Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Parámetros poblacionales de Ochlerotatus albifasciatus (Diptera: Culicidae) en poblaciones de clima diferente (árido de estepa y templado húmedo)

Garzón, Maximiliano Javier

2015-07-20

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:
Garzón, Maximiliano Javier. (2015-07-20). Parámetros poblacionales de Ochlerotatus albifasciatus (Diptera: Culicidae) en poblaciones de clima diferente (árido de estepa y templado húmedo). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Garzón, Maximiliano Javier. "Parámetros poblacionales de Ochlerotatus albifasciatus (Diptera: Culicidae) en poblaciones de clima diferente (árido de estepa y templado húmedo)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-07-20.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Parámetros poblacionales de *Ochlerotatus albifasciatus* (Díptera: Culicidae) en poblaciones de clima diferente

(árido de estepa y templado húmedo)

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

Garzón Maximiliano Javier

Director de tesis: Dr. Nicolás J. Schweigmann

Lugar de trabajo: Grupo de Estudio de Mosquitos, IEGEBA-CONICET.

Lugar y fecha de defensa: Buenos Aires, 20 de julio de 2015

Parámetros poblacionales de

***Ochlerotatus albifasciatus* (Díptera: Culicidae) en poblaciones de clima diferente**

(árido de estepa y templado húmedo)

RESUMEN

Ochlerotatus albifasciatus es un mosquito de inundación con una amplia distribución Neotropical, demostrando una capacidad de proliferación en distintos climas y sugiriendo variabilidad entre sus poblaciones geográficas.
El objetivo fue comparar características o parámetros relacionados al ciclo de vida de una población de clima árido (Sarmiento, Chubut) respecto a una de clima templado (Buenos Aires).
Se registró en campo la actividad de los adultos y las variables asociadas. Se obtuvieron huevos a partir de hembras locales. En laboratorio se indujo la eclosión y se siguió el desarrollo a distintas temperaturas. Se midieron los tamaños de las alas y se determinó su conformación mediante la técnica de morfometría geométrica.
La dinámica de los adultos en Sarmiento se asoció a la temperatura, el viento, la nubosidad y a la práctica de riego por inundación.
Evidencias de variaciones locales fueron halladas en el umbral térmico, la supervivencia, el tiempo durante el desarrollo de las formas inmaduras y la conformación alar de los adultos.
Por otra parte no se hallaron diferencias entre las regiones para supervivencia de los huevos a temperaturas de congelación y el tamaño corporal en función de la temperatura indicando posibles caracteres conservados.
Algunas características del ciclo de vida mostraron posibles respuestas adaptativas a las condiciones climáticas locales.

PALABRAS CLAVES:

Parámetros poblacionales, mosquito de patagonia, mosquitos de inundación, tiempo de desarrollo, supervivencia pre-imaginal, resistencia al congelamiento, adaptaciones locales, variación geográfica.

Ochlerotatus albifasciatus population parameters (Diptera: Culicidae) in populations from different climate (arid steppe and temperate humid)

ABSTRATC

Ochlerotatus albifasciatus is a floodwater mosquito with a wide Neotropical distribution. This demonstrating a proliferation capacity in different climates and it could suggest variability among geographical populations.
The aim of this project was to compare characteristics or parameters related to the life history of a population from arid climate (Sarmiento, Chubut) with respect to from the temperate climate (Buenos Aires).
In the field the adult activity and associated variables were recorded. Eggs were obtained from local females. In the laboratory, It was induced the hatching, and then the development of immature stadia was followed at different temperatures. It was measured the wing size, and their conformation was determined by geometric morphometric techniques.
The dynamics of adults in Sarmiento was associated with temperature, wind, cloud cover and the practice of flooding irrigation.
In the immature forms evidences of local variations were found in the thermal threshold, survival and the development time, while in the adult only in the wing shape. For another hand, egg survival to freezing temperatures like the body size in function of temperature did not show differences between regions. Possibly this could indicate that some characteristics were have preserved.
Some features of the life history showed possible adaptive responses to local climatic conditions.

KEYWORDS:

Population parameters, Patagonian mosquito, floodwater mosquitoes, development time, pre-imaginal survival, resistance to freezing, local adaptations, geographic variation.

Agradecimientos

- A mi director, Nicolás Schweigmann, por su valiosa orientación, confiar en mis capacidades, y brindarme el tiempo necesario para desarrollar esta tesis.
- A Sylvia, quien un día vino a hablarme sobre la idea de hacer una tesis doctoral y desde entonces estar siempre predispuesta a mis consultas.
- A mi mujer y mi hija por su enorme paciencia y apoyo incondicional, durante estos años de tesis, los cuales no fueron pocos.
- A mis viejos por el cariño, afecto y valores, con los cuales me educaron y me formaron como persona, y los cuales tratare de repetir con mi hija.
- A mis compañeros de trabajo por su amistad y hacer que venir al labo sea un relajo.
- A mi familia por brindarme todo su apoyo, siempre y en todo momento.
- A mis amigos por estar siempre ahí, presentes no solo físicamente.
- Y a todos aquellos a los que de alguna u otra manera han colaborado para hacer factible esta tesis.

A mi pequeña Isabel,

“ella decide cuando es de día, ella maneja el sol”
(V. Heredia)

INDICE

INTRODUCCION GENERAL……9

OBJETIVO GENERAL……..14
OBJETIVOS PARTICULARES…...……14
HIPOTESIS GENERALES……..15
FUNDAMENTOS DE HIPOTESIS……15
HIPOTESIS PARTICULARES……17
PREDICCIONES……...18

MATERIALES Y METODOS GENERALES……19

SITIOS DE ESTUDIO……...19
TRABAJO DE CAMPO……....23
RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO……..24

CAPITULO I: Factores ambientales relacionados con la actividad de *Ochlerotatus albifasciatus* en el valle de Sarmiento (Chubut) respecto de la región templada…...…27

I. RESUMEN……..……...28
I. INTRODUCCION……..……29
I. OBJETIVO……..……30
I. MATERIALES Y METODOS……..……31
I. RESULTADOS……..……..……...38
I. DISCUSION……..……49

CAPITULO II: Resistencia a temperaturas de congelamiento en huevos de *Ochlerotatus albifasciatus*……55

II. RESUMEN…..……..…56

II. INTRODUCCION……...57
II. OBJETIVO……..……..59
II. MATERIALES Y METODOS……..……60
II. RESULTADOS…..……...65
II. DISCUSION……..……70

CAPITULO III: Respuestas térmicas en la biología pre-imaginal de *Ochlerotatus albifasciatus*……76

III. RESUMEN……..……77
III. INTRODUCCION……..……..78
III. OBJETIVO……..……80
III. MATERIALES Y METODOS……..……..81
III. RESULTADOS……..……..87
III. DISCUSION……..……...95

CAPITULO IV: Morfometría geométrica en alas de *Ochlerotatus albifasciatus*…..…...99

IV. RESUMEN……..……..100
IV. INTRODUCCION……..……...101
IV. OBJETIVO……..……..103
IV. MATERIALES Y METODOS……..……104
IV. RESULTADOS…….....107
IV. DISCUSION……..112

CAPITULO V: Comparación de los tiempos de desarrollo de *Ochlerotatus albifasciatus* en laboratorio (temperatura constante) y en campo (temperatura fluctuante)……..115

V. RESUMEN……..……116
V. INTRODUCCION……..……117
V. OBJETIVO……..……119
V. MATERIALES Y METODOS……..……..120
V. RESULTADOS……..……124
V. DISCUSION……..……..130

DISCUSION GENERAL……133

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS……..……..142

APENDICE…… ……..157

Se adjuntan publicaciones (con referato internacional) realizadas a partir de los datos resultantes de esta tesis:

- Garzón M. J., O. Jensen & N. Schweigmann. 2013. Resistance to freezing temperatures in *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart) eggs (Diptera: Culicidae) from two different climatic regions of Argentina. J. Vector Ecol. 38 (2): 339-344.

- Garzón M. J., O. Jensen & N. Schweigmann. 2014. Environmental Factors Related to the Abundance and Activity of *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) in an Agricultural Landscape of Steppe Arid Climate. J. Med. Entomol. 51(4): 733-741.

- Garzón M. J. & N. Schweigmann. 2015. Thermal response in pre-imaginal biology of *Ochlerotatus albifasciatus* from two different climatic regions. Med. Vet. Entomol. (aceptado).

INTRODUCCION GENERAL

Los insectos responden a las variaciones ambientales a través de un amplio rango de respuestas eco-fisiológicas, tales como las tasas de crecimiento, los tiempos de desarrollo, la diapausa, la resistencia al frío, entre otras características del ciclo de vida (Danks 2006). Por ejemplo se ha observado que en las especies multivoltinas la intensidad de la diapausa se incrementa hacia latitudes más altas (Massaki 1999) y correlaciona positivamente con la rigurosidad del invierno y negativamente con la duración de la estación favorable para la reproducción (Danks 2006).

La adaptación por resistencia al frio en las poblaciones geográficas de insectos está determinada por el tipo de ambiente en el que pasan la mayor parte del tiempo y es proporcional a los extremos térmicos anuales (Jing & Kang 2003). La mayoría de los organismos maximizan el crecimiento, el desarrollo y la reproducción con el incremento de la latitud, debido a la menor duración de la estación cálida favorable, respecto de los recursos aprovechables.

Se ha observado que especies de regiones tropicales poseen umbrales de temperatura mínima de desarrollo superiores al de las especies de regiones templadas. Como las especies tropicales desarrollan en ambientes con rango térmico cálido, no sería adaptativamente ventajoso tener un umbral de desarrollo a muy bajas temperaturas (Honek 1996).

A nivel morfológico se ha observado que el tamaño de los artrópodos es proporcional al incremento de la latitud. La repetición de esta relación, a través de los distintos taxones y

en varios continentes, sugiere una respuesta adaptativa a las variaciones bióticas y/o abióticas a lo largo del gradiente latitudinal (Ambruster & Conn 2006). Probablemente la selección natural haya actuado sobre los caracteres morfológicos dentro de este gradiente con sus respectivos climas (Vinogradova 2003, Ambruster & Conn 2006)

La selección natural podría causar en algunas sub-poblaciones, la evolución de ciertos caracteres que provean una ventaja adaptativa bajo ciertas condiciones ambientales locales. Para ello debería existir un polimorfismo estable, donde cada fenotipo este óptimamente adaptado a un tipo de hábitat. Sin embargo en la naturaleza existe una tensión constante entre el potencial efecto diferenciador de la selección natural (que favorece las adaptaciones locales) y el efecto homogeneizador del flujo génico (Mopper & Strauss 1998, Kawecki & Ebert 2004), que disminuye la variación y conserva la arquitectura genética de los caracteres (Kawecki & Ebert 2004).

Las diferencias térmicas entre regiones tropicales y templadas no siempre resultan en poblaciones con adaptaciones locales visibles para todas las características fisiológicas (Jing & Kang 2003). Por ejemplo, existen poblaciones templadas de distintas latitudes que no difieren en la resistencia al frio, pero difieren en cuanto a la respuesta al fotoperiodo (Bradshaw et al. 2000). Esto hace que la interpretación de los efectos del ambiente térmico sobre la evolución de las características adaptativas dependa en muchos casos de los componentes del fitness o de los caracteres examinados (Bradshaw et al. 2000).

En los culícidos se ha demostrado que la actividad y abundancia de los adultos varia en relación con la temperatura, humedad, precipitación (Yang et al. 2008, Pinto et al. 2009, Gray et al. 2011), vegetación, actividad humana (Okogun et al. 2003), viento, etc. Estos factores que suelen caracterizar a un determinado paisaje a nivel local o regional influyen directamente sobre las dinámicas poblacionales de esta familia de insectos.

En el desarrollo de los estadios inmaduros se han observado variaciones regionales de las tasas metabólicas (ej. mas elevadas a altas latitudes). Esto indicaría adaptaciones poblacionales a veranos cortos y frescos o a veranos más largos y calurosos (Trimble & Smith 1978, Ayres & Scriber 1994). Un mayor metabolismo a mayores latitudes podría explicarse por un aumento en la concentración de enzimas o por cambios cualitativos en la estructura de las enzimas que incrementan la afinidad con los sustratos (Ayres & Scriber 1994). La variación en la respuesta metabólica con la latitud, afectaría parámetros térmicos, como el umbral mínimo y la constante térmica del desarrollo. Así también como el tamaño final de los adultos emergentes.

Ochlerotatus albifasciatus es un mosquito que cría en “aguas de inundación” o “floodwater mosquitoes”. Prolifera en charcos temporarios ubicados en todo tipo de pastizales o microambientes con distintos periodos de inundación. Su área de distribución abarca diferentes regiones (Mitchel & Darsie 1985, Rossi et al. 2006) con distintos tipos de paisajes y ambientes, incluyendo zonas extremas como sitios elevados o microambientes de aguas salobres (Duret 1954, Bachmann & Casal 1962). Se distribuye aproximadamente al sur del paralelo 17 S, desde Santa Cruz de la Sierra, Bolivia (Prosen et al. 1962/63) y Rio de Janeiro, Brasil (Forattini 1965, Lourenco de Oliveira 1984), llegando hasta Tierra de Fuego, Argentina (Prosen et al., 1960; Bachmann & Bejarano 1960, Burroni et al. 2011); y desde las costas del Océano Atlántico hasta las costas del Océano Pacifico (Angulo & Olivares 1993). Por lo que podría decirse que es el mosquito silvestre de distribución más austral del planeta.

