuesta de orientación de los parasitoides hacia estímulos químicos de potenciales hospedadores (especificidad) y su posible modulación por la edad de la larva del parasitoide.

Cuando la orientación hacia concentraciones crecientes de extractos fue evaluada, se observó que las larvas jóvenes se orientaron hacia extractos de *C. signaticollis* de 2,5, 5 y 7,5 gb/ml, pero la distribución en la arena fue aleatoria en las series realizadas con el extracto de 10 gb/ml. En cambio, cuando las larvas jóvenes fueron expuestas a cada una de las concentraciones de los extractos de *C. modesta* y *C. putrida* se distribuyeron aleatoriamente en la arena experimental en todas las series experimentales. Luego, cuando la orientación hacia extractos de concentración creciente de *C. signaticollis* fue evaluada con larvas longevas, los parasitoides se orientaron significativamente hacia los extractos del hospedador de 2,5 y 5 gb/ml, y se distribuyeron al azar en las arenas experimentales con 7,5 y 10 gb/ml. Resultados similares fueron observados con los extractos de *C. modesta*: las larvas longevas se orientaron únicamente hacia el estímulo del hospedador cuando se

las expuso a las concentraciones de 2,5 y 5 gb/ml, no así cuando se evaluaron las concentraciones de 7,5 y 10 gb/ml. En el caso de las series experimentales con extractos de *C. putrida*, en ningún caso se registró una preferencia por parte de las larvas parasitoides hacia ninguno de los extremos de la arena experimental. Cabe aclarar que en todos los tratamientos, es decir, cada combinación de especie de hospedador y edad de la larva, *M. ruficauda* nunca se orientó hacia los extractos de 10 gb/ml (Tabla 3.1, Figura 3.2).

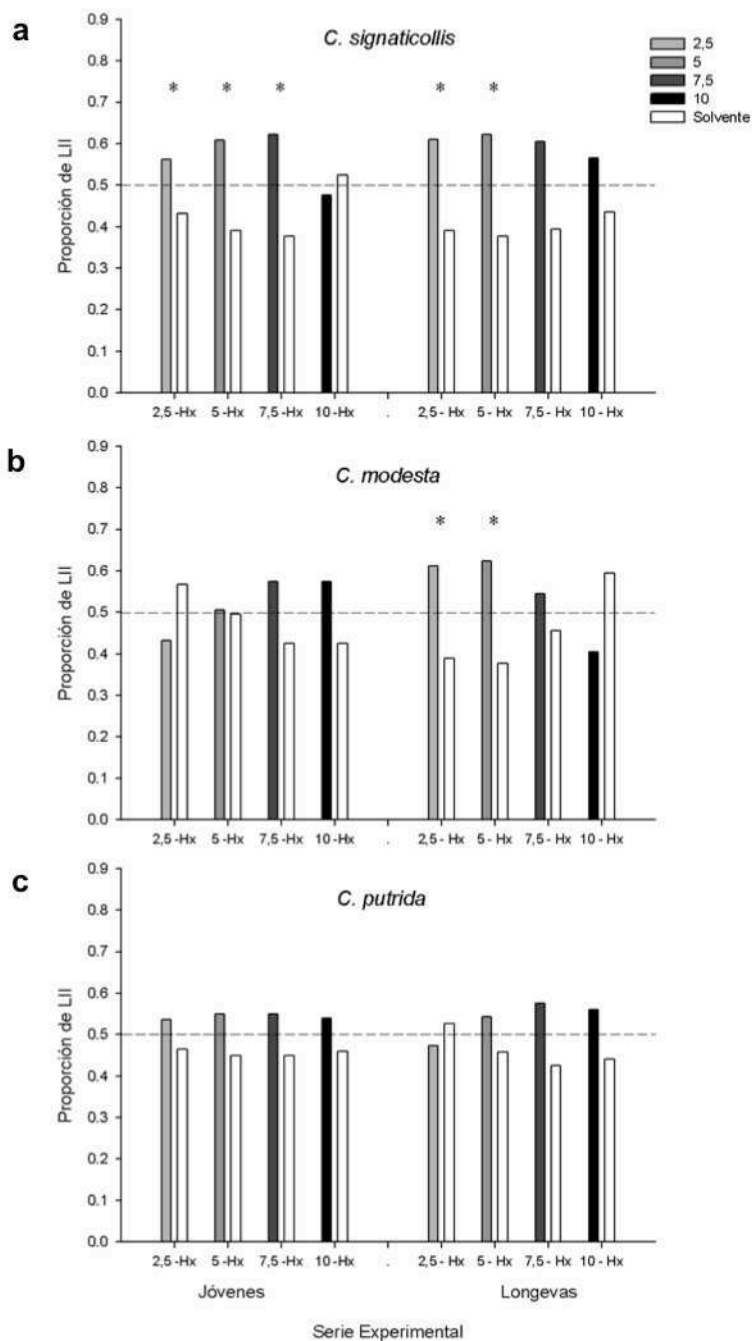


Figura 3.2. Respuestas de orientación del segundo estadio larval de *M. ruficauda* de distintas edades hacia extractos de concentración creciente de hospedadores del género *Cyclocephala* en experimentos de elección dual. **a.** *Cyclocephala signaticollis*, **b.** *Cyclocephala modesta*, **c.** *Cyclocephala putrida*. Abreviaturas: Jóvenes, larvas jóvenes; Longevas, larvas longevas; Hx, hexano (control); 2,5, 5, 7,5 y 10 corresponden a concentraciones medidas como cantidad de gusanos blancos/ml; * diferencias estadísticas significativas (χ^2 , $p < 0,05$).

Tabla 3.1. Diseño experimental y detalle de las series llevadas a cabo para evaluar el grado de orientación (especificidad) del segundo estadio larval de *M. ruficauda* (LII) expuestas a concentraciones crecientes de extractos de hospedadores del género *Cyclocephala* en función de la edad de las larvas parasitoides. Se consideraron jóvenes a aquellas larvas de 17-28 días de edad y larvas longevas corresponden a aquellas con más de 58 días de edad. Abreviaturas: N, número de réplicas. Entre paréntesis se informa el número de individuos que eligieron una de las zonas de la arena (izquierda: estímulo, derecha: solvente). La concentración del extracto está expresada en cantidad de gusanos blancos/ml de solvente.

Edad LII	Hospedador	Concentración del extracto	n	χ^2	gl	p
Jóven	<i>C. signaticollis</i>	2,5	132 (63 - 42)	4,200	1	0,040 *
		5	113 (53 - 34)	4,149	1	0,041 *
		7,5	139 (61 - 37)	5,877	1	0,015 *
		10	178 (60 - 66)	0,285	1	0,593
	<i>C. modesta</i>	2,5	129 (45 - 59)	1,885	1	0,169
		5	116 (50 - 49)	0,010	1	0,920
		7,5	129 (58 - 43)	2,227	1	0,135
		10	142 (58 - 43)	2,227	1	0,135
	<i>C. putrida</i>	2,5	133 (52 - 45)	0,505	1	0,477
		5	117 (49 - 40)	0,910	1	0,340
		7,5	136 (60 - 49)	1,110	1	0,292
		10	123 (47 - 40)	0,563	1	0,453
Longeva	<i>C. signaticollis</i>	2,5	137 (64 - 41)	5,038	1	0,024 *
		5	184 (61 - 37)	5,133	1	0,023 *
		7,5	149 (46 - 30)	3,368	1	0,066
		10	143 (35 - 27)	1,032	1	0,309
	<i>C. modesta</i>	2,5	197 (77 - 49)	6,222	1	0,012 *
		5	133 (48 - 29)	4,688	1	0,030 *
		7,5	146 (43 - 36)	0,620	1	0,431
		10	146 (34 - 50)	3,047	1	0,080
	<i>C. putrida</i>	2,5	168 (53 - 59)	0,321	1	0,571
		5	133 (38 - 32)	0,514	1	0,473
		7,5	142 (42 - 31)	1,657	1	0,198
		10	197 (28 - 22)	0,720	1	0,396

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió, bajo un contexto de búsqueda, el efecto que podía tener la concentración de las claves químicas de hospedadores potenciales del mismo género sobre la interpretación de la identidad del hospedador por parte de las larvas de *M. ruficauda*, considerando la orientación hacia las claves químicas de los hospedadores como indicadora de la selección del hospedador y especificidad. Además, se evaluó la influencia de la esperanza de vida del parasitoide en la respuesta de orientación hacia las distintas claves.

Se observó para las larvas jóvenes la habitual preferencia hacia *C. signaticollis*, excepto en la concentración de 10 gb/ml (lo que se discutirá más adelante), por lo tanto podemos decir que, al menos para las concentraciones de 2,5, 5 y 7,5 gb/ml, las condiciones de experimentación son adecuadas y las larvas respondieron como se esperaba bajo estas condiciones, hacia el hospedador óptimo. Un patrón similar se encontró para las larvas longevas, confirmando que esta especie de hospedador es siempre atractiva para el parasitoide.

Respecto a los estímulos de *C. modesta*, el hecho de no haber encontrado orientación en las larvas jóvenes pero si en las longevas sugiere que la respuesta hacia esta especie estaría vinculada al estado fisiológico y esperanza de vida del parasitoide y no estaría relacionada a la cantidad de clave contenida en los homogenatos debida a la diferencia de tamaño existente entre los hospedadores, tal como se había sugerido y esperaba. Es decir, que las larvas longevas que poseen una peor condición fisiológica y se encuentran más urgidas de hallar un hospedador se orientan hacia este hospedador sub-óptimo. La larva ante esta situación, y al disminuir la probabilidad de supervivencia drásticamente, pareciera reducir el umbral de optimalidad y en ausencia de una mejor opción (en este caso, un hospedador *C. signaticollis*), la especie que representaba un hospedador subóptimo pasa a ser su mejor opción. Además, el hecho de que el parasitoide se oriente a este hospedador potencial y no hacia *C. putrida* sugiere que podría haber algún tipo de similitud entre las claves de *C. modesta* y *C. signaticollis*. Las claves de ambos hospedadores podrían compartir componentes químicos pero variar en sus proporciones, o diferir en sus componentes, pero poseer similitudes estructurales cercanas. Estas similitudes podrían ser el resultado de las relaciones filogenéticas entre ambas especies (Tillman et al., 1999; Guerrieri et al., 2005; Yong et al., 2007; Félix et al., 2011). Existen numerosos ejemplos de especies cercanamente relacionadas que comparten los componentes de sus feromonas mientras que adquieren los atractantes especie-específicos con componentes únicos o proporciones únicas de componentes (Cardé & Millar, 2004). Por ejemplo, al tratar de definir cual era la mezcla que resultaba atractiva a campo para el noctuido *Feltia jaculifera* Guenée se descubrió que se trataba en realidad de dos especies diferentes. Estas especies no presentaban ni diferencias morfológicas ni linajes mitocondriales distintivos. Los estudios de la composición de las feromonas revelaron que existían dos formas de feromonas. Ambas especies producían una mezcla de tres compuestos, pero la proporción para la especie A era de 100:13:3 y para la especie B de 0,3:0,5:100 (Cardé & Millar, 2004). En el caso de las especies de hospedadores potenciales de *M. ruficauda*, los resultados sugieren la existencia de algún tipo de similitud entre las claves de *C. signaticollis* y *C. modesta*, pero la clave perteneciente a *C. putrida* pareciera tener más diferencias, ya que bajo ninguna concentración ni estado fisiológico del parasitoide se halló una respuesta positiva de orientación. Se necesitará de estudios adicionales de CG-masa para finalmente

esclarecer de qué manera se componen las señales químicas de estas especies del género *Cyclocephala*.

Dado que para la especie *C. putrida* no se encontró orientación en ninguno de los tratamientos evaluados, pero en estudios previos se ha observado una orientación muy similar a la de *C. signaticollis* cuando se ofrecen estímulos vivos y, una falta de orientación cuando se ofrecía *C. modesta* vivo, se considera que puede haber otro tipo de claves que resulten atractivas e intervengan en la orientación hacia los hospedadores. Los parasitoides pueden explotar una multiplicidad de claves durante el proceso de orientación hacia el hospedador (Fischer et al., 2001; Wang et al., 2010). En este caso, *M. ruficauda* podría estar utilizando otro tipo de claves para detectar al hospedador y orientarse, como por ejemplo claves mecánicas debidas a las vibraciones causadas por los hospedadores en el sustrato, como se ha observado en otros insectos (Laumann et al., 2007; Wang et al., 2010). Si este fuera el caso, puede considerarse nuevamente el tamaño de los distintos hospedadores, donde *C. putrida* y *C. signaticollis* son similares pero *C. modesta* es mucho menor. Bajo este escenario, *M. ruficauda* no podría discriminar entre diferentes especies de tamaños similares, dado que las claves mecánicas originadas por el movimiento de los gusanos blancos *C. signaticollis* y *C. putrida* sería similar. Por el contrario, podría discriminar con cierta facilidad las claves provenientes de *C. modesta* quien posee un tamaño mucho menor que la especie predilecta. Sería interesante complementar esta investigación y estudiar qué otro tipo de claves puede utilizar este diminuto insecto para identificar y seleccionar a sus hospedadores, dado que es una temática que prácticamente no ha sido muy abordada desde el punto de vista de los parasitoides inmaduros.

En el caso de los extractos de mayor concentración (10 gb/ml) de las tres especies de *Cyclocephala* evaluadas, no se observó en las larvas jóvenes ni en las longevas una preferencia alguna. Esta misma falta de preferencia se halló al evaluar los extractos de 7,5 gb/ml de las tres especies hospedadoras con las larvas longevas. En particular, la falta de preferencia hacia el extracto de *C. signaticollis*, sugiere que las condiciones experimentales no serían las óptimas para que el parasitoide detecte y se oriente dentro de la arena experimental, ya sea por las concentraciones utilizadas o por la edad seleccionada para los sujetos experimentales. La falta de orientación al utilizar estímulos de alta concentración, especialmente de 10 gb/ml, podría sugerir dos escenarios diferentes, ambos relacionados con el tipo de orientación que presenta el segundo estadio larval de este parasitoide. Las larvas de *M. ruficauda* se orientan a través de klinotaxis por sucesiva comparación de la concentración de los estímulos durante su movimiento en el ambiente (Crespo et al., 2011). Entonces, cualquier mecanismo por el cual las LII no puedan detectar diferencias de concentración de la clave en las sucesivas comparaciones se traducirá como una imposibilidad para

orientarse y se observará una distribución al azar dentro de la arena experimental. Un posible escenario sería aquel en el que el olfatómetro se sature de las claves químicas al utilizar los homogenatos de mayor concentración y que no se forme una pluma o gradiente de olor, por acción de un movimiento browniano y difusión en el espacio de las moléculas, lo que imposibilitaría la detección de cambios en la intensidad del estímulo. El mismo resultado podría darse si los quimiorreceptores del parasitoide estuviesen saturados. Bajo este escenario, si bien podría existir una pluma de olor dentro del olfatómetro, sería imperceptible para las larvas, que detectarían la misma intensidad del estímulo independientemente de cual fuese la región del olfatómetro en la que lo censen, lo que también explicaría la falta de preferencia hacia alguna de las dos regiones laterales de la arena experimental. Al considerar la concentración de 7,5 gb/ml advertimos que aparecen dos patrones diferentes en función de la edad de las larvas. En las larvas longevas se repite el patrón donde la distribución dentro de la arena experimental es completamente aleatoria, incluso cuando el estímulo de *C. signaticollis* es evaluado. Por el contrario, las larvas jóvenes muestran su habitual preferencia por *C. signaticollis*, pero no se orientan hacia los estímulos de *C. modesta* ni *C. putrida*. Es probable que en este caso la edad del parasitoide esté influenciando la sensibilidad de los quimiorreceptores. La edad puede influenciar la sensibilidad de los quimiorreceptores de diversos modos en distintas especies de insectos, y en diferentes fases ontogénicas. Por ejemplo, en los machos de algunos califóridos, el número de sensilla no funcionales se incrementa gradualmente y alcanza un nivel superior al 50% luego de 25 días. La sensibilidad de los receptores de las sensilla que permanecen funcionales también se reduce con el tiempo (Rees, 1970; Blaney, 1986). Considerando esto, existe la posibilidad que una fracción de los quimiorreceptores de las larvas longevas no sean funcionales, por lo que los receptores que permanezcan funcionales podrían saturarse a concentraciones de olor menores que los de las larvas jóvenes. De este modo, las LII longevas no podrían detectar cambios en la intensidad del estímulo a concentraciones donde sí son detectados cuando los insectos son más jóvenes (Blaney et al., 1986). Resumiendo, encontramos que las larvas longevas fallan al discriminar olores de hospedadores alternativos cuando estos se hallan concentrados. Por el contrario, las larvas jóvenes fallan únicamente en discriminarlos a las más altas concentraciones.

A modo de conclusión, la especificidad de las larvas parasitoides hacia las especies de hospedadores no estaría vinculada a la intensidad de las claves químicas percibida por los individuos, sino al estado fisiológico y esperanza de vida de las larvas, y a la identidad química estructural de la claves. La especie de hospedador como parámetro de calidad suele estar frecuentemente relacionada con el tamaño en los parasitoides generalistas, dado que especies de mayor tamaño suelen proveer una mayor cantidad de nutrientes para el desarrollo del parasitoide.

No obstante, en algunas ocasiones se ha registrado que la calidad del hospedador depende de la absorción y conversión de nutrientes que pueda hacer el parasitoide y no necesariamente del tamaño.

Dado que estos resultados, coincidentemente con estudios previos, reflejan la especificidad de *M. ruficauda* hacia *C. signaticollis*, consideramos que es conveniente enfocar los sucesivos estudios de los diferentes parámetros de calidad del hospedador y de su repercusión sobre la *performance* de los futuros adultos solamente sobre esta especie de hospedador. Por consiguiente, en el resto de esta Tesis, se encarán los estudios de la influencia de la calidad del hospedador sobre el *fitness* de *M. ruficauda* sólo en relación a la especie hospedadora *C. signaticollis*, debido a que la especificidad del parasitoide hacia esta especie es marcada y originada posiblemente a raíz de su historia coevolutiva, como en la mayoría de los parasitoides especialistas u oligófagos, más que por una decisión comportamental (Godfray, 1994). Al respecto, en el siguiente capítulo se estudia cómo se distribuyen las larvas en parches de hospedadores *C. signaticollis* en función de su calidad (medida como peso corporal), considerando aquí las variaciones intraespecíficas del tamaño del hospedador y no entre especies distintas.

CAPÍTULO 4

**COMPETENCIA INTRAESPECÍFICA PRE-PARASITISMO:
¿Cómo se distribuyen las larvas entre los hospedadores?**

INTRODUCCIÓN

Una pregunta de interés actual en ecología es cómo los animales forrajean y explotan las poblaciones de presas que están distribuidas en parches en el ambiente. Varios modelos han sido desarrollados en los que se sugiere cómo los animales deben comportarse si van a forrajear eficientemente u óptimamente un sitio (Waage, 1979). Se asume que la Selección Natural, sujeta a otras limitaciones de tiempo del animal que forrajea, actúa sobre el comportamiento de forrajeo de modo tal de maximizar la tasa de entrada de energía o de captura de presas u hospedadores cuando las presas son idénticas en su valor energético, y varios modelos al respecto han sido desarrollados (Hassell & May, 1974; Murdoch & Oaten, 1975; Charnov, 1976; Cook & Hubbard, 1977; Oaten, 1977).

Al respecto, la teoría de la Distribución Libre e Ideal (DLI) es la distribución de individuos no territoriales en el espacio cuando son libres de tomar decisiones que maximicen su *fitness* individual (Alcock, 1998). Fue desarrollada para predecir como los animales deberían estar distribuidos en un hábitat que contiene parches que difieren en la disponibilidad de recursos (Fretwell & Lucas, 1970; Fretwell, 1972; Hughes & Grant, 2000). Cuando la DLI es alcanzada, todos los predadores o parasitoides tienen la misma ganancia de *fitness* y ninguno de ellos ganará más por moverse a cualquier parte del ambiente (Bernstein et al., 1999). Por otro lado, este modelo asume que todos los individuos son omniscientes o “ideales”, es decir que poseen la misma habilidad competitiva dado que cada uno de ellos tiene completo conocimiento sobre la productividad del hábitat o la presencia de competidores; que son “libres” de moverse dentro el hábitat de manera de incrementar su *fitness*; y que la cantidad de recursos que puede utilizar un individuo decrece con el aumento de consumidores en el parche (Fretwell & Lucas, 1970; Fretwell, 1972).

Dado que la DLI asume que la ganancia de *fitness* en cada parche decrece con el número de predadores o parasitoides, esto implica que hay interferencia entre los animales (Bernstein et al., 1999). Esta interferencia se produce porque hay competencia entre los individuos del tipo Ordenada o *Contest* o alguna manifestación de territorialidad (Křivan et al., 2008; Yazdani & Keller, 2015). En el caso de los parasitoides adultos, éstos suelen forrajear en presencia de otros coespecíficos y la presencia simultánea de varias hembras sobre un mismo parche ha sido registrada frecuentemente (Godfray, 1994). En estos casos las interacciones competitivas pueden reducir la actividad de búsqueda *per capita* y la eficiencia de ataque a una densidad de hospedadores determinada (Waage, 1983). Sorprendentemente, se encontraron pocos estudios donde se hayan investigado las estrategias de forrajeo bajo competencia (Bernstein et al., 1991, Sjerps & Haccou, 1994; Goubault

et al. 2005; Yazdani & Keller, 2015). Por lo tanto, en los sistemas naturales se espera que la DLI no se cumpla por la presencia de desviaciones a los supuestos del modelo, que son derivadas de las interacciones reales que tienen los organismos con su entorno. Algunas desviaciones más documentadas son, además de las mencionadas, la falta de reconocimiento de los competidores entre sí, las diferencias de calidad/cantidad de recursos entre las presas, la heterogeneidad ambiental y la inaccesibilidad a regiones del ambiente más favorables en términos de presencia de recursos, las condiciones ambientales desfavorables, asimetrías en la habilidad competitiva de los organismos, el tiempo requerido para ir de un parche a otro, etc. (Kennedy & Gray, 1993; Tentelier et al., 2006; Wajnberg et al., 2006; Barrete et al., 2009).

En este contexto, se espera que los parasitoides solitarios que compiten por hospedadores en un parche de hábitat se distribuyan de manera de maximizar su *fitness*. Esta distribución de parasitoides dependerá de la calidad de los hospedadores, y se espera que sea equitativa cuando los hospedadores sean de la misma calidad y que se desvíe de este arreglo cuando difieran en alguna característica vinculada a su condición corporal. También se espera una desviación de la DLI cuando los parasitoides sean incapaces de reconocer a los competidores en el hábitat y cuando los hospedadores presenten diferente condición corporal, diferente calidad, o se encuentren con distinto grado de disponibilidad.

En cuanto al reconocimiento de coespecíficos competidores, hasta el momento no se ha determinado que las larvas de este parasitoide pueden detectarse unas a otras cuando están forrajeando. Previamente se han realizado ensayos de elección utilizando como estímulo extractos en hexano de larvas de primer y segundo estadio, pero los resultados han demostrado que al menos la fracción extraída con hexano no resulta atractiva o aversiva como estímulo para sus coespecíficos (Crespo & Castelo, 2009). Se desconoce si las larvas son capaces de detectar de alguna manera a los coespecíficos vivos mediante claves químicas o mecánicas, o de detectar claves químicas extraídas con otro tipo de solvente.

Por otro lado, la falta de cumplimiento de la DLI es normalmente observada y hasta puede ser adaptativa en muchos casos. Como se mencionó previamente, es usual encontrar hospedadores superparasitados por *M. ruficauda* al realizar muestreos a campo, habiendo en el mismo ambiente un gran número de hospedadores sanos (aproximadamente 89%; Castelo, 2003). Cerca del 50% de los hospedadores parasitados pertenecientes a la especie *C. signaticollis* se hallan monoparasitados, y el otro 50% se hallan superparasitados, generalmente con dos o tres parasitoides (Castelo, 2003). Si bien la moda de parasitismo es de una larva por hospedador, el hecho de observar gran

proporción de hospedadores sanos y hospedadores superparasitados indica que existe una distribución no equitativa de larvas parasitoides en los hospedadores atacados. Previamente se ha determinado que el superparasitismo ocurre en los hospedadores más pesados lo que sugiere que los parasitoides podrían determinar la cantidad de recursos que el gusano blanco representa, previo a parasitarlo. El peso medio de los hospedadores monoparasitados observado a campo al final del proceso de parasitismo es de $0,641 \pm 0,014$ g, mientras que la media para los superparasitados es de $0,713 \pm 0,013$ (Crespo & Castelo, 2009).

Con la finalidad de evaluar la capacidad de selección de las LII de *M. ruficauda* frente a hospedadores que difieren en su condición corporal (peso) o en su calidad (estado de parasitismo, sano o monoparasitado) y determinar como se distribuyen entre los hospedadores disponibles, se realizaron diferentes experimentos de elección múltiple combinando estos factores en parches artificiales. Para ello, se estudió si la selección de hospedadores de diferente calidad era influenciada por la presencia de coespecíficos en el parche (una o varias larvas forrajeando). Además, se estudió si las larvas parasitoides que se encuentran en situación de competencia previa al parasitismo, es decir libres en el ambiente antes de atacar a un hospedador, son capaces de detectar a sus coespecíficos.

En función de lo descrito anteriormente, se propone que las larvas de *M. ruficauda* son capaces de discriminar a los hospedadores sanos y parasitados en función de su peso corporal en parches con varios hospedadores disponibles simultáneamente. Por otro lado, se presume que las larvas son capaces de detectar la presencia de otras larvas en el medio, es decir que son omniscientes en cuanto a la presencia de competidores. Entonces, se espera que las larvas parasitoides se distribuyan de forma desigual cuando se encuentren en situación de competencia en un parche cuyos hospedadores posean una condición física diferente. Cuando las larvas se encuentran en ausencia de competidores, se espera que seleccionen en mayor proporción a aquellos hospedadores que posean una mejor condición física, es decir, a los de mayor peso corporal, ya sea para aquellos parches conformados enteramente por hospedadores previamente parasitados, como para aquellos parches cuyos hospedadores se encuentran sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

En esta sección de la Tesis se utilizaron LII de *M. ruficauda* y larvas III de *C. signaticollis* tanto sanas como monoparasitadas. Los insectos utilizados en esta sección fueron recolectados y mantenidos como se explica en la sección “*Recolección y mantenimiento de los insectos*” del capítulo “*Materiales y Métodos Generales*”.

Obtención de hospedadores sanos y monoparasitados

Los hospedadores sanos fueron obtenidos a partir de los muestreos de campo, verificando bajo lupa estereoscópica que estuvieran libres de larvas parasitoides aferradas a su cuerpo. Los hospedadores monoparasitados que fueron utilizados en parte de los tratamientos de este capítulo se obtuvieron mediante parasitismo artificial en el laboratorio. Con tal fin se colocaron individualmente gusanos blancos *C. signaticollis* (Cs) en frascos iguales a los de mantenimiento descritos previamente (opacos, 30 ml). En primer lugar, con ayuda de un pincel se tomó una larva parasitoide del frasco donde se las mantenía y se corroboró mediante lupa estereoscópica que correspondiese al segundo estadio larval. Seguidamente, la larva fue colocada sobre el cuerpo del hospedador y luego de transcurridos al menos 5 días se corroboró si se había producido el parasitismo.

Confección de los parches de hospedadores

Los gusanos blancos Cs que fueron utilizados como estímulo en los parches artificiales fueron pesados el mismo día o el día previo a iniciar los ensayos. Para ello se utilizó una balanza electrónica de tres decimales Ohaus PA153. Previo al pesado, cada uno de ellos fue sacado de su frasco de almacenamiento para retirarle con ayuda de un pincel de cerdas suaves cualquier residuo de tierra o alimento que pudiera haber quedado retenido en su cuerpo. Una vez registrado el peso, el gusano fue nuevamente dispuesto en su frasco hasta su utilización en el ensayo. Con estos datos se confeccionaron las diferentes categorías de peso y se armaron los parches artificiales. Los hospedadores utilizados pesaron entre 0,6 y 1,2 g. Los parches se confeccionaron con cuatro Cs, uno de cada categoría de peso, de manera tal que cada Cs difería en 0,1 g con el gusano Cs de la categoría siguiente. Es decir, el gusano perteneciente a la categoría más liviana (+) difería en 0,3 g con el gusano perteneciente a la categoría más pesada (++++) y 0,1 y 0,2 g con las categorías intermedias de peso (++ y +++, respectivamente).

Procedimientos experimentales

Detección de coespecíficos por las larvas parasitoides

Con el objeto de determinar si se produce la detección de coespecíficos por parte de las LII de *M. ruficauda* previamente al parasitismo, se realizó un experimento de elección dual en un olfatómetro de ambiente estacionario que fue utilizado como arena experimental (ver Capítulo 2, “*Materiales y Métodos Generales*”). Como estímulo se utilizaron 20 larvas de segundo estadio contenidas en un tubo tipo Eppendorf de 0,5 ml, cuya tapa se encontraba perforada y con una malla de 100 μm , que permitía el paso de cualquier clave química proveniente de los parasitoides pero evitaba la salida de las larvas hacia la arena experimental (Figura 4.1). Dentro del tubo se colocó una porción de papel de filtro de 0,5 x 2 cm embebida en agua mineral la cual, además de actuar como sustrato para los insectos, evitaba su desecación durante el tiempo de experimentación. En el extremo contrario de la arena experimental se colocó un tubo de iguales características pero que carecía de larvas. Una vez armado este dispositivo se liberó una larva parasitoide en el centro de la arena experimental. Finalmente, se tapó el dispositivo y se lo colocó dentro de una caja de cartón en oscuridad total durante 60 minutos. Luego de transcurrido este tiempo se registró en que zona del olfatómetro se encontraba el individuo experimental. Debido a la gran cantidad de tiempo que demoraba preparar cada uno de los estímulos por el elevado número de larvas que debían ser seleccionadas, estos fueron reutilizados en cinco ensayos consecutivos. Por este motivo también se evaluó si se produce algún cambio en la respuesta comportamental de los sucesivos individuos experimentales, ya que las claves -químicas o mecánicas- que podrían estar emitiendo las larvas que actuaban como estímulo podrían modificarse con el paso del tiempo en el transcurso de los ensayos. Esto fue tenido en cuenta y evaluado para descartar posibles efectos de su reutilización.

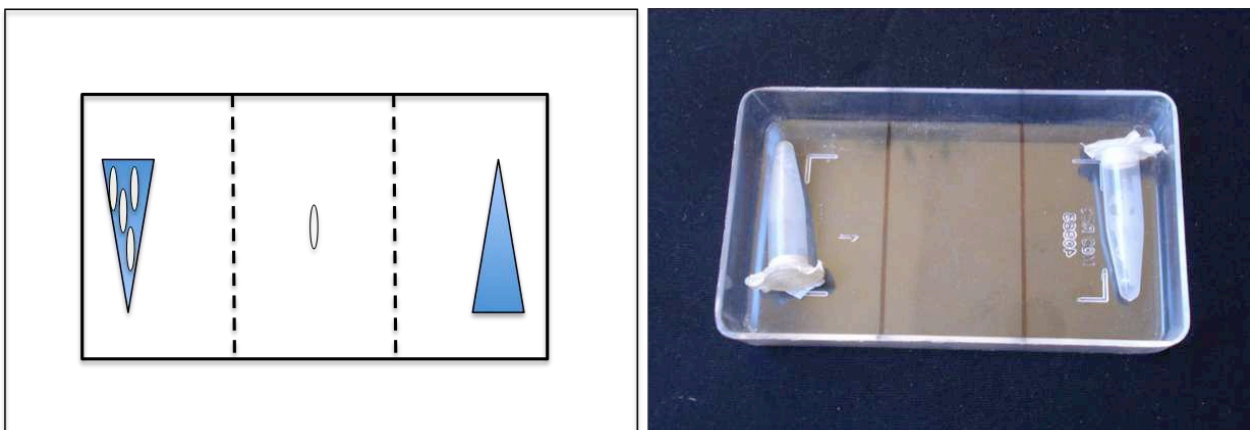


Figura 4.1. Esquema y fotografía del dispositivo experimental utilizado para evaluar la detección de coespecíficos por parte de larvas del segundo estadio del parasitoide *M. ruficauda*. Fotografía: ME Barrantes.

Distribución del parasitoide dentro del parche en función del peso corporal y estado de parasitismo de los hospedadores, y presencia de competidores previo al parasitismo

Con la finalidad de evaluar la capacidad de selección de las LII de *M. ruficauda* frente a hospedadores que difieren en su condición corporal (peso) y determinar cómo se distribuyen entre los hospedadores disponibles se realizaron experimentos de elección múltiple en parches artificiales de cuatro hospedadores presentes simultáneamente. Asimismo, se estudió si la selección de hospedadores de diferente calidad era influenciada por el estado de parasitismo del hospedador o la presencia de coespecíficos en el parche.

Para ello se confeccionaron parches artificiales con cuatro hospedadores de diferente peso corporal y se realizaron diferentes experimentos, cruzando 2 factores de 2 niveles cada uno: estado de parasitismo de los hospedadores (sanos – monoparasitados) y competencia previa al parasitismo (sin competidores – con competidores). Entonces, para la mitad de los tratamientos los cuatro hospedadores dentro del parche estaban sanos y para la otra mitad de los tratamientos, los parches se confeccionaron con cuatro hospedadores monoparasitados. A su vez, la mitad de los tratamientos incluyeron la liberación de una única larva parasitoide (sin competidores) o la liberación de cuatro larvas parasitoides en simultáneo (con competidores). Es decir, que se conformaron 4 tratamientos según la combinación de variables utilizadas (Figura 4.2).

Los dispositivos utilizados fueron descritos en la sección “*Experimentos de elección y no elección en parches artificiales*” del Capítulo 2. Dentro de cada parche, los hospedadores fueron alojados individualmente en jaulas de malla mosquitera plástica de forma piramidal (ver detalle más adelante en la sección “*Obtención de hospedadores de distinta condición fisiológica*” del Capítulo 5, Figura 5.1). Estas jaulas cuentan con la característica de permitir que los hospedadores permanezcan en un lugar fijo dentro del parche, de manera equidistante del lugar de liberación de la/las LII, quienes a su vez pueden circular libremente, detectar y parasitar a los hospedadores. Cabe aclarar que al realizar los experimentos con gusanos blancos que diferían en su condición física (peso), estos eran colocados al azar en las posiciones fijas dentro del recipiente. Transcurrido el tiempo de experimentación de 5 días, se procedió a registrar cuál o cuales hospedadores se hallaban parasitados y cuál era la cantidad de larvas aferradas a cada uno de ellos.

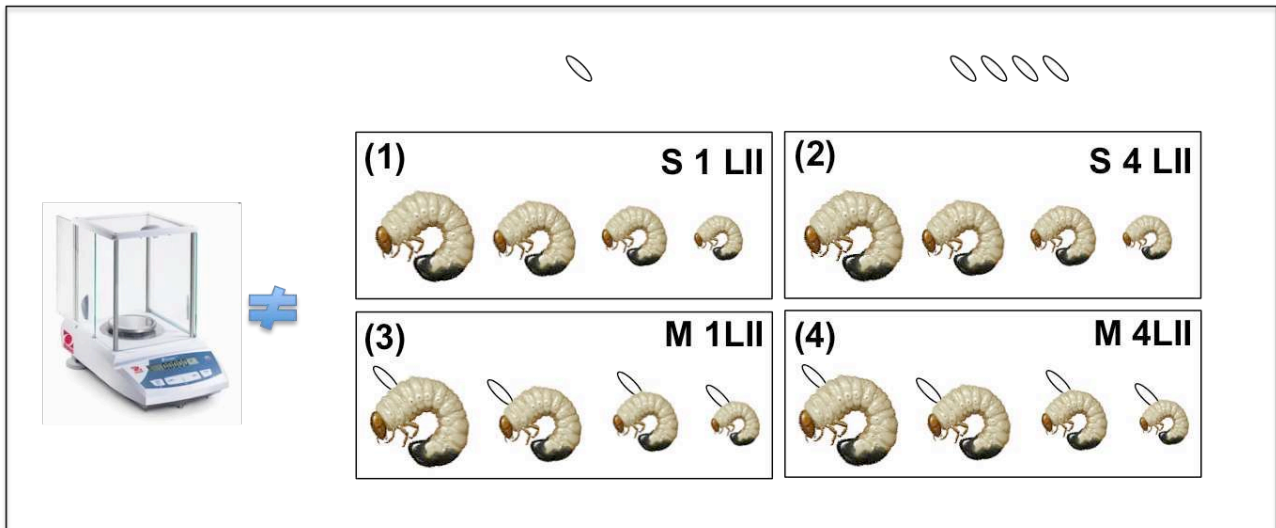


Figura 4.2. Diseño experimental para evaluar la distribución de las larvas de *M. ruficauda* en parches de hospedadores de diferente peso corporal confeccionados en función del estado de parasitismo del hospedador (sano – monoparasitado) y el nivel de competencia entre los parasitoides (sin competidores – con competidores). Abreviaturas: S, sano, M, monoparasitado, 1 LII, una única larva parasitoide (sin competencia), 4 LII, 4 larvas parasitoides (con competencia).