Desde el punto de vista sanitario, las hembras de esta especie de mosquito, requieren principal atención ya que han mostrado capacidad vectorial para el virus de la Encefalitis Equina del Oeste (EEO) (Avilés et al. 1992). Por otro lado, las grandes explosiones

demográficas suelen afectar negativamente la producción del ganado en pie (Raña et al. 1971) y causan molestias tanto a humanos como animales domésticos (Prosen et al. 1960, Forattini 1965).

Las hembras luego de la fecundación depositan alrededor de 50 a 100 huevos sobre la tierra húmeda alrededor de los charcos temporarios (Ludueña Almeida & Gorla 1995). Los huevos depositados en el sustrato eclosionaran dependiendo de las condiciones climáticas. En el caso de la región templada, si las condiciones son favorables, los huevos, caracterizados por su resistencia a la sequía, pueden madurar dentro de los diez días a temperaturas templadas (Fava et al. 2001) y suelen permanecer en estado de quiescencia, hasta eclosionar por el estímulo de una inundación (Service 1993). Si las condiciones se presentaran desfavorables, por ejemplo bajas temperaturas, la población de huevos podría entrar en diferentes grados de diapausa (Campos & Sy 2006).

Para *Oc. albifasciatus* se han realizados algunos estudios sobre la dinámica poblacional en la región templada. En los mismos se ha observado que la abundancia relativa reflejada en la actividad varía en función del tipo de ambiente (Gleiser & Gorla 1997), y está asociada fuertemente a los regímenes de precipitación (Almirón & Brewer 1994, Almirón & Brewer 1995, Gleiser & Gorla 1997, Fontanarrosa et al. 2000, Fava et al. 2001, Fischer et al. 2002). Mientras que el patrón de actividad diurna depende de las condiciones térmicas (Hack et al. 1978, Ludueña Almeida & Gorla 1995).

En la región patagónica no existen estudios sobre la actividad y abundancia de los adultos de *Oc. albifasciatus.*, mientras que los estadios inmaduros han sido detectados en cuerpos de agua asociados al sistema de riego de las áreas agrícolas (Burroni et al. 2007) y durante el periodo primavera-verano cuando las precipitaciones son escasas (Elissalde et al. 1998, Ñancucheo et al. 2008).

En el valle de Sarmiento, (Chubut) durante el periodo estival, la presencia de zonas anegadas, producto del sistema de riego por inundación utilizado en las prácticas agropecuarias, podrían favorecer la proliferación de *Oc. albifasciatus* con la presencia de todos los estadios del ciclo de vida. Las marcadas diferencias climáticas y de paisaje entre Sarmiento y Buenos Aires generan interrogantes acerca de posibles diferencias en la dinámica espacio temporal de *Oc. albifasciatus*. Es probable que en cada región los distintos estadios del ciclo de vida hayan desarrollado características particulares que respondan a diferentes dinámicas térmicas a lo largo del año. De aquí surge el interrogante respecto a si estas adaptaciones podrían mostrar cierta variabilidad entre las diferentes poblaciones locales, o permanecer conservadas en la especie.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la existencia de variaciones geográficas (o de respuestas similares) de la ecología y biología poblacional de *Ochlerotatus albifasciatus* de una región de clima árido respecto a una de clima templado.

Aportar al conocimiento, para una localidad patagónica (Sarmiento) comparativamente a la región templada (Buenos Aires), sobre los parámetros relacionados al ciclo de vida de *Oc. albifasciatus*, como la eclosión de huevos, el desarrollo de las formas inmaduras (tamaño, supervivencia, etc.), la morfología y actividad de los adultos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Evaluar la dinámica poblacional a nivel de la actividad de los adultos de *Oc. albifasciatus* en un valle patagónico respecto de lo conocido para las poblaciones de la región templada (pampa húmeda).

2) Evaluar diferencias o similitudes sobre parámetros y características del ciclo de vida entre individuos de *Oc. albifasciatus* provenientes de la Patagonia y la Pampa húmeda, en respuesta al clima local :

a) Resistencia al congelamiento de los huevos

b) Tiempo de desarrollo en función de la temperatura de cría

c) Supervivencia de las larvas durante el desarrollo

d) Tamaño de los adultos (como indicador de fecundidad o fitness)

3) Evaluar las variaciones geográficas entre poblaciones a partir del tamaño y la forma de las alas provenientes de individuos de Patagonia y la Pampa húmeda.

HIPOTESIS GENERALES

Hipótesis A: En las sub-poblaciones de *Oc. albifasciatus*, la actividad de adultos, la resistencia al congelamiento en huevos, la supervivencia y el desarrollo de los inmaduros y el tamaño de los adultos emergentes, varían en respuesta a adaptaciones térmicas locales. *Oc. albifasciatus* como especie es una composición de poblaciones localmente o regionalmente adaptadas

Hipótesis B: En las sub-poblaciones de *Oc. albifasciatus*, la actividad de adultos, la resistencia al congelamiento en huevos, la supervivencia y el desarrollo de los inmaduros y el tamaño de los adultos emergentes, mantienen similitudes en respuesta a las variaciones térmicas debido a posibles características evolutivamente conservadas.

FUNDAMENTOS DE HIPOTESIS

Las opciones hipótesis biológicas planteadas no poseen una predicción o dirección debido a que el estudio es exploratorio y los antecedentes demuestran que la adaptación local por parte de las diferentes características del ciclo de vida pueden ocurrir o no.

Las hipótesis generales se basan en que las características climáticas que dependen de la latitud (y la altitud) resultan en ciclos de vida con variaciones locales.

Las poblaciones de climas frescos (elevadas latitudes) completarían su ciclo de vida en una estación favorable relativamente más corta (Bentz et al. 2001, Addo Bediako et al. 2002).

La capacidad de *Oc. albifasciatus* para ocupar un amplio rango de distribución se funda en que algunos caracteres podrían ser adaptativos a nivel local, mientras que otros

podrían ser evolutivamente más conservados en todas las poblaciones geográficas. Una vez que un rasgo se ha vuelto genéticamente determinado, podría seguir siendo expresado incluso si un cambio ambiental hace que se pierda su ventaja (Stearns 1994, Kawecki & Ebert 2004).

Cuando las poblaciones están subdivididas por barreras topográficas que influyen en el grado de dispersión, interrumpiendo el flujo génico, y por otro lado están sujetas a condiciones ambientales heterogéneas o gradientes climáticos, se generaría la oportunidad para desarrollar adaptaciones locales y evolucionar en una variación clinal en las características fenológicas (Reznick & Ghalambor 2001).

Algunos caracteres del ciclo de vida no suelen variar marcadamente con la latitud o el clima debido a una canalización del carácter (mismo fenotipo), por ejemplo, la variación en el umbral superior de tolerancia térmica (Addo Bediako et al. 2000). Parece razonable asumir que las características que se encuentran íntimamente relacionados al fitness se mantengan fuertemente canalizadas como resultado de una selección estabilizadora del pasado (Nylin & Gottard 1998). Sin embargo, estas características pueden tener algún grado de plasticidad fenotípica.

Las características del ambiente pueden ser adversas, favorables, impredecibles o variables de un año a otro respecto de un parámetro estacional (Danks 2006). Dentro de los factores abióticos, la temperatura sería una fuente de variación ambiental que afectaría las características del ciclo de vida, importantes para el fitness (Bentz et al. 2001, Addo Bediako et al. 2002) y consideradas para las hipótesis particulares.

HIPOTESIS PARTICULARES

Hipótesis 1: La actividad de los adultos de *Oc. albifasciatus* depende de la temperatura, la humedad ambiente, la magnitud del viento y la actividad antrópica de una región.

Hipótesis 2: Los huevos de resistencia de *Oc. albifasciatus* de la región árida patagónica están adaptados a resistir la congelación.

Hipótesis 3: El desarrollo de las formas inmaduras de *Oc. albifasciatus* de altas o bajas latitudes se diferencian por desempeños más eficiente a bajas o altas temperaturas (respectivamente).

Hipótesis 4: Las adaptaciones a diferentes regiones se manifiestan en los rasgos morfológicos de los adultos.

PREDICCIONES

1) La actividad de *Oc. albifasciatus* en el valle de Sarmiento está acotada al corto periodo cálido y es favorecida por la actividad antrópica (riego por inundación). Los adultos mostrarán mayor actividad en los parches favorables (húmedos), reflejado en las altas abundancias relativas y menor en los desfavorables. Dicho patrón se relaciona con los factores microambientales (ej. temperatura, humedad, velocidad del viento).

2) Los huevos de ejemplares provenientes de las regiones áridas, Sarmiento, mostraran una mayor supervivencia (aptitud) frente a las temperaturas de congelación (bajo cero) respecto de los provenientes de regiones templadas, Buenos Aires.

3) Los estadios inmaduros provenientes de Sarmiento mostraran rendimientos óptimos, reflejados en tiempos de desarrollo cortos y elevadas supervivencias bajo temperaturas frías. Por el contrario, los ejemplares de Buenos aires los mostraran bajo temperaturas cálidas.

4) El tamaño (como indicador de fecundidad) de los ejemplares de *Oc. albifasciatus* a mayores latitudes como Sarmiento será mayor que el de los de Buenos Aires, mientras que la conformación de las alas mostrará un patrón característico para cada una de las poblaciones locales estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

SITIOS DE ESTUDIO

Para llevar a cabo los análisis comparativos y responder las preguntas formuladas, se han elegido dos regiones climáticas contrastantes con registros de *Ochlerotatus albifasciatus*: la región Templada Húmeda representada por la ciudad de Buenos Aires y la región Árida de Estepa representada por Sarmiento (Fig.1).

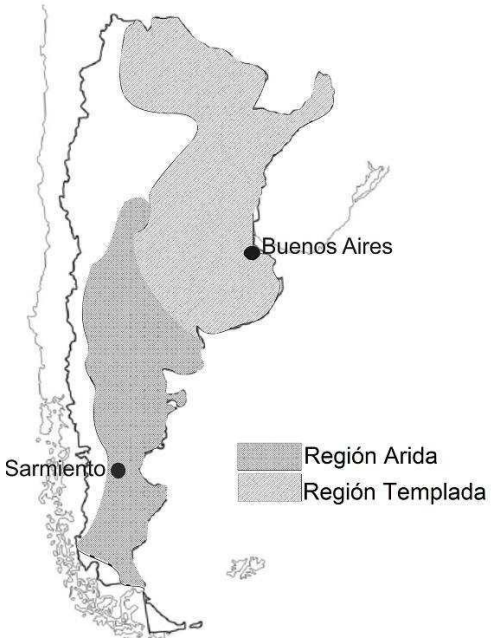


Fig.1. Sitios de estudio y regiones climáticas de Argentina (Peel *et a*l. 2007).

Para la elección de los sitios de estudio, se aprovecharon cuestiones operacionales y logísticas que facilitaron la ejecución del proyecto. En la ciudad de Buenos Aires se contó

con el apoyo del Instituto de Zoonosis Pasteur para la producción de huevos a partir de hembras capturadas en el campo. Mientras que en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA se realizaron los ensayos y análisis de laboratorio.

En la localidad de Sarmiento se contó con el apoyo del Departamento de Investigación en Salud (Ex Departamento de Zoonosis) dependiente de la Provincia de Chubut, donde se realizó la segunda producción de huevos a partir de hembras capturadas del campo y experimentos.

Aspectos climáticos y geográficos

a) Sarmiento

El valle de Sarmiento dentro del cual se encuentra ubicado el departamento de Sarmiento se haya en la Provincia de del Chubut, Argentina (45º35' Sur, 69º05' Oeste). Rodeado por los lagos Musters y Colhué Huapi, comprende un área pastoril de aproximadamente 42000 has, donde el 15% recibe riego por inundación, de las cuales 1400 has están destinadas a cultivos forrajeros (pasturas y alfalfares) (Ñancucheo et al. 2008). En la actualidad el rio Senguer que atraviesa el valle de Sarmiento no suele provocar inundaciones naturales, debido a que tiene un sistema de riego que se distribuye a través de una red de canales de aproximadamente 60km desde un azud a toda la zona agrícola-ganadera.

El valle patagónico representa un "oasis" húmedo dentro de una matriz desértica de estepa (Cabrera 1971). Se caracteriza por una heterogeneidad de parches dentro de un paisaje agrícola general. Los parches generan un mosaico claramente delimitado donde se pueden reconocer mallines, utilizados para el pastoreo o para cultivos, y zonas de estepa (Buono 2010) (Fig.2). Los primeros están representados por especies herbáceas

hidrófilas naturales (mallines) y por especies implantadas en áreas de cultivos (alfalfares, frutales, hortalizas), mientras que en las estepas prevalece la vegetación xerófila con dominio de especies arbustivas y subarbustivas (Elissalde et al. 1998).