Distribución de larvas parasitoides dentro del parche en función de la condición corporal (peso) y estado de parasitismo de los hospedadores y presencia de coespecíficos

Con la finalidad de evaluar la capacidad de selección de las LII de *M. ruficauda* frente a hospedadores sanos que difieren en su condición corporal (peso) y determinar cómo se distribuyen entre los hospedadores disponibles se realizaron experimentos de elección múltiple en parches artificiales de cuatro hospedadores presentes simultáneamente, colocando sólo una larva experimental. Esto se llevó a cabo tanto para los parches confeccionados con hospedadores sanos como para los confeccionados con hospedadores monoparasitados (Tratamientos S 1LII y M 1LII, Figura 4.2, cuadro 1 y 3, respectivamente). Cada una de las distribuciones de hospedadores parasitados por las larvas se comparó con una distribución teórica uniforme, es decir, 25:25:25:25 % (de aquí en adelante “25%”). Se espera que las larvas ataquen en mayor proporción al hospedador más pesado si el factor peso es importante, o que las larvas se distribuyan uniformemente entre los hospedadores si el peso fuera irrelevante, es decir una larva por hospedador. Luego se compararon ambas distribuciones experimentales obtenidas entre sí para evaluar si el estado de parasitismo del hospedador, afecta de alguna manera estas distribuciones.

Con el objeto de evaluar si la influencia de la presencia de varios parasitoides coespecíficos y de la condición corporal (peso) de los hospedadores afecta en forma conjunta la distribución de las larvas de *M. ruficauda* dentro de un parche se realizó el mismo diseño experimental pero liberando cuatro larvas parasitoides simultáneamente en el parche. Esto se llevó a cabo tanto para los parches confeccionados con hospedadores sanos como para los confeccionados con hospedadores monoparasitados (Tratamientos S 4LII y M 4LII, Figura 4.2, cuadro 2 y 4, respectivamente). Cada una de las distribuciones de hospedadores parasitados por las larvas se comparó con una distribución teórica uniforme (25%). Se espera que las larvas ataquen en mayor proporción a/al hospedador/es más pesado/s si el factor peso es importante, o que las larvas se distribuyan uniformemente entre los hospedadores si el peso fuera irrelevante, es decir una larva por hospedador. Luego, al igual que en el experimento anterior, se compararon ambas distribuciones experimentales obtenidas entre sí para evaluar si el estado de parasitismo del hospedador afecta de alguna manera estas distribuciones.

Para evaluar cómo afectan simultáneamente la presencia de coespecíficos libres dentro del parche artificial y la condición corporal del hospedador a las decisiones de parasitismo que toman las larvas, se comparó la distribución de las larvas dentro de los parches confeccionados con hospedadores monoparasitados con diferente peso corporal entre los tratamientos donde se liberaron una y cuatro larvas parasitoides (Tratamientos M 1LII y M 4LII; Figura 4.2, cuadros 3 vs. 4). Aquí se espera que las larvas ataquen en mayor proporción a/al hospedador/es más pesado/s si el factor peso del hospedador es importante, o que las larvas se distribuyan uniformemente entre los hospedadores si el factor peso fuera irrelevante.

Análisis estadísticos

Para evaluar la detección de coespecíficos por parte de las LII de *M. ruficauda* se comparó la proporción de individuos que se orientaron hacia ambos extremos de la arena experimental mediante una prueba de bondad de ajuste de χ^2 . Para evaluar el posible efecto del tiempo sobre las LII usadas como estímulo dada su reutilización en el experimento de detección de coespecíficos, se compararon las proporciones de las larvas que se orientaban hacia el estímulo en la segunda, tercera, cuarta y quinta reutilización contra la proporción de larvas que se orientaron durante el primer uso del estímulo. Para ello realizó una prueba de comparación de proporciones contra una proporción control análoga a la prueba de Dunnett (Zar, 2010).

En los casos donde se evaluaron las preferencias de las LII de *M. ruficauda* como aferramiento o ataque hacia un determinado hospedador en presencia o ausencia de competidores dentro del parche de hospedadores, se utilizó una prueba de máxima verosimilitud de G y se comparó la proporción de larvas que se encontraban parasitando a cada una de las cuatro categorías de hospedadores contra una distribución al azar (es decir, una larva o 25% de parasitismo en cada hospedador). En el caso en donde se liberan cuatro larvas parasitoides, se asume que las larvas atacan en simultáneo a los hospedadores en el análisis de los datos, es decir que durante el tiempo de ejecución del experimento no se producen cambios químicos en los hospedadores atacados, dado que el tiempo de parasitismo necesario para ello debe ser mayor a 7 días (Martínez et al., en preparación) y que las larvas son omnicientes de la presencia de coespecíficos forrajeando en el parche (puesto a prueba en este capítulo de la Tesis). Para evaluar si existen diferencias entre los tratamientos experimentales M 1LII y M 4LII, también se utilizó prueba de máxima verosimilitud de G.

RESULTADOS

Detección de coespecíficos por las larvas parasitoides

Al evaluar la respuesta de las larvas frente a sus coespecíficos, se observó una activa orientación hacia la zona de la arena experimental que contenía de estímulo otras larvas parasitoides ($\chi^2 = 8,921$, $gl = 1$, $p = 0,0028$; Figura 4.3). Se descartó un posible efecto temporal dada la reutilización de los estímulos (coespecíficos) ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las comparaciones entre el grupo control (primer uso) y el resto de los grupos (sucesivos usos) ($q' 1-2_{0,05(2),\infty,5} = 0$, $q' 1-3_{0,05(2),\infty,5} = 1,844$, $q' 1-4_{0,05(2),\infty,5} = 0,172$, $q' 1-5_{0,05(2),\infty,5} = 1,620$).

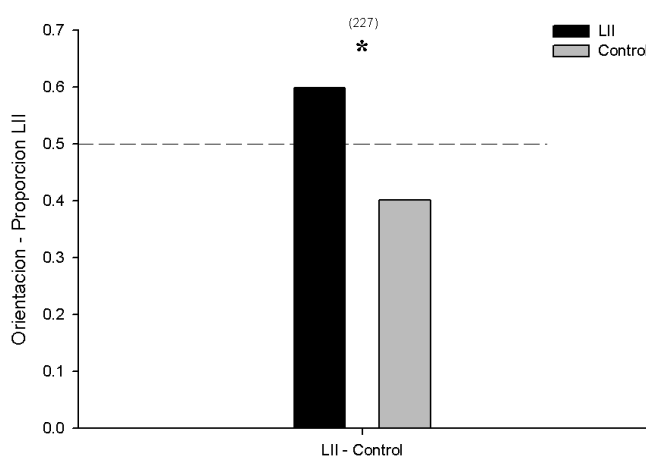


Figura 4.3. Respuestas de orientación del segundo estadio larval de *M. ruficauda* frente a estímulos de coespecíficos en experimentos de elección dual. Abreviatura: LII en el eje X, estímulo de coespecíficos. Entre paréntesis se aclara la cantidad de réplicas. * denota diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $p < 0,05$).

Distribución de larvas parasitoides dentro del parche en función de la condición corporal (peso) y estado de parasitismo de los hospedadores y presencia de competidores

Al evaluar la elección de las LII de *M. ruficauda* en un parche de hospedadores sanos que diferían en su condición corporal (peso) y en ausencia de otras larvas competidoras no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de LII que parasitaron las cuatro categorías ofrecidas (Tratamiento SD 1LII; Figura 4.2, cuadro 1 vs. 25%) (Figura 4.4; Tabla 4.1). Al evaluar el tratamiento análogo pero con parches confeccionados con hospedadores monoparasitados, tampoco se encontraron diferencias significativas, observándose que las larvas parasitaban a las distintas categorías de peso por igual (Tratamiento M 1LII; Figura 4.2, cuadro 3 vs. 25%). La comparación entre ambos tratamientos (1 vs. 3) no mostró diferencias en la distribución de los parasitoides dentro de los parches (Tabla 4.1).

Es necesario aclarar en este punto que en los tratamientos donde se utilizaron cuatro sujetos experimentales (LII) en simultáneo, sólo en unas pocas réplicas se las halló a todas parasitando a los hospedadores. En la mayoría de las réplicas se hallaron menos LII que las que originalmente se habían colocado en la arena experimental, pero dada la dificultad de lograr un mínimo de réplicas se utilizaron de todos modos para realizar los análisis.

Para los casos donde se colocaron cuatro LII (con competencia) en parches confeccionados con hospedadores sanos de diferente condición corporal (peso) se observó que las larvas parasitoides se distribuyeron uniformemente (S 4LII; Figura 4.2, cuadro 2) (Figura 4.5; Tabla 4.1). Del mismo modo, al evaluar las elecciones de las larvas en presencia de coespecíficos en el tratamiento realizado con *C. signaticollis* monoparasitados, se halló que las larvas se distribuían de manera uniforme dentro del parche (S 4LII; Figura 4.2, cuadro 4) (Figura 4.5; Tabla 4.1). Luego, al comparar ambos tratamientos experimentales entre sí (2 vs. 4), se encontró que las distribución de hospedadores parasitados no diferían entre ellos (Tabla 4.1).

Al evaluar cómo afectan simultáneamente la presencia de coespecíficos libres dentro del parche artificial y la condición corporal y estado de parasitismo del hospedador a las decisiones de parasitismo que toman las larvas (3 vs. 4), no se encontraron diferencias entre las distribución de las larvas atacando hospedadores entre los tratamientos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Comparaciones llevadas a cabo para evaluar la elección y distribución de parasitismo de una o cuatro larvas II de *M. ruficauda* en parches de cuatro hospedadores *C. signaticollis* en función de su peso corporal y estado de parasitismo presentados simultáneamente. El estadístico muestra el resultado de la comparación de cada tratamiento con una distribución teórica uniforme (25%) o entre tratamientos. Abreviaturas: n, Cantidad de réplicas, S, hospedador sano, M, hospedador monoparasitado, LII, larva II de *M. ruficauda*.

Comparaciones	n	G	gl	p
(1) S 1LII – 25%	59	2,014	3	0,569
(3) M 1LII – 25%	50	2,146	3	0,542
(2) S 4LII – 25%	30	3,313	3	0,346
(4) M 4LII – 25%	32	1,805	3	0,614
(1) S 1LII – (3) M 1LII	-	0,267	3	0,966
(2) S 4LII – (4) M 4 LII	-	6,790	3	0,079
(3) M 1LI – (4) M 4 LII	-	1,615	3	0,656

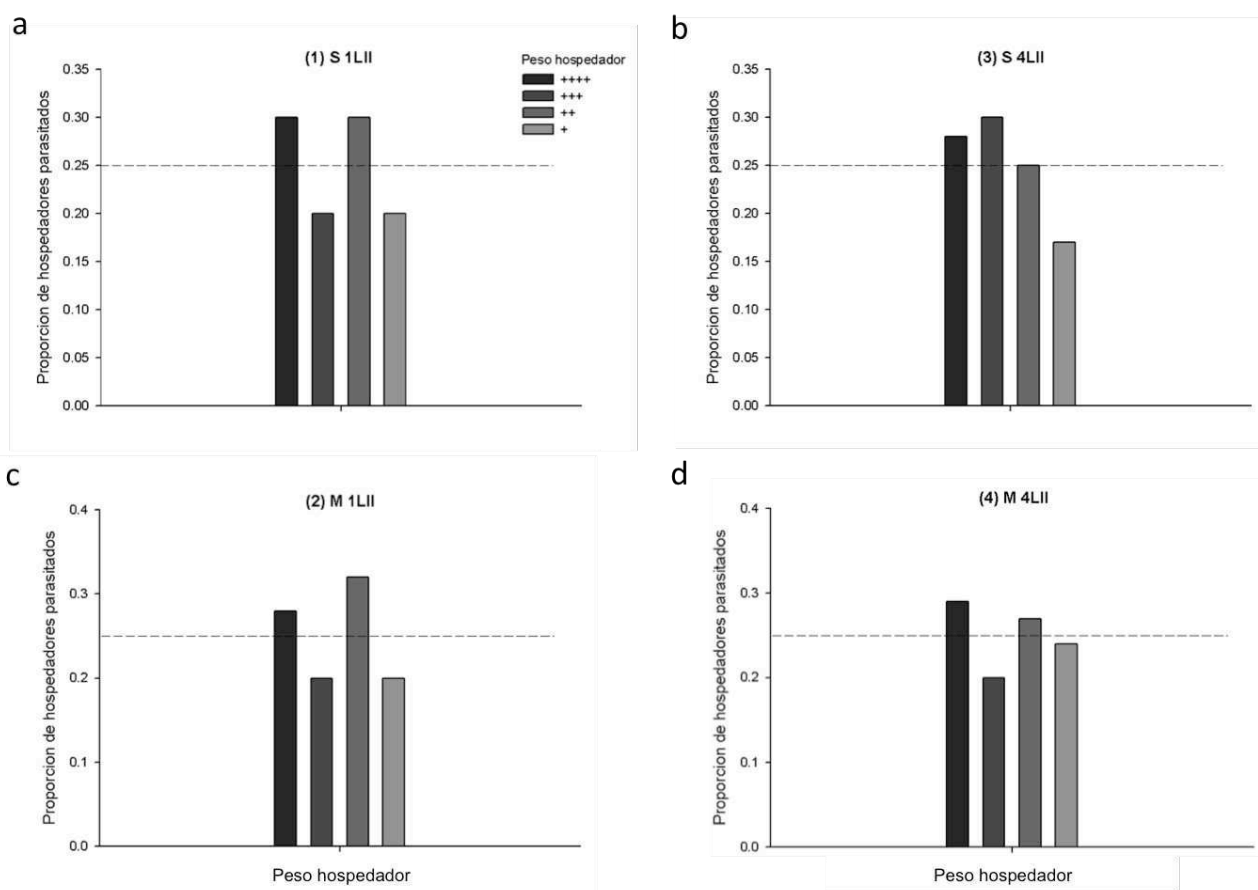


Figura 4.4. Proporción de hospedadores *C. signaticollis* sanos que fueron parasitados por una o cuatro larvas de *M. ruficauda* en función de su peso corporal y su estado de parasitismo (Sano – Monoparasitado), en ausencia o presencia de otras larvas parasitoides (1LII – 4LII). **a.** Tratamiento S 1LII (1), **b.** Tratamiento M 1LII (2), **c.** Tratamiento S 4LII (3), **d.** Tratamiento M 4LII (4). Las barras grises corresponden a los parches confeccionados con hospedadores que diferían en peso. El aumento en la intensidad de los grises en las barras indica un mayor peso corporal del hospedador. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($G, p > 0,05$).

DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó la capacidad de elección de las larvas II de *M. ruficauda* frente a hospedadores que diferían en peso corporal y si esta capacidad se veía influenciada por el estado de parasitismo de los hospedadores o la presencia de competidores de la misma especie dentro del parche. Bajo las condiciones experimentales establecidas, no se detectó reconocimiento de la condición física del hospedador por parte del parasitoide en ninguna de las circunstancias evaluadas, observándose que la distribución de las larvas en los parches de hospedadores no presentó un patrón definido. Además, si bien no se pudieron dilucidar los detalles del proceso, se determinó que hay detección de coespecíficos por parte de las larvas II de *M. ruficauda*, es decir que las larvas son capaces de determinar la presencia de otras larvas II competidoras en el hábitat.

En este capítulo se pudo confirmar la existencia de la detección de coespecíficos por parte de las LII de *M. ruficauda*, es decir que las larvas son omniscientes de la presencia de competidores. Sin embargo, por la manera en la que se realizó el experimento no se pudo distinguir si el estímulo en el reconocimiento se trata de una clave química o mecánica, en donde intervienen olores y vibraciones producidas por el movimiento de las LII confinadas en el tubo Eppendorf y que se transmiten por el substrato. Ya se había estudiado previamente la detección y orientación de coespecíficos con los dos primeros estadios larvales de *M. ruficauda* ofreciéndoles solución de larvas sin encontrar resultados positivos (Crespo & Castelo, 2009). Estos estudios se habían llevado a cabo a partir de extractos químicos donde se extraía la fracción polar utilizando hexano como solvente de extracción. Esto podría estar indicando que la clave que detectan, y a la cual se orientan las larvas, es de naturaleza mecánica o bien que la fracción extraída con ese solvente no contiene la clave atractiva de naturaleza química. Como fue sugerido previamente, las larvas de *M. ruficauda* podrían no liberar claves químicas de manera que sus hospedadores no puedan defenderse, al menos hasta que ocurre el ataque al hospedador (Crespo & Castelo, 2009). De ser necesario, se podrían realizar nuevamente homogenatos de larvas pero utilizando diferentes solventes que extraigan distintas moléculas y probarlos como estímulos químicos para confirmar o descartar que se trate de una clave química. De hecho, como las larvas en los experimentos estaban en presencia de competidoras, se esperaba que las LII se orientasen hacia el otro extremo, ya que de este modo estarían evitando la presencia de coespecíficos previa al parasitismo y, probablemente durante el parasitismo. El hecho de que las LII se hayan orientado hacia otras larvas parasitoides puede estar relacionado con el hecho de que la presencia de otras LII actúe como indicador, por ejemplo, de la presencia de un hospedador. Los coespecíficos son usualmente considerados competidores que afectan negativamente el uso de un determinado recurso, como el alimento o un territorio donde

establecerse (Baude et al., 2011). Sin embargo, su presencia puede también informar sobre la calidad del recurso (Stamps, 1987; Müller et al., 1997; Clark, 2007; Baude et al., 2011; Raitanen et al., 2013). Existen varios estudios donde la técnica utilizada -tanto por vertebrados como por invertebrados- para estimar la calidad del recurso y la toma de decisiones frente a este recurso involucra el uso de coespecíficos como claves. La información que provee la localización, performance (rendimiento) y comportamiento de otros individuos es lo que se conoce como información social (Danchin et al., 2004). Se considera que esta información social permite a los individuos evitar los costos de adquirir información por ellos mismos y estar actualizados con la información sobre las condiciones de su entorno (de este modo los individuos evalúan el ambiente de manera más rápida y precisa) (Valone & Templeton, 2002; Dall et al., 2005). Por ejemplo, en los abejorros *Bombus terrestris* L. se ha observado que la presencia de coespecíficos es utilizada como fuente de información ambiental en las tomas de decisiones para la elección del lugar de forrajeo. La presencia de otros abejorros aumenta la cantidad de visitas a flores de alta calidad, reflejando el rendimiento de los recursos alimenticios florales. También el tiempo hasta el primer aterrizaje sobre las flores se ve reducido con la presencia de otros abejorros (Baude et al., 2011). Las hembras de las mariposas *Pieris napi* L. prefieren oviponer sobre plantas que poseen huevos de coespecíficos por sobre aquellas plantas que no poseen ninguno, independientemente del tamaño de la planta o de la densidad de huevos (Raitanen et al., 2013). No obstante, dado que los experimentos de detección de coespecíficos se realizaron en ausencia de hospedadores, sería muy aconsejable a futuro realizar experimentos con claves químicas o mecánicas del hospedador, para determinar si la presencia del recurso en el ambiente modifica la respuesta comportamental de las larvas.

Al respecto de la selección de los hospedadores en base a su peso o tamaño por parte de las larvas de *M. ruficauda* se observó que este parasitoide no parece seleccionar a los que poseen un mayor tamaño, es decir, a aquellos que representarían un recurso de mejor calidad. Este patrón se encontró tanto en presencia como en ausencia de competidores, lo que sugiere que, la detección de coespecíficos no estaría modulando el comportamiento de selección de los hospedadores en base al peso corporal. La falta de discriminación en base a este atributo, al menos en condiciones de laboratorio, sugiere que no sería un factor ni importante ni limitante para el desarrollo normal de este insecto hasta la adultez. Podríamos estar ante un mecanismo de umbral para la discriminación de hospedadores óptimos. Es decir, pasado un determinado peso umbral cualquier *C. signaticollis* representaría un hospedador óptimo, por lo que no se observarían diferencias en la distribución dentro de los parches, sin embargo la elucidación de este aspecto requiere ulterior investigación. Además, la falta de selección por peso podría estar relacionada con la estrategia de explotación del hospedador por parte de este parasitoide. En este punto se hace necesario recordar que en los

parasitoides koinobiontes el hospedador puede continuar con su desarrollo durante un período más o menos largo según la especie a la que nos refiramos, por lo que representa un recurso dinámico cuyo peso puede ir variando durante el período de parasitismo. Tiene sentido entonces suponer que no hay una selección por parte del parasitoide en lo que respecta al peso corporal, dado que este parámetro variará durante el parasitismo. Es probable incluso que debido a la asincronía presente entre parasitoide y hospedador, los primeros parasitoides que aparecen y son parasitados, sean los de menor tamaño o peso, ya que acaban de mudar recientemente y en el ambiente ya hay larvas en su búsqueda. Estos hospedadores, parasitados o no, irán ganando peso a través de la alimentación, aumentando su calidad como recurso alimenticio durante la temporada. Además, teniendo en cuenta los resultados del capítulo anterior, donde se observó que el aumento en la intensidad de la clave química no modifica el comportamiento de orientación de las larvas, podría implicar que, si bien un hospedador de mayor tamaño podría liberar una mayor cantidad de clave, esto no necesariamente representa un hospedador más atractivo o de mejor calidad para el parasitoide. En cierto sentido, estos resultados muestran que el peso no sería necesariamente un indicador de condición nutricional del hospedador. Este hecho está siendo también observado actualmente en experimentos de elección dual en los cuales las larvas no discriminaron el peso corporal de dos hospedadores presentados en simultáneo (Zermoglio & Castelo, 2015) y ha sido registrado también en otros parasitoides. Por ejemplo, la avispa *Hyssopus pallidus* Askew es parasitoide de dos larvas de tortricidos, *Cydia pomonella* L. y *C. molesta* Busck, siendo la última notablemente menor en tamaño. Sin embargo, la hembra del parasitoide pone la misma cantidad de huevos en ambas especies y, llamativamente, los adultos que se desarrollan a partir de *C. molesta*, son de mayor tamaño que los de *C. pomonella*. En este caso, el tamaño no es el único parámetro que explica la calidad nutricional del hospedador (Häckermann et al., 2007). Por ende, el próximo paso en la investigación es corroborar si el tamaño de *C. signaticollis* estimado con una variable distinta a peso corporal, refleja la calidad y contenido de los nutrientes que posee el hospedador.

Al evaluar los resultados de los experimentos realizados en parches con hospedadores que estaban previamente monoparasitados y variaban en su peso, se encontró que las larvas no seleccionan a aquellos de mayor peso como se esperaba según el trabajo previo de Crespo y Castelo (2009). Este patrón de distribución de parasitismo se encontró tanto en los parches con y sin competencia y además, no se halló una diferencia al comparar estos tratamientos entre sí, lo que sugiere que la presencia de coespecíficos no estaría modulando la distribución de las larvas entre los hospedadores ofrecidos. Las diferencias halladas entre los datos a campo (Crespo & Castelo, 2009) y los resultados de laboratorio de este trabajo podrían deberse a un artefacto producido por el diseño en el muestreo (confusión de efectos). Podría no existir una selección por parte del parasitoide de la

cantidad de recursos (o recurso alimenticio) que ofrece un determinado hospedador, o podría simplemente deberse al tiempo de exposición potencial del hospedador al parasitoidismo. Es decir, al momento en que se realiza el muestreo, un hospedador que haya nacido más temprano en la temporada estará más avanzado en su desarrollo larval y físico con respecto a uno que nació al final de la temporada ya que lleva más tiempo alimentándose. A su vez la probabilidad de este insecto de ser parasitado será mayor, ya que ha estado disponible más tiempo, respecto a otros. En el trabajo de Crespo y Castelo (2009), la manera en que se realizaron los muestreos visualizan un momento fijo (estático) y avanzado en la temporada, con lo cual refleja el resultado de un proceso largo y complejo. Para determinar como se van produciendo los sucesos de elección y discriminación habría que observar la dinámica de cómo van variando las decisiones de las larvas en la temporada. En este sentido, se está viendo una fracción del tiempo sin tener en cuenta lo que sucedió antes. En concordancia con este hecho, Slansky (1986) aclara justamente que uno de los mayores beneficios de seleccionar los primeros estadios del hospedador sobre los más avanzados en su desarrollo, es que la probabilidad de los primeros de haber sido parasitados previamente es mucho menor.

Respecto a la detección de coespecíficos en las pruebas de elección múltiple con cuatro larvas experimentales existe la posibilidad que las larvas de *M. ruficauda* no hayan detectado la presencia de sus competidoras dentro del parche y que debido a esto no se hayan evidenciado diferencias con los tratamientos con una única larva experimental. Considerando que en los ensayos de detección de coespecíficos con larvas del parasitoide se utilizaron 20 individuos como estímulo y, por el contrario, al realizar las pruebas de elección dentro del parche artificial con las larvas en presencia de coespecíficos, el número máximo era de cuatro, cabe la posibilidad que las claves no fueran lo suficientemente intensas para ser percibidas. Además, al comparar las arenas experimentales en uno y otro experimento respecto a la cantidad y naturaleza de claves, resulta claro que el parche artificial es enormemente más rico y complejo en este aspecto que el olfatómetro, no sólo debido a la presencia de los hospedadores sino también al sustrato. Otro factor a tener en cuenta es la diferencia en el tamaño de las arenas experimentales utilizadas en uno y otro experimento. Al desconocer el tipo de clave atractiva que media el reconocimiento entre las larvas parasitoides, no podemos hacer ninguna inferencia respecto a su alcance, pero existe la posibilidad que dentro del parche, y dependiendo de la posición en que se encuentren los parasitoides, la clave sea débil, y así difícilmente detectable. Por este motivo es que las larvas podrían estar comportándose como si se hallaran en ausencia de competidores. Por otro lado, recientemente Crespo y colaboradores (2015) han publicado un trabajo en el que demuestran que en las larvas parasitoides criadas en densidades elevadas (500 larvas en 36 cm² y 100 ml de tierra) el umbral de selección de hospedadores decrece y se orientan y parasitan hospedadores subóptimos respecto a larvas que fueron criadas

individualmente. Si bien en esta Tesis se colocaron cuatro LII en cada parche de 1600 cm², estas habían sido mantenidas hasta el momento de su utilización en densidades de entre 3 a 7 larvas/cm², es decir en media densidad (M. Castelo, comunicación personal). El hecho de haber criado las larvas en estas densidades tal vez sea el motivo por el cual no se observó el patrón esperado ya que no estarían seleccionando a los mejores hospedadores frente a los subóptimos.

Al comparar los tratamientos donde había competencia intraespecífica pero los parches eran de hospedadores sanos o parasitados, no se encontraron diferencias entre sus distribuciones de parasitismo, ni al compararlas con una distribución uniforme (teórica). En primer lugar, este resultado está indicando que el estado de parasitismo de los hospedadores no tendría influencia sobre el comportamiento de elección de las larvas frente a hospedadores que difieren en peso y se encuentran ante la presencia de competidores. Por otro lado, dado que las distribuciones de las larvas parasitoides no difieren de la distribución teórica contemplada, no se puede descartar la existencia de una Distribución Libre e Ideal, hecho que se puede percibir al observar las frecuencias de parasitismo en cada situación experimental analizada. No obstante, esto indica que las larvas se detectan en estado libre y distribuyen entre los hospedadores atenuando la competencia entre ellas pero que este comportamiento no estaría condicionado por la calidad del hospedador en cuanto a su estado de parasitismo y condición corporal. Sin embargo, estos patrones de distribución de parasitismo encontrados en los tratamientos con 4 LII pueden ser un efecto dado por cómo se tomaron los datos. Recordemos que en la sección de resultados se aclaró que en el caso de los tratamientos con competidores, no en todas las réplicas se encontraron las larvas al final del período de experimentación, y esto pudo deberse a la condición física de las larvas. Si bien se chequeó previo a ser liberadas que correspondieran al estadio II y que se mostraran activas y exhibiendo los movimientos típicos que reflejan un buen estado físico, existe una tasa de mortalidad intrínseca que queda fuera de control experimental. Por otro lado, la constitución y el tamaño del parche no deberían estar afectando el alcance de la larva, dado que el ambiente era homogéneo y además se ha visto que la larva puede desplazarse distancias que se encuentran comprendidas dentro del rango del diámetro de la arena experimental (Castelo et al., 2006).

Considerando que estos resultados reflejan una falta de discriminación y selección de las larvas de *M. ruficauda* en base al peso de *C. signaticollis*, podría considerarse que los hospedadores están siendo seleccionados en base a otras características. Puesto que se hallan bajo condiciones de laboratorio, los hospedadores podrían presentarse perturbados y ser considerados subóptimos por las larvas parasitoides, independientemente de su calidad en función del peso. Resta aun dilucidar

qué otros atributos del hospedador pueden ser sentidos y seleccionados positivamente por este parasitoide.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE LAS CUALIDADES DEL HOSPEDADOR Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE EL PARASITISMO: ¿Pueden las larvas evaluar si un hospedador está perturbado?

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivientes están inmersos en ambientes dinámicos que los desafían continuamente a adaptarse y responder a los cambios de su medio (Perić-Mataruga et al., 2006; Johnson & White, 2009; Zhao et al., 2010). Los organismos en su entorno natural raramente experimentan condiciones óptimas. Por el contrario, durante la mayor parte de su vida se enfrentan a condiciones subóptimas y, ocasionalmente, a estresores ambientales severos (Holmstrup et al., 2010). Frente a estas condiciones adversas o subóptimas, los organismos tienden a mantener un estado estable, proceso que se conoce como homeostasis (Cannon, 1939; Morgan & Tromborg, 2006). Se define entonces a un estresor como cualquier agente o factor que desafíe el mantenimiento de la homeostasis (Selye, 1956, 1976; Morgan & Tromborg, 2006; Johnson & White, 2009; Even et al., 2012). Se puede definir al estrés como una respuesta adaptativa e inespecífica, que puede ser comportamental y/o fisiológica, ante un desafío al mantenimiento de la homeostasis (Selye, 1976; Johnson & White, 2009; Zhao et al., 2010; Even et al., 2012). Por lo tanto, bajo esta amplia definición hay una sorprendente cantidad de diferentes tipos de estresores que pueden desafiar a un organismo, que van desde los gradientes de temperatura hasta la presencia de toxinas (Johnson & White, 2009; Holmstrup et al., 2010). Como contrapartida, todos los organismos vivos responderán a los estresores de múltiples maneras, tanto a nivel celular como organizmático e incluso ecológico o social (Perić-Mataruga et al., 2006; Even et al., 2012).

Desde el trabajo de Hans Selye (1936), quien acuñó el término estrés, se han publicado una incontable cantidad de trabajos en el tema. El concepto biológico de estrés se originó en mamíferos donde el “Síndrome General de Adaptación” (GAS, por sus siglas en inglés) describe un grupo de respuestas fisiológicas integradas comunes independientemente de cual sea la naturaleza o identidad del estresor (Selye, 1936; Even et al., 2012). Este paradigma fue estudiado y extendido a invertebrados (Perić-Mataruga et al., 2006). El paradigma *GAS* establece que la dinámica temporal de las respuestas comportamentales y fisiológicas son predecibles e incluyen una fase de alarma, una de adaptación y una de agotamiento. La fase de alarma es definida como el período durante el cual el organismo sensa al estresor. La primera reacción adaptativa que se produce en esta fase es la clásica respuesta “defensa o escape”. Para que esta reacción sea efectiva se desencadenan una serie de respuestas fisiológicas, como por ejemplo aumento de la tasa cardíaca, cese de la digestión, etc. (Przewlocki, 2009; Even et al., 2012). En el caso en que la reacción no sea exitosa y el organismo siga en contacto con el estresor, su cuerpo continúa funcionando por encima del nivel homeostático de excitación, lo que se conoce como fase de resistencia o adaptación. Un organismo que se ha adaptado al estrés requerirá recursos adicionales, los cuales agotarán las reservas necesarias para el

normal funcionamiento del cuerpo. Siempre que el estrés persista, la fase de adaptación es seguida por la fase de agotamiento, en la cual el animal sucumbe a los efectos combinados del estrés y la respuesta propia y, eventualmente puede conducirlo a la muerte (Johnson & White, 2009). Llamativamente, a pesar de la variedad de estresores, las respuestas de estrés están altamente conservadas en muchos organismos (Lee et al., 2012). Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que la hormona liberadora de corticotropina se halla conservada, la cual está involucrada en la respuesta de estrés en invertebrados y vertebrados (Huisin & Flik, 2005). La respuesta de estrés de vertebrados e invertebrados parece haber evolucionado de un sistema ancestral común (Adamo & Baker, 2011 y sus citas; Ottaviani & Franceshi, 1996; Stefano et al., 2002).

Existen diversos tipos de respuestas de estrés, relacionadas entre sí que pueden ser cuantificadas: fisiológica, celular y comportamental (Pfaff et al., 2009; Even et al., 2012). En el caso particular de los insectos estas respuestas pueden ser cuantificadas a través de diferentes marcadores de estrés. Para ilustrar mejor, la respuesta fisiológica puede ser cuantificada a través de marcadores hormonales (aminas biogénicas, neuropéptidos y hormonas metabólicas) (Zhao et al., 2010; Adamo & Baker, 2011; Lee et al., 2012); la respuesta celular a través de la expresión de genes (proteínas de shock térmico o HSPs) (Benoit, 2011; Zhao & Jones, 2012) y la respuesta comportamental a través de un comportamiento particular (extensión del aguijón en abejas, inicio del vuelo) (Balderrama et al., 2002; Adamo & Jones, 2011). Frecuentemente, uno de los marcadores de estrés bajo determinados desafíos homeostáticos más comúnmente utilizado es la supervivencia o una combinación de varias de las respuestas antes mencionadas (Pfaff et al., 2009; Even et al., 2012; Ismail et al., 2013).

Los insectos, al igual que el resto de los seres vivos, pueden encontrarse con una serie de estresores dentro de su entorno que abarcan distintos factores abióticos y bióticos. Los estresores abióticos incluyen cambios en la temperatura, la humedad, la salinidad, la disponibilidad de nutrientes, la disponibilidad de espacio, vibración mecánica, radiación UV y la presencia de un amplio rango de contaminantes químicos (pesticidas, fertilizantes, etc.) y metálicos, entre otros (Pimentel, 1994; Furlong & Groden, 2003; Holmstrup et al., 2010; Zhao & Jones, 2012; Browne et al., 2014). Los estresores de origen biótico también son de lo más variados: incluyen infecciones virales, bacterianas o fúngicas, parásitos, la presencia de competidores y/o predadores, etc. (Gaugler et al., 1994; Adamo & Baker, 2011; Lee et al., 2012; Hawlena et al., 2011; Zhao & Jones, 2012). Dado que la respuesta de estrés abiótico o biótico es inespecífica, es frecuente encontrar en la literatura estudios donde, bajo estresores de diferente naturaleza, se cuantifican las mismas respuestas. Por ejemplo, en el escarabajo *Tribolium castaneum* Herbst se ha observado un aumento en los niveles

de expresión génica (HSPs) y una disminución en la supervivencia al ser expuestos los individuos a altas y bajas temperaturas, así como a vibración mecánica (Kiyotake et al., 2014). Cuando abejas melíferas son anestesiadas con CO₂ o enfriamiento o sometidas a un giro vertical se deprimen los niveles cerebrales de dopamina, y aumenta la latencia para llegar al sitio de alimentación (Chen et al., 2008). En este tipo de trabajos, suele utilizarse algún tipo de estresor mecánico artificial, debido a que es un estresor abiótico de fácil aplicación experimental (Davenport & Evans, 1984; Balderrama et al., 2002; Mowlds et al., 2008; Sénatore et al., 2010; Browne et al., 2014).

Sorprendentemente, estos factores pueden afectar directamente a un individuo por padecimiento del estresor o de forma indirecta cuando el estresor es sufrido por un miembro inferior en la cadena trófica, como las presas o los hospedadores. La influencia de la calidad de eslabones más bajos en la cadena trófica sobre los eslabones más altos ha sido bien documentada, demostrando que por regla general, los estresores pueden inducir un impacto más negativo en los parásitos o parasitoides que en sus hospedadores (Teder & Tammaru, 2002; Harvey et al., 2003, 2007; Thomas et al., 2006; Morse, 2009; Moon & Moon, 2010). Por ejemplo, se ha observado que un aumento en la salinidad del agua altera la calidad de ciertas plantas hospedadoras y esta alteración se transmite en los niveles tróficos superiores a través del herbívoro y del parasitoide primario hasta el hiperparasitoide, lo que influye sobre su tamaño y carga inicial de huevos (Moon & Moon, 2010). En el caso de los hiperparasitoides de la familia Eulophidae, la cantidad de progenie y el peso de los adultos se ven afectados negativamente a través de varios eslabones por la dieta del herbívoro (Morse, 2009). Los parasitoides son particularmente sensibles a la variación de la calidad de sus insectos hospedadores debido al desarrollo fuertemente acoplado entre ellos (Teder & Tammaru, 2002). Cuando el estrés es sufrido por el hospedador éste último se convierte en un hospedador subóptimo o empobrecido desde el punto de vista del estado fisiológico, lo cual puede tener efecto negativo sobre el *fitness* del parasitoide.