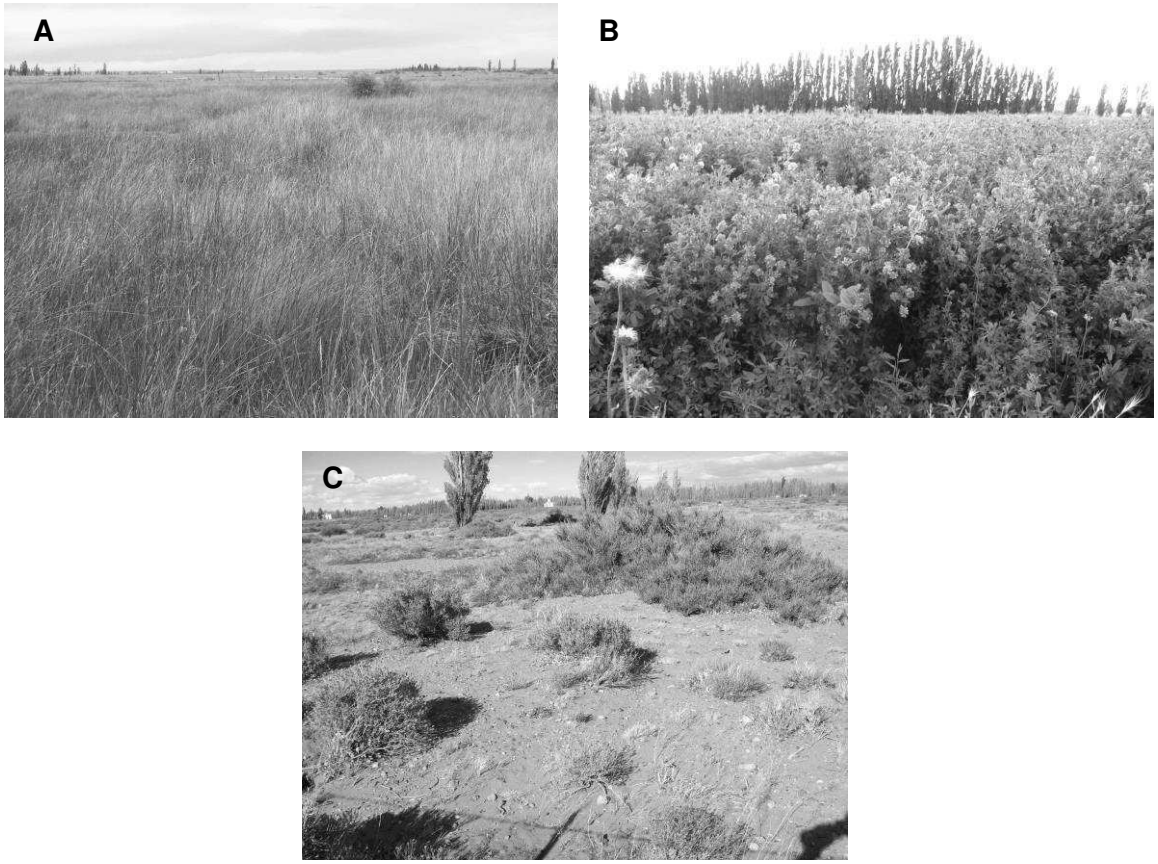


Fig.2. Microambientes presentes en el paisaje agrícola del valle Sarmiento (Chubut). A: Mallín, B: Área cultivada (alfalfar) y C: Parche de estepa

Sarmiento presenta un típico clima árido de estepa patagónico (Peel et al. 2007), con una marcada amplitud térmica anual. Las temperaturas máximas absolutas y medias del verano alcanzan los 39.3ºC y 17.8 ºC respectivamente. Mientras que en invierno las mínimas absolutas llegan a -33 ºC y las medias resultan de 4.1 ºC (serie 1931-1960) (Elissalde et al. 1998, Ñancucheo et al. 2008).

La precipitación media anual resulta de 147.2 mm (serie 1931-1960), siendo la estación fría la que presenta los mayores registros pluviales (Elissalde et al. 1998) mientras que en los meses cálidos no alcanza a promediar los 15 mm.

La humedad relativa media mensual resulta aproximadamente 75 a 80 % en invierno (Junio y Julio) y 40 % durante el verano (Ñancucheo et al. 2008).

Finalmente la región se caracteriza por ser una zona ventosa. Las ráfagas de viento entre períodos de calma son un fenómeno común y suelen presentar velocidades medias que oscilan entre los 8 y 30 km/h, registrándose los valores más altos en los meses cálidos y predominantemente del cuadrante oeste (Ñancucheo et al. 2008).

b) Buenos Aires

Buenos Aires (34° 35' Sur, 58° 22' Oeste), se ubica en un clima templado húmedo o sin estación seca (Peel et al 2007). Las temperaturas del aire de invierno tienen una media general de 11.5 ºC (serie 1961-1990) y una mínima absoluta de -5 ºC en 1918 (serie 1906-2011), (SMN-Servicio Meteorológico Nacional). Mientras que durante la estación estival, caracterizada por veranos cálidos (Burkart et al. 1999), con temperaturas que pueden alcanzar medias de 25 ºC y máximas absolutas de los 43ºC (1957).

En cuanto a la humedad relativa, el invierno es la estación más húmeda del año. Los valores medios normales de este parámetro alcanzan a 74-79% en junio- agosto. Durante el verano alcanzan a 63-68% en diciembre-febrero.

Las precipitaciones varían entre los 600 mm hasta los 1100 mm anuales (Burkart et al. 1999). El verano es la estación más lluviosa (342 mm). En otoño 304,7mm, concentra sus precipitaciones especialmente durante el mes de marzo.

El clima húmedo ha favorecido el desarrollo de suelos con altos contenidos de materias orgánicas y nutrientes, con excelente aptitud agrícola (Burkart et al. 1999).

La formación vegetal originaria característica de la región es el pastizal templado (Fig. 3), cuya comunidad dominante es el flechillar, de alta palatabilidad ganadera, en la que predominan diversos géneros de gramíneas (Burkart et al. 1999). Los cultivos de cereales finos, de lino, de girasol, de papa, etc. y los campos dedicados a la cría de vacunos, cubren prácticamente toda la superficie de la región, de modo que la vegetación primitiva ha sido alterada casi en su totalidad (Cabrera 1971).

Fig.3. Patizal Pampeano de la provincia de Buenos Aires

TRABAJO DE CAMPO

En ambas regiones de estudio se realizó un seguimiento de la dinámica poblacional (2009-2012) tratando de identificar los lugares y los momentos del año más favorables para la captura de mosquitos adultos. Para mantener la población en cautiverio, se realizaron capturas sucesivas hasta alcanzar un número de 200 a 300 ejemplares.

En el caso de Buenos Aires se visitaron parques, reservas y distinto espacios verdes durante todo el año. El nivel de abundancia relativa registrado durante las capturas diarias sirvió para intensificar los esfuerzos y lograr buenos números de capturas durante el periodo de muestreo. En todas las oportunidades, los esfuerzos de búsqueda y captura de

adultos se intensificaron en los días posteriores a los eventos de precipitación, de acuerdo a su estrecha relación según la literatura.

En determinados sitios se registraron las temperaturas y los estadios por fecha para determinar los tiempos de desarrollo en campo.

En el valle Sarmiento, los muestreos, para obtención de huevos a partir de hembras del campo y mediciones de actividad de adultos entre microambientes, se realizaron durante el mes más cálido del verano (enero). Las capturas de adultos se realizaron diariamente en distintas chacras pertenecientes a la zona agrícola.

Para estudiar comparativamente la dinámica poblacional de Sarmiento respecto de lo conocido para Buenos Aires se realizaron estimaciones de los tiempos de desarrollo de cohortes en campo. Además, se registraron las temperaturas y otras variables, durante los momentos de muestreos.

RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Una vez capturados, los mosquitos fueron colocados en cajas de cría (30x32x31 cm) con una pared y el piso de madera, dos laterales de plástico, un techo de tul y un frente con una manga de tela para manipular mosquitos e introducir o retirar recipientes (Fig.4).

Las hembras fueron acondicionadas a una temperatura ambiente del laboratorio (≈ 23 ºC) y un fotoperíodo de 14:10 (L : O). Las mismas fueron alimentadas diariamente con una solución de agua con azúcar mediante un recipiente cubierto y en contacto con un papel absorbente. Para mantener una humedad relativa elevada (> 80 %), en cada una de las cajas de cría se colocó un paño húmedo sobre la base y el techo, las cuales fueron humedecidas cada vez que fue necesario. Todo este conjunto (caja, paños, recipientes y mosquitos) fue cubierto con una bolsa plástica oscura para proveer sombra y mantener las condiciones de humedad.

Fig.4. Tres cajas de cría y acondicionamiento. Las hembras de *Oc. albifasciatus* capturadas en campo se introdujeron en ellas utilizando las mangas que se observan al frente de cada una. En la parte posterior se puede observar las bolsas oscuras con las que fueron cubiertas para proveer sombra y mantener la humedad.

Para nutrir a las hembras durante el proceso de maduración de los huevos, se les brindó una fuente de sangre de mamífero (un conejo y/o ratones lactantes). Con el fin de lograr una tasa de picadura óptima, se provocó el hambreado de las hembras, retirándoles la fuente de azúcar 24 Hs. antes.

La oferta de sustrato para la ovipostura fue una caja de Petri con un algodón húmedo y recubierto con papel absorbente o un paño húmedo (Fig.5). Los huevos en los sustratos fueron colocados dentro de una bolsa pequeña de nylon sin cerrar y todo este conjunto a su vez dentro de otra bolsa cerrada herméticamente. Para asegurar el desarrollo embrionario completo, las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (≈ 24 ºC) durante 8-9 días (Fava et al. 2001). Finalmente, luego de este periodo, los huevos fueron almacenados de 3 a 4 meses, a aproximadamente 5 ºC, para asegurar un mayor éxito de eclosión (Campos 2008) para los experimentos.

Fig.5. Oferta de sustrato para la ovispostura de las hembras de *Oc. albifasciatus*. Se observa una caja de Petri con un algodón húmedo sobre el cual se colocó un papel absorbente.

Capítulo I

Factores ambientales relacionados con la actividad de *Ochlerotatus albifasciatus* en el valle de Sarmiento (Chubut) respecto de la región templada

I. RESUMEN

Ochlerotatus albifasciatus es un mosquito de inundación cuya altas densidades han sido asociadas a paisajes naturales (praderas y pastizales) y a eventos de precipitación en las regiones templadas y subtropicales. En el presente estudio, se analizó el efecto de las diferentes características ambientales de los parches de un paisaje agrícola de la Patagonia sobre la abundancia relativa de esta especie.

En los parches de mallines, la alta actividad de los adultos fue fuertemente asociada con el sistema de riego por inundación, sugiriendo que la actividad agrícola contribuye a la proliferación de *Oc. albifasciatus* en esta región. Los parches de estepa podrían constituir un ambiente adverso reflejado en el abrupto decrecimiento en la abundancia. La regresión lineal múltiple mostró que algunas variables explicatorias, tales como el tipo de parche (mallín) y momento del día (mediodía), no contribuyeron significativamente a la variación de la abundancia relativa. En contraste, temperatura, viento y cobertura de nubes (nubosidad) regularía la actividad de picadura de las hembras. La temperatura afectó la actividad de los mosquitos en la estepa pero no en los parches de mallines donde la actividad fue permanente y más estable frente al cambio de las condiciones térmicas. En los parches de estepa, los cuales presentaron bajos niveles de humedad, escasa vegetación y mayor exposición al viento, la actividad resultó ser más inestable frente a mínimos cambios en la variación térmica.

La variabilidad de la abundancia relativa de *Oc. albifasciatus* en el paisaje agrícola de Sarmiento fue ampliamente explicada por la temperatura en combinación con el tipo de microambiente (parche), velocidad del viento y cobertura de nubes, e indirectamente por la actividad humana.

I. INTRODUCCION

Desde el punto de vista ecológico, un paisaje estaría formado por un conjunto de parches dentro de una matriz con características particulares (Forman & Gordon 1981). Un paisaje agrícola moderno está caracterizado por un uso intensivo de la tierra que genera un mosaico de parches o hábitats con características marcadamente contrastantes (Tscharntke et al. 2002). Dicho paisaje altera las características ecológicas naturales tanto a nivel espacial como temporal (Benton et al. 2003). En muchos casos, la actividad agrícola ha favorecido la proliferación de algunas especies de insectos, por ejemplo los mosquitos (Chandler & Highton 1975). Esto quiere decir que la dinámica poblacional puede ser afectada por la actividad humana (Hooks & Johnson 2003) a través de la modificación del paisaje natural.

Diferentes estudios han demostrado que la actividad y abundancia de las diversas especies de mosquitos varia en relación con la temperatura, humedad, viento, precipitación, vegetación y actividad humana (Okogun et al. 2003, Yang et al. 2008, Pinto et al. 2009, Gray et al. 2011). En otros grupos de insectos, tales como los ceratopogonidos, la temperatura, la humedad relativa, la radiación solar y el momento del día parecen afectar la actividad de picadura (Carrieri et al. 2011), mientras que en los plecópteros, la temperatura y velocidad del viento sería la clave para la actividad de vuelo (Briers et al. 2003).

En la región sur de la distribución de *Ochlerotatus.albifaciatus* (valles de la región patagónica) no se han realizado evaluaciones sobre abundancia relativa o actividad y su relación con el tipo de paisaje, factores físicos ambientales y climáticos. Estudios en ese sentido podrían contribuir al conocimiento general de la dinámica espacio-temporal en los microambientes naturales y artificiales asociados a la agricultura.

I. OBJETIVO

Comparar la abundancia relativa de *Oc. albifasciatus* entre microambientes (favorables y desfavorables) de un paisaje agrícola y sus variables asociadas, en diferentes momentos del día. Además, construir un modelo de regresión lineal para relacionarlas.

I. MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

El estudio fue llevado a cabo en la zona rural de Sarmiento, en la cual se practica un sistema de riego por inundación para cultivos forrajeros, producción hortícola y pasturas para el ganado (Ñancucheo et al. 2008).

Las áreas o parches son claramente delimitadas por su vegetación predominante y se reconocen: mallines, áreas cultivadas y parches de estepa. Los mallines y áreas cultivadas por sus características (humedad relativa elevada, tipo de vegetación herbácea, con riego controlado o por inundación, etc.) fueron considerados como microambientes favorables. Por otro lado, los parches de estepa, por su baja humedad relativa, vegetación xerófila y ausencia de riego, fueron considerados como microambientes desfavorables.

La región tiene un clima árido de estepa y se caracteriza por ser muy ventosa, sobre todo en verano. La estación fría representa el periodo más lluvioso del año *(*Ver más detalle en *Materiales y métodos generales*). Para mitigar las fuertes ráfagas de viento, las chacras suelen estar rodeadas por "cortinas de viento" formadas por hileras de álamos.

El río Senguer, atraviesa el valle de Sarmiento, tiene un sistema de riego distribuido a través de una red de canales de aproximadamente 60km de extensión, que va desde un azud a toda la zona agrícola-ganadera. El Instituto Provincial de Aguas (IPA) administra el cronograma para la apertura (fines de septiembre-principios de octubre) y clausura (fines de abril-principio de Mayo) de las compuertas del azud.

Periodo de actividad anual

La presencia anual de adultos de *Oc. albifasciatus* fue registrada semanalmente, durante 3 años (2009-2011), mediante la detección de hembras con actividad de picadura.

Para evaluar el patrón de actividad anual se consideraron los periodos de riego por inundación y los registros de temperatura del aire. La temperatura fue obtenida mediante un datalogger HOBO®-Onset colocado a la sombra de un sauce (*Salix sp.*) en la zona de chacras, durante marzo 2010-febrero 2011. Paralelamente se consideraron los registros obtenidos por la estación del Instituto Nacional de Tecnológica Agropecuaria (INTA) de Sarmiento, Chubut, (http://inta.gob.ar/region/pas/sipas/sipas_index.htm), para los años 2009-2011.

Estudios preliminares

Ráfagas y periodos de calma.

Para caracterizar las ráfagas y periodos de calma se realizó una evaluación preliminar donde se registró la velocidad del viento cada dos segundos y durante lapsos de 3 a 5 minutos y la velocidad máxima del viento (Km/h) durante la sesión de registros. Para ello se utilizó un anemómetro de campo (SmartSensor®, AR816) colocado a un metro del suelo.

Se analizó la relación entre proporción y duración del tiempo de calma y la velocidad máxima de la ráfaga. Se consideró calma a la velocidad del viento por debajo del valor umbral (10.08 Km/h) donde los mosquitos dejan de orientarse hacia su presa u otro estímulos (Grimstad & De Foliart 1975; Bidlingmayer et al.1995).

Selección de horarios de captura.

Para determinar los horarios del día con menor y mayor actividad se realizaron capturas preliminares. Estas fueron realizadas con la ayuda de un aspirador eléctrico capturando aquellos mosquitos que se posaban sobre el cuerpo (ropa). La colecta de ejemplares se realizó durante 30 minutos, con intervalos de dos horas y desde el amanecer hasta el anochecer (6:30 – 21:00 Hs.), durante los dos días previos a lo que luego fue el estudio definitivo.

Muestreos definitivos

Abundancias relativas en relación al microambiente y horarios de actividad

Para el estudio de abundancias relativas de *Oc. albifasciatus* en relación al tipo de parche y momento del día, se realizaron capturas de hembras durante la temporada de verano de 2011 en 7 chacras espaciadas en un área de 400 ha de la zona rural de Sarmiento (Fig. I. 1). Los sitios fueron elegidos por presentar los tres parches evaluados (Mallín (M), Área cultivado (C) y Estepa (E)), a escasos metros (200 m) entre sí. Se asumió que los individuos podían dispersarse de modo equivalente dentro y entre los tres microambientes.

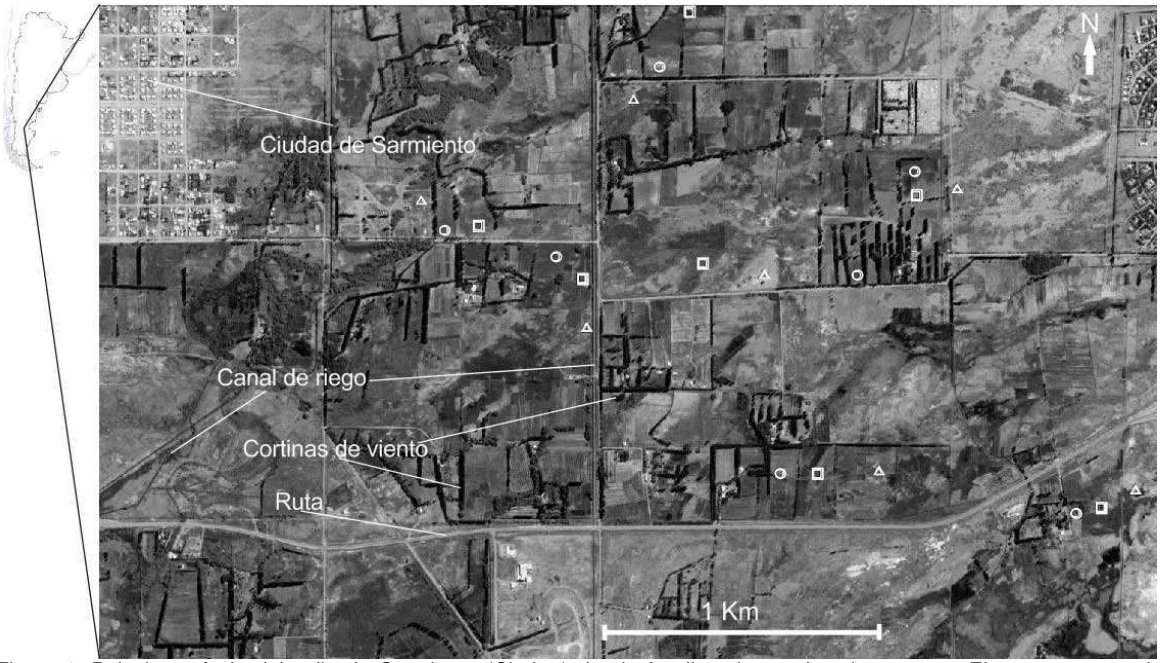


Fig. I. 1. Paisaje agrícola del valle de Sarmiento (Chubut) donde fue llevado a cabo el muestreo. El mapa muestra los parches: Mallín (cuadrado), Área cultivada (circulo) y Estepa (triángulo), y algunas características del paisaje.

La actividad de picadura se midió mediante el método de captura por hora hombre con la ayuda de un aspirador eléctrico. Las capturas fueron realizadas sobre aquellos mosquitos que se posaban en la ropa, en todo el cuerpo, y siempre sobre el mismo operador (cebo y capturador al mismo tiempo).

La comparación de los niveles de actividad en distintos sitios y a la misma hora sirvió para evaluar diferencias de abundancia relativas. El patrón de comportamiento diario de la actividad de picadura fue calculada como la diferencia entre el número de hembras capturadas en dos horarios para un mismo sitio, asumiendo constancia de la abundancia relativa durante el mismo día.

Variables ambientales asociadas a la actividad de adultos

- Al momento de la captura se registró *la temperatura* (ºC) y *la humedad relativa* (% HR) a nivel del suelo con un sensor termo-higrométrico portátil (Litz instruments®, LZ 122D).
- La *velocidad máxima del viento* (Km/h) fue registrada a un metro sobre el suelo mediante un anemómetro de campo (SmartSensor®, AR816).
- La *nubosidad* fue registrada como el porcentaje del tiempo de cobertura del sol por nubes durante el tiempo de captura.

Análisis estadístico

Selección de horarios de captura

Las abundancias relativas mediante capturas realizadas en distintos horarios (06:30-08:00; 09:40-11:10; 13:30-15:00; 17:00-18:30 y 19:30-21:00) en un estudio preliminar fueron comparadas y evaluadas mediante diferencia de medianas (Kruskal Wallis) con un nivel de significancia del 0.05.

Actividad de adultos y variables ambientales

Las diferencias de abundancia relativas entre sitios y el patrón de comportamiento se analizaron de a pares con estadística paramétrica (t pareado) y/o no paramétrica (Wilcoxon), con un nivel de significancia de 0.05 (Zar, 1996). Del mismo modo se procedió con las variables ambientales asociadas.

Se utilizó una regresión lineal múltiple (RLM) (Chatterjee et al. 2000) para: a) estimar la relación existente entre las variables físicas registradas durante los momentos de captura y la actividad de *Oc. albifasciatus* b) determinar las variables más influyentes en la variabilidad de la abundancia relativa y c) obtener un modelo de predicción de la abundancia en el Valle de Sarmiento.

El modelo propuesto de RLM fue el siguiente:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 * x_{1i} + ... + \beta_7 * x_{7i} + \gamma_1 * x_{5i}\, x_{1i} + ... + \gamma_4 * x_{5i}\, x_{4i} + ... + \gamma_m * x_{ji}\, x_k + \varepsilon_i$$

Donde y_i es la variable respuesta Log (N+1), β_0 es la ordenada al origen (constante) y β_i (i = 1 a 7) los coeficientes de regresión parcial. Las variables explicatorias fueron: x_1: Temperatura (ºC), x_2: Humedad Relativa (%), x_3: Nubosidad (%), x_4: Velocidad máxima del viento (Km/h), x_5: Estepa (Dummy 1), x_6: Mallín (Dummy 2) y x_7: Mediodía (Dummy 3). Como las variables indicadoras o dummys interaccionan con las cuantitativas (Chatterjee et al. 2000), se agregaron términos de interacción (γ_m) (m = 1 a 12), quedando como x_j las variables indicadoras o dummy (j = 5 a 7) y x_k las cuantitativas (k = 1 a 4). La variable respuesta fue normalizada (Log (N+1) y luego el modelo fue corrido con el software estadístico (Regresión lineal múltiple, Infostat® 2011). Luego de esto se extrajeron 12 outliers en total (criterio de Leverage y D-Cook arrojados por el paquete estadístico Infostat), entre variables respuesta y explicatorias ($N_{inicial}$=90), y aquellos términos cuyos coeficientes no fueron significativos ($p>0.05$).

Condiciones hipotéticas favorables y desfavorables en función de la zona

Finalmente, la abundancia relativa de mosquitos fue estimada bajo condiciones hipotéticamente favorables y desfavorables en ambos tipos de parches (Estepa y Mallín) incluidos en la regresión. Los rangos de máxima y mínima actividad de *Oc. albifasciatus*

fueron considerados como indicadores de condiciones de favorabilidad ambiental. Para ello se tomaron en cuenta las variables de mayor significancia obtenida en la RLM.

I. RESULTADOS

Periodo de actividad anual

La actividad de picadura de *Oc. albifasciatus* (Fig. I. 2) fue detectada desde principios de noviembre (3 - 4 semanas luego de iniciado el periodo de riego) hasta fines de abril (2 - 3 semanas anteriores a la clausura de la actividad de riego). Durante dicho periodo de actividad, las temperaturas mínimas promedio mensuales del aire fueron superiores a los 5°C (Fig. I. 2). Esto fue registrado tanto por las estaciones del INTA como por el sensor HOBO.

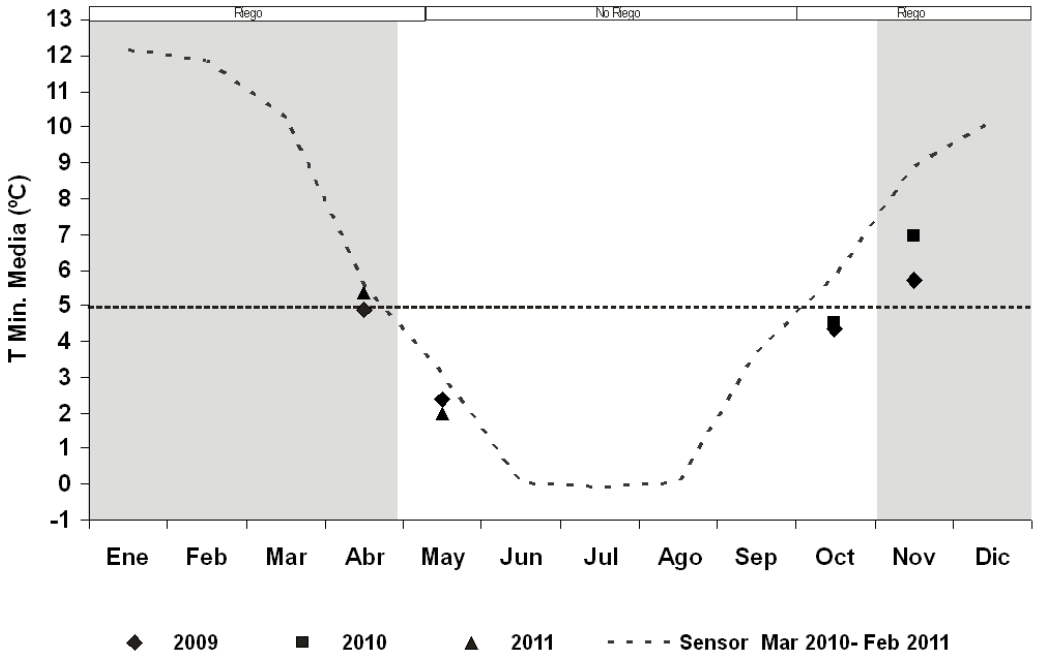


Fig. I. 2. Periodo de actividad de los adultos de *Oc. albifasciatus* durante el año (área sombreada). Temperatura mínima promedio mensual (del aire) determinada por los registros del sensor térmico HOBO, desde marzo 2010 hasta febrero 2011 (línea punteada). Temperatura mínima promedio mensual (del aire) para los meses antes y después del inicio y finalización de la actividad: abril-mayo y octubre-noviembre de 2009 (rombo), octubre-noviembre para 2010 (cuadrado) y abril-mayo para 2011 (triangulo). En la parte superior del grafico se señala los periodos de riego en el valle de Sarmiento.