En el caso de las larvas de Scarabaeidae, han demostrado ser susceptibles a estresores de diversa naturaleza y se han registrado respuestas fisiológicas y comportamentales para estos organismos. Por ejemplo, las larvas de *Popilia japonica* Newman y *Cyclocephala* sp. han mostrado cambios comportamentales y fisiológicos frente al parasitismo de *Tiphia* Fabricius (Roggers et al., 2003). Al ser parasitados se observa que se entierran más profundo en el suelo que aquellos individuos no parasitados. Además, esta respuesta de enterramiento parece responder a alteraciones en niveles hormonales ya sea, manipulados artificialmente o en respuesta al parasitismo (Roggers et al., 2003). Para las larvas de *P. japonica* también se han registrado respuesta de agresión y evasión frente a ciertos nematodos entomopatógenos (Gaugler et al., 1994). Asimismo, se han observado

respuestas de escape, dispersión y detención de las actividades fisiológicas en respuesta a disturbios externos como falta de alimento y propiedades físicas del suelo, lo que produce efectos negativos en estos insectos sobre el estado corporal general (Villani & Nyrop, 1991). En el caso de las larvas de *Cyclocephala* utilizadas como hospedadores en esta Tesis (*C. signaticollis*, *C. modesta* y *C. putrida*), se ha observado que al estar confinadas en espacios reducidos, muestran una respuesta de agresividad, atacándose entre ellas y en varios casos, provocando la muerte de otras larvas de escarabeidos (Barrantes, 2009). Asimismo, Castelo y Crespo (2012) mostraron que las larvas de nueve especies de escarabeidos que coinciden con la distribución de *M. ruficauda* (ver Capítulo 1, “Introducción General”) responden con distinto grado de agresividad al simular el ataque de un parasitoide artificialmente. Dado que el parasitismo puede considerarse una forma de estrés para el hospedador (Pimentel, 1994), y que esto podría ser detectado y discriminado por *M. ruficauda*, sería interesante conocer si este tipo de respuestas de estrés pueden ser desencadenadas a partir de otros estresores sufridos por el hospedador.

Teniendo en cuenta que las larvas del parasitoide *M. ruficauda* son capaces de discriminar químicamente hospedadores que difieren en su calidad en lo que respecta al estado de parasitismo y a la especie de hospedador (Crespo & Castelo, 2009; Barrantes & Castelo, 2014), es interesante saber que otros aspectos del hospedador son capaces de sensar las larvas y seleccionar positivamente. Ahora bien, se desconoce si un hospedador estresado mecánicamente representa un hospedador de menor calidad para el parasitoide *M. ruficauda*. También se desconoce si las larvas, que poseen la capacidad de discriminar la calidad del hospedador en base a otros parámetros, son capaces de discriminar individuos *C. signaticollis* con diferentes niveles de estrés y seleccionar a aquellos que representen un mejor recurso sobre el cual desarrollarse (menor grado relativo de estrés).

Por otro lado, existen algunos factores que pueden disminuir el éxito reproductivo de los insectos. Broom y Johnson (1993) han definido al “estrés” como la exposición de un organismo a condiciones no placenteras (irritantes) con efectos adversos. Este término se utiliza a menudo en relación a circunstancias que resultan en un estado empobrecido de un individuo, reduciendo su *fitness*. Las “condiciones no placenteras” que causan estrés son particulares a cada organismo y pueden deberse a diversas causas como competencia intraespecífica, depredación, heridas, baja disponibilidad de alimento o cambios en las condiciones físico-químicas del ambiente (temperatura, humedad, salinidad), y pueden evidenciarse mediante cambios o variaciones comportamentales, físicos y fisiológicos (Holmstrup et al., 2010).

El objetivo de este capítulo fue determinar si la condición fisiológica del hospedador, definida por su nivel de estrés mecánico, puede ser detectada por parte de las larvas de *M. ruficauda*. Asimismo se estudió cómo el nivel de estrés del hospedador determina el proceso de selección del hospedador por parte de las larvas parasitoides.

En base a los antecedentes expuestos, existe la posibilidad que las larvas parasitoides tengan la capacidad de discriminar el nivel de perturbación de los hospedadores, y eviten parasitarlos. En este estudio se espera que las LII de *M. ruficauda* parasiten en mayor proporción a aquellos hospedadores *C. signaticollis* que se encuentran en un nivel relativo de perturbación bajo (menor estrés). De la misma manera, se espera que la orientación de las LII se de mayoritariamente hacia las claves químicas provenientes de hospedadores con un menor grado relativo de estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

En este capítulo de la Tesis se utilizaron como individuos experimentales larvas del segundo estadio de *M. ruficauda*. Como estímulos se utilizaron tanto ejemplares vivos del hospedador de la especie *C. signaticollis* del tercer estadio larval, como su extracto. Tanto los hospedadores como los parasitoides fueron recolectados y mantenidos como se explicó previamente en la sección “*Recolección y mantenimiento de los insectos*” del Capítulo 2.

Obtención de hospedadores de distinta condición fisiológica

Con el fin de determinar si una perturbación mecánica puede producir estrés en el hospedador, entendido como un cambio en cuanto a su estado fisiológico o comportamental, y si las larvas parasitoides tienen la capacidad de detectar a estos hospedadores estresados, se realizaron procedimientos de perturbación sobre los hospedadores, y pruebas comportamentales de elección dual y pruebas de no elección con las larvas parasitoides en distintos dispositivos. En estos experimentos los estímulos ofrecidos fueron hospedadores vivos en dos grados distintos de estrés (no estresado o sano - estresado) o extractos confeccionados a partir de hospedadores también con dos niveles diferentes de estrés.

El estrés en los gusanos blancos se logró alojándolos dentro de una jaula confeccionada con una malla mosquitera plástica de 1 x 6,5 x 7 cm aproximadamente, con tierra y una porción de alimento, durante un tiempo especificado según el experimento (ver párrafos siguientes). De aquí en adelante denominaremos a este tipo de jaula como “jaula rectangular” (Figura 5.1). Este dispositivo provoca un estrés de tipo mecánico en los hospedadores dado que comprime levemente a los insectos desde los lados y les restringe en buena medida sus movimientos. A modo de control, el menor nivel de estrés (hospedadores no estresados o sanos) fue logrado alojando a los gusanos blancos en una jaula confeccionada con la misma malla plástica pero con forma de pirámide con base de triangular (o tetraedro de lados triangulares), la cual será llamada a partir de ahora “jaula piramidal” (Figura 5.1). Esta jaula permite al hospedador moverse con cierta libertad dentro de ella, por lo que en este caso consideramos el estrés mecánico sobre el hospedador es inexistente o muy bajo.

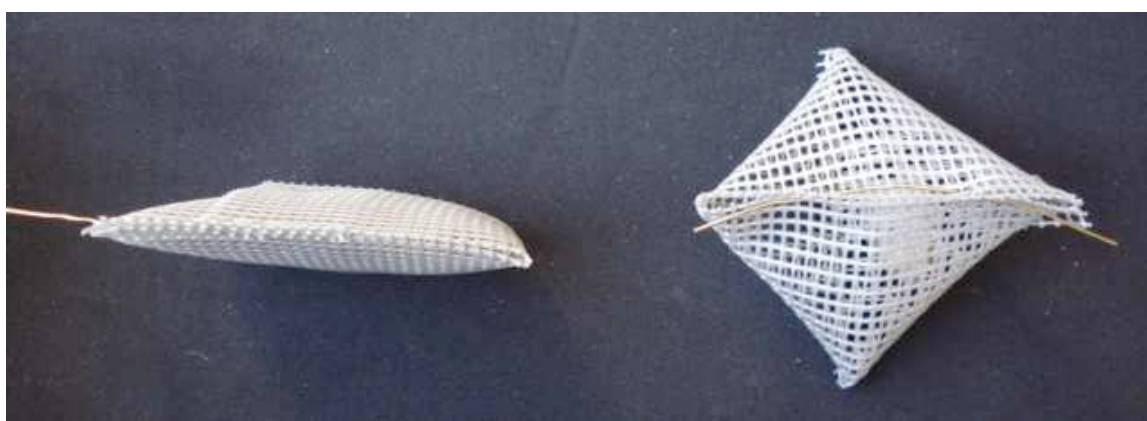


Figura 5.1. Jaulas de confinamiento “rectangular” y “piramidal”, respectivamente, utilizadas para provocar distintos niveles de estrés en los hospedadores *C. signaticollis*.

Discriminación del nivel de estrés y parasitismo en hospedadores vivos en experimentos de elección dual

Con el objeto de evaluar la capacidad de determinación, por parte de las LII del parasitoide, del nivel de estrés de su hospedador se realizaron experimentos de elección dual con hospedadores vivos (Tabla 5.1). La arena experimental consistió en un recipiente de Telgopor cilíndrico de 1600 ml (20 cm diámetro x 7,9 cm altura) que contenía tierra negra de uso comercial (Ver Capítulo 2, y Figuras 2.4 y 5.2). En cada recipiente se colocaron en forma simultánea dos hospedadores de igual peso, que a su vez estaban confinados dentro de jaulas individuales que diferían en forma y tamaño provocando los dos niveles de estrés (no estresado o sano - estresado). Una de ellas es la jaula rectangular explicada en la sección anterior, que comprime lateralmente a los hospedadores y la otra

es la que permitía al hospedador moverse con cierta libertad o jaula piramidal (Figura 5.1). Con dichos dispositivos se realizaron dos series experimentales que diferían en el tipo de procedimiento para generar el estrés en los hospedadores. En una de ellas se colocaban ambos gusanos en sendas jaulas y luego en simultáneo en la arena experimental (“sin adaptación al confinamiento”, SA). En la otra serie experimental el hospedador estresado era colocado con dos días de antelación en la jaula rectangular (“con adaptación al confinamiento”, CA) ya que podría ocurrir un cambio no inmediato a nivel fisiológico en el gusano a causa del estrés que demoraría en evidenciarse, y por lo tanto el parasitoide podría no detectarlo si se lo expone inmediatamente. La otra mitad de los hospedadores, que corresponden al nivel “no estresado” fueron mantenidos en los frascos que se habían utilizado inicialmente para su conservación hasta el momento de inicio del ensayo, donde fueron traspasados a la jaula piramidal. Para ambas series experimentales y una vez que el dispositivo se encontraba armado, en la zona central de la arena se liberó una larva parasitoide. Se tapó el dispositivo y luego fue mantenido durante 5 días a temperatura y humedad relativa controladas (24 - 26 °C, 45 -70 % HR). Transcurrido este período se procedió a registrar, con ayuda de una lupa estereoscópica cuál de los dos hospedadores se encontraba parasitado por la larva de *M. ruficauda*. En los casos en que la larva parasitoide no fue encontrada o bien alguno de los hospedadores murió durante el transcurso del experimento la réplica fue descartada.

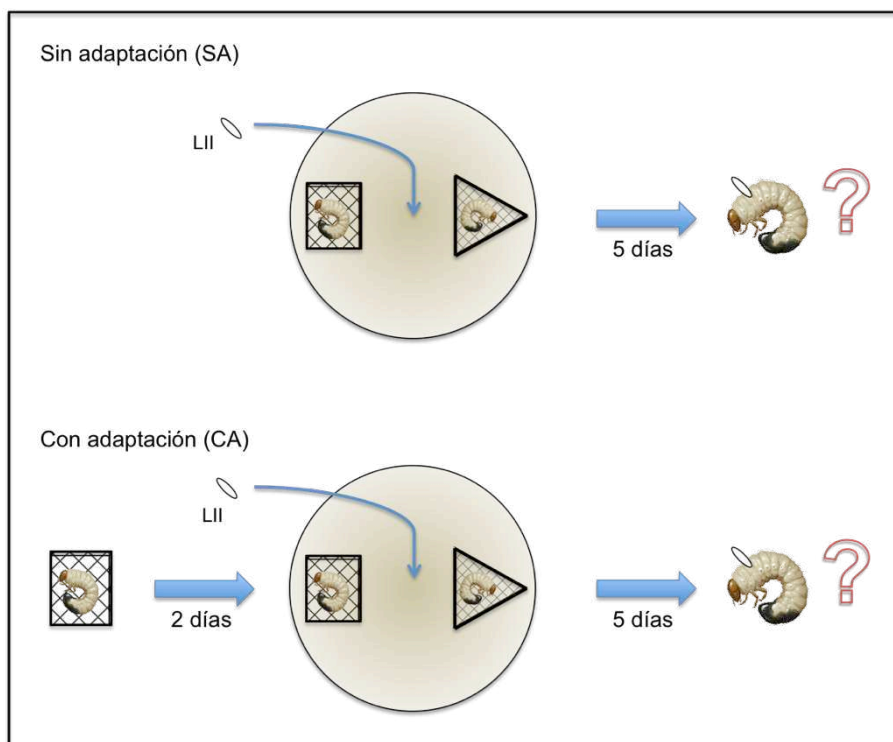


Figura 5.2. Diseño experimental empleado para cuantificar la respuesta de elección de *M. ruficauda* frente a hospedadores *C. signaticollis* que variaban en calidad en cuanto al nivel de estrés.

Aceptación de hospedadores vivos con diferente nivel de estrés en experimentos de no elección

Para evaluar la aceptación de hospedadores con diferente nivel de estrés por parte de las LII se realizaron experimentos de no elección tanto con hospedadores sanos como con estresados. Para ello se utilizó una arena experimental idéntica a la utilizada en la sección anterior, pero en este caso se realizaron dos series experimentales en donde se expuso al parasitoide a un único hospedador con uno de los dos niveles de estrés (no estresado o estresado; Tabla 5.1). Transcurridos 5 días a temperatura y humedad relativa controladas (24 – 26 °C, 45 - 70 % HR) se procedió a registrar la proporción de hospedadores parasitados para cada uno de los tratamientos y en el caso en que el hospedador hubiera muerto durante el transcurso del ensayo, la réplica fue descartada. Los experimentos de no-elección permiten visualizar si los parasitoides atacan hospedadores sub-óptimos en ausencia de una mejor opción, es decir de un *C. signaticollis* sano. En el caso de la serie experimental en la que se utiliza un gusano blanco no estresado como estímulo, esta actúa como control positivo donde se evidencia que los parasitoides y las condiciones ambientales son las adecuadas para que se produzca el parasitismo.

Discriminación de niveles de estrés del hospedador mediante extractos de claves químicas

Con el objeto analizar la existencia de un cambio en la clave atractiva del hospedador producto del estrés generado mecánicamente y la capacidad de discriminación del estadio larval II de *M. ruficauda* frente a las claves de hospedadores con dos niveles de estrés diferentes (no estresados y estresados), se realizaron experimentos de olfatometría, cuantificando las respuestas comportamentales de las larvas mediante una prueba de elección dicotómica. Para ello se utilizaron larvas provenientes de 25 desoves mantenidas en forma gregaria y estímulos de gusanos blancos de la especie *C. signaticollis*. Para elaborar el extracto de *C. signaticollis* estresado se colocó el insecto durante dos días en la jaula que genera el estrés mecánico con el procedimiento CA (ver secciones anteriores) (Figura 5.3). Luego se procedió a hacer la extracción con una metodología ligeramente modificada a la explicada en la sección “*Obtención de los extractos químicos del hospedador*” del Capítulo 2. Esta modificación yace en que en el caso que el estrés se viera reflejado en el perfil químico de los hospedadores esto podría deberse a un cambio en la clave que normalmente resulta atractiva para el parasitoide o a la aparición de una nueva clave que resulte aversiva. En el caso de que ocurra la generación de una nueva clave aversiva, su procedencia o la región corporal en donde se genera resultan inciertas. Por este motivo, en esta sección los extractos fueron elaborados utilizando el cuerpo completo de los hospedadores y únicamente se eliminaron la cápsula cefálica y las patas para facilitar el proceso de homogeneización y extracción del estímulo. Se realizaron tres

series experimentales. En una de ellas se evaluó la elección del parasitoide cuando se lo expone en simultáneo a estímulos de hospedadores estresados y no estresados, y en las otras dos se evaluó la respuesta de las LII cuando son expuestas a claves de uno y otro estímulo frente al solvente (Tabla 5.1).

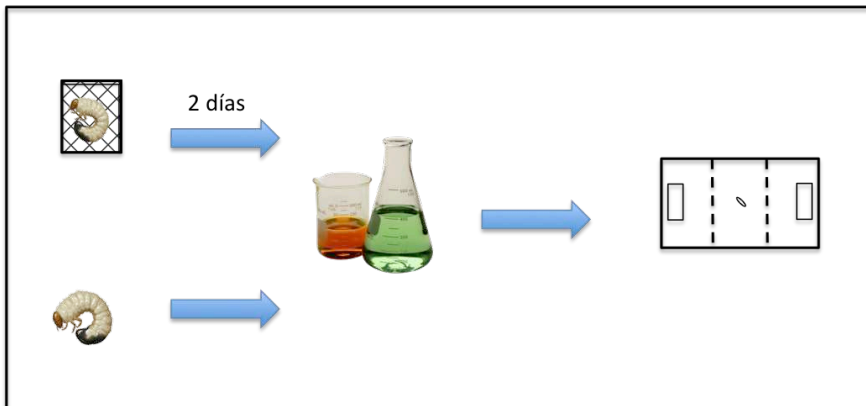


Figura 5.3. Obtención de estímulos de hospedadores con diferente nivel de estrés utilizados para cuantificar respuestas de orientación de las larvas parasitoides en olfatómetro de ambiente estacionario.

Análisis estadístico

En los experimentos de elección dual, la proporción de LII de *M. ruficauda* que se orientó hacia los estímulos, evaluada tanto con hospedadores vivos como con extractos químicos, fue analizada estadísticamente por medio de una prueba de bondad de ajuste de χ^2 (Sokal & Rohlf, 1980). Asimismo, las proporciones de LII que parasitaron hospedadores sanos en los tratamientos con y sin adaptación fueron comparadas entre sí mediante una prueba de diferencia de dos proporciones (Zar, 2010). En cuanto a los experimentos de no elección realizados con gusanos blancos vivos estresados y no estresados, se compararon las proporciones de parasitismo utilizando una prueba de diferencia de dos proporciones (Zar, 2010).

RESULTADOS

Discriminación del nivel de estrés y parasitismo en hospedadores vivos en experimentos de elección dual

Al evaluar la proporción de LII que parasitaron a los hospedadores sanos y estresados, tanto para los ensayos con y sin adaptación previa de los hospedadores al confinamiento, las diferencias

fueron estadísticamente significativas, siendo mayor -en ambos casos- la proporción de LII que parasitó al hospedador sano ($\chi^2_{CA} = 5,565$, $p = 0,0183$; $\chi^2_{SA} = 4,455$, $p = 0,0347$). Los resultados para los ensayos de elección de hospedadores vivos se presentan en la Tabla 5.1. Adicionalmente, se realizó una prueba de diferencia entre dos proporciones (Z) entre las proporciones de LII que parasitaron tanto hospedadores sanos como estresados entre los tratamientos CA y SA que determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($Z_{0,05} = 0,1491$, $p = 0,8807$) (Figura 5.4). Por lo tanto, este resultado indica que el confinamiento previo o inmediato antes del experimento produciría el mismo nivel de estrés sobre los gusanos.

Aceptación de hospedadores vivos con diferente nivel de estrés en experimentos de no elección

Al evaluar la aceptación de *C. signaticollis* con dos niveles de estrés por parte de los parasitoides mediante experimentos de no elección observamos que los valores de proporción de parasitismo obtenidos fueron de 0,62 y 0,17 con hospedadores sanos y estresados, respectivamente. Al compararlos estadísticamente se obtuvo una diferencia significativa, observándose que las larvas parasitan en mayor grado a los gusanos sanos ($Z_{0,05} = 3,9685$, $p = 0,00008$) (Figura 5.5).

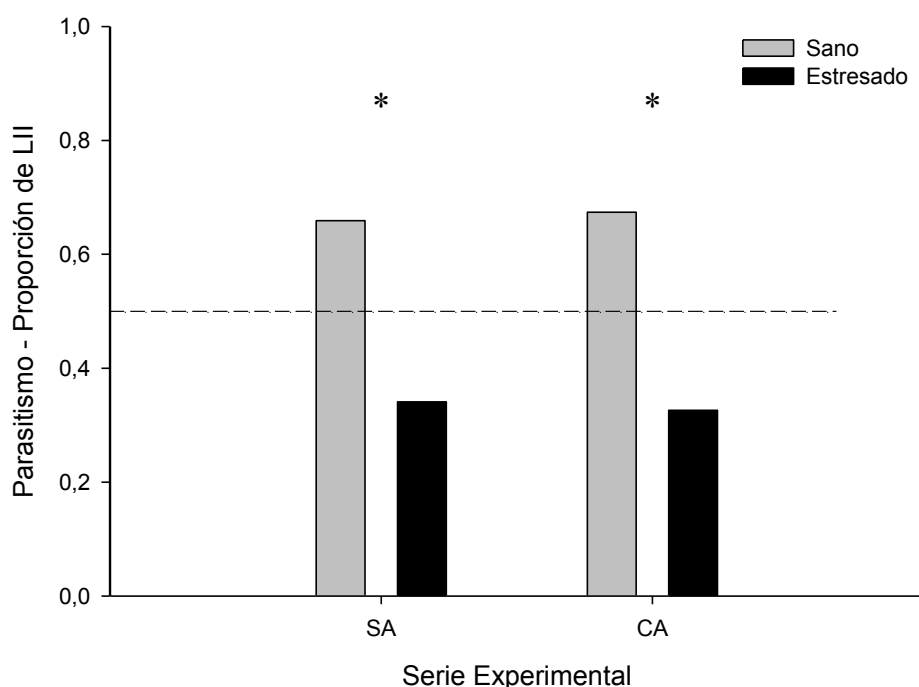


Figura 5.4. Discriminación del nivel de estrés del hospedador. Proporción de larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* que parasitaron hospedadores vivos de la especie *C. signaticollis* sanos o mecánicamente estresados en experimentos de elección dual. SA, serie experimental sin adaptación al estrés; CA, serie experimental con adaptación al estrés; * diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $p < 0,05$).

Discriminación de niveles de estrés del hospedador mediante extractos de claves químicas

Al evaluar la respuesta de orientación del parasitoide frente a estímulos químicos de hospedadores sanos y estresados en simultáneo se encontró una preferencia de las LII de *M. ruficauda* por la zona lateral que contenía la clave del hospedador sano ($\chi^2 = 7,0205$; $p = 0,008$; Tabla 5.1, Figura 5.6), lo que evidencia que la larva tiene la capacidad de discriminar a los hospedadores de diferente condición. Asimismo, al evaluar la elección del parasitoide frente al estímulo del hospedador sano y el solvente, la respuesta observada fue orientación positiva hacia el hospedador sano ($\chi^2 = 10,7977$; $p = 0,001$; Tabla 5.1, Figura 5.6). No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la orientación de las larvas al realizar la serie experimental con estímulo de hospedador estresado y el solvente, con lo que las larvas se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2 = 0,5632$; $p = 0,4529$; Tabla 5.1, Figura 5.6).

Tabla 5.1. Diseño experimental utilizado para evaluar la discriminación y aceptación de larvas II de *M. ruficauda* hacia hospedadores vivos y la discriminación hacia claves químicas de hospedadores que difieren en calidad en cuanto al nivel de estrés. El número de réplicas está discriminado entre paréntesis entre las larvas parasitoides que eligieron un estímulo u otro dentro de la arena experimental en el caso de los experimentos de elección dual. En el experimento de no elección el N se refiere a la cantidad de réplicas totales y entre paréntesis la cantidad de parasitoides que se encontraron aferrados al hospedador. En los ensayos de elección dual el estadístico corresponde a la comparación del número de elecciones que hicieron hacia uno u otro estímulo dentro de cada serie experimental. En los ensayos de no elección el estadístico surge de la comparación entre las dos series experimentales. Abreviaturas: Sa, hospedador sano, Es, hospedador estresado, Sv, solvente de extracción (hexano), CA, con adaptación al confinamiento, SA, sin adaptación al confinamiento. *, diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Experimento	Tipo de estímulo	Serie experimental	Cantidad de réplicas	Estadístico	p
Discriminación (Elección dual)	Vivo	Sa – Es (CA)	46 (31 – 15)	$\chi^2 = 5,565$	0,0018*
		Sa – Es (SA)	44 (29 – 15)	$\chi^2 = 4,455$	0,0347*
Aceptación (No elección)	Vivo	Sa	42 (26)	Z = 3,968	0,00008*
		Es	35 (6)		
Discriminación (Elección dual)	Químico	Sa – Es	195 (116 – 79)	$\chi^2 = 7,020$	0,0080 *
		Sa – Sv	89 (60 – 29)	$\chi^2 = 10,797$	0,0010*
		Es - Sv	87 (47 – 40)	$\chi^2 = 0,5632$	0,4529

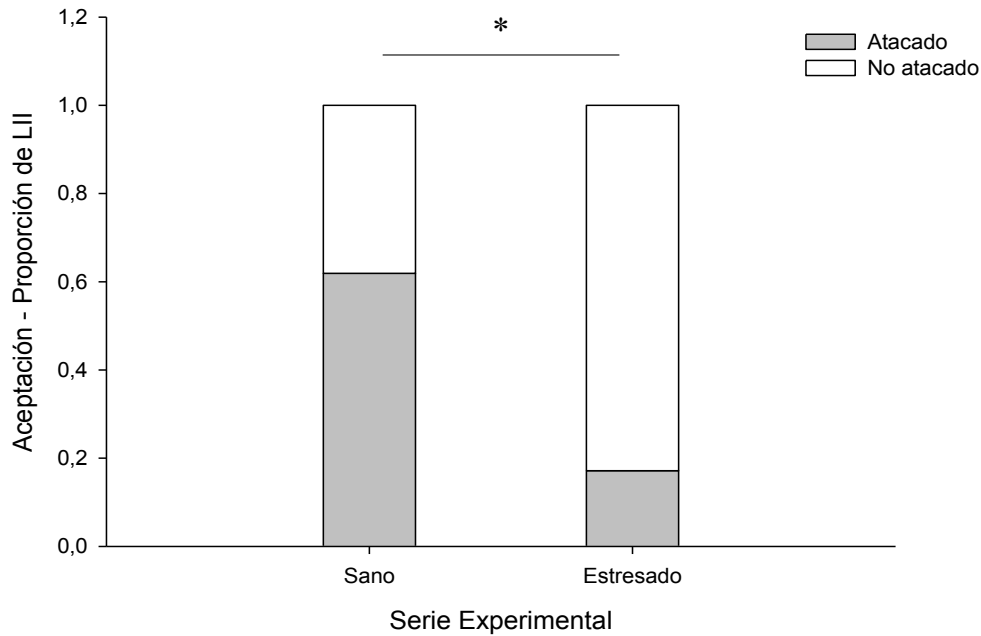


Figura 5.5. Proporción de larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* que parasitaron hospedadores de la especie *C. signaticollis* sanos y mecánicamente estresados en experimentos de no elección. * diferencias estadísticamente significativas (Z , $p < 0,05$).

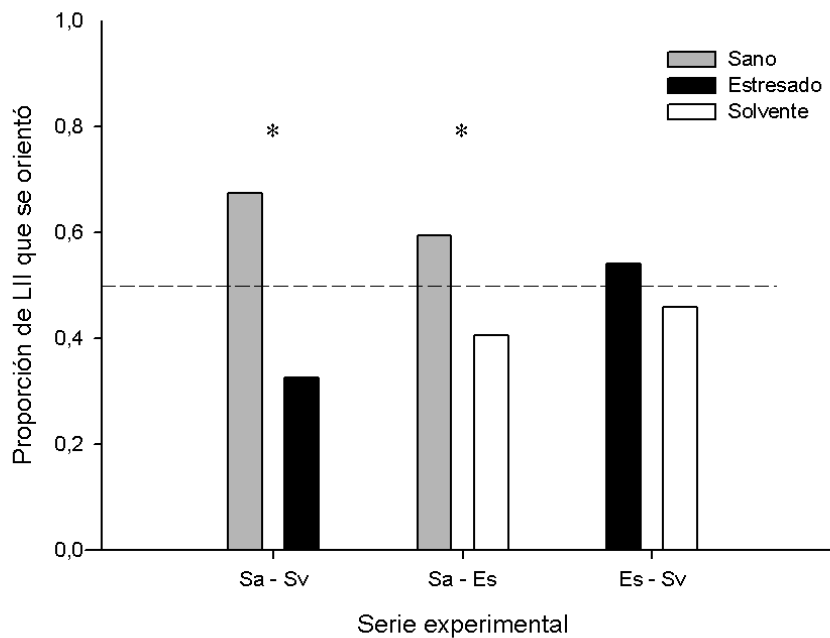


Figura 5.6. Proporción de larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* que se orientaron hacia extractos de hospedadores de la especie *C. signaticollis* sanos o mecánicamente estresados o el solvente de extracción en experimentos de elección dual. Sa, extracto de hospedador sano, Es, extracto de hospedador estresado, Sv, solvente de extracción (hexano), * diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

A lo largo de este capítulo se ha evidenciado que los gusanos blancos de la especie *C. signaticollis* son susceptibles al estrés mecánico y que al menos una de las respuestas de estrés frente a esta perturbación es fisiológica. Además, las larvas de *M. ruficauda* son capaces de discriminar y seleccionar aquellos hospedadores con un grado de estrés menor. El mecanismo mediante el cual las LII discriminan el nivel de estrés de los hospedadores parece estar relacionado con un cambio en la clave química que emiten los hospedadores o la aparición de una nueva clave que no resulte igual de atractiva que la de un hospedador sano o bien, que resulte aversiva. No podemos descartar que aparezca un cambio comportamental en el hospedador estresado, pero dada la manera en la cual se efectuaron los ensayos no nos es posible separar los distintos tipos de respuesta a partir de nuestras observaciones.

Respecto al estresor mecánico, las larvas de *C. signaticollis* han demostrado ser susceptibles a este tipo de perturbación. Esto se ha visualizado de manera indirecta, a través de la discriminación y selección que realizan los parasitoides hacia hospedadores vivos y/o sus extractos. Si bien se desconoce cuál es el mecanismo concreto que estaría ocurriendo en los gusanos blancos, las respuestas de orientación hacia los estímulos químicos estarían evidenciando la ocurrencia de una respuesta fisiológica. En los últimos años se han incrementado los trabajos donde se evidencian este tipo de respuestas frente a perturbaciones como las infecciones por virus, hongos o bacterias, un daño físico y la presencia de parásitos o parasitoides, entre otros (Roggers et al., 2003; Beckage & Gelman, 2004; Edwards et al., 2006; Lebreton et al., 2010). Por ejemplo, las larvas de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Povolny (Gelechiidae), muestran un incremento de hasta diez veces en los niveles de hormona juvenil cuando son infectadas por el microsporidio *Vairimorpha necatrix* Kramer (Down et al., 2008). En el caso de las larvas de *Tenebrio molitor* L., al ser tratadas con lipopolisacáridos, muestran una respuesta inmune (sensibilización inmunológica) que les da una mejor supervivencia frente a infecciones fúngicas (Moret & Siva-Jothy, 2003). Sin embargo, para el caso particular de esta especie de coleóptero aún queda mucho por investigar para dilucidar el mecanismo específico de esta respuesta fisiológica.

Dado que la quimiorrecepción es un sentido muy desarrollado en los insectos, la discriminación de la calidad del hospedador en base a parámetros químicos es clave. En el caso particular de los parasitoides la discriminación del estado de parasitismo de un hospedador puede ocurrir mediante el reconocimiento de cambios en estos perfiles químicos. Por ejemplo, se ha registrado en las larvas de coleópteros que el perfil químico cuticular cambia de una manera particular cuando es parasitado

por las avispas *Anisopteromalus calandrae* Howard (Lebreton et al., 2010). Esta diferencia entre un hospedador sano y uno parasitado es la que la hembra adulta utiliza en la discriminación y selección de sus hospedadores. Cabe mencionar que en el transcurso de esta Tesis parte de los extractos químicos de hospedadores sanos y estresados fueron utilizados para realizar análisis químicos de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa pero lamentablemente no pudieron ser completados antes de la finalización de este trabajo. Sin embargo, los resultados preliminares mostraron que habría diferencias cualitativas en los perfiles de hospedadores sanos y estresados (M. Castelo, análisis en ejecución). Si bien estos resultados son preliminares y aún resta la mayor parte del análisis para conocer cuales son los compuestos que conforman dichos perfiles, en un análisis cualitativo exploratorio se observa que habría diferencias en ambos cromatogramas. Este resultado es alentador, pero se necesita repetir los análisis para confirmar este resultado, debido a que se obtuvieron pocas réplicas de los extractos y algunos contaban con contaminación asociada. Sin embargo, con las muestras analizadas se estaría en condiciones de decir que existe un cambio en la composición química del olor que libera un hospedador perturbado respecto de uno sano (M. Castelo, comunicación personal).

En relación a los resultados de preferencia de los hospedadores vivos, se observó que no hay diferencia entre los ensayos realizados con y sin adaptación previa al confinamiento (CA vs. SA). El hecho de que las preferencias no varíen, al menos en intensidad entre estos resultados, podría estar indicando dos escenarios posibles. En el primero de ellos podría involucrar la existencia de un cambio comportamental del hospedador, además de haber un cambio fisiológico. Teniendo en cuenta que se desconoce el mecanismo fisiológico particular mediante el cual *C. signaticollis* reacciona frente a la perturbación mecánica, podríamos considerar que un cambio en la clave química es un proceso que no es instantáneo sino que conlleva un tiempo intrínseco para que este cambio ocurra. De lo contrario, se esperaría que los resultados en la serie CA tuviesen un nivel de significación mayor respecto a las series SA. En otras palabras, si se tratase únicamente de un cambio a nivel fisiológico que se ve reflejado en las claves químicas atractivas, se esperaría encontrar una respuesta de mayor intensidad hacia los hospedadores sanos al realizar las réplicas con adaptación al confinamiento, ya que en estos ensayos se expone a los hospedadores al estresor previamente por lo que se le da tiempo para que los cambios a nivel fisiológico se desencadenen y sean notorios a nivel de la clave. La ausencia de esta diferencia podría sugerir la existencia de una respuesta inmediata ante el estresor, de tipo comportamental, ya que no hay una demora en este tipo de respuestas, que suelen estar caracterizadas típicamente por las respuestas del tipo “defensa o escape”. Mediante estos ensayos no podemos dilucidar cuál sería la respuesta comportamental

frente al estrés, pero una opción es un cambio en las claves mecánicas que pueden producir los hospedadores.

En trabajos previos se sugirió que además de haber claves químicas que resultan atractivas, existen claves de otra naturaleza que pueden resultar atractivas para las larvas de *M. ruficauda*, como lo son las claves mecánicas que pueden percibirse como una vibración que se transmite por medio del sustrato (Barrantes, 2009; Barrantes & Castelo, 2014). Un cambio en el patrón de movimientos del hospedador con un mayor grado de estrés también podría ser percibido y no seleccionado por el parasitoide. Otra opción que también sería plausible, es que al encontrarse confinado en un espacio reducido y ver reducida su movilidad, el hospedador podría no estar produciendo la clave mecánica que atrae al parasitoide.

El segundo escenario que podría explicar la ausencia de diferencias entre los resultados de parasitismo de los tratamientos CA y SA es completamente opuesto al que se planteó previamente: ante la perturbación mecánica, el gusano blanco activa su respuesta fisiológica de estrés y el desarrollo de esta respuesta es inmediato, por lo que la clave química percibida por el parasitoide en ambos tratamientos es la misma. Por ejemplo, en langostas y grillos a pocos minutos de producirse la respuesta de defensa o escape, ya comienza a liberarse un tipo de neurohormona (octopamina) y unos 30 minutos después se registra la liberación de una segunda hormona (Orchard et al., 1993). También para otros ortópteros se registró un aumento significativo en los niveles de octopamina inmediatamente después de haber sido sometidos a un ensayo de 3 minutos donde el estresor era un predador simulado (Adamo & Baker, 2011). En el caso de estos resultados, es válido considerar esta opción pero sería necesario evaluar la respuesta fisiológica de *C. signaticollis* a tiempos más cortos de ser expuestos al estresor mecánico, ya sea a través del análisis de perfiles químicos o de la cuantificación de aminas biogénicas, hormonas metabólicas y/o neuropéptidos.