Selección de horarios de captura

Las capturas preliminares permitieron observar un patrón bimodal de actividad solo en los mallines (M) y áreas cultivadas (C) (Fig. I. 3). En base a estos resultados y a la duración del día en esta región durante el verano, se seleccionaron y definieron los siguientes momentos del día para la captura: mediodía (m) (13:30 – 15:00 Hs.) y tarde (t) (17:00 – 18:30 Hs.), para los estudios de comparación de abundancia entre microambientes.

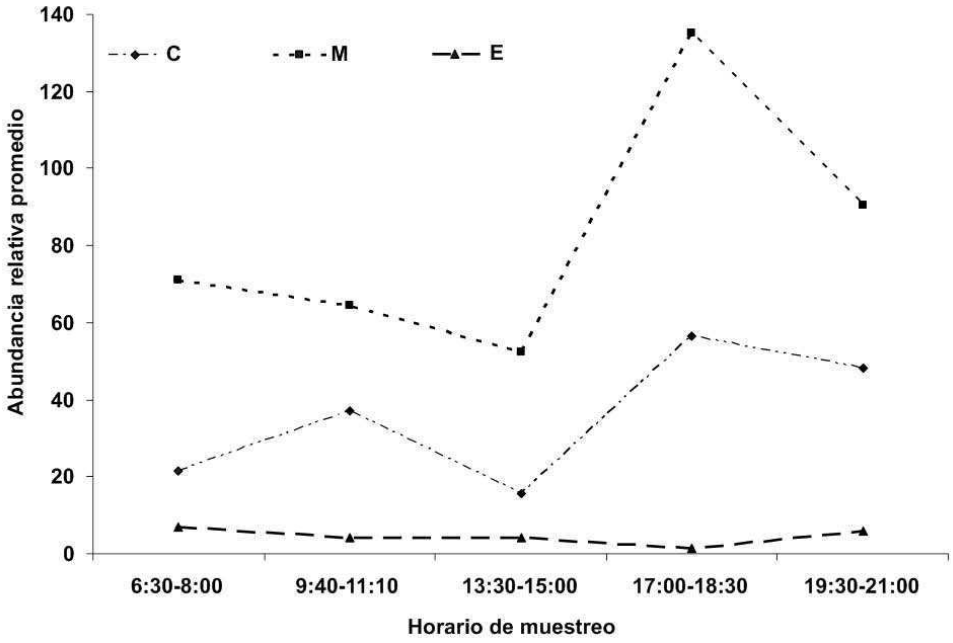


Fig.I.3. Muestreo preliminar para la elección de horarios de capturas en Sarmiento. La abundancia relativa promedio representa la actividad de picadura de *Ochlerotatus albifasciatus* (desde el amanecer hasta el anochecer) en los tres parches micro ambientales seleccionados para el estudio [área cultivada (C), mallín (M) y estepa (E)].

Muestreo definitivo

Abundancias relativas en relación al microambiente y al momento del día

Los abundancias relativas de culícidos en mallines naturales y cultivados presentaron valores similares entre sí (*Prueba de t pareada*, mediodía: p_{CM}=0.2699; atardecer: p_{CM}=0.1547), mientras en la estepa resultaron significativamente menores a los mallines naturales o cultivados [(*Prueba de t pareada*, mediodía: C-E (T=4.25; df=14;p_{CE}=0.0008); M-E (T=3.51;df=14, p_{ME}=0.0035); *Prueba de t pareada*, atardecer: C-E (T=4.61;df=14;

p_{CE}=0.0004); M-E (T=4.88; df=14; p_{ME}=0.0002)], incluso en más de un orden de magnitud (Fig. I. 4).

Respecto al momento del día, en los mallines y áreas cultivadas la actividad fue significativamente mayor hacia la tarde respecto del mediodía (*Prueba de Wilcoxon*, Mallín: (Sum (+)=3; df=14; p_{ma}<0.0001); Cultivado: (Sum(+); df=14; p_{ma}<0.0001), mientras que en la estepa no se observaron diferencias (*Prueba de t pareada*, Estepa: p_{ma}=0.056) (Fig. I. 4). Al tomar en cuenta solamente los días nublados no se observaron diferencias a distintas horas del día (Prueba de t pareada, mallín + alfalfar; T=-2.77; df=4; p_{ma}= 0.05).

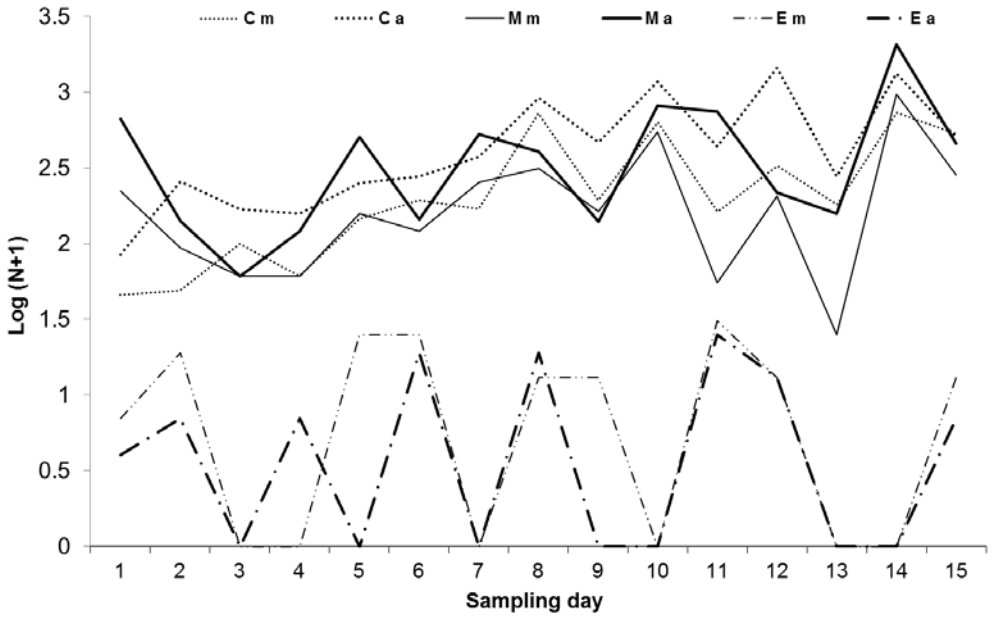


Fig. I. 4. Abundancia relativa de *Ochlerotatus albifasciatus* (Log (N+1)) estimada a partir de la captura por hora-hombre durante el mediodía (m) y el atardecer (a) en tres microambientes (parches) del valle [Mallín (M), Área cultivada (C) y Estepa (E)]. Los eventos de captura (15) fueron realizados en el periodo 27 enero - 12 febrero en el valle de Sarmiento, Chubut, Argentina.

En todas las oportunidades, se observó que la actividad de *Oc. albifasciatus* se produjo siempre en los momentos de calma entre ráfagas.

<u>Factores ambientales asociados a la actividad de adultos</u>

Temperatura

La temperatura promedio de la estepa fue mayor que en los mallines y áreas cultivadas tanto al mediodía como para la tarde. Mientras que los mallines resultaron más frescos respecto de las áreas cultivadas en ambos momentos de día (Tabla. I. 1).

Los registros de temperatura al nivel del suelo para el mallín resultaron en un rango de 15.7 a 32.8 ºC, para el área cultivado 15.5-28.9 ºC y para la estepa 19.2-37.6 ºC (Fig.I. 5). La estepa mostró temperaturas mayores a las áreas cultivadas y a los mallines, en los dos momentos del día estudiados [*Prueba de t pareada*, mediodía E-C: (T=-3.07;df=14; p_{EC} = 0.009); mediodía E-M: (T=-2.75;df=14; p_{EM} = 0.016); atardecer E-C: (T=-3.85;df=14; p_{EC}=0.002); atardecer E-M: (T=-6.14; df=14; p_{EM}<0.0001)]. Mientras que entre mallines naturales y cultivados no se hallaron diferencias [*Prueba de t pareada*, mediodía C-M: (p_{CM} = 0.393); atardecer C-M: (p_{AM}=0.181)]. Independientemente del microambiente, la temperatura del mediodía resultó significativamente superior que al atardecer [*Prueba de t pareada*, C: (T=2.90; df=14; p_C=0.012); M: (T=2.29; df=14; p_M=0.022) y E: (T=2.46; df=14; p_E=0.028)] (Fig. I. 5.).

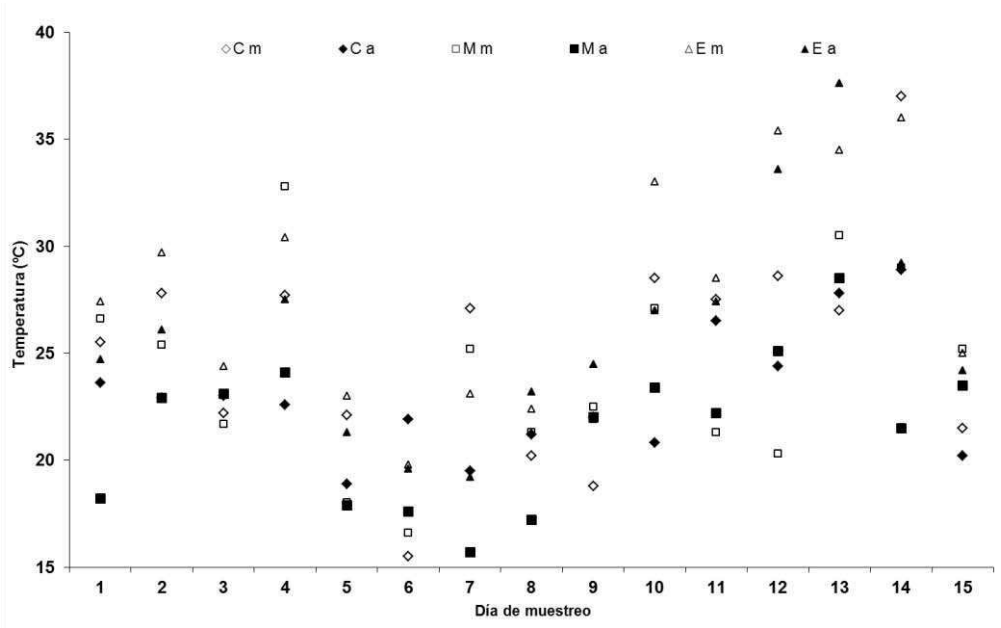


Fig. I. 5. Temperatura registrada durante las capturas de adultos de *Oc. albifasciatus* durante el mediodía (m) y el atardecer (a) en tres microambientes [Mallín (M), Área cultivada (C) y Estepa (E)] del valle de Sarmiento, Chubut, Argentina (27enero-12 febrero).

Tabla. I.1. Media ± EE para cada variable ambiental registrada durante las capturas de adultos de *Oc. albifasciatus*.

Parche / momento	Temperatura (ºC)	Humedad Relativa (%)	Velocidad Máxima del Viento (Km/h)
Área cultivada /mediodía	25.13 ± 1.34 a	48 ± 2.85 a	4.37 ± 4.71 a
Área cultivada /atardecer	22.95 ± 0.76 b	49 ± 2.39 a	5.21 ± 4.70 a
Mallín / mediodía	24.23 ± 1.18 a	49.13 ± 2.38 b	7.21 ± 5.64 b
Mallín /atardecer	21.53 ± 0.9 b	48.33 ± 2.16 b	7.59 ± 5.90 b
Estepa / mediodía	27.63 ± 1.38 c	32.33 ± 1.94 c	7.88 ± 6.93 b
Estepa / atardecer	25.88 ± 1.13 d	31.87 ± 1.34 c	9.70 ± 7.84 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) en las pruebas estadísticas de a pares.

Humedad Relativa

Los valores promedio de humedad relativa resultaron superiores para los mallines y áreas cultivadas respecto de los parches de estepa (Tabla. I. 1).

La humedad relativa del aire al nivel del suelo varió en un rango de 37 a 68 % para el mallín, 31-70 % para el área cultivada y 24-48 % para la estepa (Fig. I. 6).

La comparación de la humedad relativa entre los mallines (cultivados y naturales) no mostró diferencias significativas [*Prueba de t pareada*, mediodía C-M: (p_{CM}=0.678); atardecer C-M: (p_{AM}=0.836)]. Sin embargo, ambos resultaron significativamente superiores a la estepa [*Prueba de t pareada*, mediodía, C-E: (T=5.51;df=14; p_{EC}=0.0001) y M-E: (T=6.34; df=14; p_{EM}<0.0001); atardecer, C-E: (T=5.64;df=14; p_{EA}: 0.0001) y E-M: (T=-7.58;df=14; p_{EM}<0.0001)] (Fig. I. 6).

Independientemente del sitio de muestreo, no se detectaron diferencias significativas de humedad relativa entre el mediodía y el atardecer [Prueba de t pareada, M: (p_{ma}=0.718); C: (p_{ma}=0.064) y E: (p_{ma}=0.833)] (Fig. I. 6).

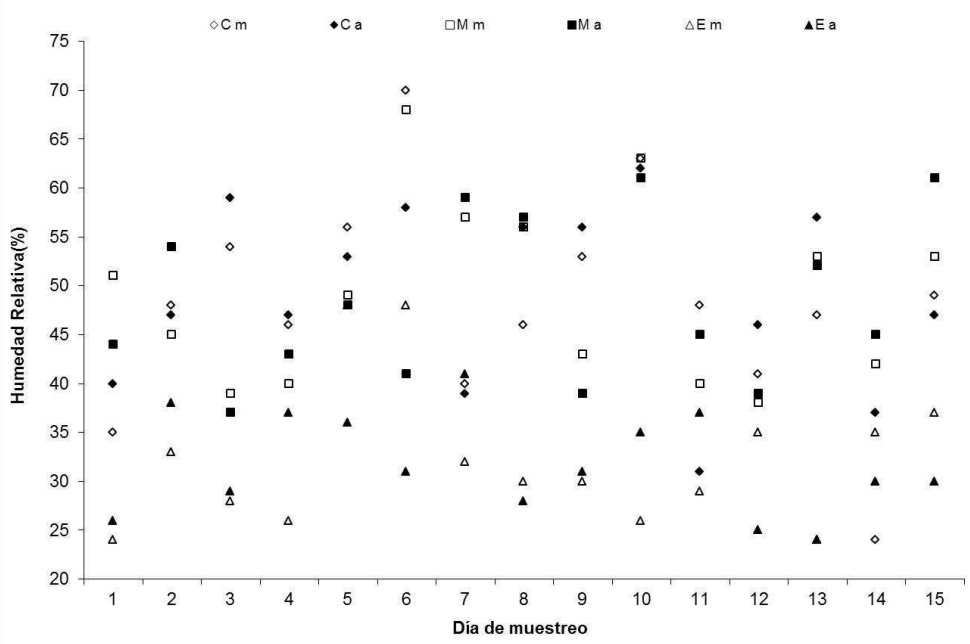


Fig. I. 6. Humedad relativa registrada durante las capturas de adultos de *Oc. albifasciatus* al mediodía (m) y el atardecer (a) en los tres microambientes presentes [Mallín (M), Área cultivada (C) y Estepa (E)] en el valle de Sarmiento, Chubut, Argentina (27 enero-12 febrero).

Viento

Ráfagas y periodos de calma

Los eventos de calma resultaron de 6 segundos de duración mediana. Solo se observó en un único evento de aproximadamente tres minutos de duración de calma.

Cuando en un periodo de muestreo la velocidad máxima del viento alcanzó los 20 Km/h se registraron 12 eventos de calma representando el 28 % del tiempo total, mientras que cuando las velocidades alcanzaron a 22 Km/h se registraron 5 eventos, representando el 15% del tiempo total. Los resultados preliminares mostraron una relación inversa entre la velocidad máxima del viento y la duración y frecuencia de los periodos de calma. Se estimo que a velocidades superiores a 24 km/hs, los periodos de calma estarían ausentes (Fig. I. 7).

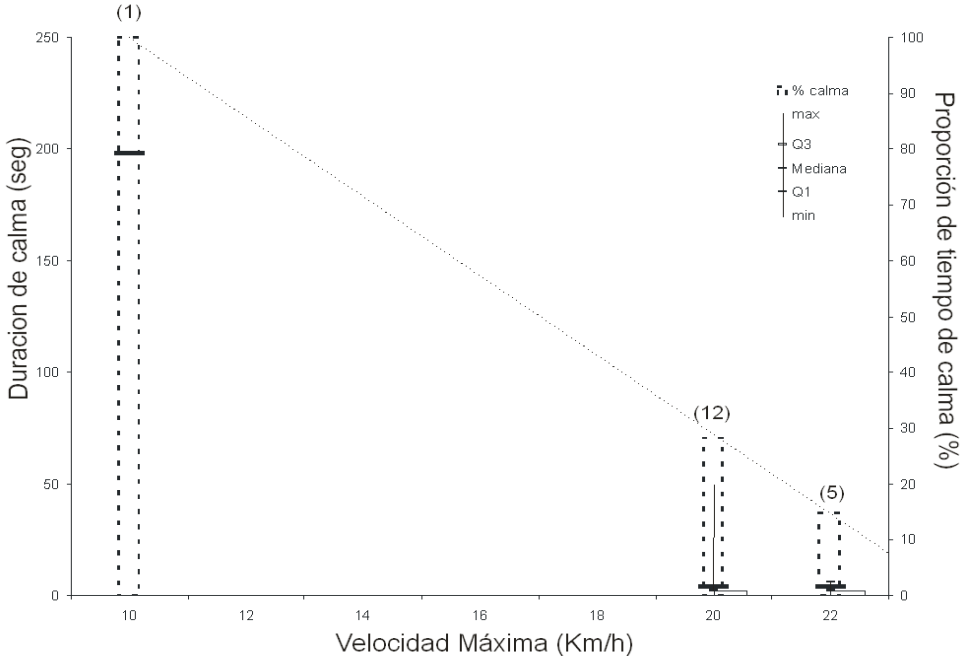


Fig. **I**. 7. Frecuencia (n), proporción (barra punteada) y duración de los momentos de calma (cuartiles) en relación a la máxima velocidad del viento (ráfaga). Los registros fueron hechos durante tres sesiones de 3-5 min. por día en el valle de Sarmiento, Chubut, Argentina (24, 25 y 26 de enero).

Velocidad máxima del viento

Durante las sesiones de captura los parches de estepa mostraron las mayores velocidades máximas promedio del viento, mientras que los menores valores resultaron en los parches de áreas cultivadas. En todos los parches, las ráfagas de viento por las tardes superaron en promedio a las del mediodía (Tabla. I. 1).

Durante el momento de captura, la velocidad del viento alcanzó valores máximos de 20 Km/h en los mallines naturales, 14 Km/h en los mallines cultivados (alfalfares) y 24 Km/h en la estepa (Fig. I. 8).

Hacia la tarde, las intensidades de viento registrados en la estepa fueron significativamente superiores a los registrados en mallines cultivados [*Prueba de t pareada*, atardecer E-C (T=2.82; df=14; p_{EC}=0.014)] pero no resultaron diferentes respecto de los mallines [*Prueba de t pareada*, atardecer E-M: (p_{EM}=0.077)]. Durante el mediodía, las velocidades máximas del viento de la estepa resultaron significativamente superiores a los mallines cultivados [*Prueba de t pareada*, mediodía C-E. (T=-2.37; df=14; p_{EC}=0.033).

En los mallines naturales se registraron velocidades significativamente superiores a los cultivados [*Prueba de t pareada*, mediodía M-C: (T=2.27; df=14; p_{MA}=0.039); *Prueba de Wilcoxon*, atardecer M-C: (Suma(+)=10.50; df=14; p<0.0001)] (Fig. I. 8).

Las velocidades máximas del viento del mediodía no difirieron significativamente a los de la tarde, independientemente del parche muestreado [*Prueba de t pareada*, C :(p=0.435); M: (p=0.714) y E: (p=0.207)] (Fig. I. 8).

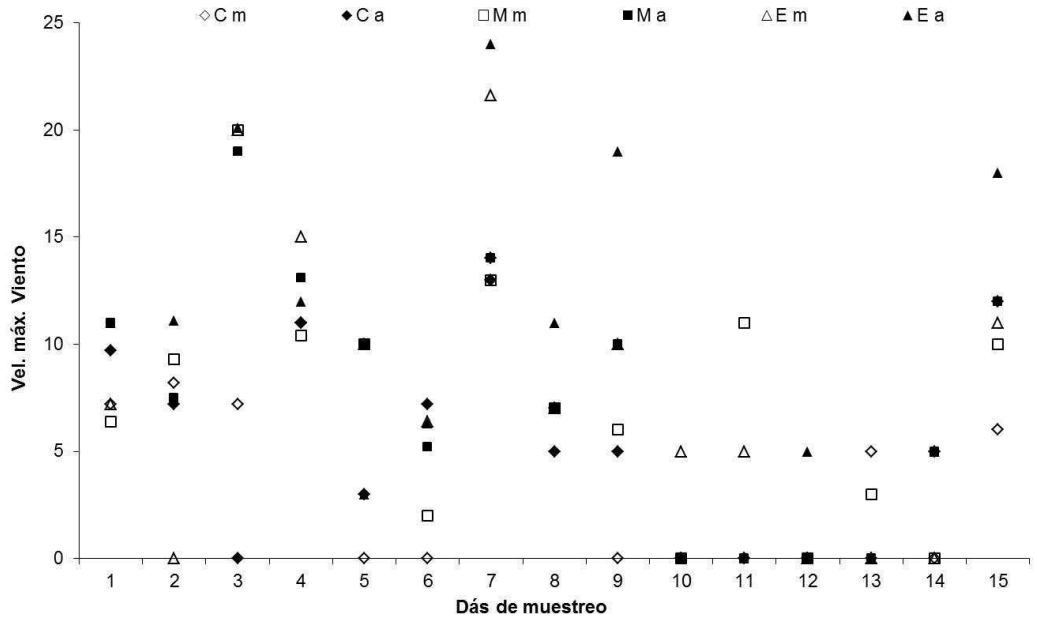


Fig. I. 8. Velocidad máxima del viento registrada durante las capturas de adultos de *Oc. albifasciatus* durante el mediodía (m) y el atardecer (a) en tres microambientes [Mallín (M), Área cultivada (C) y Estepa (E)] del valle de Sarmiento, Chubut, Argentina (27 enero-12 febrero).

Regresión lineal múltiple

El modelo de RLM propuesto permitió explicar el 86% de la variabilidad de la abundancia relativa de mosquitos capturados durante el muestreo (r^2=0.86). La función final obtenida fue:

$$yi = b_0 + b_3x_{3i} + b_4x_{4i} + c_1x_{5i}x_{1i}$$

Donde b_0 es la ordenada al origen, b_i los coeficientes de regresión parcial para x_3: Nubosidad (%) y x_4: Velocidad del viento (Km/h) y c_1 el coeficiente de interacción entre x_1: Temperatura (ºC) y x_5: Estepa (Tipo de Ambiente como variable dummy). Los valores de los coeficientes estimados, la estimación de la varianza para los parámetros, p-valores y los coeficientes de Mallows se resumen en la tabla. I. 2.

Tabla. I. 2. Regresión lineal múltiple de la abundancia relativa (estimador de actividad) de *Ochlerotatus albifasciatus* en función de factores ambientales y microambientes.

	SC	CM	Coeficiente	p-valor	Cp Mallows
Constante			2.48	<0.0001	
Nubosidad	1.57	1.57	0.0032	0.0004	16.63
Vel. Máx.Viento	3.66	3.66	-0.04	<0.0001	34.66
Estepa x Temp.	39.88	39.88	-0.06	<0.0001	348.21
Error	8.43	0.11			

r^2 = 0.86, n = 78, P <0.05
SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios

La interacción entre la variable física (temperatura) y el tipo de ambiente fue el factor que más contribuyó al ajuste del modelo propuesto y el que más influyó sobre variabilidad del número de captura (Cp Mallows: 348.21). El coeficiente de regresión parcial resultó negativo (*-0.06*) indicando una relación inversa con la actividad de mosquitos. La velocidad máxima del viento explicó la variabilidad en un orden de magnitud menor (Cp Mallows: 34.66) y se relacionó negativamente con el número de mosquitos (*-0.04)*. Finalmente la nubosidad, con un valor de 16.63 de Cp Mallows, influyo positivamente (*0.0032)* sobre la actividad.

En la estepa, el factor térmico fue tomado en cuenta para la actividad, mientras que en el mallín el término que incluyó a la temperatura no resultó significativo. La variación de la abundancia se relacionó directamente a la nubosidad e inversamente a la velocidad máxima del viento.

Las variables dummy mediodía y mallín no resultaron significativas tanto individualmente como en interacción con otra variable cuantitativa. La humedad relativa fue excluida del modelo final para evitar la colinealidad con la temperatura.

Condiciones hipotéticas favorables y desfavorables en función de la zona

La actividad de *Oc. albifasciatus* mostró estar favorecida (vs. no favorecida) por las condiciones de temperatura baja (vs. alta), nublado (vs. despejado) y calmo (vs. ventoso).

Los rangos de condiciones favorables-desfavorables de temperatura para la estepa resultaron 19.2ºC-37.6ºC (Fig. I. 5). En el Mallín no habría efecto significativo de la temperatura.

Tanto para estepa como para mallín el incremento del porcentaje de nubosidad (desde 0 hasta 100 %) favorecería la actividad (no mostrado).