La discriminación de los hospedadores estresados por parte de los parasitoides, ya sea a partir de un cambio en las claves químicas o comportamentales, es un proceso vital, dado que del hospedador y su calidad dependerán su desarrollo y éxito reproductivo. Un hospedador estresado puede implicar un hospedador subóptimo por diversos motivos y esto dependerá de cual sea el estresor, la intensidad y la duración del mismo (Morgan & Tromborg, 2006). Por ejemplo, las larvas de *Galleria mellonella* Fabricius, al ser expuestas a estresores térmicos (altas temperaturas) y físicos (son agitados durante dos minutos), tienen una sensibilización inmunológica que les incrementa la supervivencia frente infecciones fúngicas (Browne et al., 2014). Algunas larvas de escarabeidos han mostrado ser sensibles a cambios ambientales y parte de su respuesta implica un arresto del

comportamiento de alimentación (Villani & Nyrop, 1991). Cualquiera sea el caso de *C. signaticollis*, frente a estas respuestas una larva parasitoide se vería perjudicada dado el estado fisiológico y/o nutricional empobrecido del hospedador. El hecho de seleccionar un hospedador subóptimo puede traer consecuencias negativas sobre el desarrollo del parasitoide que podrían ir desde una disminución en su *fitness* hasta la interrupción del desarrollo del organismo.

Dado que la respuesta de estrés es inespecífica, *C. signaticollis* podría mostrar un patrón similar bajo otras circunstancias o estresores. Como se mencionó anteriormente, una fuente de perturbación puede ser la presencia o el ataque por parte de parásitos y parasitoides. De este modo, un hospedador ya parasitado por otra larva de *M. ruficauda* podría estar presentando una respuesta de estrés similar a la encontrada aquí y sus consecuencias sobre el éxito reproductivo podrían ser semejantes. En este modelo de estudio en particular se desconocen cuáles son las consecuencias de seleccionar ciertos atributos del hospedador sobre el *fitness* del adulto que se desarrollará. En los capítulos siguientes se tratará de dilucidar la existencia de una ventaja adaptativa al superparasitismo y las consecuencias de aceptar hospedadores que difieren en su calidad en base a distintos parámetros sobre el éxito reproductivo de *M. ruficauda*.

CAPÍTULO 6

COMPETENCIA INTRAESPECÍFICA DE LAS LARVAS SOBRE EL HOSPEDADOR: ¿Quién gana la competencia?

Este capítulo dio origen a la siguiente publicación: Barrantes ME & Castelo MK. Intraspecific competition rules determining parasitism success in solitary ectoparasitoid fly larvae (en preparación).

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, una única especie de hospedador puede tener múltiples especies de enemigos naturales, lo que a menudo se traduce en una intensa interacción de competencia o interferencia por los recursos del hospedador (Harvey et al., 2009b; Harvey et al., 2013; Xu et al., 2013). Las interacciones competitivas ocurren frecuentemente en los parasitoides, ya que estos insectos, a diferencia de la mayoría de los predadores, tienen usualmente rangos más estrechos de hospedadores (Harvey et al., 2013). De este modo, la tendencia a multi- o superparasitar un hospedador parece estar ampliamente distribuida, incluso entre especies de parasitoides que poseen una habilidad innata para la discriminación de los hospedadores (Montoya et al., 2003; Tenna et al., 2008; Montoya et al., 2013). El superparasitismo implica el parasitismo de un hospedador por dos o más individuos de la misma especie. Por otro lado, el multiparasitismo es el parasitismo de un hospedador por diferentes especies de parasitoides (Harvey et al., 2013). La competencia que involucra a parasitoides puede dividirse en dos categorías: la competencia extrínseca, que está relacionada con las interacciones indirectas entre los adultos de vida libre en busca de recursos de los hospedadores y la competencia intrínseca, que está relacionada con las interacciones directas o indirectas entre parasitoides inmaduros que se desarrollan sobre o dentro de un mismo hospedador (Godfray, 1994; De Moraes & Mescher, 2005; Harvey et al., 2013).

Entre los parasitoides inmaduros, la competencia por los recursos sucede en el hospedador luego de ocurrir el super- o multiparasitismo. En los parasitoides gregarios, el superparasitismo implica una reducción en los recursos disponibles por parasitoide, resultando en individuos de menor tamaño o peso (Dorn & Beckage, 2007). En los parasitoides solitarios, únicamente una larva por hospedador puede completar su desarrollo y los individuos supernumerarios son eliminados como huevo o larva (Fisher, 1961; Lawrence, 1988; Godfray, 1994; Reitz, 1995; Lo Verde et al., 2008). Si bien el superparasitismo se considera desventajoso, desde hace ya unos años, la idea de que puede resultar beneficioso bajo determinadas circunstancias ha sido ampliamente aceptada. La razón subyacente de esto es que, por lo general, cualquier huevo o larva que es depositado en, o parasita a un hospedador particular, tiene una probabilidad distinta de cero de ganar una competencia intra- o interespecífica (Sirot & Bernstein, 1997).

Los mecanismos mediante los cuales los parasitoides supernumerarios son eliminados pueden dividirse en dos categorías básicas: supresión fisiológica y ataque físico (Fisher, 1961; Lawrence, 1988; Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1996; Lo Verde et al., 2008, Cusumano et al., 2012a). Lo que se ha descrito como supresión fisiológica es a menudo poco comprendido y se han

sugerido múltiples mecanismos que incluyen secreción tóxica luego de la eclosión, inducción de anoxia y privación nutricional por parte de los competidores más avanzados en el desarrollo larval, y como resultado de toxinas y virus inyectados por la hembra durante la oviposición (Mackauer, 1990; Vinson & Hegazi, 1998; Cusumano et al., 2012a). En su mayoría se habla de algún tipo de supresión fisiológica en endoparásitoides. En cuanto al ataque físico, se ha observado que el primer estadio larval de parasitoides solitarios, principalmente himenópteros y unos pocos dípteros, está equipado con mandíbulas oponibles relativamente grandes y cápsulas cefálicas rígidas que forman una base firme para anclaje muscular. Estas estructuras son utilizadas en el ataque de individuos de otras especies o coespecíficos de estadios larvales más avanzados donde usualmente las mandíbulas se pierden (Vinson & Hegazi, 1998; Alim & Taek Lim, 2011). El caso inverso también ha sido estudiado, donde los primeros estadios larvales poseen mandíbulas y tentorios menos desarrollados y el último estadio larval posee estas estructuras más desarrolladas, lo que los hace mejores competidores para un ataque físico (Tena et al., 2011).

Cuál de los competidores saldrá victorioso y tomará control del hospedador dependerá de múltiples factores, en particular si se trata de competidores coespecíficos o heteroespecíficos (Vinson & Hegazi, 1998). En el caso que la competencia sea interespecífica, algunos estudios han demostrado que puede existir una competencia asimétrica, es decir, que una especie es intrínsecamente superior con respecto a otra (Weber et al., 1996; Cusumano et al., 2011, 2012b). Sin embargo, el resultado de la competencia larval entre especies de parasitoides suele verse afectado por las diferencias en las tasas de desarrollo, el número de huevos, el estado de desarrollo del hospedador, el orden en el cual las oviposiciones ocurren y el intervalo temporal entre la primera y la segunda oviposición (Tillman & Powell, 1992; De Moraes et al., 1999; De Moraes & Mescher, 2005; Harvey et al., 2013). La ventaja temporal no siempre se aplica en casos donde las especies competidoras muestran grandes diferencias en el desarrollo o mecanismos utilizados para eliminar larvas supernumerarias (Chow & Mackauer, 1984; Mackauer, 1990; Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1996). No obstante, muchos estudios han demostrado que tanto el orden en que ocurren las oviposiciones o parasitismo, así como el intervalo entre oviposiciones son procesos clave en la competencia intrínseca interespecífica (Weber et al., 1996; Agboka et al., 2002; Irvin et al., 2006; Alim & Taek Lim, 2011). Por regla general, ser la primera especie o individuo que explota al hospedador es usualmente provechoso ya que la larva puede comenzar a ingerir recursos antes que sus competidores y de esta manera podría prevenir que otros huevos o larvas se desarrollen sobre el mismo hospedador. En este contexto, se ha sugerido que el tiempo entre oviposiciones parece ser el mayor determinante del resultado de la competencia entre coespecíficos y entre especies con similares patrones de desarrollo y mecanismos competitivos. En estos casos, la primera larva es la

que tendría ventaja sobre la que parasita más tardíamente ya que puede eliminar huevos o larvas a través de competición por recursos limitantes (Tillman & Powell, 1992; Schmid-Hempel & Schmid-Hempel, 1996; De Moraes et al., 1999; De Moraes & Mescher 2005; Alim & Taek Lim, 2011; Cusumano et al., 2012b). Sin embargo, en algunos casos se ha visto que existe un período, justo después que el hospedador es parasitado por primera vez, en el que el segundo o posterior huevo tiene una probabilidad positiva de ganar la competencia (Visser et al., 1992; Gates, 1993; Field et al., 1997; van Baalen & Hemerik, 2008). Por supuesto que una larva mucho más longeva puede consumir al hospedador antes de que su competidor nazca, pero existen formas más sutiles de competencia por el recurso.

En el caso de *M. ruficauda*, alrededor de la mitad de los hospedadores pertenecientes a la especie *C. signaticollis* que se hallan parasitados a campo se encuentran superparasitados (Castelo, 2003) (Figura 6.1). Si bien se han registrado un caso extremo de hasta 106 larvas (Castelo, 2003) sobre un mismo gusano blanco, se trata en su mayoría de hospedadores que llevan dos o tres larvas (Crespo & Castelo, 2009). Este hecho se ha detectado durante toda la temporada de muestreo de hospedadores, lo que estaría sugiriendo que la definición de la competencia intrínseca no se daría a comienzos o mediados del superparasitismo, si no que en una etapa más avanzada de este proceso o del desarrollo del hospedador, lo que aun no se ha confirmado. El superparasitismo en esta especie podría deberse a una falta de discriminación por parte del parasitoide en los casos donde las larvas son las que buscan activamente al hospedador, como se ha sugerido en el trabajo de Feener y Brown (1997). Sin embargo, se ha demostrado bajo condiciones de laboratorio, que las larvas de este parasitoide son capaces de discriminar mediante claves químicas si un hospedador se halla previamente parasitado, por lo que el superparasitismo no sería producto de una falla o una falta de discriminación (Crespo & Castelo, 2009; Crespo et al., 2015).

En este contexto, es interesante estudiar si el superparasitismo en esta especie puede resultar adaptativo, y si los tiempos relativos de parasitismo regulan de alguna manera el resultado de la competencia, lo que se puede evidenciar mediante la observación del desarrollo exitoso de las larvas que superparasitaron a un hospedador.

En el presente capítulo se estudió la influencia del tiempo relativo en que se produce el parasitismo sobre el resultado de la competencia intraespecífica de las larvas de segundo estadio del parasitoide *M. ruficauda*. Asimismo, se considera que el momento de definición de la competencia intrínseca entre las larvas de *M. ruficauda* ocurre en un momento particular del desarrollo del hospedador. Por

último, se describen y discuten algunos aspectos de la competencia con coespecíficos, como el tipo de contienda que podría estar ocurriendo.



Figura 6.1. Larva de *C. signaticollis* superparasitada por una elevada cantidad de larvas de *M. ruficauda*.
Foto: MK Castelo.

Dados los antecedentes en el tema y en este modelo en particular, se considera que la probabilidad de ganar la competencia intraespecífica está influenciada por el orden en que las larvas de *M. ruficauda* colonizan a su hospedador, así como por el tiempo transcurrido entre la colonización de ambas larvas parasitoides. Se espera que las larvas que hayan parasitado inicialmente al hospedador sean mejores competidoras que las que hayan parasitado en segundo lugar, ya que contarían con la ventaja de haber obtenido recursos alimenticios y así un mejor estado fisiológico previamente. Además, al extenderse el intervalo temporal entre ambas larvas, se espera que esta tendencia se vea acentuada. Por otro lado, se espera que el momento de definición de la competencia intraespecífica se produzca principalmente durante la transición del hospedador del estado larval al estado pupal (“prepupa”).

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

En este capítulo de la Tesis se emplearon LII del parasitoide y larvas III del hospedador. Los detalles de su recolección y mantenimiento se encuentran en la sección “Recolección y mantenimiento de los insectos” del Capítulo 2 “Materiales y Métodos Generales”.

Marcado de larvas de *M. ruficauda* mediante el corte de setas caudales y su influencia en la supervivencia

Debido a la necesidad de individualizar a las distintas larvas de *M. ruficauda* que se encuentran superparasitando a un mismo hospedador en este experimento (ver más abajo sección “*Orden de llegada de las larvas al hospedador*”), se desarrolló una técnica de marcado específica para las larvas de *M. ruficauda*, que consistió en la realización del corte diferencial de los dos últimos pares de setas del segmento caudal de los individuos. En primer lugar, para evaluar la influencia del corte de setas caudales sobre la supervivencia del parasitoide se utilizaron 100 larvas de estadio II de *M. ruficauda*, de las cuales, la mitad fueron sometidas al tratamiento y el resto actuaron como control. Esta evaluación se realizó para descartar efectos del marcado sobre el resultado del experimento. Para realizar el corte, las larvas parasitoides fueron colocadas en un portaobjetos que se encontraba sobre un gel refrigerante. De este modo se bajó la temperatura corporal de las larvas, inmovilizándolas casi completamente, lo que facilitó su manipulación. Se utilizó un bisturí para cortar dos de las cuatro setas latero-caudales del lado derecho o izquierdo de la larva (N=25 por cada lado). Posteriormente se las colocó en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml que contenían una porción de papel de filtro humedecido con agua mineral como sustrato. Las larvas fueron almacenadas en oscuridad a temperatura y humedad relativa controladas (24 - 26 °C y 45 - 70 %). A las 50 larvas control se las almacenó de igual manera. Al cabo de un mes se registró la supervivencia de las larvas como proporción de larvas vivas tanto en los individuos tratados como en los individuos control.

Orden de llegada de las larvas parasitoides al hospedador

En esta sección se estudió si el orden de llegada de las larvas al producirse el parasitismo sobre un mismo hospedador, y el tiempo transcurrido entre la llegada de dos parasitoides, es determinante al momento de definir cuál de ellos gana la competencia intraespecífica. Para ello se realizaron experimentos de parasitismo artificial secuencial sobre *C. signaticollis*. En frascos plásticos opacos de 30 ml se colocaron individualmente gusanos blancos, tierra negra de uso comercial y una porción de alimento. A cada uno de ellos se le agregó una primera larva parasitoide (1ra LII), marcada mediante el corte de las dos setas derechas, verificándose al cabo de 2 días si la larva se aferró al tegumento del gusano blanco, es decir si se produjo el parasitismo. Transcurrido un determinado intervalo temporal se agregó una segunda larva (2da LII), marcada mediante el corte de las dos setas izquierdas, y también se verificó si se produjo el aferramiento, en este caso el superparasitismo. Los intervalos temporales que se utilizaron como tratamientos fueron de 2, 7, 30

y 60 días (Figura 6.2; Tabla 6.1). Luego de corroborar que ambas larvas permanecían aferradas a su hospedador, se realizó un seguimiento semanal donde se registró la supervivencia de ambos parasitoides, se airearon los recipientes y se repuso el alimento del hospedador (Figura 6.3). Asimismo, se registró la ubicación de ambas larvas de *M. ruficauda* sobre el hospedador y cualquier cambio en esta variable, utilizando los cortes de setas diferenciales para la identificación de los individuos. Se consideró que la competencia intraespecífica se definía cuando una de las larvas era encontrada aferrada a su hospedador muerta o cuando durante tres semanas consecutivas no era encontrada sobre el hospedador. Además, se registró en que etapa de desarrollo del hospedador se definía la competencia (tercer estadio larval, propiamente dicho o tercer estadio larval en prepupa).

Determinación de la condición corporal del adulto de las larvas que ganaron la competencia

Por último, se realizó un seguimiento del desarrollo de la larva ganadora y se registraron el peso del adulto al momento de su emergencia, así como su supervivencia y varias medidas corporales. Estos datos fueron evaluados para detectar una posible influencia del orden de llegada de las larvas y del tiempo transcurrido entre que se produce el aferramiento de la primera y segunda larva sobre el *fitness*. Los resultados se muestran en el Capítulo 7 de esta Tesis.

Análisis estadístico

Para evaluar si existe diferencia de supervivencia entre larvas a las que se les practicó el corte de setas caudales y las intactas en el procedimiento de marcado, se analizó la proporción de larvas sobrevivientes en cada tratamiento mediante una prueba de diferencia de dos proporciones (Zar, 2010).

En los experimentos de parasitismo secuencial, la proporción de larvas que ganó la competencia intraespecífica correspondientes al primer o al segundo orden de llegada al hospedador fue comparada con una distribución teórica de 50:50 usando una Prueba de bondad de ajuste de Chi-cuadrado (Zar, 2010). Esta misma prueba fue utilizada para evaluar la diferencia entre las proporciones de contiendas que se resolvieron durante el CS III y el CS prepupa.

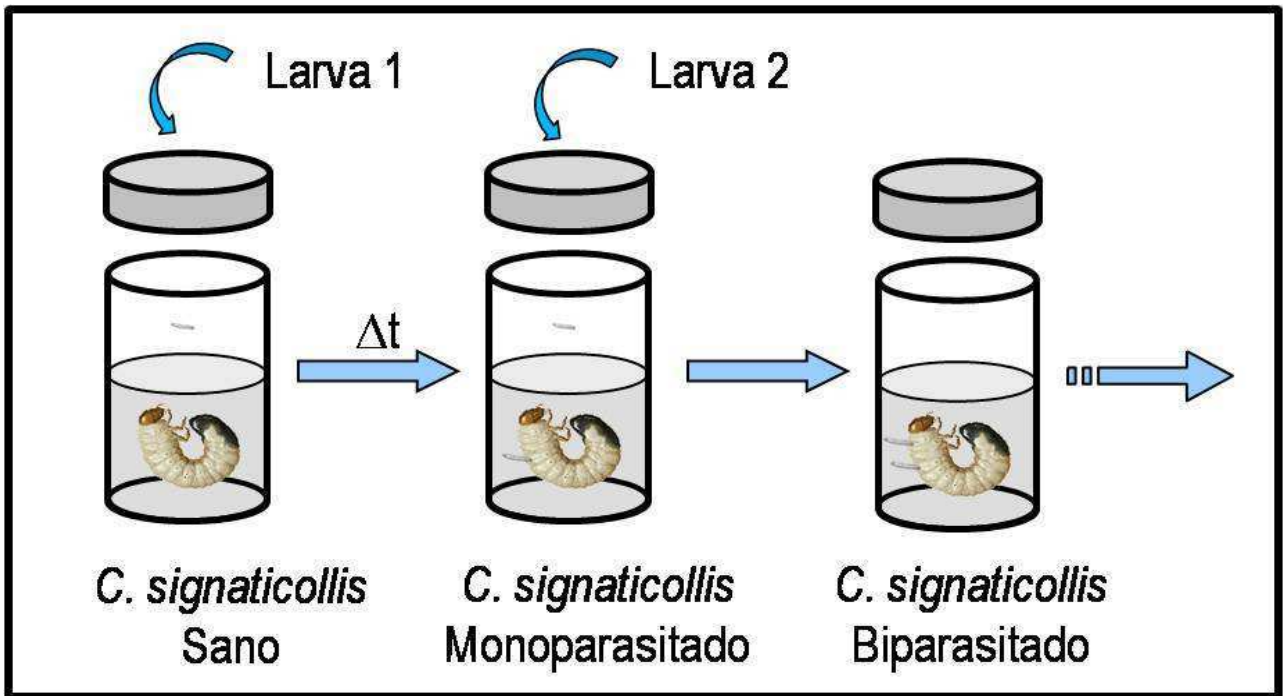


Figura 6.2. Diseño experimental utilizado para evaluar la influencia del orden en que se produce el parasitismo y el tiempo relativo de ocurrencia entre dos larvas de *M. ruficauda* que compiten intraespecífica en función del orden de llegada y del intervalo temporal transcurrido entre el parasitismo de uno y otro parasitoide.

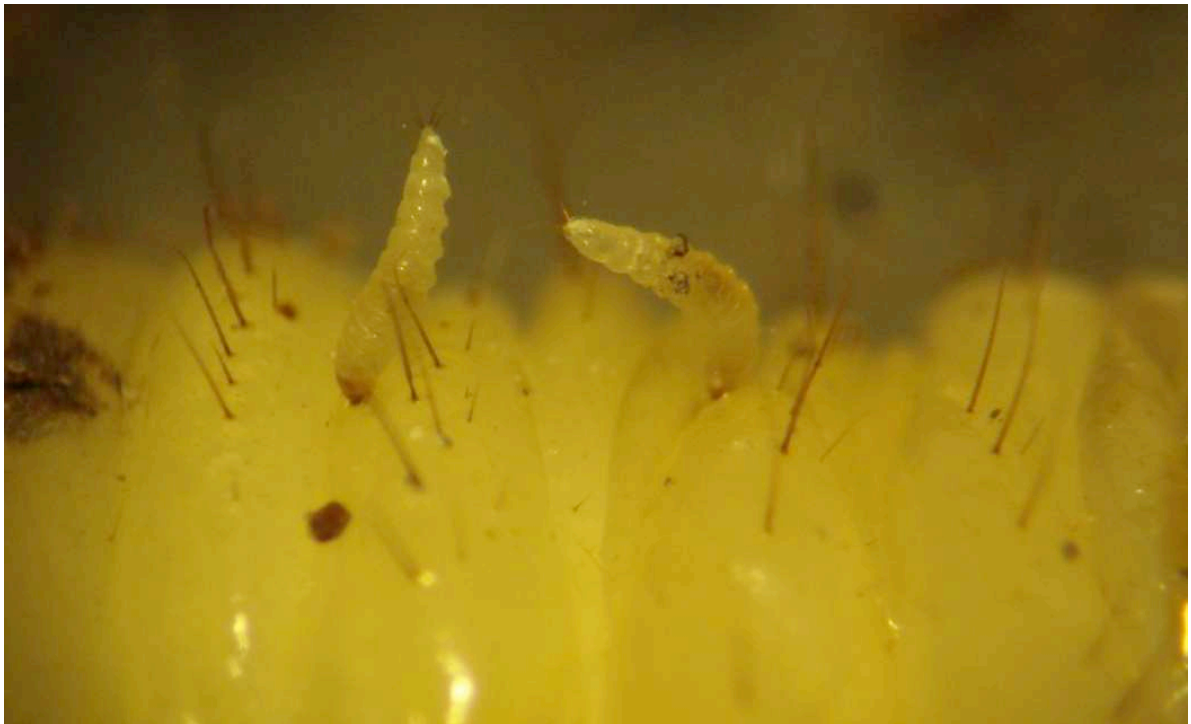


Figura 6.3. Dos larvas del segundo estadio de *M. ruficauda* parasitando a *C. signaticollis*. Fotografía: ME Barrantes.

RESULTADOS

En el procedimiento de marcado de larvas, se observó al cabo de un mes que la proporción de supervivencia de las LII fue de 0,92 y 0,91 para el tratamiento con corte de setas caudales y el control, respectivamente. Al evaluar estos valores estadísticamente podemos afirmar que los cortes de las setas caudales no tuvieron influencia en la supervivencia de las larvas II del parasitoide *M. ruficauda* respecto al control ($n_{\text{corte}} = 46$, $n_{\text{control}} = 45$; $Z = 0,3494$; $p = 0,7263$). Por lo tanto, se considera que esta técnica es adecuada para marcar larvas durante los experimentos.

Al evaluar la influencia del orden de llegada al hospedador, se observó que las proporciones de LII que ganaron la competencia habiendo parasitado en primer y segundo lugar fueron de 0,51 y 0,49, respectivamente. Estos valores no difieren estadísticamente por lo que el orden de llegada al hospedador de las LII no determinaría cual de las larvas gana la competencia ($\chi^2 = 0,095$; $gl = 1$, $p = 0,757$; Figura 6.4).

Por otro lado, se observó que el incremento en el tiempo transcurrido entre la llegada de 1ra LII y 2da LII no tiene influencia en el resultado de la competencia intraespecífica. En ninguno de los tratamientos se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de primeras y segundas larvas que ganaron la competencia ($\chi^2_{2 \text{ días}} = 2,000$, $gl = 1$, $p = 0,157$; $\chi^2_{7 \text{ días}} = 1,247$, $gl = 1$, $p = 0,264$; $\chi^2_{30 \text{ días}} = 0,000$, $gl = 1$, $p = 1,000$; $\chi^2_{60 \text{ días}} = 0,111$, $gl = 1$, $p = 0,738$; Figura 6.5, Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Experimentos de parasitismo secuencial artificial realizados para evaluar la influencia del tiempo relativo de parasitismo sobre el resultado de la competencia entre dos larvas del parasitoide *M. ruficauda*. Abreviaturas: N, número de réplicas. Entre paréntesis se informa el número de individuos que ganaron la competencia en función del orden de colonización del hospedador (izquierda: primera larva, derecha: segunda larva).

Tratamiento (días)	N	χ^2	gl	p
2	32 (12 - 20)	2,000	1	0,157
7	97 (54 - 43)	1,247	1	0,264
30	30 (15 - 15)	0,000	1	1,000
60	9 (5 - 4)	0,111	1	0,738

Luego, el momento de definición de la competencia intraespecífica se produjo principalmente durante el estado de prepupa del hospedador (0,76) y en menor medida durante el tercer estadio

larval propiamente dicho (0,24) ($\chi^2 = 11,274$; gl = 1, p = 0,0007; Figura 6.6). Estos resultados fueron calculados a partir de 164 réplicas ya que en 4 de ellas no se registró el momento de ocurrencia de la definición de la competencia. En los casos en los que la resolución de la competencia ocurrió durante la prepupación, el 50% de las larvas que perdieron la competencia fueron halladas muertas y aferradas al hospedador, mientras que el otro 50% desapareció y no fue detectado durante 3 semanas consecutivas. Además en esta etapa de resolución se contabilizó en un total de 99 réplicas (de 125) diversos movimientos de las LII: 46,4% una de las larvas cambió su posición sobre el hospedador, 16,8% ambas larvas cambiaron de posición. También se registró que en el 12,8% de los casos se vió a una de las larvas suelta, sobre el hospedador y en 3,2% ambas larvas estaban sueltas. Para el caso de las competencias que fueron resueltas durante el estadio III del hospedador, el 60% de las larvas fueron halladas muertas y aferradas al hospedador y el restante 40% no fue detectado en 3 revisiones consecutivas. En unos pocos casos (n = 3) se registró el ataque físico por parte de una larva II a una larva III (Figura 6.7) En un único caso se observaron en simultáneo un estadio III y IV sobre un mismo hospedador.

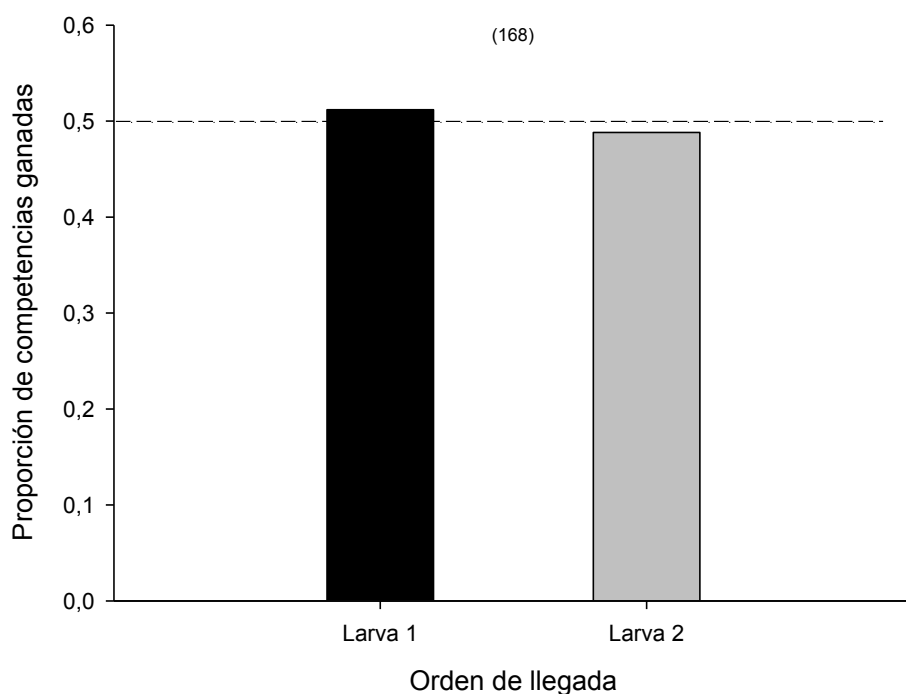


Figura 6.4. Proporción de larvas de *M. ruficauda* que ganaron la competencia intraespecífica en función del orden de llegada secuencial de los parasitoides al hospedador. Entre paréntesis la cantidad de réplicas totales (χ^2 , p > 0,05).

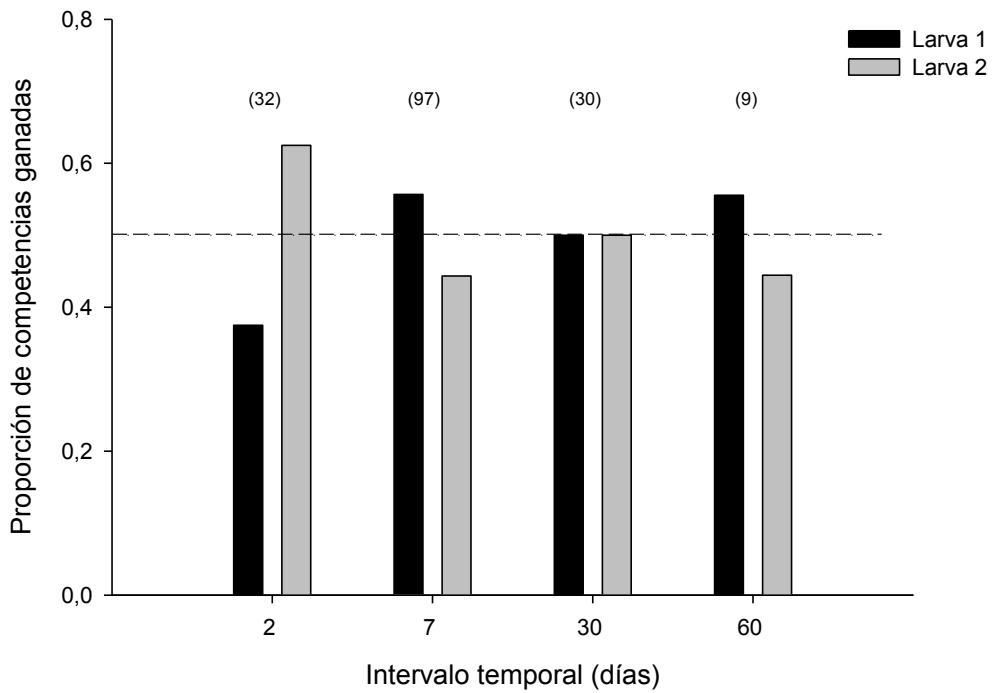


Figura 6.5. Proporción de larvas de *M. ruficauda* que ganaron la competencia intraespecífica en función del orden de llegada y del intervalo temporal transcurrido entre el parasitismo de uno y otro parasitoide. Los números entre paréntesis muestran la cantidad de réplicas para cada tratamiento (χ^2 , $p > 0,05$).

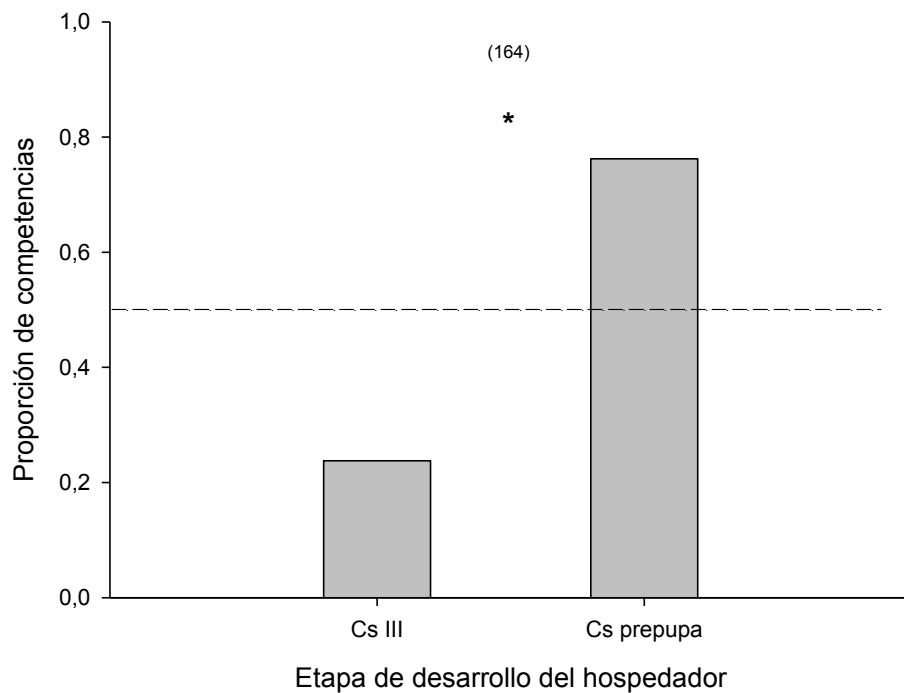


Figura 6.6. Etapa de desarrollo del hospedador *C. signaticollis* al momento de definición de la competencia intraespecífica entre dos larvas de *M. ruficauda*. El número entre paréntesis corresponde a la cantidad de réplicas realizadas. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $p < 0,05$).

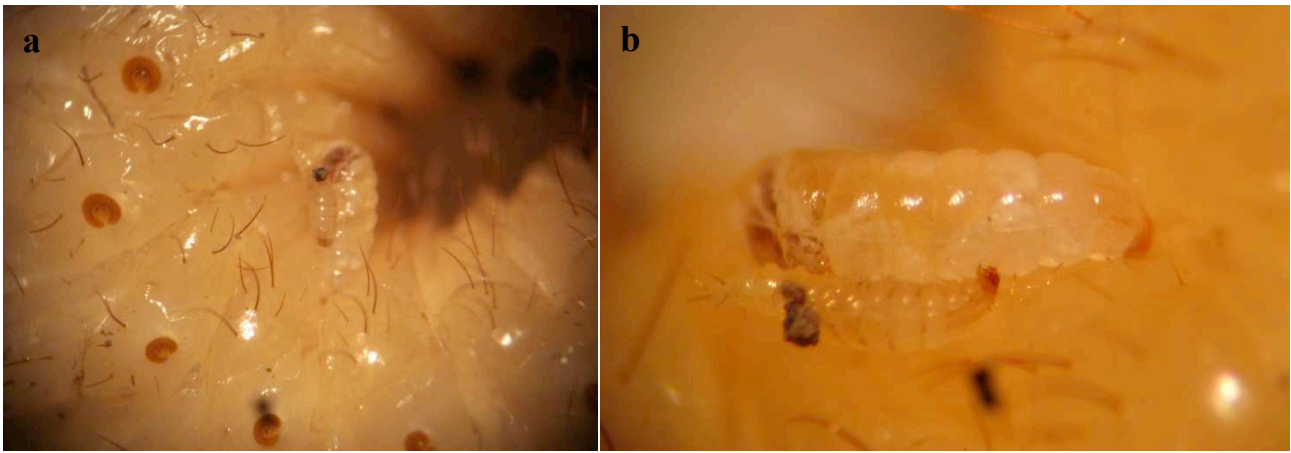


Figura 6.7. a y b. Dos larvas de *M. ruficauda* sobre su hospedador, *C. signaticollis*. La larva de mayor tamaño, recientemente mudada al tercer estadio larval, se encuentra aferrada al hospedador. La otra larva, aún en el segundo estadio larval, se encuentra aferrada a la primera. Fotografías: ME Barrantes.

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió la influencia del tiempo relativo de parasitismo sobre el resultado de la competencia que se da entre dos larvas del parasitoide *M. ruficauda* que se hallan en un mismo hospedador. Los resultados obtenidos muestran que la probabilidad de las larvas de ganar la competencia no sería influenciada por el orden de llegada de las larvas al hospedador ni por el tiempo transcurrido entre el primer evento de parasitismo y el siguiente. Otro rasgo que se determinó fue que la competencia entre las larvas se resuelve, principalmente, en la prepupa de *C. signaticollis*, es decir, durante la transición entre el estado larval y el estado pupal de su hospedador.

Si bien inicialmente el superparasitismo fue tomado en Ecología como una falla por parte del parasitoide o una falta en la capacidad de discriminación de la calidad del hospedador, numerosos trabajos han demostrado que puede resultar adaptativo bajo diversas circunstancias (Weisser & Houston, 1993; Yamada & Miyamoto, 1998; Gu et al., 2003). En particular, se ha sugerido como beneficioso en escenarios donde los hospedadores sanos son escasos o en el caso de las hembras adultas están limitadas de tiempo (*time limited*) (Sirot & Bernstein, 1997; Jarvis, 2005; Benelli et al., 2013).

Ciertamente, podemos afirmar que el superparasitismo resulta ventajoso para esta especie dado que, independientemente cual sea el tiempo relativo de parasitismo, la larva que se aferra posteriormente al hospedador posee una probabilidad finita de ganar la competencia intraespecífica y desarrollarse exitosamente hasta el estado adulto. Puntualmente, la probabilidad de salir exitoso en esta

contienda habiendo superparasitado es prácticamente la misma que al haber parasitado un hospedador sano (49% y 51%, respectivamente). Aunque esta probabilidad de supervivencia fuera pequeña, el superparasitismo sería adaptativo en un contexto de búsqueda de hospedador, especialmente cuando los hospedadores sanos son escasos dentro del parche (van Alphen & Visser, 1990; Jervis, 2005; Silva-Torres et al., 2009). En este sentido, teniendo en cuenta que un desove promedio de *M. ruficauda* cuenta con 328 huevos (Castelo, 2003; Castelo & Corley, 2004) y los parches de hospedadores no suelen ser tan numerosos, la escasez de hospedadores sanos dentro del parche es un escenario plausible. Además, niveles moderados de superparasitismo podrían, no sólo resultar en un detrimento a nivel específico, sino que incluso podrían resultar beneficiosos al favorecer la supervivencia de las larvas frente a las defensas del hospedador o reduciendo la severidad de la respuesta inmune del hospedador, como se ha sugerido en otros modelos (van Alphen & Visser, 1990; Mackauer & Chau, 2001; Gu et al., 2003; González et al., 2007; Khafagi & Hegazi, 2008; Böckmann et al., 2012). De hecho, la ocurrencia de superparasitismo moderado (entre 2 y 6 larvas) parece ser una estrategia condicional, la cual incrementa el éxito reproductivo en especies como el braconido *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead al parasitar a *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) en laboratorio (González et al., 2007). No sólo experimentan la menor mortalidad, sino que además poseen una mejor habilidad de vuelo como adultos y la proporción de sexos exhibe un sesgo hacia las hembras en comparación con aquellos individuos que emergen de pupas que fueron monoparasitadas. En el caso de *Psytalia concolor* Szépligeti, se estimó que las condiciones óptimas para obtener la cantidad máxima de descendencia era de dos huevos del braconido por cada larva del díptero *Ceratitis capitata* Wiedemann (Canale, 1998). Böckmann y colaboradores (2012) sugieren un fenómeno similar en el ectoparasitoide *Spalangia cameroni* Perkins (Hymenoptera: Pteromalidae), donde la producción de la descendencia es mayor cuando aumentan los niveles de auto superparasitismo, es decir, de superparasitismo por parasitoides emparentados (hermanos). *Mallophora ruficauda* podría tener una estrategia similar, dada la frecuencia de superparasitismo moderado que se observa naturalmente, pero esto se discutirá posteriormente en el Capítulo 7 sobre el *fitness* de los adultos.

Contrariamente a lo esperado para la especie *M. ruficauda*, el orden de llegada al hospedador y el tiempo transcurrido entre ataques de dos larvas en los eventos de superparasitismo no determina que larva gana la competencia, hechos que podrían resultar ventajosos para este parasitoide. La temporada reproductiva de este parasitoide se emplaza desde diciembre hasta mediados o finales de marzo, por lo que durante este período habrá una disponibilidad permanente de larvas, pero no es hasta mediados de febrero que aparecerán los primeros estadios parasitables del hospedador, por lo que la ventana temporal de parasitismo es bastante acotada. Asimismo, dada la supervivencia de las

larvas parasitoides en condiciones de laboratorio, existe una alta probabilidad de que incluso las larvas de principios de temporada lleguen con vida hasta entonces, por lo que la cantidad de larvas al momento de la aparición de los primeros hospedadores será considerablemente elevada y la ocurrencia de superparasitismo es común. En este escenario, para una larva carece de importancia el momento de la temporada que se produce el nacimiento, y cobra interés el contar con una supervivencia alta del estadio con búsqueda activa. Este hecho hace que todas las larvas tengan la potencialidad de encontrar un hospedador. Además, la larga duración que tiene el estadio larval del hospedador susceptible al parasitismo (aproximadamente 6 meses; Alvarado, 1980), hace que el hospedador sea colonizable por un período grande de tiempo por las larvas nacidas cualquier momento de la temporada. Entonces, el hecho que cualquier larva, no importando su orden de llegada al hospedador, pueda ganar la competencia, sugiere que este rasgo podría ser adaptativo para el sistema.

En cuanto al momento de resolución de la competencia, se evidencia una tendencia hacia el momento en que el hospedador comienza su transición al estado de pupa (76%) y, en menor medida durante el estadio larval III de *C. signaticollis* (24%). Es importante destacar que cuando la competencia se definió en el hospedador de tercer estadio propiamente dicho, la larva que perdía la competencia era generalmente hallada muerta en el mismo lugar al que se había aferrado inicialmente (60%) o no se hallaba en el cuerpo del hospedador (40%). La larva que continuaba con su desarrollo también era hallada en el lugar al que se había aferrado originalmente. A diferencia de esto, cuando la competencia se definió durante el estado de prepupa, generalmente ambas larvas habían cambiado su posición sobre el hospedador, probablemente en búsqueda de un mejor lugar para absorber nutrientes. En el primer caso, la posición de las larvas sugiere que la pérdida de la competencia es, en realidad, una falla fisiológica de la larva que pierde la competencia por concretar el ataque al hospedador. Es decir, que podría deberse a la tasa natural de fracaso para concretar el parasitismo. Esto podría deberse a diversas razones, como por ejemplo, un estado fisiológico de la larva empobrecido, que no le permitiría sobrellevar las defensas inmunológicas del hospedador.

El hecho de que la resolución de la competencia ocurra mayoritariamente durante la prepupa y que el cambio de las posiciones de las larvas sea frecuente va en línea con el hecho de que es probable que *M. ruficauda* sea un “compensador fisiológico”, como fue definido por Lawrence (1986). En este contexto, esto significa que este parasitoide se sincronizaría con el desarrollo de su hospedador, activando la muda al siguiente estadio larval en presencia de determinadas señales o cambios en la hemolinfa de su hospedador y por ende definiendo en este momento la competencia. Se ha

determinado que las hormonas de los hospedadores pueden penetrar y afectar a la programación del desarrollo de los parasitoides (Beckage, 1991). La respuesta hormonal de los parasitoides se ha confirmado en experimentos que demuestran su dependencia de hormonas originadas en el hospedador, incluyendo las hormonas protoracicotrópica o ecdisona para la regulación de la muda, la emergencia, o la terminación diapausa (ver revisión en Lawrence, 1986; Beckage, 1991 y sus referencias). Estas señales químicas pueden ejercer una acción directa sobre los tejidos blanco del parásito, o, alternativamente, estimular sus glándulas endócrinas para producir las hormonas requeridas para el desarrollo normal (Beckage, 1991). Este tipo de interacciones se han evidenciado no sólo en modelos hospedador-parasitoide, sino también hospedador-parásito, ya sea en hospedadores invertebrados o vertebrados (Beckage, 1991; Escobedo et al., 2012). Evidencias experimentales sugieren que varios parásitos pueden explotar el microambiente hormonal dentro del hospedador para favorecer su asentamiento, crecimiento y reproducción. Incluso, han desarrollado estructuras similares a los receptores de esteroides y hormonas proteicas expresadas en los vertebrados superiores que pueden unirse a los metabolitos hormonales sintetizados por el hospedador (Beckage, 1991; Escobedo et al., 2005). Respecto a este parasitoide como compensador fisiológico, estudios ulteriores son necesarios para confirmar esta hipótesis. Entre ellos, se podrían manipular experimentalmente los niveles hormonales en la hemolinfa del hospedador para ver que respuesta tienen las larvas frente a este cambio. En otros insectos y parasitoides se han realizado este tipo de manipulaciones confirmando esta dinámica de desarrollo (Lawrence, 1986; Beckage, 1991 y sus referencias).

Por otro lado, que la competencia se defina en la etapa de prepupa de *C. signaticollis* podría resultar ventajoso para la larva que no logra desarrollarse exitosamente y pasar al siguiente estadio, debido a que durante el proceso transcurre suficiente tiempo como para que la larva pueda tomar la decisión de cambiar de hospedador. De alguna manera, el estar superparasitando le asegura al menos, lo mínimo y necesario para su supervivencia y podría permitirle encontrar un hospedador sano más avanzada la temporada. En este sentido, vale la pena mencionar que en varias ocasiones se observó al momento de definición de la competencia durante la etapa de prepupa del hospedador que una de las larvas se encontraba deambulando sobre el hospedador, probablemente en busca de una mejor posición donde aferrarse para poder consumirlo. En esta instancia y de fallar en la búsqueda por una mejor posición, la presencia de otro hospedador en el ambiente podría significar la supervivencia y desarrollo del parasitoide. Sin embargo, estudios previos sugieren que las larvas de *M. ruficauda* que superparasitan a un hospedador y tienen a disposición la presencia contigua y simultánea de un hospedador sano, no cambian de hospedador (M. Castelo, datos no publicados). Se ha observado que las larvas sólo cambian de hospedador y aceptan a otro cuando el hospedador al que parasitan

enferma a causa de entomopatógenos o muere (M. Castelo, datos no publicados). El hecho de no desprenderse aun teniendo otro hospedador sano a disposición podría estar reflejando la alta probabilidad de ganar la competencia que tiene la larva que superparasita. El hecho de desprenderse y cambiar a un hospedador cuando al que estaba atacando muere o enferma muestra que tiene la capacidad de hacerlo en situaciones límite. Sin embargo se desconoce que sucede cuando la larva que no logra avanzar en el desarrollo se desprende y no es encontrada sobre el hospedador como ocurrió en varios casos. En la naturaleza, una larva en esta condición podría tener la opción de encontrar otro hospedador, migrar hacia él y continuar con desarrollo. En un futuro, esto podría ponerse a prueba experimentalmente ofreciendo hospedadores sanos, en el momento de resolución de la competencia, a larvas que se hallen superparasitando a un hospedador.

Por otra parte, la resolución de la competencia durante la transición al estado pupal del hospedador podría estar vinculada con lo que se discutió previamente sobre el superparasitismo como una ventaja adaptativa. Se puede considerar como un comportamiento altruista donde varias larvas sobre un mismo hospedador sobrellevan o enfrentan la respuesta inmune de éste, de manera que no resulte tan intensa para una única larva y permita superar esta barrera y asegurar la supervivencia de al menos una de ellas al final del proceso de parasitismo.

La resolución de la competencia por el hospedador entre un número elevado de larvas es un proceso poco conocido para los ectoparasitoides. Si bien no era uno de los objetivos de este capítulo dilucidar cuál era el mecanismo mediante el cual las larvas supernumerarias eran eliminadas por sus coespecíficos, es importante destacar que en unas pocas ocasiones se registró ataque físico entre las larvas. En dichas ocasiones una de las larvas se hallaba aferrada al tegumento del hospedador y la otra, a su vez, aferrada a la primera. El hecho de haberlo detectado sólo unas pocas veces puede estar relacionado con que no sea un mecanismo de eliminación de competidores utilizado frecuentemente. O contrariamente, este podría ser un mecanismo empleado por las larvas pero debido a la periodicidad con la que se revisaban los ensayos este proceso haya sido difícil de detectar. Estos mecanismos han sido descritos principalmente para endoparasitoides, donde el medio circundante del parasitoide es el cuerpo interno del hospedador por lo que cualquier sustancia o proceso que ocurra dentro de este afectará mucho más al parasitoide. En cuanto a las capacidades morfológicas para realizar ataques físicos, hay que considerar que ambas larvas de *M. ruficauda* pertenecen al estadio II durante toda la etapa de competencia y por lo tanto presentan el mismo desarrollo de piezas bucales. Esto sugiere que ambas cuentan con las mismas armas durante las potenciales contiendas físicas, con lo cual estarían en igualdad de condiciones durante las luchas y por lo tanto este no sería un factor a tener en cuenta al dilucidar quién gana la competencia. En otros

parasitoides, una vez producido el parasitismo se produce el desarrollo y muda a los siguientes estadios larvales de manera rápida, con coexistencia de larvas de diferentes estadios sobre el mismo hospedador (Tena et al., 2011). En estos casos es válido considerar si las larvas de los diferentes estadios poseen mandíbulas y maxilas con distinta morfología para entender cuál es la larva más propensa a ganar la competencia. Sin embargo, la estructura de las piezas bucales de la larva II de *M. ruficauda* son suficientemente fuertes como para perforar el integumento del hospedador (Crespo et al., 2011; Groba, 2014), con lo cual el ataque a sus coespecíficos y su consecuente muerte son hechos firmes para considerar que el ataque físico es un mecanismo de defensa totalmente plausible (M.E. Barrantes, observación personal). Por otro lado, se ha observado ocasionalmente que una larva de tercer estadio puede coexistir con larvas de segundo estadio, las cuales mueren posteriormente (M. Castelo, observación personal). En estos casos puede considerarse que la larva ganó la competencia por algún mecanismo que no involucra ataques físicos, y determinar cuál es ese mecanismo requiere ulterior investigación. En algunos parasitoides, cuando hay ataque físico entre dos larvas que compiten suele ocurrir que un estadio en particular porta las estructuras (mandíbulas) más fuertes necesarias para la contienda, que en general suelen ser los más inmaduros, ya que cuando mudan las pierden, por lo que estos tienen ventaja sobre los estadios larvales más avanzados en el desarrollo (Vinson & Hegazi, 1998; Alim & Taek Lim, 2011; Harvey et al., 2012). Entonces, en estos casos el hecho de “llegar después” sería ventajoso. En unos pocos casos se ha observado lo contrario, es decir, que el/los últimos estadios larvales son los que poseen las mandíbulas más desarrolladas, por lo que “llegar antes” es lo ventajoso respecto a la competencia física. Ahora bien, todos estos ejemplos se dan en parasitoides en los que una vez que se produce el parasitismo, el desarrollo y pasaje a los siguientes estadios larvales es inmediato o rápido (a veces en solo cuestión de días o 1 semana, ya están en estado pupa). En el caso de *M. ruficauda* esto no ocurre, debido a que la etapa de parasitismo dura aproximadamente 6 meses. Las larvas que están parasitando al mismo hospedador son del segundo estadio, y así permanecerán durante todo este período, entonces, en este sentido, no existiría esta ventaja temporal respecto al ataque físico, reafirmando que es un mecanismo distinto el que hace definir cuál larva gana la competencia.

La resolución de la competencia entre dos larvas parasitoides puede ocurrir tanto por combates cuerpo a cuerpo donde una muere a causa del daño físico directo como por supresión fisiológica de una sobre la otra (Godfray, 1994). Por consiguiente, otra opción a considerar sobre cómo se resuelve la competencia está vinculada con un tipo particular de supresión fisiológica, denominada privación nutricional. En particular, la privación nutricional tiene que ver con los requerimientos nutricionales específicos de cada parasitoide. Si estos nutrientes están en bajas

concentraciones, entonces el primer parasitoide que utilice la mayoría del recurso en cuestión tendría el efecto de suprimir el desarrollo de su competidor (Nettles, 1990 en Vinson & Hegazi, 1998). Este tipo de supresión fisiológica sería uno de los métodos más efectivos para eliminar competidores pertenecientes a la misma especie, debido a que estos individuos requieren los mismos nutrientes específicos (Nettles, 1990). Existe la opción de que tanto la estrategia de ataque físico como la de supresión fisiológica sean válidas y de alguna manera, complementarias. Es decir, podría existir inicialmente un mecanismo de supresión fisiológica y la larva menos competente en esta instancia utilice un ataque físico como segunda opción y viceversa. Sin embargo, para dilucidar estos interrogantes es necesario plantear nuevos experimentos de observación diaria de las larvas y continuar investigando.

Debe considerarse además que, llegado el momento de definir la competencia, si bien puede haber diferencias en el tiempo de permanencia sobre el hospedador, ambas larvas han pasado un período considerable sobre el mismo, por lo que es probable que estén en igualdad de condiciones fisiológicas como competidoras. Es probable que la ventaja que puedan tener las larvas esté entonces en activarse lo más rápido posible ante las primeras señales o cambios en la hemolinfa del hospedador y avanzar en el desarrollo. Otro aspecto a tener en cuenta para la resolución de la competencia es la ubicación que tiene cada una de las larvas sobre el hospedador. Del total de competencias que se definieron durante la prepupa del hospedador, en un 46,4% ambas larvas cambiaron de posición y en un 16,8% sólo una de ellas lo hizo. Estos resultados sugieren que sería vital para que el parasitoide pueda completar el desarrollo contar con una ubicación que le permita tener un fácil acceso al alimento una vez que el hospedador ha comenzado con los cambios físicos y fisiológicos típicos de esta etapa de transición. Esto se debe no sólo a tener buen acceso a los nutrientes del hospedador sino también a la carga hormonal del mismo, la que probablemente sea la que regule endocrinamente al parasitoide, como se ha sugerido en los párrafos anteriores.

Los resultados muestran que bajo superparasitismo, la primera y segunda larva que llegan al hospedador tendrían un 50% de probabilidad de ganar la competencia, con lo cual sería lo mismo llegar primero que última. Sin embargo, podemos especular con que llegar primero tendría otras ventajas adicionales a las antes mencionadas. Llegar primero a un hospedador le asegura a la larva un 100% de probabilidad de desarrollarse si no apareciera una segunda larva, al aparecer ésta última, esa probabilidad se ve reducida a la mitad. Sin embargo, como existe un comportamiento de discriminación del estado de parasitismo del hospedador, la probabilidad de que se adhiera otra larva a un hospedador monoparasitado se ve disminuida. En casos de baja densidad de larvas en el suelo, donde existen hospedadores libres, una larva podría elegir entre superparasitar o

monoparasitar, es decir, entre un 50% o un 100% de probabilidad de desarrollarse a adulto. En el laboratorio se vió que la preferencia es monoparasitar, lo cual se traduciría a maximizar las posibilidades de desarrollarse (Castelo, 2003). Sin embargo, la alta densidad de larvas podría considerarse el escenario más común, debido a que la alta supervivencia hace que al final del verano, cuando los gusanos blancos de tercer estadio aparecen, se hayan acumulado gran cantidad de larvas en el ambiente. En estas condiciones, las larvas nacidas en la temporada estarán buscando simultáneamente hospedadores limitados, con la subsecuente incurrancia en el superparasitismo (Castelo et al., 2006).

En resumen, el superparatisismo es un hecho frecuente y documentado en esta especie y a lo largo de este capítulo hemos demostrado que aquellos parasitoides que aceptan un hospedador sub-óptimo, es decir, previamente parasitado, poseen la misma probabilidad de ganar la competencia intrínseca que un parasitoide que atacó al hospedador en primer lugar. Por lo tanto, la estrategia de superparasitismo es ventajosa en un escenario donde los hospedadores óptimos (sanos) sean limitados. Además, dado que la competencia intrínseca se define luego de un largo período de parasitismo, esto también podría implicar una ventaja, ya que le permitiría a la larva que superparasita sobrevivir más avanzada la temporada y encontrar una mejor opción a futuro. Debemos tener en cuenta, sin embargo, que el comportamiento de discriminación y evitación del parasitismo ha sido demostrado para las larvas de *M. ruficauda* (Crespo & Castelo, 2009; Crespo et al., 2015), lo que sugiere que la estrategia de esta especie sería maximizar la distribución de las larvas en el hábitat, de manera que las larvas se encuentren en baja densidad en el suelo, tengan más opciones de encontrar hospedadores o parches de hospedadores sanos, y así minimizar el superparasitismo. Esto puede lograrse a través de una mayor dispersión de los adultos entre parches o una mayor dispersión de las larvas. Este último hecho fue estudiado y la mayor dispersión de las larvas se logra mediante la elección de determinadas alturas de los sustratos por parte de la hembra adulta en la oviposición (Castelo et al., 2006). No obstante se ha observado que las hembras ponen los huevos agregados en los pastos (Castelo & Corley, 2004a), por lo que la estrategia no estaría respondiendo solamente a evitar el superparasitismo. Bajo este escenario la estrategia podría basarse en que varias larvas ataquen un mismo hospedador para poder sobrellevar la respuesta inmune y que al menos una de ellas llegue a adulta. De este modo, la disposición de desoves agregados en los sustratos podría significar una ventaja en el sistema, sin embargo, esto requiere de ulterior investigación.

CAPÍTULO 7

FITNESS DEL PARASITOIDE ADULTO: ¿Cómo influye la calidad del hospedador parasitado por las larvas?

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los modelos de optimalidad se basan en la suposición que los organismos optimizan determinadas características fisiológicas o comportamentales de manera tal de maximizar su *fitness* (Boivin, 2010). Cuando la teoría del forrajeo óptimo fue desarrollada (Stephens & Krebs, 1986), los parasitoides estuvieron entre los organismos predilectos para poner a prueba sus predicciones (van Baalen & Hemerik, 2008). Esto se basó en que las expresiones de comportamiento asociados con la localización y selección de los hospedadores están directamente asociadas a una ganancia en el *fitness* (Godfray, 1994; Wajnberg et al., 2008). Existen numerosas definiciones de *fitness* (ver Roitberg et al., 2001). Puede ser definido desde un punto de vista genético o no-genético o desde la óptica de los genes, organismos individuales o grupos de organismos (Barrows, 2011). Desde un punto de vista ecológico puede ser considerado como adecuación biológica, la cual es el proceso (y resultado) de la evolución natural de un organismo a través de la Selección Natural, que puede ser expresado en una estructura anatómica, un proceso fisiológico o un comportamiento específico. El *fitness*, también mencionado como eficacia biológica o éxito reproductivo, considera la habilidad relativa de los individuos o de su progenie para sobrevivir bajo varias restricciones/limitaciones impuestas por el ambiente abiótico y biótico en el cual se encuentran, y es determinado por el éxito individual para encontrar y utilizar hábitats y recursos.

Mientras que los insectos predadores pueden alimentarse de varias presas para llegar a la madurez, durante su desarrollo los parasitoides dependen de los nutrientes contenidos en un único hospedador, el cual constituye el principal contribuyente de su *fitness* (Jervis et al., 2008). Consecuentemente, los recursos del hospedador para el desarrollo del parasitoide que serán utilizados para múltiples funciones, son finitos y generalmente limitantes (Slansky, 1986). Los nutrientes implicados en la reproducción son, en gran medida, adquiridos durante la fase larvaria y se asignan ya sea, a los huevos iniciales o a reservas teneales que alimentan el mantenimiento somático (aumentando así el tiempo disponible para la reproducción), la locomoción, y si las hembras maduran huevos adicionales durante sus vidas, a la formación de huevos a futuro (Jervis et al., 2008). Se ha observado en avispas parasitoides que el tamaño y la calidad nutricional del hospedador atacado y la intensidad de la competencia larval se combinan para determinar la cantidad de recursos que pasan a los estados pupal y adulto del parasitoide (Godfray, 1994; Jervis et al., 2001). La calidad del hospedador, entonces, será el determinante principal del *fitness* de la progenie del parasitoide (Godfray, 1994; Brodeur & Boivin, 2004; Caron et al., 2010). Distintos atributos del hospedador definirán su calidad como recurso para el parasitoide: la especie (Silva et al., 2011), la edad, el estadio o el tamaño (Nicol & Mackauer, 1999; Silva-Torres et al., 2009; Li &

Sun, 2011; Kant et al., 2012; Veena & Manjunath, 2013), su grado de perturbación (estrés) (Morse, 2009; Browne et al., 2014) y los eventos de parasitismo previos (González et al., 2007).

En cuanto a la calidad del hospedador y al *fitness* que puede ganar el parasitoide, el tamaño de la especie de hospedador suele estar relacionado con su contenido nutricional. Por lo general, se asume que las especies hospedadoras de mayor tamaño proveen una mayor cantidad de nutrientes para el desarrollo de los parasitoides que aquellas especies de menor tamaño (Harvey, 2000; Zaviero & Mills, 2000). Sin embargo, no siempre la calidad y cantidad de tejidos del hospedador están relacionados directamente. En algunos casos la calidad del hospedador depende de la absorción y conversión de nutrientes que pueda hacer el parasitoide y no necesariamente del tamaño del hospedador (Häckermann et al., 2007). El estadio y el tamaño del hospedador como parámetros de calidad se basan en la cantidad de alimento disponible dentro del hospedador para la larva parasitoide que se desarrolla. Por lo general un hospedador de mayor tamaño se traduce como un hospedador de alta calidad (Silva-Torres et al., 2009; Li & Sun 2011). Esto es cierto especialmente para aquellos parasitoides idiobiontes, pero no resulta tan claro para los koinobiontes, donde el hospedador representará un recurso dinámico, cuya calidad en base a este criterio puede variar con el tiempo (Harvey et al., 2013). Por su parte, el estrés puede implicar una respuesta en la que haya un costo fisiológico sin necesidad de llegar a la muerte (generalmente se observa a tratamientos sub-letales) o puede incluso ocasionar la muerte del individuo. Cuando no ocurre mortalidad, los costos fisiológicos pueden ser evaluados adecuadamente en diferentes rasgos o características del *fitness* como longevidad o fecundidad (Ismail et al., 2013). Bajo condiciones sub-letales se espera que los estimadores de *fitness* sean afectados en proporción a la intensidad o duración del estresor (Ismail et al., 2013). La calidad del hospedador también se halla influenciada por los eventos previos de parasitismo. El superparasitismo es el resultado de múltiples eventos de parasitismo de un hospedador por la misma especie de parasitoide (van Alphen & Visser, 1990; Jervis 2005). La competencia por los recursos ocurre dentro o sobre el hospedador, una vez que se da el superparasitismo. En las especies solitarias sólo una larva se desarrollará hasta la adultez por lo que el superparasitismo implica la muerte de todas las larvas excepto una (Caron et al., 2010). Además, el individuo que resulta ganador de la competencia puede sufrir costos, como por ejemplo un menor tamaño o un tiempo de desarrollo más largo (Harvey et al., 1993; Potting et al., 1997) En los parasitoides gregarios, donde varios individuos pueden alcanzar la adultez, el superparasitismo implica una reducción en los recursos disponibles por parasitoide (van Alphen & Visser, 1990; Dorn & Beckage, 2007). Como consecuencia, resulta importante que los parasitoides posean la capacidad de seleccionar hospedadores óptimos.

Se considera que el *fitness* de la descendencia está fuertemente influenciado por la capacidad de selección del hospedador del parasitoide (Godfray, 1994; Wang & Messing, 2004), aspecto que ha sido ampliamente estudiado en relación con la toma de decisiones que llevan a cabo las hembras parasitoides adultas (por ejemplo: Goubault et al., 2003; Wang & Messing, 2004; Colinet et al., 2005). Sin embargo, recordemos que un porcentaje considerable de los insectos parasitoides presentan una estrategia de búsqueda compartida o mixta, donde el verdadero encuentro con el hospedador es llevado a cabo por el primer o segundo estadio larval (Eggleton & Belshaw, 1992). Algunos autores consideraron que los factores que influyen la selección del hospedador por parte de las larvas son irrelevantes, dada la baja probabilidad de encuentro con varios hospedadores y por lo tanto, de expresar una elección (Feener & Brown, 1997). No obstante, otros autores han sugerido que en el caso de que los hospedadores se encuentren agregados en parches, que las larvas cuenten con la capacidad de selección del hospedador es importante ya que es probable que la larva encuentre varios hospedadores y tenga la posibilidad de evaluarlos (Brodeur & Boivin, 2004). De este modo, las larvas de parasitoides con esta estrategia de búsqueda pueden ser consideradas equivalentes ecológicas de las hembras adultas, pero con ciertas restricciones: una esperanza de vida reducida, baja movilidad y únicamente un huevo para oviponer (Brodeur & Boivin, 2004). En consecuencia, los distintos modelos de selección de hospedador y sus predicciones pueden ser aplicados a las larvas buscadoras. A pesar de su importancia, la selección del hospedador por parte de las larvas buscadoras respecto a diferentes parámetros de calidad ha sido estudiada en muy pocos casos (Royer et al., 1999; Lizé et al., 2006; Lizé et al., 2010) y las consecuencias de estas elecciones sobre el *fitness* del adulto que se desarrollará tampoco han sido abordada aún.

Si bien los insectos parasitoides proveen una excelente oportunidad para explotar la conexión directa entre el éxito reproductivo y sus estimadores, muy pocos estudios lo han medido de manera directa (Hoffman, 1994). Por lo general, para medir el *fitness* suelen utilizarse diferentes medidas representativas o estimadores (Wang & Messing, 2004; Jervis et al., 2012). La relación entre tamaño y *fitness* en las hembras parasitoides ha sido estudiada extensivamente. En los insectos en general, el tamaño corporal o peso de las hembras adultas está correlacionado directamente con el número de ovariolas, y es un excelente estimador de la fecundidad y por consiguiente del *fitness* (Honek, 1993). En numerosos estudios de laboratorio se ha encontrado que el *fitness* se halla positivamente correlacionado con medidas de tamaño de varias estructuras corporales, como por ejemplo largo total, largo de la tibia posterior, tamaño del ala, tórax, cabeza, entre otras (Visser, 1994 y sus referencias; Ellers et al., 1998; Kölliker-Ott et al., 2003; Veena & Manjunath, 2013), así como con diversas relaciones o índices entre estas medidas (Jakob et al., 1996; Berwaerts et al., 2002; Labocha et al., 2014). A su vez el tamaño ha sido correlacionado frecuentemente con otras

medidas o rasgos de historia de vida como longevidad, habilidad para la búsqueda del hospedador y un gran potencial reproductivo (Veena & Manjunath, 2013). Los individuos de mayor tamaño tienen una mayor esperanza de vida, un mayor éxito de apareamiento, mayor fecundidad, producen una mayor cantidad de hembras y su vagilidad es mayor que los individuos de menor tamaño (Ellers et al., 1998; Sagarra et al., 2001; Ellers & Jervis, 2003; Doyon & Boivin, 2005; Santolamazza-Carbone et al., 2007; Ismail et al., 2013). Se espera que una gran disponibilidad de recursos en los hospedadores de alta calidad promueva la supervivencia larval y que produzca una descendencia de mayor tamaño corporal y mayores tasas de fecundidad que aquellos parasitoides emergidos de hospedadores de baja calidad (King, 2000; Silva-Torres et al., 2009). También se espera una mayor longevidad de los adultos, una proporción de sexos sesgada hacia las hembras en el caso de los parasitoides arrenotocos (que producen machos haploides de huevos no fecundados y hembras diploides de huevos fecundados) (Jervis, 2005), y menor tiempo de desarrollo larval (Kant et al., 2012). Por otro lado, un mayor tamaño de hospedador produce un mayor peso corporal y un menor tiempo de desarrollo, con la consecuencia positiva de acceso a la reproducción más temprana (Li & Sun, 2011). En el caso del tamaño y la forma del ala, éstos influyen la capacidad de los insectos para dispersarse y, por lo tanto, pueden afectar directamente el *fitness* a través de la capacidad de encontrar y parasitar hospedadores en el caso de las hembras (Kölliker-Ott et al., 2003; Kölliker-Ott et al., 2004; Boivin, 2010), o de encontrar otro parche con hembras una vez que las hembras del parche actual han sido inseminadas, en el caso de los machos (Boivin, 2010). La dispersión de los insectos adultos también puede estar influenciada por otro parámetro relacionado con el tamaño corporal, como lo son las reservas energéticas (grasas). Las hembras de mayor tamaño, es decir, mayor reserva energética, se dispersan sobre distancias mayores que las hembras pequeñas (Ellers et al., 1998). Frecuentemente se han utilizado índices de condición corporal como forma de expresar el contenido o calidad de las reservas energéticas de los organismos (Stevenson & Woods, 2006).

En relación con la condición corporal, ésta puede ser definida como la cantidad relativa de energía en el cuerpo de un individuo (Moya-Laraño et al., 2008). La condición corporal, en términos de almacenamiento de nutrientes, está íntimamente relacionada a la calidad, salud o éxito reproductivo de un individuo, y ha sido ampliamente proclamada como un determinante clave del *fitness*, por lo que ha cobrado relevancia en varias disciplinas de la ecología (Moya-Laraño et al., 2008; Peig & Green, 2009; Peig & Green, 2010). Se han propuesto numerosos parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos como índices de condición corporal (IC) (Stevenson & Woods, 2006), pero en general hay una tendencia a utilizar aquellos IC que se basan en la relación del peso corporal y las mediciones de longitud, cuya finalidad es interpretar las variaciones de masa corporal

para un tamaño de cuerpo dado como un atributo del bienestar del individuo (Peig & Green, 2010). Estos parámetros para cuantificar la salud o desempeño del individuo han sido utilizados en todo tipo de organismos, vertebrados e invertebrados (Stevenson & Woods, 2006). Existe una gran variedad de fórmulas y métodos estadísticos que han sido propuestos para estandarizar esta relación y aún existe mucho debate sobre cuales son los más adecuados como ICs (Green, 2001; Stevenson & Woods, 2006). Recientemente, el IC más aceptado en ecología terrestre ha sido el Índice residual (I_{res}). Este índice utiliza los residuos de una regresión de cuadrados mínimos lineales (u ordinarios) de la masa corporal contra una medida de largo, generalmente luego de una transformación logarítmica (Jakob et al., 1996; Ardia, 2005; Schulte-Hostedde et al., 2005). Se considera que un individuo con un residuo positivo está en mejor condición que un individuo con un residuo negativo (Schulte-Hostedde et al., 2001). Individuos en mejor condición corporal, en términos de almacenamiento de nutrientes, pueden soportar períodos de ayuno por más tiempo (Atkinson & Ramsay, 1995), poseer un éxito reproductivo mayor (Cotton et al., 2006) o tener una mayor fecundidad (Moya-Laraño, 2002).

El tamaño corporal del parasitoide adulto está correlacionado positivamente con muchos otros componentes del *fitness*, como la longevidad del adulto, la fecundidad de las hembras y la habilidad de cópula en los machos (Ellers et al., 1998; Ellers & Jervis, 2003; Jervis et al., 2003). Las hembras de mayor tamaño frecuentemente poseen una mayor carga de huevos maduros y viven más tiempo debido a que poseen una mayor reserva de energía que las hembras de menor tamaño. A su vez, poseen una mayor capacidad de dispersión y de encuentro de parches en el campo, lo que está relacionado con su habilidad para hallar sitios de alimentación y oviposición (Visser, 1994; Bennet & Hoffmann, 1998; Ellers et al., 1998). Respecto a la capacidad de dispersión, al igual que otros parámetros, puede presentar dificultades para ser medida directamente o en condiciones de laboratorio (Jonsson, 2003). Afortunadamente, la morfología de estructuras asociadas al vuelo y el rendimiento de vuelo están asociados, por lo que la morfología provee un indicador útil de la habilidad de dispersión (Berwaerts et al., 2002). Tradicionalmente, se han utilizado rasgos morfológicos de vuelo como indicadores de dispersión, tanto para insectos como para pequeños vertebrados, que incluyen parámetros relacionados con el tamaño (largo o superficie alar), la carga alar y la forma del ala entre otros (Dudley, 1990; Berwaerts et al., 2002; Gibb et al., 2006; Terblanche & Anderson, 2010; Arribas et al., 2012). En particular, la carga alar se define como la relación entre el peso corporal y el área de las alas y ha sido ampliamente utilizado en insectos (Dudley, 1990). Una baja carga alar se cree que representa una habilidad de vuelo y de dispersión superiores, dado que el vuelo se hace energéticamente más eficiente cuando las áreas de las alas son mayores en relación al tamaño corporal, expresado en función del peso (Angelo & Slansky, 1984;

Gibb et al., 2006). Además, si bien una baja carga alar implica velocidades de vuelo y capacidad de aceleración menores, la maniobrabilidad será mayor (Dudley, 1990; Berwaerts et al., 2002; Ribak et al., 2009). Además, en diversos trabajos se ha demostrado que este parámetro se relaciona con la capacidad de dispersión del organismo (Webb et al., 1992; Gibb et al., 2006), lo que a su vez funciona como indicador de la capacidad de búsqueda de recursos (Gibb et al., 2006).