Respecto al viento, en la estepa resultó favorable para la actividad cuando la velocidad máxima fue nula (0 Km/h) y desfavorable a los 24 Km/h. En el mallín el rango de favorabilidad-desfavorabilidad fue de 0 Km/h-20 Km/h, respectivamente (Fig. I. 8).

El rango del número de mosquitos estimado para la estepa a partir del modelo teórico resultó 47/0 (límite superior/inferior) bajo condiciones favorables y desfavorables respectivamente, mientras que para el mallín resultó 630/48. La abundancia estimada en las condiciones más favorables en la estepa resultó similar a la estimada para condiciones menos favorables en los mallines.

Si bien, las capturas reales estuvieron comprendidas dentro de los límites estimados, los registros para la estepa se hallaron más próximos al límite inferior del estimado y en el otro extremo para el caso de los mallines.

I. DISCUSION

La presencia y dinámica del mosquito de inundación *Ochlerotatus albifasciatus* en el valle de Sarmiento estaría determinada por el anegamiento de los campos y por la temperatura ambiente. Las fluctuaciones en los niveles de agua inducen la eclosión de los huevos mientras que la temperatura del agua determina el tiempo necesario para que las formas inmaduras alcancen su desarrollo completo hasta la etapa adulta (Ludueña Almeida & Gorla 1995b; Fontanarrosa et al. 2000; Gleiser et al. 2000).

La actividad de los adultos de *Oc. albifasciatus* comienza aproximadamente un mes después del comienzo de la temporada de riego en las chacras y culmina alrededor de dos semanas antes de su finalización (Fig. I. 2). Esto sugiere que la actividad antrópica (agricultura) podría substancialmente contribuir al éxito reproductivo de esta especie. El retraso temporal de la actividad adulta desde el comienzo de la temporada de riego podría deberse al tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros en el contexto termal (Fontanarrosa et al. 2000), mientras que la finalización temprana de la actividad previa al final de temporada de riego podría deberse a que las temperaturas del aire fueron cercanas al límite termal para la actividad (5°C) (Ludueña Almeida & Gorla 1995a). La ausencia de nuevas cohortes al final del periodo estival donde todavía se continúa con el anegamiento de los campos (riego), podría sugerir que las bajas temperaturas de finales del verano podrían ser un factor inhibitorio determinante sobre la eclosión de los huevos. En contraste con la dinámica de la región templada, donde al parecer la eclosión de los huevos puede darse durante todo el año, mostrando una marcada asociación con los eventos de precipitación más que con la temperatura (Gleiser & Gorla 1997, Gleiser et al. 2000, Fischer et al. 2002, Fontanarrosa 2000).

En Sarmiento, las redes de canales de riego, hacen que la inundación por riego artificial sea el factor de anegamiento más relevante (que las escasas precipitaciones de la región)

para la producción de charcos de cría. Esta red permite a los propios chacareros decidir la inundación de sus campos a nivel espacial y temporal, y por lo tanto incidir involuntariamente sobre la eclosión e inicio de nuevas cohortes de *Oc. albifasciatus*. Los canales de riego constituyen un sistema de inundación asincrónico que ofrece permanentemente nuevos sitios de oviposición y de cría para las nuevas cohortes de adultos de *Oc. albifasciatus*. El sistema de riego mantiene, así, elevados niveles de abundancia relativa de esta especie en todo el valle durante la temporada de primavera-verano.

En los pastizales cercanos a la laguna de Mar Chiquita, Córdoba, (Ludueña Almeida & Gorla 1995a) y los pastizales de Corrientes (Hack et al. 1978) los grandes pulsos de emergencia de los adultos son eventos aproximadamente simultáneos en toda la región, pero que no se corresponden con inundaciones en parches alternados como en Sarmiento. Por lo tanto la dinámica en la región templada, con picos de abundancia seguida de una disminución abrupta de la población hasta la extinción de las cohortes hasta el próximo evento de precipitación, se vería modificada en el valle de Sarmiento por el efecto antrópico, manteniendo abundancias permanentes en toda la temporada cálida. Similarmente a lo observado en los campos de arroz (Bambardeniya & Amerasinghe 2003), el agro-sistema de Sarmiento sería otro ejemplo donde la actividad humana sostiene una población de mosquitos.

En el paisaje agrícola de Sarmiento, la marcada diferencias entre las calidades ambientales de los mallines (y áreas cultivadas) y parches de estepa son reflejadas en la relación existente entre la abundancia relativa y los factores ambientales, tales como la temperatura, humedad relativa, y máxima velocidad del viento (Fig. I. 4 y Tabla. I. 1). La elevada actividad de picadura de *Oc. albifasciatus* y la presencia de sitios de cría sugiere un mayor éxito reproductivo en mallines y cultivos que en los parches de estepa. Estas diferencias ocurren porque los mallines, naturales o cultivados, son parches húmedos

debido al riego por inundación (para pasturas y /o forrajeras) o al riego controlado (para varios cultivos) (Ñancucheo et al. 2008). Por otro lado, las escasas precipitaciones en la región patagónica (Paruelo et al. 1998), el tipo de vegetación, baja humedad, elevadas temperaturas y la ausencia de riego, convierte a los parches de estepa en un tipo de ambiente desfavorable para *Oc. albifasciatus*. Sin embargo, esta especie parece tener la capacidad de dispersarse hacia los parches estepa, al menos hasta unos 200 m, aunque con un decrecimiento abrupto en la abundancia relativa de hasta 2 órdenes de magnitud respecto de los mallines y las áreas cultivadas de Sarmiento (desde aprox. 1000 mosquitos/h a menos de 10/h) (Fig. I. 4).

En paisajes naturales como los pastizales de las regiones templadas, (los cuales son más homogéneos y favorables ambientalmente), las abundancias relativas decrecen abruptamente (como los observados para Sarmiento) a distancias mayores a los 500 metros (Gleiser & Gorla 1997). Esto podría significar que en un paisaje agrícola con parches heterogéneos como Sarmiento, el rango de dispersión de esta especie estaría restringido debido al cambio abrupto desde un ambiente favorable (mallín) a un ambiente desfavorable (estepa).

El patrón de dispersión observado en la Patagonia y también en otros insectos de otras regiones del mundo (Roland et al. 2000, Schtickzelle et al. 2006), ratificarían el efecto del hábitat fragmentado, donde la presencia de parches apropiados e inapropiados, podrían tener un efecto significante en la dispersión máxima (Hunter 2002).

Oc. albifasciatus es una especie diurna (Forattini 1965), que en el periodo invernal de la región templada tiene mayor actividad en las horas de mayor radiación. Ludueña Almeida y Gorla (1995a) han encontrado que en el contexto ambiental de los pastizales de la provincia de Córdoba, en un rango de 6 a 15 ºC, la temperatura ejerce un efecto positivo sobre la actividad de *Oc. albifasciatus*. Por el contrario, durante el resto del año, las tasas de vuelo decrecen con el aumento de la iluminación (Ludueña Almeida & Gorla 1995a)

con picos de actividad al amanecer y al anochecer. Un patrón similar se ha observado en los mallines de Sarmiento durante el verano, con mayores capturas durante el atardecer respecto del mediodía (Fig. I. 3 y Fig. I. 4). Este patrón, junto con una actividad de adultos similar entre ambos momentos del día, durante las jornadas con cobertura total de nubes (días nublados), sostendrían el hecho de que la actividad de las hembras podría estar regulada por un efecto exógeno como es la temperatura. Por lo tanto, independientemente de la región de origen, no habría una adaptación local respecto del patrón de comportamiento.

La temperatura mostró una relación negativa y resultó ser la variable que mejor explicó los patrones de abundancias de *Oc. albifasciatus* entre los tipos de parches y entre los momentos del día. Las mayores temperaturas fueron observadas en la estepa (aunque este ambiente fue el más expuesto a los fuertes vientos patagónicos) y al mediodía. Los efectos negativos de la temperatura sobre la actividad fueron descritos para otras especies de culícidos (Rudolfs 1925), y otros insectos (Burril 1981; Carrieri et al. 2011; Briers et al. 2003).

La humedad relativa, mostro una relación directa y sólo pudo explicar el patrón de abundancia observada entre los tipos de parches.

Las capturas mostraron una relación inversa con la máxima velocidad del viento. Esto puede deberse a que los periodos de calma son menos frecuentes entre ráfagas de vientos de mayores velocidades (Fig. I. 7) y por lo tanto hay menos tiempo para la actividad de picadura. Esto estaría soportado por observaciones personales durante las cuales las hembras se mostraron activas en los intervalos de calma y cesaron su actividad de picadura justo antes de que ocurran las ráfagas, para permanecer protegidos entre la vegetación. La máxima velocidad del viento mostró un patrón decreciente desde la estepa, hasta las áreas cultivadas, donde existen “cortinas de viento”, producidas por árboles plantados alrededor de las chacras (Ñancucheo et al. 1998).

Respecto de la RLM la interacción entre la temperatura y el ambiente contribuyó significativamente sobre la actividad de los mosquitos. Mientras que en los parches de estepa la temperatura afectó adversamente la actividad de los mosquitos, en los parches de mallín pareciera no haber un efecto significativo. Esto podría sugerir que las características favorables de los mallines (mayor cobertura vegetal, mayor humedad, mayor reparo al efecto del viento, presencia de terreno anegado, recursos alimenticios debido a presencia de néctar) ayudarían a mantener una actividad permanente y estable de mosquitos frente los cambios de temperatura. Mientras que en los parches de estepa, de características desfavorables (bajos niveles de humedad, escasa vegetación, y mayor exposición al viento), los cambios de térmicos incidirían sobre el comportamiento de los adultos.

Por lo tanto, la dependencia de la actividad de los adultos de *Oc. albifasciatus* de una variable del contexto ambiental.

El incremento del valor de la velocidad máxima del viento pareciera causar un efecto negativo sobre la actividad de esta especie, reflejado en menores capturas. Este efecto sería explicado por la relación inversa entre la máxima velocidad del viento (ráfagas) y los momentos de calma (Fig. I. 7), único momento donde *Oc. albifasciatus* se mostró activo. Dicho patrón de comportamiento fue observado durante cada sesión de muestreo donde las tasas de vuelo y picadura fueron aproximadamente similares entre eventos de calma.

El refugio entre la vegetación para evitar ser pasivamente transportado por el viento, ha sido afirmado para algunas especies de culícidos tanto en campo (Snow 1982) como en laboratorio (Hoffmann & Miller 2003) y para otros insectos (Briers 2003).

La relación positiva entre la cobertura de nubes y la actividad de *Oc. albifasciatus* evidenciaría el efecto negativo de la radiación solar sobre los insectos. Esta propiedad ha sido observada para culícidos (Alencar et al. 2011; Murillo et al. 1988) y otros insectos diurnos (Burril 1981).

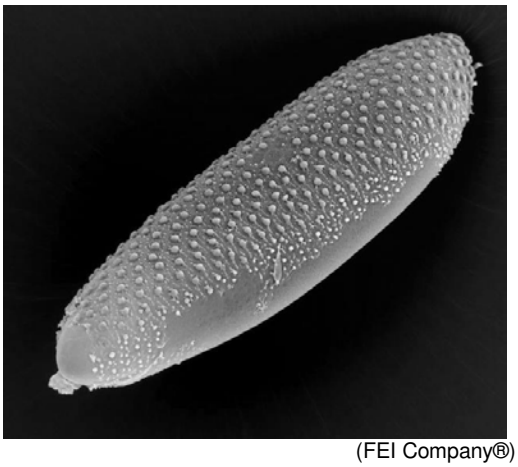
Respecto de la relación entre el viento o la nubosidad y la actividad de *Oc. albifasciatus* existe coincidencia con los registros obtenidos en la región templada subtropical (Hack et al. 1978). En otras especies, pertenecientes a los géneros de *Anopheles, Coquillettidea* y *Aedes,* se han observado resultados similares (Henderson et al. 2006; Rodríguez et al. 2009; Hoffmann & Miller 2003).

En la región pampeana se han propuesto modelos de la actividad basados en condiciones ambientales (Ludueña Almeida & Gorla 1995a), o modelos de abundancia relativa en función del paisaje (Gleiser & Gorla 2002). En el valle de Sarmiento, la combinación de factores ambientales (temperatura, velocidad del viento y la nubosidad) y tipos de parches del paisaje (estepas, humedales naturales y área cultivada) permitió explicar (con un 86%) la variabilidad de la abundancia relativa de *Ochlerotatus albifasciatus*.

El estudio de los factores que actúan sobre la distribución espacial y temporal de esta especie en la Patagonia podría aportar información de utilidad para el implemento de políticas de control sanitario. La proliferación de esta especie, favorecida por la actividad agrícola, podría ser mitigada mediante la aplicación de sistemas de riego alternativos que minimicen la inundación de los suelos por períodos prolongados.

Capítulo II

Resistencia a temperaturas de congelamiento en huevos de *Ochlerotatus albifasciatus*



(FEI Company®)

II. RESUMEN

La amplia distribución de *Oc. albifasciatus* en Sudamérica sugiere una capacidad de proliferación en un rango de climas que abarca desde subtropicales hasta fríos.

Se expusieron stocks de huevos provenientes de una región templada húmeda (Buenos Aires) y de una árida de estepa (Sarmiento) bajo condiciones de congelamiento, con el objetivo de estudiar adaptaciones térmicas locales respecto de algunas características biológicas.