Mallophora ruficauda es un parasitoide solitario cuya estrategia de búsqueda del hospedador se da en dos fases, por lo que la selección del hospedador en base a ciertos atributos que definirán su calidad quedaría supeditada al estado inmaduro. Se ha determinado que las larvas de este parasitoide pueden discriminar a las larvas III de *C. signaticollis* que se encuentren previamente parasitadas y seleccionar a aquellas que se encuentren sanas a modo de evitar la competencia con otras larvas parasitoides (Crespo & Castelo, 2009; Crespo et al., 2015; Martínez et al., en preparación) y se ha sugerido que este podría ser un aspecto que posea cierta influencia en el desarrollo del adulto y su *fitness* (Nussenbaum, 2007). Además, los gusanos blancos que se hallan superparasitados con *M. ruficauda* a campo poseen un peso superior a los que se encuentran con una única larva (Crespo & Castelo, 2009), hecho que podría sugerir que, ante la ausencia de hospedadores sanos y teniendo que superparasitar obligadamente, las larvas seleccionan a aquel que provea una mayor cantidad de recursos, es decir al de mayor tamaño o más pesado, de manera de impactar en menor medida el desarrollo larval hasta el momento de definición de la competencia. Por otro lado, los adultos de este parasitoide presentan un dimorfismo sexual, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos (Castelo, 2003). Además, en las hembras adultas se ha determinado que el número de oocitos totales y el número de ovariolas están correlacionadas positivamente con el tamaño corporal (Nussenbaum, 2007). Es decir, a mayor tamaño de hembra adulta, mayor será el número de oocitos y ovariolas, lo que se traduce en una mayor fecundidad potencial. Se desconoce aún la influencia que pueden tener ciertos atributos del hospedador que definen su calidad, como el peso o el estado de parasitismo, sobre el desarrollo de los parasitoides adultos y su éxito reproductivo. Por ello, una mayor capacidad de dispersión y vuelo, dada por una mayor reserva energética o una carga alar menor sería ventajoso para toda las actividades vitales de *M. ruficauda*, ya que le permitiría ampliar su rango de acción y hallar más y mejores lugares donde oviponer y obtener presas, producir desoves más grandes y huevos con más nutrientes, y larvas con mayor supervivencia. Como consecuencia directa, volar más enérgicamente y más lejos podría beneficiar la dispersión de las larvas en el ambiente, maximizando el encuentro de hospedadores sanos y minimizando el superparasitismo, lo cual se conoce que tiene incidencia positiva sobre el *fitness* (Castelo et al., 2006).

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la calidad del hospedador, en función de su condición corporal y fisiológica (peso, grado de parasitismo y grado de estrés), sobre el éxito reproductivo potencial del adulto de *M. ruficauda*, estimado a través de medidas representativas como la condición corporal (índice residual), la carga alar y la supervivencia del parasitoide.

La hipótesis que surge es que la calidad del hospedador *C. signaticollis* tiene influencia sobre los estimadores del *fitness* de los adultos de *M. ruficauda*. En particular, se espera encontrar que los parasitoides que hayan sido criados en hospedadores de mayor calidad, es decir, de mayor peso corporal, sin eventos de parasitismo previos, y sin perturbaciones posean un mejor *fitness*, entendido como un mayor tamaño de los adultos, menor carga alar, mayor supervivencia y mayor índice residual, respecto a aquellos parasitoides que fueron criados sobre hospedadores sub-óptimos, es decir más livianos, parasitados o estresados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de los insectos

Con el objeto de evaluar el efecto de la calidad del hospedador sobre el *fitness* o éxito reproductivo de *M. ruficauda* se realizó la cría de los individuos provenientes de los experimentos realizados en los Capítulos 4, 5 y 6, y una cría adicional con una única larva parasitoide, hasta que alcanzaron el estado adulto (Tabla 7.1). Estos individuos parasitaron durante el estado larval a hospedadores que variaban en su calidad como recurso alimenticio, en cuanto al tamaño o peso corporal (Capítulo 4), grado de perturbación o estrés (Capítulo 5) y/o estado de parasitismo previo (Capítulos 4 y 6). El éxito reproductivo de los moscardones adultos fue evaluado mediante diversas cuantificaciones y medidas representativas de su condición corporal, tales como el índice residual, la carga alar y la supervivencia.

Para realizar la cría hasta el estado adulto, los hospedadores que se encontraban mono o superparasitados -dependiendo del tratamiento al que habían estado sometidos- fueron colocados en frascos de plástico oscuro de 30 ml rellenos con tierra, siguiendo luego el protocolo general de mantenimiento descrito en el Capítulo 2. En el momento en que se alimentó a los hospedadores también se registró el estadio larval en que se encontraba el parasitoide. Al llegar al estado pupal se les determinó el sexo mediante la morfología del par de tubérculos que se hallan en la región media de la cara ventral del segmento abdominal VIII (en los machos, estos tubérculos son de mayor

tamaño y están más separados que en las hembras) (Dennis & Knutson, 1988). Una vez que las larvas empuparon fueron colocadas en frascos de vidrio con una base de tierra negra. Estos frascos conteniendo las pupas fueron trasladados a una cámara de cría con temperatura y humedad relativa controladas (24 - 26°C y 45 - 70%, respectivamente). Allí se los revisó diariamente para detectar el momento de emergencia de los adultos. Dentro del frasco se colocó un palito de madera para que los individuos lo tengan disponible al momento de la emergencia, ya que los adultos suelen estar posados en ramas en la naturaleza y utilizan soportes mientras su tegumento se esclerotiza y posteriormente en otras actividades (Nussenbaum, 2007).

En cuanto al procedimiento que se les realizó a los adultos para cuantificar su condición corporal, una vez ocurrida la emergencia, se durmió a los adultos con dióxido de carbono y se les registró su peso. Luego se los dispuso nuevamente en la cámara de cría, donde estuvieron sujetos a un régimen de 12:12 horas luz:oscuridad. Los adultos fueron revisados diariamente hasta su deceso, momento en el cual se los colocó en frascos plásticos con alcohol al 75% y se los almacenó en heladera para una correcta conservación (Figura 7.1). La supervivencia en ayunas fue registrada en esta instancia como indicadora del *fitness*. Este procedimiento fue realizado de este modo debido a que los adultos no se pueden alimentar en condiciones de laboratorio dado que únicamente se alimentan cuando capturan presas por sí mismos (Castelo, 2003). Posteriormente, a cada individuo se le tomaron 11 medidas corporales con un calibre electrónico con 0,01 mm de error y con ayuda de una lupa estereoscópica. Se tomaron varias medidas debido a que no se tiene conocimiento de cuál es la mejor indicadora de la condición corporal para esta especie, y por ende se realizó un análisis para seleccionar la medida más adecuada para la estimación del *fitness*. Las medidas registradas fueron: largo total corporal (Lt), medido desde el vértex hasta el anteuúltimo segmento abdominal; ancho máximo del tórax (Am), medido en la zona del escutum (zona con mayor desarrollo del mesotórax) teniendo en cuenta la distancia de una tégula a la otra sin incluir las alas; largo de la tibia y del tarso de la pata III (Ti y Ta, respectivamente), tanto izquierdos como derechos; ancho y largo de ambas alas (Aa y La, respectivamente) y altura de la cabeza (Ca) desde el vértex hasta el ápice del aparato sucto-picador (probóscide) (Figura 7.2, Tabla 7.2). Las medidas que se tomaron en estructuras pares (tibia, tarso, largo alar y ancho alar) fueron promediadas en cada individuo para su evaluación, excepto para los cálculos de área alar (ver más adelante), con lo cual las variables tomadas para las estimaciones se redujeron a 7.

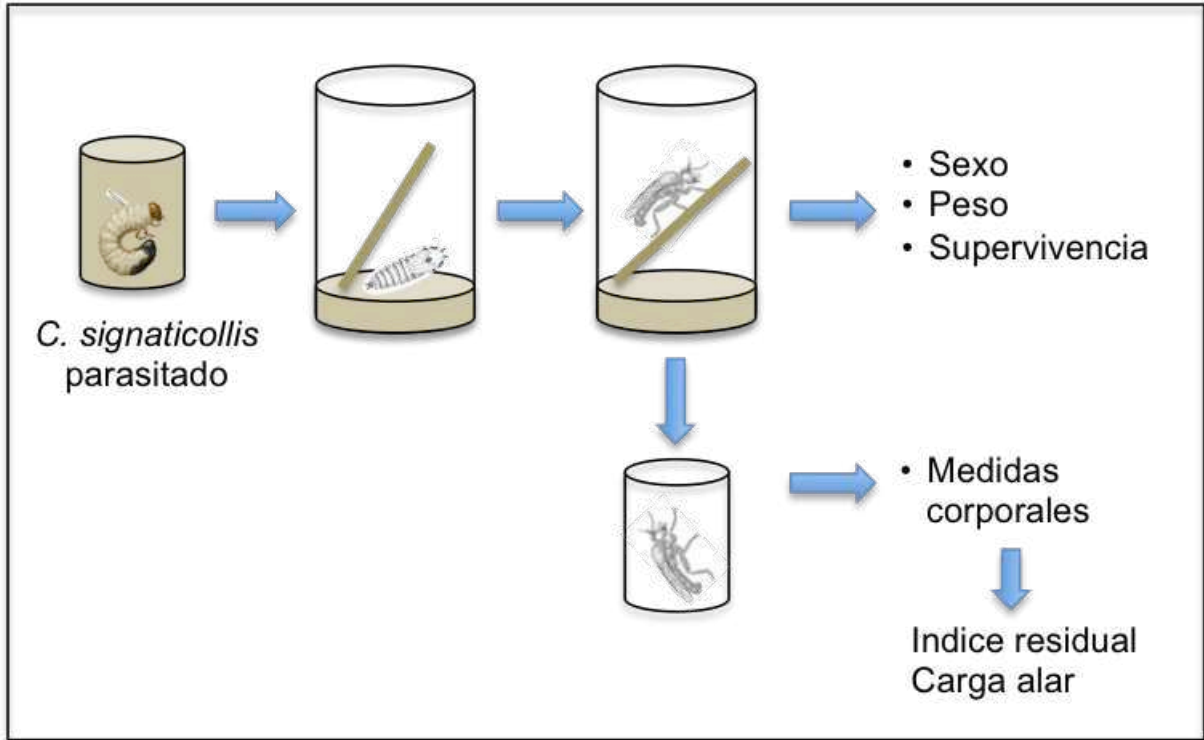


Figura 7.1. Metodología empleada para la obtención de los datos utilizados en la estimación del *fitness* de los adultos de *M. ruficauda*.



Figura 7.2. a. Hembra adulta de *M. ruficauda* donde se muestran algunas de las medidas corporales tomadas. La flecha indica la altura donde se midió el Ancho máximo del tórax. **b.** Ala de adulto donde se muestran las medidas registradas. Abreviaturas: Lt, Largo total corporal, Am, Ancho máximo del tórax, Ca, Altura de la cabeza, Ti, Largo tibia III, Ta, Largo tarso III, Aa, Ancho del ala, La, Largo del ala. Fotografías: JE Crespo.

Cálculo de los estimadores del *fitness*

Cálculo del índice residual

Para la evaluación del *fitness* y para elegir el índice residual, I_{res} , más representativo de nuestro modelo de estudio, se realizó un procedimiento de selección en función de las variables medidas. En primer lugar se realizaron correlaciones entre el peso corporal y cada una de las 7 variables corporales medidas y se seleccionaron aquellas que presentaban una mayor correlación con el peso (Tabla 7.3). Luego, se calcularon los índices residuales con los datos de todos los individuos medidos, provenientes de los diferentes experimentos y tratamientos, utilizando las variables morfométricas que tuvieron correlación positiva significativa y con un Coeficiente de Pearson mayor a 0,85. Para ello se realizaron regresiones lineales simples con el peso de los individuos como variable dependiente y utilizando cada una de las medidas corporales como regresoras o variables independientes. Cuando fue necesario, las medidas fueron transformadas mediante logaritmo natural para cumplir con los supuestos de la regresión lineal. Una vez obtenidos los distintos índices residuales, se eligió únicamente uno para evaluar la condición corporal de los adultos obtenidos de los diferentes experimentos y tratamientos en base al mejor Coeficiente de Determinación, R^2 , como indicador de la variabilidad que es explicada por el modelo (Tabla 7.4). Ya elegida la variable independiente para la regresión se procedió a corroborar el funcionamiento del I_{res} . Para ello se probó el sesgo del tamaño del I_{res} mediante la correlación entre los residuos y la variable independiente seleccionada con una correlación de Pearson (Zar, 2010). Un buen índice no debe mostrar correlación significativa con la medida corporal utilizada (Jakob et al., 1996; Labocha et al., 2014). Posteriormente los índices residuales de los tratamientos fueron comparados con pruebas-t para dos muestras independientes (Zar, 2010).

Posteriormente, para los análisis de los distintos grupos de datos (capítulos 4, 5 y 6, y cría general) se realizó una nueva regresión, para generar los residuos particulares de ese grupo de adultos, utilizando la variable independiente seleccionada. Se realizó la comprobación de los supuestos de regresión lineal y del índice residual para cada grupo de datos.

Cálculo de la carga alar

La carga alar (Ca) fue calculada para la totalidad de los individuos adultos obtenidos a lo largo de esta Tesis, según la metodología seguida en Terblanche & Andrews (2010). La carga alar fue

calculada como el área alar total/peso corporal (Terblanche & Andrews, 2010). Previamente, se estimó el área alar (Aa) como la suma del área de ambas alas. El área de cada una de ellas fue calculada aproximando la forma del ala del adulto de *M. ruficauda* a una elipse, utilizando el largo y ancho alar como los radios de la misma ($\text{Área alar} = \pi * R_1 * R_2$). El valor de peso corporal utilizado fue el indicado al principio de esta sección. Estos valores de carga alar fueron utilizados para comparar de manera indirecta la condición corporal relacionada al vuelo de los individuos de diferentes experimentos y tratamientos, mediante un análisis de varianza (ANOVA) (Zar, 2010).

Estimación de la supervivencia

La supervivencia fue medida como la cantidad de días desde la emergencia del adulto hasta su deceso, bajo las condiciones controladas que se indicaron previamente, al inicio de la sección de Materiales y Métodos.

Influencia de diferentes variables y procesos sobre el *fitness* de *M. ruficauda*

Influencia del dimorfismo sexual sobre las estimaciones del fitness

En primer lugar, y como análisis complementario, se evaluó la condición corporal de los adultos teniendo en cuenta las diferencias en su dimorfismo sexual, para entender si este parámetro interfiere con los distintos estimadores del *fitness* calculados. Para ello, se compararon el índice residual, carga alar y supervivencia teniendo en cuenta esta variable, es decir entre sexos (machos vs. hembras) de los adultos provenientes de toda la Tesis. El primero de ellos mediante una prueba-t para muestras independientes y los dos últimos mediante un análisis de varianza de dos factores, ya que se incluyó el grado de parasitismo en este análisis (ver sección posterior).

Influencia del grado de parasitismo

Con el fin de evaluar la influencia de la competencia intraespecífica durante la etapa de parasitismo sobre las reservas energéticas de los adultos emergentes, se compararon los índices residuales de adultos provenientes de la cría y de otros individuos utilizados a lo largo de la Tesis con distintos niveles de parasitismo (1 LII vs. 2 LII) mediante una prueba-t para dos muestras independientes.

Por último, para evaluar la influencia de la competencia intraespecífica durante el parasitismo sobre el *fitness* del adulto emergente, se comparó la carga alar y la supervivencia para los adultos que se criaron en ausencia de competencia o en presencia de otro competidor (1 LII vs. 2 LII) mediante un análisis de varianza de dos factores, ya que se incluyó la influencia del dimorfismo sexual en este análisis (ver sección previa).

Influencia del peso del hospedador

Con el objeto de evaluar la relación entre el peso del hospedador al momento del parasitismo y los estimadores del *fitness* (residuos, carga a alar y supervivencia) de los adultos que provenían de los experimentos de elección del hospedador en base al peso, en ausencia o presencia de parasitoides competidores (ver Capítulo 4), y de la cría sin competencia intraespecífica (1 LII) se realizaron regresiones utilizando al peso del hospedador como variable dependiente (Peso Cs) y a los distintos estimadores como variables independientes (regresoras). De la misma manera se evaluó la influencia del peso del hospedador al momento del ataque sobre los estimadores del *fitness* en los adultos criados bajo competencia con otras larvas de *M. ruficauda* (2 LII).

Influencia del grado de perturbación del hospedador

Para los insectos adultos provenientes de los experimentos de discriminación y elección del hospedador en base a dos niveles diferentes de estrés (ver Capítulo 5), no fue posible realizar pruebas estadísticas dada la baja cantidad de adultos obtenidos al final de los experimentos y la temporada de cría ($n = 3$).

Influencia del orden de llegada al hospedador

Con el objeto de evaluar la influencia del orden en que se produce el ataque al hospedador por parte de las larvas parasitoides sobre el éxito reproductivo de los adultos obtenidos se compararon el índice residual, la carga alar y la supervivencia de los adultos provenientes de los experimentos de competencia intraespecífica (ver Capítulo 6). Para el primero de ellos se utilizó una prueba-t para dos muestras independientes, y para la carga alar y la supervivencia los datos fueron comparados mediante un análisis de varianza dos factores.

Análisis estadísticos

Para evaluar las diferencias en los índices residuales (I_{res}) entre los distintos tratamientos se utilizaron pruebas-t para dos muestras independientes (Zar, 2010). En el caso de evaluar las diferencias existentes mediante la carga alar y la supervivencia se utilizaron análisis de varianza (Zar, 2010).

RESULTADOS

De los aproximadamente 2500 individuos que fueron criados en diversas condiciones a lo largo de este trabajo de Tesis, solo un 9,3% ($n = 234$) alcanzaron la madurez, probablemente debido a los efectos de la cría en laboratorio (Tabla 7.1). En la tabla 7.2 se muestran las medidas descriptivas obtenidas de las mediciones provenientes de los individuos adultos de los diferentes experimentos y tratamientos, discriminados por sexo.

Tabla 7.1. Adultos de *M. ruficauda* obtenidos en distintas condiciones de cría a partir de los tratamientos a los cuales fueron sometidos en los distintos capítulos de esta Tesis.

Experimento	Machos (n)	Hembras (n)	N total
Capítulo 4	54	49	103
Capítulo 5	1	2	3
Capítulo 6	17	25	42
Cría (este Capítulo)	49	37	86
Total	121	113	234

Tabla 7.2. Medidas corporales de adultos de *M. ruficauda*. Abreviaturas: n, número de réplicas, DE, desvío estándar, Mín - Máx, valores mínimos y máximos para dicho parámetro.

Medida	Hembras				Machos			
	Media	DE	Mín - Máx	n	Media	DE	Mín - Máx	n
Peso corporal (g)	0,18	0,06	0,08-0,35	110	0,16	0,05	0,07-0,30	116
Largo total corporal (mm)	18,25	1,93	12,96-21,71	111	17,69	1,99	13,10-23,03	116
Ancho máximo tórax (mm)	4,57	0,51	3,37-5,61	113	4,41	0,52	3,28-5,88	119
Largo de la tibia (mm)	5,49	0,59	4,09-6,67	111	5,57	0,69	3,94-6,94	119
Largo del tarso (mm)	4,03	0,44	2,72-5,10	110	4,00	0,45	2,67-4,86	119
Largo del ala (mm)	17,72	1,66	14,04-21,18	113	17,28	1,69	12,84-20,38	118
Ancho del ala (mm)	5,39	0,54	4,43-6,77	113	5,19	0,56	3,79-6,36	118
Altura de la cabeza (mm)	5,53	0,53	4,43-6,77	113	5,31	0,53	4,15-6,62	119
Supervivencia (días)	6,98	3,43	1-16	104	6,96	3,32	0-18	106
Carga alar (g/cm^2)	0,12	0,02	0,07-0,16	108	0,11	0,02	0,07-0,20	115

Cálculo del índice residual

Las correlaciones realizadas entre el peso corporal de los adultos de *M. ruficauda* y las diferentes medidas corporales registradas se presentan en la tabla 7.3. Sólo aquellas correlaciones con Coeficientes de Pearson superiores a 0,85 fueron utilizadas para hacer las regresiones lineales simples entre el peso y alguna de las medidas corporales, por ello, se descartaron el Largo total corporal y el Largo del tarso III. Las variables independientes empleadas para continuar con el análisis, debido a que presentaban las correlaciones más altas con el peso corporal fueron las siguientes: Ancho máximo del tórax, Largo promedio de las tibias III, Largo alar promedio, Ancho alar promedio y Altura de la cabeza.

Tabla 7.3. Coeficientes de correlación de Pearson entre el peso corporal del adulto de *M. ruficauda* y las siete medidas corporales. Abreviaturas: r, Coeficiente de correlación de Pearson, n, número de réplicas.

Medida corporal	Peso Adulto		
	r	P	n
Largo total corporal	0,78	<0,0001	217
Ancho máximo del tórax	0,90	<0,0001	222
Largo tibia III	0,87	<0,0001	220
Largo tarso III	0,81	<0,0001	219
Largo del ala	0,89	<0,0001	221
Ancho del ala	0,88	<0,0001	221
Altura de la cabeza	0,88	<0,0001	222

Ya seleccionadas las variables independientes se realizaron seis regresiones lineales para elegir el modelo de mayor ajuste del cual se obtuvieron los residuos. En la tabla 7.4 se muestran las regresiones realizadas así como los datos estadísticos de cada una de ellas. Dado que la regresión \ln Peso – \ln Largo ala fue la que presentó un mayor coeficiente de determinación, R^2 , este fue el modelo elegido para la obtención de los residuos. La comprobación del modelo mediante una correlación de Pearson entre los residuos y el largo del ala arrojó un resultado no significativo estadísticamente ($r = 0,0068$, $p = 0,9195$) lo que respalda el uso de este índice, debido a que no existe correlación entre los residuos y la variable independiente seleccionada (Jakob et al., 1996; Labocha et al., 2014).

Tabla 7.4. Modelos obtenidos a partir de las regresiones lineales realizadas con ln (peso) y diferentes medidas corporales. A partir de los valores del Coeficiente de Determinación, R^2 , se seleccionó ln Peso – ln Largo del ala como regresión lineal para calcular los residuos que fueron utilizados posteriormente para confeccionar los índices residuales y evaluar los distintos tratamientos en cada uno de los experimentos. Abreviaturas: gl, grados de libertad.

Regresión	Modelo			R^2	Modelo
	F	gl	p		
ln Peso – Ancho máximo	1112,47	1	<0,0001	0,83	-4,6 + 0,62 Ancho máximo
ln Peso – Largo tibia III	880,46	1	<0,0001	0,80	-4,52 + 0,49 Largo tibia III
ln Peso – Largo ala	1934,89	1	<0,0001	0,90	-5,29 + 0,2 Largo ala
ln Peso – ln Largo ala	1920,75	1	<0,0001	0,90	-11,49 + 3,39 ln Largo ala
ln peso – Ancho ala	1545,22	1	<0,0001	0,88	-4,96 + 0,59 Ancho ala
ln Peso – Altura cabeza	960,45	1	<0,0001	0,81	-5,03 + 0,50 Altura cabeza

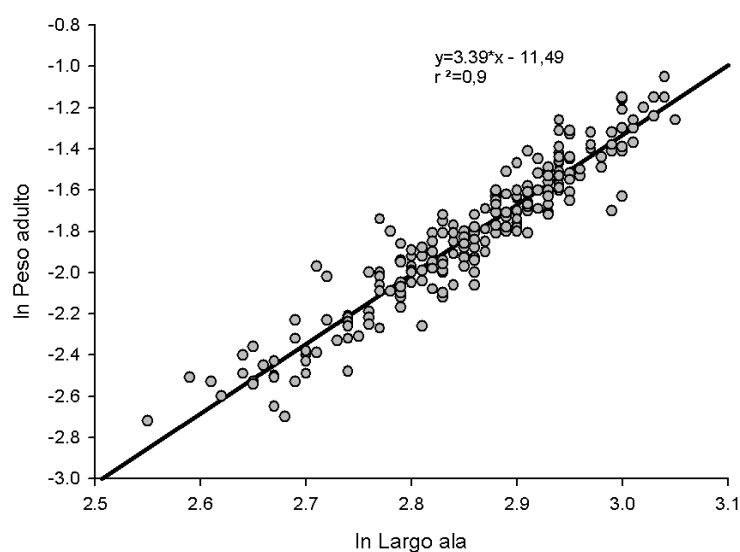


Figura 7.1. Modelo elegido para la obtención de los residuos. El mismo corresponde a la correlación lineal entre ln Peso del adulto y ln Largo del ala ($F = 1920,75$; $< 0,0001$).

Influencia del dimorfismo sexual sobre las estimaciones del fitness e influencia del estado de parasitismo

Para la totalidad de los individuos adultos no se encontraron diferencias significativas en los índices residuales de hembras y machos ($t = 0,68$, $gl = 220$, $p = 0,4965$), lo que significa que el dimorfismo sexual no estaría interfiriendo en esta estimación.

Al comparar los índices residuales entre los individuos que fueron criados bajo competencia (2 LII) y aquellos que se criaron en ausencia de competidores durante el estadio larval (1 LII) se encontraron diferencias significativas ($t = -2,75$, $gl = 207$, $p = 0,0065$; Figura 7.2), siendo los residuos de los adultos criados con 2 LII (0,02) mayores que los de aquellos con 1 LII (-0,02).

Al evaluar la influencia del sexo y la competencia intraespecífica sobre la carga alar de los adultos de *M. ruficauda* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros evaluados ($F_{\text{sexo}} = 0,51$, $gl = 1$, $p = 0,4778$; $F_{\text{cant LII}} = 3,07$, $gl = 1$, $p = 0,0811$), ni para su interacción ($F_{\text{sexo} \times \text{cant LII}} = 0,17$, $gl = 1$, $p = 0,6797$).

Respecto a la supervivencia de los adultos, al evaluar la influencia del sexo y la competencia intraespecífica tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros evaluados ($F_{\text{sexo}} = 0,03$, $gl = 1$, $p = 0,8722$; $F_{\text{cant LII}} = 0,01$, $gl = 1$, $p = 0,9203$), ni para su interacción ($F_{\text{sexo} \times \text{cant LII}} = 1,40$, $gl = 1$, $p = 0,2390$).

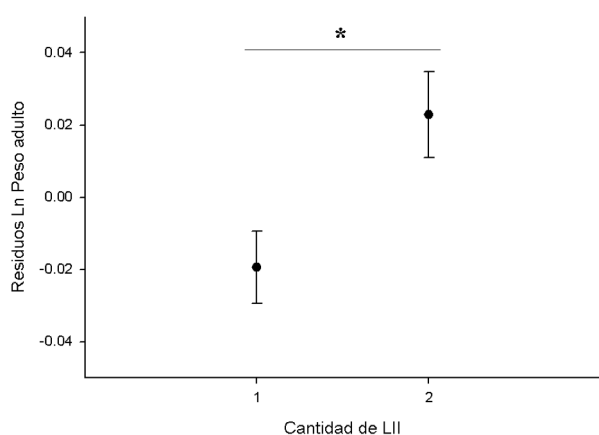


Figura 7.2. Residuos de la totalidad de los individuos adultos que se criaron durante esta Tesis en función de la cantidad de larvas que se hallaban sobre un mismo hospedador ($t = -2,75$, $gl = 207$, $p = 0,0065$). * denota diferencias estadísticamente significativas.

Influencia del peso del hospedador

Al realizar las regresiones lineales entre el peso del hospedador al momento del parasitismo (Peso Cs) y los estimadores del *fitness* de los adultos que provenían de los experimentos de elección en base al peso del hospedador en ausencia y presencia de larvas competidoras (ver Capítulo 4) y de la cría sin competencia intraespecífica (1 LII) se encontraron los siguientes resultados: la regresión del Peso Cs en función de la Carga alar fue significativa ($F = 13,99$; $p = 0,0004$, Figura 7.3.b); las regresiones entre el Peso Cs y los residuos, y Peso Cs y supervivencia no resultaron significativas ($F = 0,38$, $p = 0,5424$ y $F = 0,02$, $p = 0,8904$, respectivamente; Figuras 7.3.a y c).

Respecto a las regresiones lineales entre Peso Cs y los estimadores del *fitness* de los adultos que provenían de la cría en competencia (2 LII), los resultados fueron los siguientes: la regresión entre el Peso Cs y los residuos resultó significativa ($F = 6,38$, $p = 0,015$, Figura 7.3.d); la regresión entre el Peso Cs en función de la Carga alar fue significativa ($F = 8,94$; $p = 0,0046$, Figura 7.3.e); y la

regresión entre Peso Cs y supervivencia no resultó significativa ($F = 0,12$, $p = 0,7297$, Figuras 7.3.f).

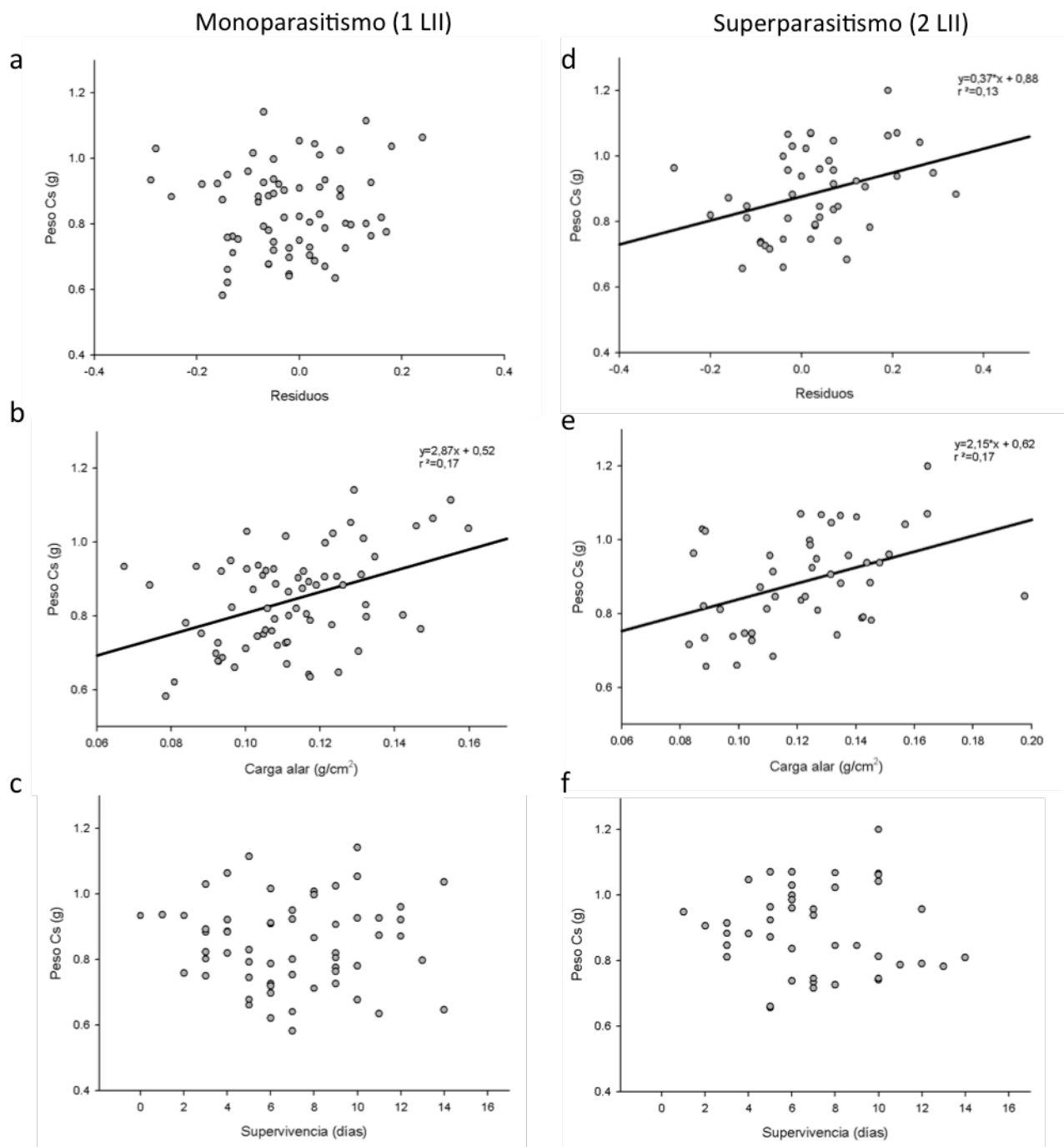


Figura 7.3. Regresiones lineales entre el peso de *C. signaticollis* al momento en que se efectuaba el parasitismo de la primera (y en los casos de monoparasitismo, única) larva de *M. ruficauda* y los estimadores del *fitness* empleados en este capítulo: residuos, carga alar y supervivencia de los moscardones adultos. Las figuras a, b y c corresponden a los adultos cuyas larvas fueron criadas en ausencia de competidores (1 LII); las figuras d, e y f corresponden a los adultos provenientes de larvas que se hallaban en hospedadores superparasitados (2 LII).

Influencia del orden de llegada al hospedador

Para los adultos provenientes de los experimentos de competencia intraespecífica (ver Capítulo 6), que estuvieron bajo competencia intraespecífica habiendo atacado al hospedador en distinto orden, al realizar nuevamente la regresión lineal entre \ln Peso – \ln Largo ala se obtuvo el modelo $-10,98 (\pm 0,45) * 3,22 (\pm 0,15) \ln$ (Largo ala), con un $R^2 = 0,92$ ($F = 432,33$, $gl = 1$, $p < 0,001$). Los residuos de esta regresión lineal no mostraron diferencias estadísticamente significativas al ser comparados entre sexos ($t = -0,59$, $gl = 40$, $p = 0,5552$) ni al compararlos entre larvas ganadoras según el orden de llegada al hospedador ($t = -0,27$, $gl = 40$, $p = 0,7913$).

Al comparar la carga alar en función del orden de llegada de las larvas parasitoides (1ra LII vs. 2da LII) y del sexo (hembras vs. machos) no se encontraron diferencias estadísticas significativas para ninguno de los factores ni su interacción ($F_{\text{sexo}} = 0,18$, $gl = 1$, $p = 0,6780$; $F_{\text{orden LII}} = 2,92$, $gl = 1$, $p = 0,0955$; $F_{\text{sexo} \times \text{orden LII}} = 0,17$, $gl = 1$, $p = 0,6827$).

Al evaluar la influencia del orden de llegada de las larvas parasitoides (1ra LII vs. 2da LII) y del sexo (hembras vs. machos) sobre la supervivencia de los adultos de moscardón no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los factores ni su interacción ($F_{\text{sexo}} = 0,16$, $gl = 1$, $p = 0,6896$; $F_{\text{orden LII}} = 0,43$, $gl = 1$, $p = 0,5180$; $F_{\text{sexo} \times \text{orden LII}} = 2,96$, $gl = 1$, $p = 0,0939$).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se estudió la influencia de la calidad del hospedador en base a su condición corporal (peso) y el grado de parasitismo sobre el *fitness* de los moscardones adultos, a través de tres estimadores: el índice residual de una regresión lineal entre la masa corporal y una medida de largo corporal, la carga alar y la supervivencia. Se encontraron diferencias entre la condición de los individuos que fueron criados con diferente nivel de parasitismo cuando fueron evaluados mediante sus residuos, pero esta diferencia no pudo evidenciarse a través de los otros dos estimadores. No se encontraron diferencias entre sexos para ninguno de los estimadores. Al evaluar la influencia del peso del hospedador al momento en que ocurría parasitismo y los tres estimadores, se encontró una relación positiva aunque débil con la carga alar, tanto para los moscardones que se habían criado en presencia como en ausencia de competidores. La supervivencia no mostró relación con este parámetro y el índice residual lo hizo sólo para los individuos criados en presencia de competidores.

Para la totalidad de los moscardones adultos provenientes de esta Tesis se encontraron diferencias significativas entre aquellos que fueron criados en ausencia de otras larvas competidoras (1 LII) y los que fueron criados bajo competencia (2 LII) únicamente al evaluarlos a través de índice residual. Se encontró que los moscardones que fueron criados bajo competencia mostraban un residuo mayor que el de los que fueron criados sin larvas competidoras. Esto indica que los individuos criados en presencia de coespecíficos se desarrollarían con una mejor condición corporal en términos de almacenamiento de nutrientes. Este hecho ha sido registrado para algunos himenópteros y se ha sugerido que este mayor crecimiento se debe a un aumento en el consumo de alimento por parte del hospedador (Bai & Mackauer, 1992; Gu et al., 2003; Mackauer & Chow, 1012). Es decir, la tasa de consumo de alimento del hospedador estaría relacionada directamente con la cantidad de parasitoides con los que el insecto hospedador soporta (Bai & Mackauer, 1992; Mackauer & Chau, 2001). Además, esto podría estar relacionado con lo discutido en el Capítulo 6 en relación a que los niveles moderados de superparasitismo podrían resultar beneficiosos para el parasitoide, dado que permiten al parasitoide a enfrentar la severidad de la respuesta inmune del hospedador (van Alphen & Visser, 1990; Mackauer & Chau, 2001; Gu et al., 2003; González et al., 2007; Khafagi & Hegazi, 2008; Böckmann et al., 2012). Entonces, bajo este escenario, al haber más de una larva parasitoide sobre el mismo hospedador, la fuerza de la respuesta inmune se atenúa entre ellas, siendo más sencillo de sobrellevar para cada uno de los individuos, por lo que se vería reflejado en un mejor *fitness* del adulto que finalmente se desarrolla.

Por otro lado, al medir el efecto de la competencia intraespecífica mediante otros parámetros estimadores del *fitness* como la carga alar y la supervivencia, no se encontraron diferencias en entre los adultos criados como única larva sobre el hospedador o bajo competencia. Algunos modelos sobre el superparasitismo, en especies parasitoides solitarias como una estrategia adaptativa, se han basado en que el superparasitismo no tiene consecuencias sobre el *fitness* de la larva que sobrevive (Visser et al., 1990; Visser et al., 1992, Jervis, 2005). En el caso de *M. ruficauda*, esto podría considerarse una suposición razonable dado que las larvas supernumerarias son eliminadas generalmente antes de que puedan usar una cantidad apreciable de hospedador como recurso. Por este motivo, los moscardones provenientes de mono- y superparasitismo tendrían una capacidad de dispersión y supervivencia similar.

Por otro lado, el análisis de la condición corporal del parasitoide adulto a través de los residuos, la carga alar y la supervivencia no reflejó que existan diferencias entre los sexos en cuanto a su habilidad para hacer uso del hospedador durante el desarrollo. Si bien existe un dimorfismo sexual en los adultos de esta especie, que se manifiesta únicamente en una diferencia en el tamaño corporal

(Castelo, 2003), esta diferencia no parece estar vinculada al modo en que se desarrollan sobre el hospedador en ninguna de las diferentes situaciones de competencia.

Respecto a la influencia del peso del hospedador al momento del parasitismo sobre los diferentes estimadores del *fitness* utilizados a lo largo de este capítulo se observaron que algunas de las regresiones fueron significativas, pero con muy bajos coeficientes de determinación, por lo que el ajuste del modelo es bajo y su capacidad predictiva limitada. Los modelos que presentaron un mayor R^2 fueron aquellos donde se utilizó la carga alar como regresora, tanto para adultos provenientes de mono- como de superparasitismo. Las regresiones realizadas con el estimador “supervivencia” no fueron significativas. De las regresiones realizadas con los residuos, sólo aquella con los datos de los moscardones adultos superparasitados mostró ser estadísticamente significativa. A pesar del bajo coeficiente de determinación y la capacidad predictiva limitada de las regresiones realizadas entre el peso del hospedador y la carga alar, la relación positiva y significativa entre estos parámetros indican que un mayor peso de *C. signaticollis* resultaría en un mayor *fitness* del parasitoide adulto, medido como carga alar. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos previamente en el Capítulo 4 donde se vió que no hay una preferencia o selección del hospedador en base al peso, se puede discutir la importancia de este atributo del hospedador en el éxito reproductivo de *M. ruficauda*. Al no mostrar un comportamiento de selección de hospedadores de mayor tamaño podríamos suponer que no es un factor limitante para el desarrollo normal hasta el estado adulto. No obstante, las regresiones sugerirían que el tamaño del hospedador podría estar aportando positivamente al *fitness* del insecto adulto.

En referencia a los moscardones criados bajo competencia intraespecífica habiendo registrado el orden en que se produjo el ataque por parte de cada una de las larvas al hospedador, no se encontraron diferencias entre el orden de llegada de las larvas ni del sexo del adulto para ninguno de los tres estimadores. La falta de diferencias respecto al orden de llegada de las larvas cobra sentido al tener en cuenta los resultados del capítulo anterior, donde se observó que ambas larvas parasitoides poseen igual probabilidad de ganar la competencia por el hospedador una vez que se produjo el superparasitismo. Las ventajas de llegar primero o segundo se ven a nivel de larva, como se discutió en el Capítulo 6, y no se evidencian en el adulto. En algunos casos se ha sugerido que la influencia del superparasitismo en koinobiontes sobre los costos del *fitness*, estará en parte determinada por la habilidad de la larva ganadora para compensar el posible crecimiento reducido durante la primera instancia de superparasitismo, incrementando posteriormente su desarrollo luego de la eliminación de sus competidores (Bai & Mackauer, 1992; Jervis, 2005). Nuestro modelo de estudio podría considerarse un caso extremo de esto, dada la dinámica de desarrollo del estado

larval, donde durante la mayor parte del proceso las larvas permanecen en estadio II y únicamente al final de este proceso, y ante estímulo de pupación del hospedador, activan su desarrollo y definen la competencia.

En lo que respecta a los adultos provenientes de la cría con hospedadores con diferentes niveles de estrés, la falta de resultados producto de los escasos moscardones obtenidos, probablemente se deba a la alta mortalidad usual bajo condiciones de laboratorio y a la baja cantidad de réplicas de la cual se partió.

A modo de conclusión, se ha observado que la competencia entre las larvas de esta especie no parece tener un efecto negativo sobre la condición del moscardón adulto. La influencia es cuanto mucho nula o positiva, dependiendo del estimador utilizado. Dada la frecuencia a campo de los *C. signaticollis* superparasitados (50%) y a la luz de los resultados previos, donde se observó que una vez producido el superparasitismo las larvas poseen la misma probabilidad de desarrollarse hasta el estado adulto, el superparasitismo parecería ser una estrategia viable para la supervivencia de la larva ganadora y con cierta ventaja para los moscardones que se desarrollan bajo estas circunstancias. En el caso del peso del hospedador, pareciera tener un efecto sobre la capacidad de dispersión del moscardón adulto, lo que también ha sido registrado para otros modelos experimentales de estudio. Sin embargo, al tratarse de un parasitoide con un estilo de vida koinobionte este efecto puede no resultar tan claro dada la variabilidad de este atributo del hospedador durante el proceso de parasitismo. Es probable que otros parámetros del hospedador, como la calidad de recursos disponibles –y no cantidad –, o características del parasitoide, como la eficiencia de conversión alimenticia en masa corporal, estén implicados en la definición de la *performance* del adulto de *M. ruficauda*, pero para dilucidar estos aspectos se requiere ulterior investigación.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

En la presente Tesis se estudió la influencia de ciertos atributos del hospedador *C. signaticollis*, que definen su calidad como recurso, sobre el proceso de selección por parte de las larvas del parasitoide *M. ruficauda* y sobre el posterior desarrollo y *fitness* del adulto (Figura 8.1). Este trabajo reveló que las decisiones de parasitismo que toman las larvas al parasitar a un hospedador *C. signaticollis* no están influenciadas por la intensidad de las claves químicas de otros hospedadores potenciales del mismo género, mostrando una fuerte preferencia hacia *C. signaticollis*. Tampoco están influenciadas por el peso corporal del hospedador, ni por el estado de parasitismo del hospedador cuando las larvas están en presencia de competidores. En cambio, las decisiones de las larvas son negativamente afectadas por el grado de estrés del hospedador al momento del ataque. En cuanto a la competencia intrínseca, se observó que, una vez producido el superparasitismo, ambas larvas poseen igual probabilidad de ganar la competencia. Esta probabilidad no se ve afectada por el orden en que se hayan producido los ataques ni por el tiempo transcurrido entre estos ataques. La resolución de la competencia ocurre, principalmente durante la transición del estado larval al estado pupal del hospedador (prepupa). Adicionalmente, ante la presencia de coespecíficos, las larvas individuales se orientan preferentemente hacia las claves de otras larvas. Por otro lado, en este trabajo se observó que el *fitness* del adulto que emerge es afectado positivamente por el peso del hospedador atacado y por la presencia de otra larva competidora sobre el hospedador (Figura 8.1).

La respuesta de orientación hacia otras especies del género *Cyclocephala* no estaría relacionada a la cantidad de clave química contenida en los estímulos utilizados debida a la diferencia de tamaño existente entre los hospedadores, sino a la identidad química estructural de las claves. El hecho que las larvas se orienten hacia las claves de un hospedador potencial como *C. modesta* pero no a *C. putrida* cuando sus esperanza de vida decrece sugiere que las claves de *C. modesta* y *C. signaticollis* podrían presentar ciertas similitudes. Se ha demostrado que las diferencias en la composición cuantitativa de una clave puede informar a los parasitoides sobre la identidad de una especie de hospedador entre especies pertenecientes al mismo género (Cardé & Millar, 2004; Yong et al., 2007). Además, en algunos casos se ha evidenciado que la evolución de las mezclas de feromonas (que suelen actuar como kairomonas para los parasitoides) puede ser un reflejo de las relaciones filogenéticas de los organismos, en este caso, los hospedadores del género *Cyclocephala* (Roelofs & Brown 1982; Cardé & Millar, 2004). Es decir, que las especies de *Cyclocephala* podrían compartir componentes químicos pero variar en sus proporciones, o diferir en sus componentes, pero poseer similitudes estructurales cercanas. En este trabajo, se encaró un estudio comportamental de la selectividad, con lo cual para dilucidar estas variantes se hace necesario realizar estudios de análisis químicos de CG-EM. Además, sería interesante estudiar cual es la performance de este parasitoide, mediante indicadores indirectos del *fitness*, en individuos emergidos de las especies

potenciales, *C. modesta* y *C. putrida*.

Se encontró que las larvas parasitoides pueden detectar la presencia de otras larvas en el ambiente y, sorprendentemente orientarse activamente hacia ellas. Este hecho puede interpretarse como no adaptativo, ya que es esperable que las larvas busquen alejarse de lo que representa una futura competencia por recursos en presencia de un hospedador, o la posibilidad de que la larva sea canibalizada, como es frecuente observar al mantener estos insectos agregados bajo determinadas condiciones de laboratorio. Si bien aun no se ha esclarecido cuales son las claves que utilizarían sería interesante estudiar cual es la estrategia o cual sería la ventaja de orientarse hacia potenciales competidores dado que al tratarse de un parasitoide solitario, el proceso de superparasitismo supone la muerte de todas las larvas sobre un hospedador excepto una. Se ha sugerido para otros organismos que la presencia de coespecíficos puede indicar la “buena calidad” de un hábitat. El hecho de orientarse hacia coespecíficos puede estar relacionado con una estrategia de parasitismo “cooperativo”, dónde tras el ataque la respuesta inmune del hospedador se atenúa debido a la presencia de varias larvas que lo consumen simultáneamente. En los últimos años han surgido ciertos modelos donde se evidenció que los niveles moderados de superparasitismo serían beneficiosos tanto para la supervivencia de larvas en desarrollo como para el porcentaje de emergencia y el *fitness* de los parasitoides adultos. Particularmente, en el caso de los parasitoides himenópteros se han desarrollado hipótesis alternativas para explicar la evolución del estilo de vida solitario y gregario, en las cuales se asume que el desarrollo solitario es el carácter ancestral y el desarrollo gregario el carácter derivado. Entonces una estrategia “cooperativa” de parasitismo en *M. ruficauda* podría ser interpretada como que el sistema está frente a un paso evolutivo intermedio o en una transición entre dos estrategias, pero para el caso de un díptero parasitoide. También, la orientación hacia coespecíficos puede estar relacionada con lo que se conoce como información social. Este comportamiento presente en diversos organismos permite utilizar la presencia de coespecíficos como clave para estimar la calidad de un recurso y la toma de decisiones frente a la utilización de ese recurso. Para el caso de *M. ruficauda*, este comportamiento podría implicar un compromiso entre adquirir información de su entorno en el encuentro de recursos y encontrarse con más competidores, lo cual podría traducirse en una desventaja para su desarrollo y supervivencia. Sin embargo, dado que la probabilidad de dejar fuera de competencia a otras larvas es considerable, la presencia de otros parasitoides podría estar indicando la presencia cercana de un potencial hospedador. Es necesario ampliar los estudios sobre la naturaleza de la clave que las larvas pueden estar percibiendo de otras larvas y cual es su influencia sobre diversos procesos como evitación de coespecíficos, agregación y/o distribución entre los recursos disponibles.

En cuanto a la discriminación y selección del hospedador en base a su peso, considerado un estimador del tamaño, se encontró que las larvas no eligen a sus hospedadores evaluando esta característica corporal. La ausencia de discriminación y selección del hospedador por parte del parasitoide en base a su peso corporal cobra sentido al considerar que *M. ruficauda* es koinobionte, por lo que su hospedador continúa con el desarrollo durante la mayor parte del proceso de parasitismo. La calidad de *C. signaticollis* en base a este atributo no estará fijada al momento de ocurrir el parasitismo, por lo que representa un recurso dinámico que la larva difícilmente pueda predecir inicialmente. En este sentido, es probable que la calidad del hospedador como recurso alimenticio esté relacionada con la calidad y capacidad de aprovechamiento de los nutrientes que el hospedador contiene y no con la cantidad de los mismos, así como en la eficiencia de conversión de los tejidos del hospedador en masa propia por parte del parasitoide.

En las situaciones en que varias larvas coexistieron en un parche de hospedadores, se observó una distribución de parasitismo bastante equitativa entre los hospedadores ofrecidos, que fue independiente de su condición corporal. Para que este patrón de distribución de parasitismo ocurra, lo más parsimonioso es que exista la capacidad de detectar coespecíficos por parte de las larvas, hecho que fuera confirmado durante el desarrollo de esta Tesis. La importancia de detectar coespecíficos es importante en un parche de hospedadores, debido a que es ventajoso para cada larva monoparasitar un hospedador y evitar así la competencia durante el desarrollo. Sin embargo, en lugar de evitación se observó agregación de larvas, ya que se orientaron activamente hacia otras larvas parasitoides, por lo que resulta contradictorio según el proceso resultante observado en los parches de hospedadores. Existe la posibilidad que en los parches artificiales no se haya producido la detección entre las larvas parasitoides, debido a algún problema espacial. Por otro lado, el patrón de distribución uniforme de parasitismo de las larvas parasitoides discrepa con los datos hallados a campo previamente. Esto podría deberse a que al momento de realizar el muestreo se esté observando una situación estática en el tiempo y no cómo evolucionan los patrones de parasitismo y superparasitismo naturalmente a lo largo de todo el proceso. El hecho de encontrar que los hospedadores superparasitados son los *C. signaticollis* más pesados podría implicar que son los primeros hospedadores disponibles, por lo que la probabilidad de ser superparasitados es mayor y su desarrollo está más avanzado que un hospedador que aparece posteriormente en la temporada reproductiva. Por otro lado, como las larvas en alta densidad pueden bajar el umbral de selección de hospedadores, podría ser este el motivo por el cual no se observó el patrón de parasitismo esperado, ya que no estarían seleccionando a los mejores hospedadores según peso. Para esclarecer este punto sería interesante estudiar la dinámica del proceso de parasitismo a campo y laboratorio, registrando cómo van ocurriendo los procesos de parasitismo y superparasitismo durante toda la temporada.

Este trabajo contribuyó a sumar conocimiento acerca de las características de los hospedadores subóptimos. Respecto al nivel de perturbación del hospedador se observó que *C. signaticollis* es susceptible frente a un estresor mecánico y que desarrolla una respuesta de estrés que es sensada de alguna manera por las larvas de *M. ruficauda*. Probablemente los cambios que percibe el parasitoide sean a nivel fisiológico, dado que frente a estímulos químicos las larvas no se orientan y, si bien aun falta completar los análisis, los cromatogramas mostraron diferencias entre un hospedador sano y uno estresado. Dado que la respuesta de estrés es inespecífica, cualquier agente estresor, independientemente de su naturaleza, biótico o abiótico, podría generar la misma respuesta en *C. signaticollis*. Es razonable entonces pensar que frente a otras fuentes de estrés esta respuesta fisiológica del gusano, y el probable cambio de identidad química, se desarrolle de manera similar y sea sensada también por el parasitoide, por lo que podría ser considerado como un hospedador subóptimo. Dicho esto y dado que el parasitismo es un estresor biótico, y que se ha demostrado que las larvas pueden discriminar y no seleccionar a aquellos hospedadores parasitados frente a los que se encuentran sanos, es probable que la respuesta que se observa ante un estresor mecánico sea la misma. A futuro, los resultados de las identidades químicas de los hospedadores con diferente grado de estrés o estado de parasitismo permitirán esclarecer estos interrogantes. Además, un hospedador estresado podría ser considerado subóptimo dado que la respuesta fisiológica de estrés en insectos ha sido registrada como una sensibilización inmunológica. Por lo que parasitar un hospedador sensibilizado representa una mayor probabilidad de fracaso en el ataque, con un consecuente gasto energético adicional asociado a una nueva búsqueda de hospedador o la eventual muerte del parasitoide. En el caso de producirse un ataque a un hospedador estresado, el parasitoide se enfrenta con un hospedador de menor calidad, que podría afectar su desarrollo al estado adulto. En base a esto, resulta ventajoso y adaptativo para este parasitoide poder discriminar el nivel de estrés de un potencial hospedador, de modo de incrementar sus probabilidades de desarrollo.

Respecto a la competencia intraespecífica, se encontró que, una vez producido el superparasitismo, cualquier larva, independientemente del orden de llegada al hospedador y del tiempo transcurrido entre los ataques, tiene la misma probabilidad de ganar la competencia intraespecífica. Si bien, el superparasitismo fue tomado inicialmente como una estrategia ecológica desventajosa, numerosos trabajos han demostrado que bajo ciertas circunstancias puede resultar adaptativo. Bajo un escenario donde los hospedadores sanos son escasos, resulta ventajoso superparasitar ya que implica una mínima probabilidad de monopolizar al hospedador y de desarrollarse exitosamente. Asimismo, se han registrado en algunos modelos que los niveles moderados de superparasitismo pueden llegar a resultar beneficiosos al contrarrestar la respuesta inmune del hospedador, y no se descarta en *M. ruficauda* la ocurrencia de este mecanismo. Cabe mencionar, además, que la

resolución de la competencia ocurre, principalmente durante la transición del estado larval al estado pupal del hospedador (prepupa), lo que sugiere que esta especie es un compensador fisiológico. Los compensadores fisiológicos utilizan señales químicas de sus hospedadores de manera directa sobre sus tejidos, o indirecta estimulando sus glándulas endócrinas para producir las hormonas requeridas para el desarrollo normal. De ser este el caso en *M. ruficauda* podría estar relacionado con una estrategia de resolución de la competencia denominada deprivación nutricional, un tipo de supresión fisiológica que está relacionada con los requerimientos nutricionales de cada organismo o especie particular. En este caso la primera larva que se active y utilice estas señales químicas del hospedador podría tener el efecto de suprimir el desarrollo de la larva competidora.

Las decisiones tomadas por las larvas en los eventos de parasitismo en general tienen repercusiones sobre el *fitness* del adulto parasitoide que emerge, las cuales se traducen en su condición corporal, desempeño de actividades y supervivencia. En esta Tesis, los moscardones provenientes de la cría en superparasitismo mostraron una condición corporal mayor que los adultos criados individualmente. Para el caso de los adultos desarrollados bajo competencia, ni el orden de llegada ni el sexo mostraron diferencias en el *fitness* de los adultos. En cambio se encontró una relación positiva entre el peso del hospedador al momento de ocurrencia del parasitismo y la carga alar del adulto parasitoide, tanto para los adultos provenientes de monoparasitismo y superparasitismo. Únicamente en los moscardones que fueron criados bajo competencia se halló influencia positiva pero débil entre el peso del hospedador y su condición corporal. La supervivencia, en cambio, en ningún caso fue influenciada por el peso de *C. signaticollis* parasitado. El hecho que el peso corporal no influya sobre las decisiones de parasitismo que toman las larvas se contrapone con los hallados en adultos donde se encontró que el peso tiene cierta influencia en la carga alar, uno de los estimadores de *fitness* del adulto. Por este motivo se esperaría encontrar en la larva parasitoide alguna habilidad de sensor o medir el tamaño del hospedador, dado que el tamaño en general está relacionado con el contenido energético del hospedador. Dado que este parasitoide sensa y discrimina químicamente otros parámetros de calidad del hospedador, se espera que utilice un mecanismo similar al evaluar el peso corporal. Sin embargo, dado que la intensidad de la clave no modula la respuesta de orientación de la larva, un hospedador *C. signaticollis* más grande, aunque aporte una mayor intensidad de clave al ambiente, no resultará más atractivo para el parasitoide. Sin embargo, la calificación del tamaño del hospedador bajo algún método es posible, dado que se ha registrado en algunas avispas parasitoides que el tamaño del hospedador puede ser estimado por contacto mediante el anteneo del adulto. De todos modos, este mecanismo parece poco probable para la larva de *M. ruficauda*, dado su escaso tamaño respecto al hospedador. En trabajos previos sobre otros modelos parasitoides, se ha sugerido la posible utilización de claves

mecánicas en el reconocimiento de los hospedadores por lo que sería interesante explorar este aspecto en la selección de hospedadores mediante trabajo experimental.

El hospedador como recurso, ya sea en base a su peso como al estado de parasitismo, ha mostrado tener cierta influencia sobre el *fitness* del moscardón, debido a la existencia de un efecto del tamaño del hospedador sobre la capacidad teórica de dispersión del adulto, tanto para parasitoides criados bajo competencia como individualmente. Por este motivo, el tamaño puede resultar importante para el desarrollo durante el estado larval, pero no limitante y podría ser por ello que *C. signaticollis* no sea discriminado y seleccionado por las larvas en base a esta característica. En este escenario, la existencia de un umbral para la discriminación de hospedadores óptimos, donde una vez superado determinado tamaño o peso del hospedador el parasitoide lo acepte y pueda desarrollarse exitosamente, es una posibilidad que no se debe dejar de tener en cuenta. Por otra parte, aquellas larvas parasitoides que se desarrollan bajo competencia intrínseca muestran adultos que parecen tener una mejor condición corporal que aquellos derivados de larvas criadas en forma solitaria. Una vez más a lo largo de este trabajo, surgió evidencia que, al menos en un grado leve, el superparasitismo podría resultar beneficioso para el individuo que gana la competencia y se desarrolla. En otros modelos se han encontrado patrones similares y se ha sugerido que los hospedadores superparasitados brindan un mayor potencial de crecimiento para el parasitoide que sobrevive a la competencia, dado que la tasa de uso e ingestión de alimentos está relacionada positivamente con la cantidad de larvas que están parasitando al hospedador. El hecho de que las larvas se orienten hacia coespecíficos, junto con la probabilidad equitativa de ganar la competencia bajo biparasitismo y que el moscardón adulto pareciera desarrollarse con una mayor cantidad de reservas energéticas cuando lo hace en presencia de otras larvas, sumado a que las larvas en estado libre criadas de manera gregaria bajan los umbrales de selectividad y aceptan hospedadores subóptimos como óptimos, sugiere que en esta especie el superparasitismo podría ser un comportamiento que contribuye a maximizar la supervivencia del individuo durante la etapa larval e inclusive y mejorar la condición corporal en su vida adulta.

Por último, dado que *M. ruficauda* es considerado una plaga cíclica de la apicultura, los aportes de conocimiento a su particular biología son esenciales para definir estrategias de control. En esta Tesis se han presentado diferentes metodologías de laboratorio para estudiar y dilucidar los mecanismos por los cuales este parasitoide se orienta y selecciona a sus hospedadores. A su vez, el hecho de realizar experimentos manipulativos en el laboratorio permite regular algunos parámetros de la calidad del hospedador y condiciones de cría para evaluar posteriormente su influencia en el desarrollo del adulto. Estas mismas metodologías pueden ser utilizadas para otros modelos de

parasitoides de importancia económica. No obstante, este estudio abre otros interrogantes sobre *M. ruficauda* que deberán resolverse a futuro para continuar con la investigación. Se ha puesto en evidencia la necesidad de conocer más aspectos de la ecología química de los hospedadores que son considerados subóptimos por este parasitoide, ya sea por tratarse de otras especies potenciales a *C. signaticollis* que se presentan perturbados mecánicamente o bajo otro estresor como ser estar previamente parasitado. Además, y dado que distintos resultados de este trabajo han sugerido que podría existir una estrategia “cooperativa” de parasitismo, sería conveniente profundizar en esta temática mediante estudios sobre la supervivencia de las larvas criadas bajo mayores niveles de competencia y la *performance* de los adultos resultantes, en relación con aquellos que emergen de hospedadores monoparositados. Estas nuevas preguntas y sus respuestas permitirán a futuro entender en mayor profundidad la biología y ecología de esta particular especie y a su vez aumentar el escaso conocimiento de aquellos sistemas parasitoide - hospedador similares al estudiado en esta Tesis. En general, la bibliografía e información previa están enfocadas en otro tipo de interacciones y actores, no profundizan en las características ecológicas distintivas de estos sistemas, y se centran en especies pertenecientes a otros grupos taxonómicos con una historia coevolutiva diferente, por o tanto, la realización de nuevos trabajos de investigación en este grupo particular de parasitoides es un aporte valioso y original al magro acervo de conocimiento existente. En particular, este trabajo aporta un antecedente de estudio para aquellos parasitoides con una biología tan compleja como la de *M. ruficauda*, con una estrategia de búsqueda del hospedador compartida donde es la larva quien lleva a cabo la etapa final de la búsqueda y selección activa del hospedador.

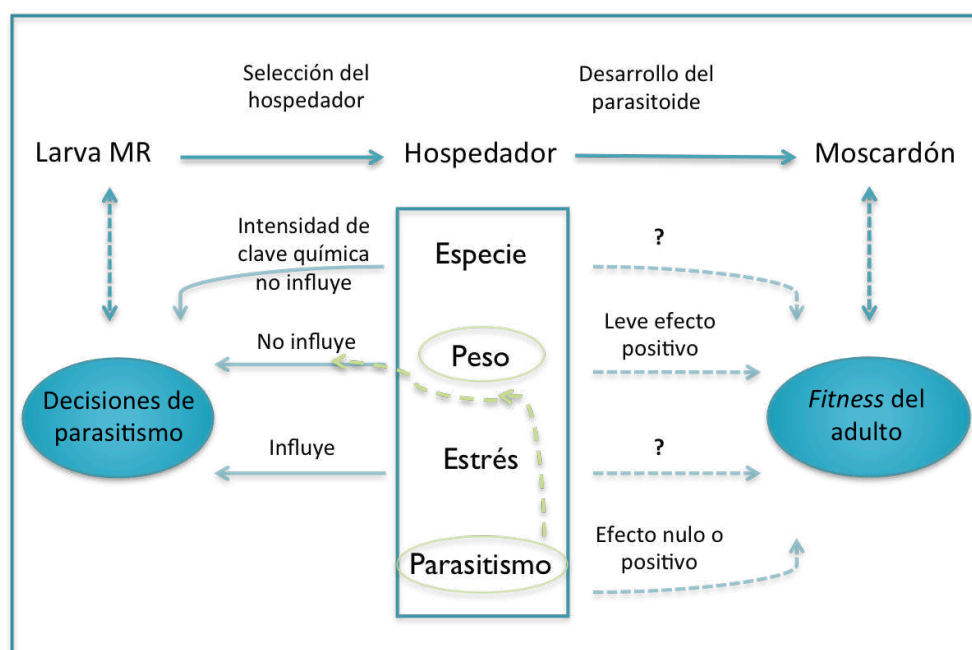


Figura 8.1. Esquema de los interrogantes que se respondieron en esta Tesis, relacionados con la calidad del hospedador durante la etapa larvaria y su influencia sobre el éxito reproductivo potencial del parasitoide adulto.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

- Agboka K, Schulthess F, Chabi-Olaye A, Labo I, Gounou S & Smith H** (2002) Self-, intra-, and inter-specific host discrimination in *Telenomus busseolae* Gahan and *T. Isis* Polaszek (Hymenoptera: Scelionidae), sympatric egg parasitoids of the African cereal stem borer *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Behavior*, 15: 1–12.
- Alim MA & Taek Lim U** (2011) Interspecific larval competition between two egg parasitoids in refrigerated host eggs of *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Biocontrol Science and Technology*, 21(4): 395-407.
- Alcock J.** (1998) *Animal Behaviour: An Evolutionary Approach*, 6ta Edición. Sinauer Associates Inc. Publishers. Estados Unidos, 720 pp.
- Ali AD & Harivandi MA** (1987) White grubs in lawns. *Biology and Insect Management Series*. Cooperative Extension, University of California. Leaflet 21442.
- Alvarado L** (1980) Sistemática y bionomía de los estados inmaduros de coleópteros Scarabaeidae que habitan en el suelo. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo-UNLP, La Plata, Argentina.
- Alvarado L** (1983) Daños de insectos del suelo en semillas de plantas cultivadas. INTA Estación Experimental Regional Agropecuaria Pergamino, Informe Técnico nº 180: 7 pp. Trabajo presentado al IX Seminario Panamericano de semilla, Bs. As., 1980.
- Álvarez Castillo HA, López AN, Vincini AM, Carmona D & Manetti PL** (1993) Relevamiento de los insectos del suelo en cultivos de papa del sudeste bonaerense. Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA – Estación Experimental Agropecuaria Balcarce Boletín Técnico 118: 18 pp.
- Amarasekare KG, Mannion CM & Epsky ND** (2010) Host instar susceptibility and selection and interspecific competition of three introduced parasitoids of the mealybug *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Environmental Entomology*, 39: 1506-1512.
- Amat I, Castelo M, Desouhant E & Bernstein C** (2006) The influence of temperature and host availability on the host exploitation strategies of sexual and asexual parasitic wasps of the same species. *Oecologia* 148, 153–161.
- Angelo MJ & Slansky Jr F** (1984) Body building by insects: trade-offs in resource allocation with particular reference to migratory species. *Florida Entomologist*: 22-41.
- Ardia DR** (2005) Super size me: an experimental test of the factors affecting lipid content and the ability of residual body mass to predict lipid stores in nestling European Starlings. *Functional Ecology*, 19(3): 414-420.
- Arribas P, Velasco J, Abellán P, Sánchez-Fernández D, Andujar C, Calosi P, Millán A, Ribera I & Bilton DT** (2012) Dispersal ability rather than ecological tolerance drives differences in range size between lentic and lotic water beetles (Coleoptera: Hydrophilidae). *Journal of Biogeography*, 39(5): 984-994.
- Artigas JN** (1970) Los Asílidos de Chile (Diptera: Asilidae). *Gayana, Zoología* 17: 1-437.
- Artigas JN & Angulo AO** (1980) Revisión del género *Mallophora* Maquart por sistemática alfa y taxonomía numérica (Diptera: Asilidae). *Gayana, Zoología* 43:1-182.
- Artigas JN, Papavero N & Serra AL** (1991) The American genera of Asilidae (Diptera): keys for identification with an atlas of Hermann (Lapriinae), with descriptions of two genera and three new species, and a catalogue of Neotropical species. *Gayana* 55(1): 53-85.
- Askew RR & Shaw MR** (1986) Parasitoid communities: their size, structure and development. En: *Insect Parasitoids*. Editado por: Waage J & Greathead D, 13th Symposium of Royal Entomological Society of London. pp. 225-264.
- Atkinson SN & Ramsay MA** (1995) The effects of prolonged fasting of the body composition and reproductive success of female polar bears (*Ursus maritimus*). *Functional Ecology*: 559-567.

- Bai B & Mackauer M** (1992) Influence of superparasitism on development rate and adult size in a solitary parasitoid wasp. *Functional Ecology* 6: 302-307.
- Balderrama N, Núñez J, Guerrieri F & Giurfa M** (2002) Different functions of two alarm substances in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 188: 485-491.
- Barrantes ME** (2009) Influencia de la especie de hospedador sobre la fisiología y comportamiento de las larvas del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 57 pp.
- Barrantes ME & Castelo MK** (2014) Host specificity in the host-seeking larva of a dipteran parasitoid *Mallophora ruficauda* and the influence of age on parasitism decisions. *Bulletin of Entomological Research*, 104: 295-306.
- Barrette M, Boivin G, Brodeur J & Giraldeau LA** (2010) Travel time affects optimal diets in depleting patches. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(4): 593-598.
- Barrows EM** (2011) *Animal behavior desk reference: a dictionary of animal behavior, ecology, and evolution*. CRC press, 922 pp.
- Baude M, Danchin É, Mugabo M & Dajoz I** (2011) Conspecifics as informers and competitors: an experimental study in foraging bumble-bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, rspb20102659.
- Beckage NE** (1991) Host-parasite hormonal relationships: a common theme?. *Experimental Parasitology*, 72(3): 332-338.
- Belshaw R** (1994) Life history characteristics of Tachinidae (Diptera) and their effect on polyphagy. En: *Parasitoid community ecology*. Editado por: Hawkins BA & Sheehan W. Oxford University Press, 615 pp.
- Benelli G, Gennari G & Canale A** (2013) Host discrimination ability in the tephritid parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Pest Science*, 86(2): 245-251.
- Bernal JS, Luck RF & Morse JG** (1999) Host influences on sex ratio, longevity, and egg load of two *Metaphycus* species parasitic on soft scales: implications for insectary rearing. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92(2): 191-204.
- Bernstein C & Jervis M** (2008) Food-searching in parasitoids: the dilemma of choosing between immediate or future fitness gains. En: *Behavioral ecology of insects*. Editado por: Wajnberg E, Bernstein C & van Alphen J. Blackwell, 445 pp.
- Bernstein C, Kacelnick A & Krebs JR** (1991) Individual decisions and the distribution of predators in a patchy environment. II. The influence of travel costs and structure of the environment. *Journal of Animal Ecology*, 60: 205–225.
- Bernstein C, Auger P & Poggiale JC** (1999) Predator Migration decisions, the Ideal Free distribution and predator-prey dynamics. *American Naturalist*, 153: 267–81.
- Berwaerts K, Van Dyck H & Aerts P** (2002) Does flight morphology relate to flight performance? An experimental test with the butterfly *Pararge aegeria*. *Functional ecology*, 16(4): 484-491.
- Bezemer TJ, Harvey JA, Kamp AFD, Wagenaar R, Gols R, Kostenko O, Fortuna T, Engelkes T, Vet LEM, van der Putten WH & Soler R** (2010) Behavior of male and female parasitoids in the field: influence of patch size, host density, and habitat complexity. *Ecological Entomology*, 35: 341-351.
- Blengino, C** (2013) Sector apícola 2013 - Informe anual de coyuntura N° 3. URL http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/otros/apicola/informes/2013_02Feb.pdf

- Boivin G** (2010) Phenotypic plasticity and fitness in egg parasitoids. *Neotropical Entomology*, 39(4): 457-463.
- Boivin G & Gauvin M-J** (2009) Egg size affects larval performance in a coleopteran parasitoid. *Ecological Entomology*, 34: 240-245.
- Böckmann EA, Tormos J, Beitia F & Fischer K** (2012) Offspring production and self-superparasitism in the solitary ectoparasitoid *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae) in relation to host abundance. *Bulletin of Entomological Research*, 102: 131-137.
- Bottrell DG, Barbosa P & Gould F** (1998) Manipulating natural enemies by plant variety selection and modification: a realistic strategy? *Annual Review of Entomology* 43: 347-367.
- Braendle C & Weisser W W** (2001) Variation in escape behavior of red and green clones of the pea aphid. *Journal of Insect Behavior*, 14: 497-509.
- Brodeur J & Boivin G** (2004) Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 49: 27-49.
- Cannon WB** (1939) *The Wisdom of the Body*. New York: Norton. (En el libro *Hormones, Brain and Behavior*).
- Cardé RT & Millar JG** (Eds.) (2004) *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge University Press.
- Carmona DM, Vincini AM, López AN, Álvarez Castillo HA & Manetti PL** (1994) Cambios estacionales en la comunidad de "insectos del suelo" en el cultivo de papa en el sudeste bonaerense. Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA, Estación Experimental Agropecuaria, Balcarce. *Boletín Técnico*, 126, 15 pp.
- Caron V, Myers JH & Gillespie DR** (2010) The failure to discriminate: superparasitism of *Trichoplusia ni* Hübner by a generalist tachinid parasitoid. *Bulletin of Entomological Research*, 100: 255-261.
- Castelo MK** (2002) Moscardón cazador de abejas, *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Algunas consideraciones sobre su presencia en los apiarios. *Ciencia Apícola*, 1(1): 10-18.
- Castelo MK** (2003) Comportamiento de localización y patrones de explotación de hospedadores (Coleoptera: Scarabaeidae) por el moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 169 pp.
- Castelo MK** (2007) Determinación de los estadios del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y del hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) que intervienen en la relación de parasitismo. II Reunión Argentina de Parasitoidólogos. Ciudad de Córdoba, Córdoba. Argentina. 22-23/11/2007. Resumen: 13.
- Castelo MK** (en preparación) Oviposición strategy in the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae).
- Castelo MK & Capurro AF** (2000) Especificidad y densidad-dependencia inversa en parasitoides con oviposición fuera del hospedador: el caso de *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) en la pampa argentina. *Ecología Austral* 10: 89-101.
- Castelo MK & Corley JC** (2004a) Oviposition behaviour in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(5): 1050-1054.
- Castelo MK & Corley JC** (2004b) Evaluación de la capacidad reguladora del moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) sobre los gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 33(1): 61-80 INTA, Argentina.
- Castelo MK & Corley JC** (2010) Spatial density dependent parasitism and specificity in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Austral Ecology*, 35:72-81.

- Castelo MK & Crespo JE** (2012) Incidence of non-immunological defenses of soil white grubs on parasitism success of *Mallophora ruficauda* larva (Diptera: Asilidae). *Insects*, 3: 692-708.
- Castelo MK & Lazzari CR** (2004) Host-seeking behavior in larvae of the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Journal of Insect Physiology*, 50(4): 331-336.
- Castelo MK, Ney-Nifle M, Corley JC & Berstein C** (2006) Oviposition height increases parasitism success by the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61: 231-243.
- Charnov EL** (1976) Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theoretical population biology*, 9(2): 129-136.
- Chen YL, Hung YS & Yang EC** (2008) Biogenic amine levels change in the brains of stressed honeybees. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 68(4): 241-250.
- Cherry RH & Schueneman TJ** (1998) Insect management in sugarcane. Department of entomology, University of Florida, cooperative extension service, Institute of food and agricultural sciences. ENY-406 series.
- Clements AN & Bennett FD** (1969) The structure and biology of a new species of *Mallophora* Macq. (Diptera: Asilidae) from Trinidad, W.I.- *Bulletin of Entomological Research*, 58(3): 455-463.
- Clark RW** (2007) Public information for solitary foragers: timber rattlesnakes use conspecific chemical cues to select ambush sites. *Behavioral Ecology*, 18: 487-490.
- Clark CW & Mangel M** (2000) *Dynamic State Variable Models in Ecology: Methods and Applications*. Oxford University Press: New York.
- Colinet H, Salin C, Boivin G & Hance TH** (2005) Host age and fitness-related traits in a koinobiont aphid parasitoid. *Ecological Entomology*, 30(4): 473-479.
- Copello A** (1922) Biología del moscardón cazador de abejas (*Mallophora ruficauda* Wied.). *Physis*, 6: 30-42.
- Copello A** (1927) Biología del moscardón cazador de abejas (*Mallophora ruficauda* Wied.). Publicación del Ministerio de Agricultura de la Nación, Sección Propagandas e Informes, Circular 699: 18 pp.
- Copello A** (1942) Moscardón cazador de abejas. *Revista de Apicultura*, 19(200): 13-14; (218): 4-5; (219): 10-11; 220: 13-14; (221): 14; (222): 12-13.
- Cooperband MF & Vinson SB** (2000) Host-acceptance requirements of *Melittobia digitata* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of mud dauber wasps. *Biol. Control* 17:23-28.
- Cotton S, Small J & Pomiankowski A** (2006) Sexual selection and condition-dependent mate preferences. *Current Biology*, 16(17): 755-765.
- Cranshaw WS & Zimmerman R** (1998) Billbugs and white grubs. Home & Garden, 5.516, Colorado State University, Insect Series.
- Crespo JE** (2007) Supervivencia y duración de los estadios larvales del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae): El papel de la edad en el comportamiento de orientación hacia el hospedador. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 78 pp.
- Crespo JE & Castelo MK** (2008) The ontogeny of host-seeking behaviour in a parasitoid dipteran. *Journal of Insect Physiology*, 54: 842-847.
- Crespo JE & Castelo MK** (2009) Insights to host discrimination and host acceptance behavior in a parasitoid (Diptera: Asilidae): Implications for fitness. *Journal of Insect Physiology*, 55: 1072-1078.

- Crespo JE & Castelo MK** (2010) Life history traits in a parasitoid dipteran species with free living and obligate parasitic immature stages. *Physiological Entomology*, 35: 160-167.
- Crespo JE & Castelo MK** (2012) Barometric pressures influences host-orientation behavior in the larva of a dipteran ectoparasitoid. *Journal of Insect Physiology*, 58: 1562-1567.
- Crespo, JE, Lazzari CR & Castelo MK** (2011) Orientation mechanisms and sensory organs involved in host location in a dipteran parasitoid larva. *Journal of Insect Physiology*, 57: 191-196.
- Crespo JE, Martínez GA & Castelo MK** (2015) Exposure to competitors influences parasitism decisions in ectoparasitoid fly larvae. *Animal Behaviour*, 100: 38-43.
- Crouzel IS de** (1965) Parasitismo en gusanos blancos en la República Argentina (Coleoptera, Scarabaeidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 27(1/4): 83-87.
- Crutchfield BA & Potter DA** (1995) Damage relationships of Japanese beetle and southern masked chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in cool-season turfgrasses. *Journal of Economic Entomology* 88: 1049-1056.
- Cusumano A, Peri E, Vinson SB & Colazza S** (2011) Intraguild interactions between two egg parasitoids exploring host patches. *BioControl* 56:173–184.
- Cusumano A, Peri E, Vinson SB & Colazza S** (2012a) Interspecific extrinsic and intrinsic competitive interactions in egg parasitoids. *BioControl*, 57: 719-734.
- Cusumano A, Peri E, Vinson SB & Colazza S** (2012b) The ovipositing female of *Ooencyrtus telenomicida* relies on physiological mechanisms to mediate intrinsic competition with *Trissolcus basalidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143(2): 155-163.
- Dall SR, Giraldeau LA, Olsson O, McNamara JM & Stephens DW** (2005) Information and its use by animals in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 20: 187–193.
- Danchin E, Giraldeau LA, Valone TJ & Wagner RH** (2004) Public information: from nosy neighbors to cultural evolution. *Science*, 305: 487–491.
- Dennis DS & Knutson L** (1988) Descriptions of pupae of South American robber flies (Diptera, Asilidae). *Annals of Entomological Society of América*, 81(6): 851-864.
- De Santis LG** (1989) El moscardón cazador de abejas. *Revista Industria Apícola*, 1(1): 16-24. Edit. Por Coop. Apícola Ltda. del Oeste de Mones Cazón. Prov. Bs. As.
- De Santis LG & Cornejo L** (1990) El moscardón cazador de abejas "*Mallophora ruficauda*". Conferencia Cooperativa Apícola del oeste Ltda. de Mones Cazón, 25 de Agosto de 1990: 17 pp.
- Desouhant E, Driessen G, Amat I & Bernstein C** (2005) Host and food searching in a parasitic wasp *Venturia canescens*: a trade-off between current and future reproduction? *Animal Behaviour*, 70: 145-152.
- Dindo ML** (2011) Tachinid parasitoids: are they to be considered as koinobionts? *BioControl*:56(3), 249-255.
- Dicke M** (2006) Chemical ecology from genes to communities – Integrating ‘omics’ with community ecology. En: *Chemical ecology – From gene to Ecosystem*. Editado por: Dicke M & Takken W. Serie Wageningen UR Frontis, Springer Publishing, Dordrecht, Holanda, 190 pp.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M & Robledo CW** (2014). InfoStat, versión 2014, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dudley R** (1990) Biomechanics of flight in neotropical butterflies: morphometrics and kinematics. *Journal of Experimental Biology*, 150(1): 37-53.

- Even N, Devaud JM & Barron AB** (2012) General stress responses in the honey bee. *Insects*, 3: 1271-1298.
- Eller FJ, Tumlinson JH & Lewis WJ** (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.
- Ellers J, van Alphen JJM & Sevenster JG** (1998) A field study of size-fitness relationships in the parasitoid *Asobara tabida*. *Journal of Animal Ecology*, 67: 318-324.
- Escobedo G, Roberts CW, Carrero JC & Morales-Montor J** (2005) Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?. *Trends in Parasitology*, 21(12): 588-593.
- Even N, Devaud JM & Barron AB** (2012) General Stress Responses in the Honey Bee. *Insects*, 3: 1271-1298.
- Feener DH Jr & Brown BV** (1997) Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 42: 73-97.
- Fellowes MDE, van Alphen JJM & Jervis MA** (2005) Foraging Behaviour. En: *Insects as natural enemies*. Editado por: Jervis MA. Springer, Holanda, 755 pp.
- Fischer S, Samietz J, Wäckers FL & Dorn S** (2001) Interaction of vibrational and visual cues in parasitoid host location. *Journal of Comparative Physiology* 187: 785–791.
- Fretwell SD & Lucas HJ Jr** (1970) On territorial behaviour and other factors influencing habitat distribution in birds. *Acta Biotheoretica*, 19: 16-36.
- Fretwell SD** (1972) *Populations in a Seasonal Environment*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Fritzsche Hoballah ME, Tamo C & Turlings TCJ** (2002) Differential attractiveness of induced odors emitted by eighty maize varieties for parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology* 28(5): 951-968.
- Geller-Grimm F** (2010) Asilidae homepage: <http://www.geller-grimm.de/asilidae.htm>.
- Gibb H, Hjältén J, Ball JP, Pettersson RB, Landin J, Alvini O & Danell K** (2006) Wing loading and habitat selection in forest beetles: Are red-listed species poorer dispersers or more habitat-specific than common congeners?. *Biological Conservation*, 132(2): 250-260.
- Godfray HCJ** (1994) *Parasitoids. Behavior and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ: 473 pp.
- Gonzalez PI, Montoya P, Perez-Lachaud G, Cancino J & Liedo P** (2007) Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 40: 320-326.
- Goubault M, Fourrier J, Krespi L, Poinso D & Cortesero AM** (2004) Selection strategies of parasitized hosts in a generalist parasitoid depend on patch quality but also on host size. *Journal of Insect Behavior*, 17: 99 – 113.
- Goubault M, Outreman Y, Poinso D & Cortesero AM** (2005) Patch exploitation strategies of parasitic wasps under intraspecific competition. *Behavioral Ecology*, 16: 693-701.
- Goubault M, Plantegenest M, Poinso D & Cortesero AM** (2003) Effect of expected offspring survival probability on host selection in a solitary parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 109(2): 123-131.
- Groba HF** (2014). Caracterización morfológica de las larvas y de los receptores olfativos del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y determinación del origen de las claves químicas en el

hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 162 pp.

Groba HF & Castelo MK (2012) Chemical interaction between the larva of a dipteran parasitoid and its coleopteran host: A case of exploitation of the communication system during the searching behaviour? *Bulletin of Entomological Research*, 102(3): 315.

Groba HF, Lauría de Cidre LS & Castelo MK (2014) Description of antennal structures of the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) and its relationship with resources searching behaviour. *Zoomorphology*, 133(2): 191-204.

Gross, P (1993) Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 38, 251-273.

Gu H, Wang Q & Dorn S (2003) Superparasitism in *Cotesia glomerata*: response of hosts and consequences for parasitoids. *Ecological Entomology*, 28: 422-431.

Guerrieri E, Poppy GM, Powell W, Tremblay E & Pennacchio F (1999) Induction and systemic release of herbivore-induced plant volatiles mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 25(6): 1247-1261.

Guerrieri E, Poppy GM, Rao R & Pennacchio F (2002) Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 28(9): 1703-1715.

Guerrieri F, Schubert M, Sandoz JC & Giurfa M (2005) Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS biology*, 3(4), e60.

Guppy JC & Harcourt DG (1973) A sampling plan for studies on the population dynamics of beetle larvae, *Phyllophaga spp.* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Can Entomol* 105, 479-483.

Häckermann J, Rott AS & Dorn S (2007) How two different host species influence the performance of a gregarious parasitoid: host size is not equal to host quality. *Journal of Animal Ecology*, 76(2): 376-383.

Harvey JA, Harvey IF & Thompson DJ (1993) The effect of superparasitism on development of the solitary parasitoid wasp, *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ecological Entomology*, 18(3): 203-208.

Harvey JA (2000) Dynamic effects of parasitism by an endoparasitoid wasp on the development of two host species: implication for host quality and parasitoid fitness. *Ecological Entomology*, 25: 267-278.

Harvey JA (2005) Factors affecting the evolution of development strategies in parasitoid wasps: the importance of functional constraints and incorporating complexity. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 117: 1-13.

Harvey JA, Gols R & Strand MR (2009a). Intrinsic competition and its effects on the survival and development of three species of endoparasitoid wasps. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 130: 238-248.

Harvey JA, Wagenaar R & Bezemer TM (2009b). Life-history traits in closely related secondary parasitoids sharing the same primary parasitoid host: evolutionary opportunities and constraints. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132: 155-164.

Harvey JA, Gumovsky A & Gols R (2012) Effect of host-cocoon mass on adult size in the secondary hyperparasitoid wasp, *Pteromalus semotus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Insect Science*, 19: 383-90.

Harvey JA, Poelman EH & Tanaka T (2013) Intrinsic inter- and intraspecific competition in parasitoid wasp. *Annual review of Entomology*, 58: 333-351.

- Hawkins BA** (1994) *Pattern & Process in Host-Parasitoid Interactions*. Cambridge University Press. Great Britain. 190pp.
- Hassel MP** (2000) *The spatial and temporal dynamics of host-parasitoid interaction*. Oxford University Press, Oxford. 200 pp.
- Hassell MP & May RM** (1974) Aggregation of predators and insect parasites and its effect on stability. *The Journal of Animal Ecology*, 567-594.
- Hoffmann AA** (1994) Genetic analysis of territoriality in *Drosophila melanogaster*. *Quantitative Genetic Studies of Behavioural Evolution*, 188-205.
- Holmstrup M, Bindsbøl AM, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, Köhler HR, ... & Spurgeon DJ** (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of the Total Environment*, 408: 3746-3762.
- Hubbard SF & Cook RM** (1978). Optimal foraging by parasitoid wasps. *The Journal of Animal Ecology*, 593-604.
- Hughes NF & Grand TC** (2000) Physiological ecology meets the ideal-free distribution: predicting the distribution of size-structured fish populations across temperature gradients. *Environmental Biology of Fishes*, 59(3): 285-298.
- Huising MO & Flik G** (2005) The remarkable conservation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-binding protein in the honeybee (*Apis mellifera*) dates the CRH system to a common ancestor of insects and vertebrates. *Endocrinology*, 146: 165– 170.
- Ichiki RT, Ho GTT, Wajnberg E, Kainoh Y, Tabata J & Nakamura S** (2012) Different uses of plant semiochemicals in host location strategies of the two tachinid parasitoids. *Naturwissenschaften* 99: 687-694.
- Irvin NA, Hoddle MS & Morgan DJW** (2006) Competition between *Gonatocerus ashmeadi* and *G. triguttatus* for glassy winged sharpshooter (*Homalodisca coagulata*) egg masses. *Biocontrol Science and Technology*, 16: 359–375.
- Ismail M, Van Baaren J, Hance T, Pierre JS & Vernon P** (2013) Stress intensity and fitness in the parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae): temperature below the development threshold combined with a fluctuating thermal regime is a must. *Ecological Entomology*, 38(4): 355-363.
- Javois J & Tammaru T** (2006) The effect of egg load on readiness to accept a low-quality host plant is weak and age dependent in a geometrid moth. *Ecological Entomology* 31: 597-600.
- Jervis MA, Eilers J & Harvey JA** (2008) Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annual Review of Entomology*, 53: 361-385.
- Jervis MA, Heimpel GE, Ferns PN, Harvey JA & Kidd NA** (2001) Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. *Journal of Animal Ecology*, 70(3): 442-458.
- Jervis MA, Moe A & Heimpel GE** (2012) The evolution of parasitoid fecundity: a paradigm under scrutiny. *Ecology letters*, 15(4): 357-364.
- Johnson EC & White MP** (2009) Stressed-Out insects: Hormonal actions and behavioral modifications. En: *Hormones, Brain and Behavior*. Editado por: Pfaff DW, Arnold AP, Fahrbach SE, Etgen AM & Rubin RT. Academic Press, San Diego, EEUU. 3.592 pp.
- Jonsson M** (2003) Colonisation ability of the threatened tenebrionid beetle *Oplocephala haemorrhoidalis* and its common relative *Bolitophagus reticulatus*. *Ecological Entomology*, 28(2): 159-167.

- Kant R, Minor MA & Trewick SA** (2012) Fitness gain in a koinobiont parasitoid *Diaeretiella rape* (Hymenoptera: Aphidiidae) by parasitizing hosts of different ages. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15: 83-87.
- Khafagi WE & Hegazi EM** (2008) Does superparasitism improve host suitability for parasitoid development? A case study in the *Microplitis rufiventris-Spodoptera littoralis* system. *BioControl*, 53: 427-438.
- King** (1989) Host-size-dependent sex ratios among parasitoid wasps: does host growth matter? *Oecologia*, 78:420-426.
- Kitson FG, Larsen BS & McEwen CN** (1996) Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide. Academic Press, 369 pp.
- Kölliker-Ott UM, Blows MW & Hoffmann AA** (2003) Are wing size, wing shape and asymmetry related to field fitness of *Trichogramma* egg parasitoids?. *Oikos*, 100(3): 563-573.
- Kölliker-Ott UM, Bigler F & Hoffmann AA** (2004) Field dispersal and host location of *Trichogramma brassicae* is influenced by wing size but not wing shape. *Biological Control*, 31(1): 1-10.
- Koyama S, Thomas CE & Takata M** (2013) Relationship between the size of the parasitoid wasp *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae) and host ladybird species (Coleoptera: Coccinellidae). *Trends in Entomology*, 9: 39-43.
- Křivan V, Cressman R & Schneider C** (2008) The ideal free distribution: a review and synthesis of the game-theoretic perspective. *Theoretical Population Biology*, 73(3): 403-425.
- Labocha MK, Schutz H & Hayes JP** (2014) Which body condition index is best?. *Oikos*, 123(1): 111-119.
- Lawrence PO** (1986) Host-parasite hormonal interactions: an overview. *Journal of Insect Physiology*, 32(4): 295-298.
- Lawrence PO** (1990) The biochemical and physiological effects of insect hosts on the development and ecology of their insect parasites: An overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 13(3-4): 217-228.
- Laumann RA, Blassioli Moraes MA, Cokl A & Borges M** (2007) Eavesdropping on sexual vibratory signals of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) by the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Animal Behaviour* 73: 637-649.
- Lee Y, Kim H, Kang TJ & Jang Y** (2012) Stress response to acoustic stimuli in an aphid: A behavioral bioassay model. *Entomological Research*, 42(6): 320-329.
- Lefèvre T, de Roode JC, Kacsoh BZ & Schlenke TA** (2011) Defence strategies against a parasitoid wasp in *Drosophila*: fight flight? *Biology Letters*, doi:10.1098/rsbl.2011.0725
- Lewis WJ & Martin WR** (1990) Semiochemicals for use with parasitoids: status and future. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3067-3089.
- López AN, Alvarez Castillo HA, Carmona D, Manetti PL & Vincini AM** (1994) Aspectos morfológicos y biológicos de *Ciclocephala signaticollis* Burm. (Coleoptera: Scarabaeidae). Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA-Estación Experimental Agropecuaria, Balcarce. *Boletín Técnico* 123. 18 pp.
- Mackauer M & Chau A** (2001) Adaptive self superparasitism in a solitary parasitoid wasp: the influence of clutch size on offspring size. *Functional Ecology*, 15: 335-343.
- Mackauer M & Chow FJ** (2012) Facultative gregarious development in a solitary koinobiont parasitoid, *Ephedrus californicus*: implications of larval ecology and host constraints. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142: 203-210.

- Mangel M & Clark CW** (1988) *Dynamic Modelling in Behavioural Ecology*. Princeton University Press: Princeton.
- Marín-Loaiza JC & Céspedes CL** (2007) Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnica Mexicana* 30(4): 327-351.
- Marktl RC, Stauffer C & Schop A** (2002) Interspecific competition between the braconid endoparasitoids *Glyptapanteles porthetriae* and *Glyptapanteles liparidis* in *Lymantria dispar* larvae. *Entomologia experimentalis et applicata*, 105: 97-109.
- Mayoral L** (1999) Negocios apícolas: Tendencias globales, capacidades y carencias en la empresarización del sector. Una perspectiva argentina. *Revista Electrónica de Administración*, Agosto, 5 (2), 19 pp.
- Mohamed SA, Wharton RA, von Mérey G & Schulthess F** (2006) Acceptance and suitability of different host stages of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) and seven other tephritid fruit fly species to *Tetrastichus giffardii* Silvestri (Hymenoptera: Eulophidae). *Biological Control*, 39 : 262-271.
- Moon DC & Moon JC** (2010) Effects of environmental stress cascade up through four trophic levels in a salt marsh study system. *Ecological Entomology*, 35: 721-726.
- Morgan ED** (2004) *Biosynthesis in insects*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra, 199 pp.
- Mori K** (2010) Pheromones in chemical communication. En: *The chemistry and biology of volatiles*. Editado por: Herrmann A. Wiley-InterScience Oxford, Inglaterra, 402 pp.
- Moya-Laraño J** (2002) Senescence and food limitation in a slowly ageing spider. *Functional Ecology*, 16(6): 734-741.
- Moya-Laraño J, Macías-Ordóñez R, Blanckenhorn WU & Fernández-Montraveta C** (2008) Analysing body condition: mass, volume or density?. *Journal of Animal Ecology*, 77(6), 1099-1108.
- Muller KL, Stamps JA, Krishnan VV & Willits NH** (1997) The effects of conspecific attraction and habitat quality on habitat selection in territorial birds (*Troglodytes aedon*). *The American Naturalist*, 150 (5): 650-661.
- Musso JJ** (1978) Recherches sur le développement, la nutrition et l'écologie des Asilidae (Diptera-Brachycera). These de Doctorat. Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille, Faculté des Sciences et Technique de Saint-Jérôme. 312 pp.
- Musso JJ** (1981) Morphology and development of the immature stages of some robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis*, 7(1): 89-104.
- Musso JJ** (1983) Nutritive and Ecological requirements of robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis*, 9(1/2): 35-50.
- Nicol CMY & Mackauer M** (1999) The scaling of body size and mass in a host-parasitoid association: influence of host species and stage. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90(1): 83-92.
- Nussenbaum AL** (2007) Comportamiento de oviposición y estrategia de ovigenia en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 86 pp.
- Oaten A** (1977) Optimal foraging in patches: a case for stochasticity. *Theoretical population biology*, 12(3), 263-285.
- Oaten A & Murdoch WW** (1975) Functional response and stability in predator-prey systems. *American Naturalist*, 289-298.
- Orre GUS, Wratten SD, Jonsson M & Hale RJ** (2010) Effects of an herbivore-induced plant volatile on arthropods from three trophic levels in brassicas. *Biological Control*, 53: 62-67.

- Ozkan C** (2006) Effect of host diet on the development of the solitary egg-larval parasitoid: *Chelonus oculator* in superparasitized *Ephestia kuehniella*. *Phytoparasitica*, 34: 338-346.
- Pfaff DW, Arnold AP, Fahrbach SE, Etgen AM & Rubin RT** (Eds.) (2009) *Hormones, Brain and Behavior*, 2da Ed. Academic Press, 3.591 pp.
- Peig J & Green AJ** (2010) The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*, 24: 1323-1332.
- Pekas A, Aguilar A, Tena A & Garcia-Marí F** (2010) Influence of host size on parasitism by *Aphytis chrysomphali* and *A. melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) in Mediterranean populations of California red scale *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae). *Biological Control*, 55(2): 132-140.
- Perić-Mataruga V, Nenadović V & Ivanović J** (2006) Neurohormones in insect stress: A review. *Archives of Biological Science Belgrade* 58: 1-12.
- Potter DA** (1998) *Destructive Turfgrass Insects: Biology, diagnosis and control*. Ann Arbor Press, Chelsea, MI, 336 pp.
- Potter MF & Potter DA** (1981) Controlling White Grubs in Turfgrass. In: "Bug Dope", May 6, 1981. Cooperative Extension Service, Ohio State University.
- Potting RPJ, Snellen HM & Vet LEM** (1997) Fitness consequences of superparasitism and mechanism of host discrimination in the stemborer parasitoid *Cotesia flavipes*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82(3): 341-348.
- Przewlocki R** (2009) Stress, opioid peptides, and their receptors. En: *Hormones, Brain and Behavior*. Editado por: Pfaff DW, Arnold AP, Fahrbach SE, Etgen AM & Rubin RT. Academic Press, San Diego, EEUU. 3.592 pp.
- Raitanen J, Forsman JT, Kivelä SM, Mäenpää MI & Välimäki P** (2013) Attraction to conspecific eggs may guide oviposition site selection in a solitary insect. *Behavioral Ecology*, art092.
- Rabinovich M** (1994) Un importante predador de abejas: El moscardón cazador de abejas (*Mallophora ruficauda*). *Anales del IV Congreso Iberolatinoamericano de Apicultura*. Córdoba. Argentina.
- Rabinovich M & Corley JC** (1997) An important new predator of honey bees. The robber fly *Mallophora ruficauda* Wiedemann (Diptera-Asilidae) in Argentina. *American Bee Journal*, 137(4): 303-306.
- Rabinovich M & Quiroga RM** (1995) Moscardón cazador de abejas. *Jornada de Sanidad Apícola*. Pigué. 5 pp.
- Redmond CT & Potter DA** (2010) Incidence of turf-damaging white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) and associated pathogens and parasitoids on Kentucky golf courses. *Environmental Entomology* 39(6): 1838-1847.
- Rees CJC** (1970) Age dependency of response in an insect chemoreceptor sensillum. *Nature*, 227: 740-742.
- Remedi de Gavotto AL** (1964) Ciclo biológico de *Cyclocephala signaticollis* Burm. (Coleoptera, Scarabaeidae) y caracteres específicos de su larva. *INTA. Revista de Investigaciones Agropecuarias, Serie 5*, 1(10): 151-161.
- Ribak G, Pitts ML, Wilkinson GS & Swallow JG** (2009) Wing shape, wing size, and sexual dimorphism in eye-span in stalk-eyed flies (Diptera: Diopsidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(4): 860-871.
- Roelofs WL & Brown RL** (1982) Pheromones and evolutionary relationships of Tortricidae. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 13: 395-422.

- Roitberg B & Bernhard P** (2007) State-dependent problems for parasitoids: case studies and solutions. En: Wajnberg E, Bernstein C & van Alphen JJM (Eds) (2008) Behavioural Ecology of Insect Parasitoids. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 445 pp.
- Roitberg BD, Mangel M, Lalonde RG, Roitberg CA, van Alphen JJM & Vet LEM** (1992) Seasonal dynamic shifts in patch exploitation by parasitic wasps. Behavioral Ecology, 3:156–165
- Royer L, Fournet S, Brunel E & Boivin G** (1999) Intra- and interspecific host discrimination by host-seeking larvae of coleopteran parasitoids. Oecologia, 118: 59-68.
- Ruiz F** (1925) Voracidad de los Asílidos (Dípteros). Revista Chilena de Historia Natural, 29: 220-224.
- Sabelis MW, Van Baalen M, Pels B, Egas M & Janssen A** (2002) Evolution of exploitation and defense in tritrophic interactions, en Adaptative dynamics of infectious diseases: in pursuit of virulence management, Dieckmann, U., et al. (Eds.), pp 297-321. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 552 pp.
- Salvadori JR** (1997) Manejo de corós em cereais de inverno. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 3:1-8.
- Schmid-Hempel R. & Schmid-Hempel P** (1996) Larval development of two parasitic flies (Conopidae) in the common host *Bombus pascuorum*. Ecological Entomology, 21:63-70.
- Schmidt JM & Smith JJB** (1987) Short interval time measurement by a parasitoid wasp. Science, 237: 903-905.
- Schulte-Hostedde AI, Millar JS & Hickling GJ** (2001) Evaluating body condition in small mammals. Canadian Journal of Zoology, 79(6): 1021-1029.
- Schulte-Hostedde AI, Zinner B, Millar JS & Hickling GJ** (2005) Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. Ecology, 86(1): 155-163.
- Selye H** (1936) A Syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, 138: 32-32.
- Selye H** (1956) What is stress? Metabolism, 5: 525–530.
- Selye H** (1976) Forty years of stress research: Principal remaining problems and misconceptions. Canadian Medical Association Journal, 115: 53-56.
- Silva RJ, Cividanes FJ, Pedroso EC & Sala SRD** (2011) Host quality of different aphid species for rearing *Diaeretiella rapae* (McIntosh) (Hymenoptera: Braconidae). Neotropical Entomology, 40(4): 477-482.
- Sirot E & Bernstein C** (1997) Food searching and superparasitism in solitary parasitoids. Acta Oecologica, 18 (2): 63-72.
- Sirot E, Ploye H & Bernstein C** (1997) State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. Behavioral Ecology, 8: 226-232.
- Sjerps M & Haccou P** (1994) Effects of competition on optimal patch leaving: a war of attrition. Theoretical Population Biology, 46: 300–318.
- Smitley DR** (1996) Incidence of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) and other scarab larvae in nursery fields. Journal of Economic Entomology 89(5): 1262-1266.
- Sokal RR & Rohlf FJ** (1980) Introducción a la bioestadística. Serie de Biología Fundamental. Editorial Reverté: 362 pp.
- Speight MR, Hunter MD & Watt AD** (2008) Ecology of insects: concepts and applications. Blackwell Science Ltd., 640 pp.
- Stamps JA** (1987) Conspecifics as cues to territory quality: a preference of juvenile lizards (*Anolis aeneus*) for previously used territories. American Naturalist, 629-642.

- Steidle JL, Lanka J, Müller C & Ruther J** (2001) The use of general foraging kairomones in a generalist parasitoid. *Oikos*, 95(1): 78-86.
- Steidle JL, Steppuhn A & Ruther J** (2003). Specific foraging kairomones used by a generalist parasitoid. *Journal of Chemical Ecology*, 29(1): 131-143.
- Steidle JLM, Van Loon JJA** (2003) Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 108: 133–148.
- Stevenson D & Woods WA** (2006) Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 1169–1190.
- Stowe MK, Turlings TCJ, Loughrin JH, Lewis WJ & Tumlinson JH** (1995) The chemistry of eavesdropping, alarm and deceit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 92: 23-28.
- Tena A, Kapranas A, Walker GP, Garcia-Marí F & Luck RF** (2011) Larval morphology of *Metaphycus flavus* and its role in host attachment and larval cannibalism. *Bulletin of Entomological Research*, 101(03): 365-372.
- Tentelier C, Desouhant E & Fauvergue X** (2006) Habitat assessment by parasitoids: mechanisms for patch use behavior. *Behavioral Ecology*, 17(4): 515-521.
- Terblanche JS & Anderson B** (2010) Variation of foraging rate and wing loading, but not resting metabolic rate scaling, of insect pollinators. *Naturwissenschaften*, 97(8): 775-780.
- Tian SP, Zhang JH, Yan YH & Wang, CZ** (2008) Interspecific competition between the ichneumonid *Campoletis chlorideae* and the braconid *Microplitis mediator* in their host *Helicoverpa armigera*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 127: 10-19.
- Tunca H & Kilinçer 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.
- Turlings TCJ, Loughrin JH, McCall PJ, Röse USR, Lewis WJ & Tumlinson JH** (1995) How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 92: 4169-4174.
- Turlings TCJ & Wäckers F** (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants, en *Advances in Insect Chemical Ecology*, Carde, R.T. y Millar, J.G. (Eds.), pp 21-75. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 352 pp.
- Valone TJ & Templeton JJ** (2002) Public information for the assessment of quality: a widespread social phenomenon. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 357: 1549–1557.
- van Alphen JJM & Visser ME** (1990) Superparasitism as an adaptive strategy of insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 35: 59-79.
- van Baleen M & Hemerik L** (2008) Parasitoid fitness: From a single idea to an intricate concept. En: *Behavioural Ecology of Insect Parasitoids*. Editado por: Wajnberg E, Bernstein C & van Alphen JJM. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 445 pp.
- Vet LEM & Dicke M** (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology*, 37: 141-172.
- Vet LEM, Hemerik L, Visser ME & Wäckers FE** (2002) Flexibility in host-search and patch-use strategies in insect parasitoids. En: *The Behavioural Ecology of Parasites*. Editado por: Lewis EE, Campbell JF & Sukhdeo MVK. CAB International, 3: 39-64.

- Vet LEM, Lewis WJ & Carde RT** (1995) Parasitoid foraging and learning, *Chemical Ecology of Insect 2*, Carde, R.T. y Bell, W.J. (Eds.), pp 65-101. Springer Publishing, Nueva York, E.E.U.U., 434 pp.
- Vet LEM, Wäckers FL & Dicke M** (1991) How to hunt for hiding host: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology* 41: 202-213.
- Vinson SB & Hegazi EM** (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.
- Visser ME, van Alphen JJM & Nell HW** (1990) Adaptive superparasitism and time allocation in solitary parasitoids: the influence of the number of parasitoids depleting the patch. *Behaviour*, 114: 21–36.
- Visser ME, Luyckx B, Nell HW & Boskamp GJF** (1992) Adaptive superparasitism in solitary parasitoids: marking of parasitised hosts in relation to the pay-off from superparasitism, *Ecological Entomology*, 17: 76–82.
- Waage JK** (1979) Foraging for patchily-distributed hosts by the parasitoid, *Nemeritis canescens*. *Journal of Animal Ecology*, 48: 353–371.
- Waage JK** (1983) Aggregation in field parasitoid populations: foraging time allocation by a population of *Diadegma* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Ecological Entomology*, 8: 447- 453.
- Wäckers FL & Lewis WJ** (1999) A comparison between color- shape- and pattern-learning by the hymenopteran parasitoid *Microplitis croceipes*. *Journal of Comparative Physiology A*, 184: 387-393.
- Wajnberg E, Bernhard P, Hamelin F & Boivin G** (2006) Optimal patch time allocation for time-limited foragers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60: 1-10.
- Wajnberg E, Bernstein C & van Alphen JJM** (2008) *Behavioral ecology of insects*. Blackwell, 445 pp.
- Wang XG & Messing RH** (2004) Fitness consequences of body-size-dependent host species selection in a generalist ectoparasitoid. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 56: 513-522.
- Wang XY, Yang ZQ, Wu H & Gould JR** (2008) Effects of host size on the sex ratio, clutch size, and size of adult *Spathius agrili*, an ectoparasitoid of emerald ash borer. *Biological Control*, 44(1): 7-12.
- Wang XY, Yang ZQ, Gould JR, Wu H & Ma JH** (2010) Host-seeking behavior and parasitism by *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the emerald ash borer. *Biological Control* 52: 24–29.
- Webb PI, Speakman JR & Racey PA** (1992) Inter- and intra- individual variation in wing loading and body mass in female pipistrelle bats: theoretical implications for flight performance. *Journal of Zoology*, 228(4): 669-673.
- Weber CA, Smilanick JM, Ehler LE, Zalom FG** (1996) Ovipositional behavior and host discrimination in three scelionid egg parasitoids of stink bugs. *Biological Control* 6:245–252
- Weisser WW & Houston AI** (1993) Host discrimination in parasitic wasps: When is it advantageous? *Functional Ecology*, 7: 27-39.
- Werthein I** (1981) 40 años en el mundo maravilloso de las abejas. Dist. G.D.A., Buenos Aires, 238 pp.
- Wiskerke JSC, Dicke M & Vet LEM** (1993) Larval parasitoid uses aggregation pheromone of adult hosts in foraging behavior: a solution to the reliability-detectability problem. *Oecologia*, 93: 145- 148.
- Wood GC** (1981) Asilidae. En: McAlpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey HJ, Vockeroth JR & Wood DM (Eds.): *Manual of Nearctic Diptera*. Volume 1. - Research Branch, Agriculture Canada, Monographs 27: 549-573; Ottawa.

- Wyatt TD** (2003) Pheromones and animal behavior: Communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 391 pp.
- Xu HY, Yang NW & Wan FH** (2013) Competitive interactions between parasitoids provide new insight into host suppression. *PloS one*, 8: e82003.
- Yamada YY & Miyamoto K** (1998) Payoff from self and conspecific superparasitism in a dryinid parasitoid, *Haplogonatopusatraus*. *Oikos*, 81: 209-216.
- Yazdani M & Keller M** (2015) Mutual interference in *Dolichogenidea tasmanica* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) when foraging for patchily-distributed Light Brown Apple Moth. *Biological Control*, doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.01.004.
- Yeates DK & Greathead D** (1997) The evolutionary pattern of host use in the Bombyliidae (Diptera): a diverse family of parasitoid flies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60(2): 149-185.
- Zar JH** (2010). *Biostatistical Analysis*, 5^a ed. Prentice-Hall, 944 pp.
- Zaviezo T & Mills N** (2000) Factors influencing the evolution of clutch size in a gregarious insect parasitoid. *Journal of Animal Ecology*, 69: 1047–1057.
- Zermoglio PF & Castelo MK** (2015) Elección del hospedador en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae): ¿El peso corporal es un factor importante? IX Congreso Argentino de Entomología. Posadas, Misiones, Argentina.
- Zhang JH, Gu LQ & Wang CZ** (2010) Superparasitism behavior and host discrimination of *Campoletis chloridae* (Ichneumonidae: Hymenoptera) toward *Mythimna separata* (Noctuidae: Lepidoptera). *Environmental Entomology*, 39: 1249-1254.
- Zhao Y, Bretz CA, Hawksworth SA, Hirsh J & Johnson EC** (2010) Corazonin neurons function in sexually dimorphic circuitry that shape behavioral responses to stress in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5(2): e9141. doi:10.1371/journal.pone.0009141.
- Zhao L & Jones WA** (2012) Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 93-101.

María Eugenia Barrantes

Marcela Castelo