Se describió el comportamiento térmico del sustrato de deposición de los huevos de *Oc. albifasciatus* en la localidad de Sarmiento. Los valores extremos de -12°C° y de 10 hs. de duración promedio fueron reproducidos bajo condiciones de laboratorio y utilizados como tratamiento sobre huevos provenientes de hembras de Sarmiento y de Buenos Aires. Se evaluaron los efectos del congelamiento de los huevos sobre la supervivencia embrionaria y la eclosión producida luego de la primera inundación.

La supervivencia luego del tratamiento resultó exitosa para ambas poblaciones (94-99%) y el porcentaje de eclosión fue mayor al 98%. La proporción de huevos embrionados resultó de 78% para Sarmiento y del 83% para Buenos Aires sin demostrar diferencias significativas.

El hecho que las poblaciones de *Oc. albifasciatus* de Buenos Aires y Sarmiento se encuentren adaptadas a diferentes climas pero sus huevos tengan similar capacidad de resistir las condiciones de congelamiento sugieren que dicha respuesta sería conservada en la especie en vez de tratarse de una adaptación local.

II. INTRODUCCION

La extensa distribución de *Ochlerotatus albifasciatus* en el cono sur Sudamérica sugiere una capacidad de proliferación en un rango amplio de climas que abarca desde subtropicales hasta fríos. En la Argentina, en la localidad de Sarmiento (Chubut) pese al riguroso invierno patagónico (con temperaturas extremas históricas que llegaron a -33 ºC (SMN), durante la estación cálida se producen grandes explosiones demográficas de esta especie. Por otro lado, en la Pampa Húmeda las condiciones de frio invernal suelen ser menos intensas (mínimas históricas algo menores a -12 ºC (SMN) y a *Oc. albifasciatus* se lo puede hallar activo durante todo el año.

Asumiendo que las poblaciones de Sarmiento son endémicas, los huevos tendrían la capacidad de sobrevivir a las temperaturas frías extremas, resistiendo o evitando el congelamiento como ocurre en los Aedinos árticos (Strathedee & Bale 1998, Bale 2002) o bien resguardándose de las temperaturas extremadamente frías en microclimas generados por la materia orgánica en descomposición. Para las poblaciones de la provincia de Buenos Aires, se ha sugerido que los huevos quedarían resguardados a los eventos de fríos extremos (Campos & Sy 2006.).

Por otra parte se ha sugerido que los adultos podrían provenir de zonas aledañas por dispersión activa desde los lugares cercanos a los sitios de cría (Gleisser & Gorla 1997) o transportados en forma pasiva por el viento (Bejarán et al. 2008).

La diapausa, un estado de dormancia donde el desarrollo ha sido suprimido, parece ser la estrategia adoptada por los culícidos, al igual que otros insectos, para poder sobrevivir a periodos adversos (Kostal 2006). Para mosquitos de origen tropical como *Ae. aegypti*, las bajas temperaturas y la disminución del fotoperíodo, previo a la llegada del invierno, serian los disparadores de la diapausa en las regiones templadas (Focks et al. 1994). Campos y Sy (2006) observaron que la diapausa de *Oc. albifasciatus*, reflejada por el

porcentaje de eclosión, disminuye su intensidad a medida que las condiciones térmicas en el campo o en el laboratorio se tornan favorables.

Se ha estudiado como las condiciones térmicas de una región inducen adaptaciones locales de ciertos caracteres, como la supervivencia de huevos en *Aedes albopictus* de Indiana, EEUU, (Hawley et al. 1989). Para *Wyeomyia smithii* de la región templada de EEUU se ha demostrado que la supervivencia y la fertilidad decrecen a mayores latitudes, debido a las menores temperaturas durante el verano y a la mayor intensidad y duración del frío durante el invierno (Bradshaw et al. 2000).

En otros ordenes de insectos, por ejemplo en tisanópteros de Inglaterra, se observaron adaptaciones locales respecto de la relación entre grados días y temperatura mínima para el desarrollo (Stacey & Fellowes 2002).

Si en condiciones de laboratorio los huevos de *Oc. albifasciatus,* demostraran una disminución significativa en la supervivencia frente a temperaturas extremadamente bajas (T°<0°C), podría interpretarse que los huevos no serian capaces de sobrevivir a las condiciones naturales del invierno salvo por el comportamiento de las hembras al oviponer en refugios térmicos, como entre la hojarasca en el suelo (Campos & Sy 2006). Mientras que si los huevos sobrevivieran, podría indicar que esta capacidad de tolerancia seria algún tipo de carácter conservado en ambas poblaciones que les permitiría sobrevivir a las bajas temperaturas, sin necesidad de un refugio.

La preservación de la capacidad de sobrevivir al congelamiento entre poblaciones de regiones contrastantes climáticamente podría indicar la presencia de un carácter conservado en la especie, mantenido por presión selectiva.

Mientras que si la supervivencia y/o una tasa de eclosión resultaran distintas, podría indicar la existencia de adaptaciones a las condiciones térmicas locales para estos parámetros poblacionales.

II. OBJETIVO

Evaluar la supervivencia y la eclosión de los huevos de *Ochlerotatus albifasciatus*, de poblaciones de la pampa húmeda (templada) y de la patagonia (árida fría), expuestos experimentalmente a un evento de condiciones térmicas bajo cero, recreando un evento del invierno patagónico. Para este objetivo se describe previamente la dinámica térmica del sustrato de un charco temporario patagónico donde *Oc. albifasciatus* deposita los huevos.

II. MATERIALES Y METODOS

Caracterización térmica

Para obtener una caracterización térmica de ambos sitios de estudio, Buenos Aires y Sarmiento, se registró la temperatura mínima absoluta diaria del aire durante el periodo Mayo-Septiembre del año 2011. El periodo elegido se caracterizó por la ausencia de estadios inmaduros y adultos en Sarmiento.

Los datos de temperaturas para la región templada fueron obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional (www.smn.gov.ar), mientras que para la región fría fueron provistas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Sarmiento.

Por otro lado, se describió térmicamente el sustrato (suelo) de deposición de los huevos de *Oc. albifasciatus*. Para ello, se colocaron registradores de temperatura HOBO® (Fig. II. 1) en el centro de un charco efímero, con registros previos como productor de larvas y asociado a riego por inundación (Fig. II. 2). El charco se ubicó en una chacra de área rural de Sarmiento (45°35'29.51"S, 69°2'20.28"O). Los registros fueron hechos a nivel del suelo y cada media hora (entre Mayo y Septiembre de 2009). Se eligieron las temperaturas mínimas absolutas diarias como insumo para analizar patrones térmicos mínimos.

Fig. II. 1. Data logger térmico HOBO® Onset.

Fig. II. 2. Charco efímero, asociado al riego por inundación y productor de larvas (Sarmiento) donde fue colocado el data logger térmico.

Stocks de huevos

Para obtener stocks de huevos de *Ochlerotatus albifasciatus* de ambas regiones, se capturaron hembras del campo que luego fueron mantenidas en cajas de cría. Las mismas fueron alimentadas con una fuente de sangre (mamífero) para lograr la maduración de los huevos (Ver más detalles en *Materiales y métodos generales*).

Luego de la ovipostura, los stocks de huevos fueron almacenados durante 2 a 6 meses en frío a una temperatura de 5 ºC y oscuridad para inducir la diapausa (Campos & Sy. 2007) o al menos para reducir significativamente la actividad metabólica, hasta su uso en los ensayos. Se ha observado que largos periodos de almacenamiento a bajas temperaturas y largos periodos de aclimatación mejoran la respuesta de eclosión (Campos 2008).

Estudios preliminares mostraron que la respuesta de eclosión respecto del tiempo de almacenamiento (2-6 meses) no demostró diferencias significativas, test exacto de Fisher, $p>0.05$).

Tratamientos

Tanto para la población de Chubut como para la de Buenos Aires se realizaron los siguientes tratamientos:

a) Condiciones de congelación (-12 ºC / 10 Hs)

Se usó un conjunto de huevos pertenecientes al mismo periodo. Cuando el número de huevos por stock no superó los 100 ejemplares se realizaron repeticiones para el mismo tratamiento, es decir, se sumó otro stock hasta alcanzar un mínimo de 200 huevos.

Entre dos y cuatro stocks de 36 a 117 huevos, almacenados en frío como se indica en "Materiales y Métodos generales", fueron colocados en un freezer a una temperatura de -12 ºC durante un periodo de 10 Hs., simulando un evento de frío extremo durante una noche de invierno patagónico (ver resultados de temperaturas durante el periodo invernal). Luego de este periodo fueron colocados nuevamente a 5ºC durante una semana, y finalmente a temperatura ambiente de laboratorio (24 ºC) durante dos semanas con un fotoperíodo 14:10 Hs. (L:O) para aclimatarlos y revertirlos del estado de diapausa (Campos & Sy 2006).

Finalmente se los inundó por 12 horas con agua destilada a temperatura ambiente y una solución de levadura (10 mg/40 ml de agua declorada) para inducir la eclosión (Campos & Sy 2006).

Luego de 12 Hs., el número de huevos eclosionados fue contabilizado en base al número de larvas del primer estadio. Los huevos no eclosionados fueron mantenidos sobre un paño húmedo a temperatura ambiente durante una semana más.

Se llevó a cabo una nueva inundación de esos huevos y se contabilizaron las larvas nacidas. Los huevos que no eclosionaron luego de las dos sumersiones fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio al 50% para transparentar el corion y determinar la presencia o ausencia embrionaria (Campos & Sy 2006). Los huevos embrionados que no eclosionaron luego de la segunda sumersión fueron consideraron no viables.

b) Control

El procedimiento fue similar al tratamiento, excepto que los huevos no se expusieron al evento de frío extremo (-12 ºC / 10 Hs), y fueron directamente aclimatados, desde su almacenamiento en frío (5℃), a temperatura ambiente del laboratorio.

<u>Análisis de datos</u>

Inicialmente se consideró el número total de huevos utilizados para cada tratamiento y de manera descriptiva se graficaron los porcentajes de eclosión luego de la primera y segunda sumersión, de huevos embrionados no eclosionados y de huevos no embrionados.

Para cada stock de huevos de cada tratamiento se calculó:

- La eclosión primaria, - como la proporción entre número de huevos eclosionados luego de la primera inundación sobre el número total de huevos eclosionados (suma de eclosionados luego de la primera y la segunda inundación).

- La proporción de huevos embrionados, como el número total de huevos eclosionados más los huevos no eclosionados con presencia de embriones respecto el número total de huevos.
- Finalmente se consideró supervivencia embrionaria, como el número de larvas eclosionadas tanto para la primera como para la segunda inundación sobre el número total de huevos embrionados (eclosionados o no).

El origen de la población y el efecto de las condiciones térmicas bajo 0°C sobre la eclosión y la supervivencia embrionaria fueron evaluados mediante un análisis de la varianza no paramétrico (Kruskal Wallis). La comparación entre poblaciones respecto de la proporción de huevos embrionados fue evaluado mediante un análisis de la varianza (Zar 1996). El paquete estadístico utilizado fue Infostat®(2008).

El nivel de significancia utilizado para las pruebas estadísticas fue de 0.05. Cada stock de huevos fue tratado como una réplica.

II. RESULTADOS

Temperaturas invernales

La distribución de las temperaturas mínimas del aire de Buenos Aires (región templada) resultó superior a la de Sarmiento (región árida) (Fig. II. 3). Con una mediana de 10 °C para Buenos Aires y 2°C para Sarmiento. Además Sarmiento mostró una mayor amplitud térmica (Fig. II. 3).

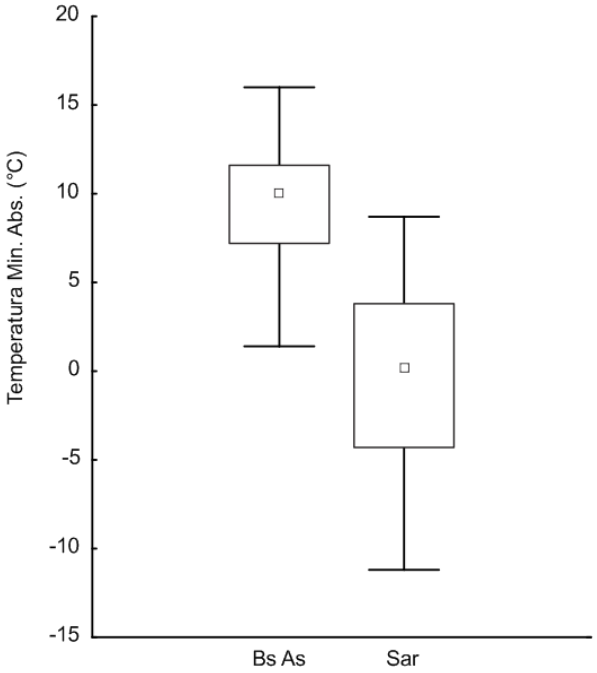


Fig. II. 3. Distribución de la temperatura mínima absoluta del aire en los sitios de estudio.

Las temperaturas mínimas absolutas del aire de Sarmiento alcanzaron entre -11 y 9ºC,(INTA) y de los 100 días analizados (periodo Mayo-Septiembre del año 2011) el 43 % demostró registros por debajo del punto de congelación (periodo 26 de julio-16 de septiembre: sin datos). Para Buenos Aires no se registraron temperaturas mínimas inferiores a 0ºC, y oscilaron entre 1.4 y 16 ºC (Fig. II. 4).

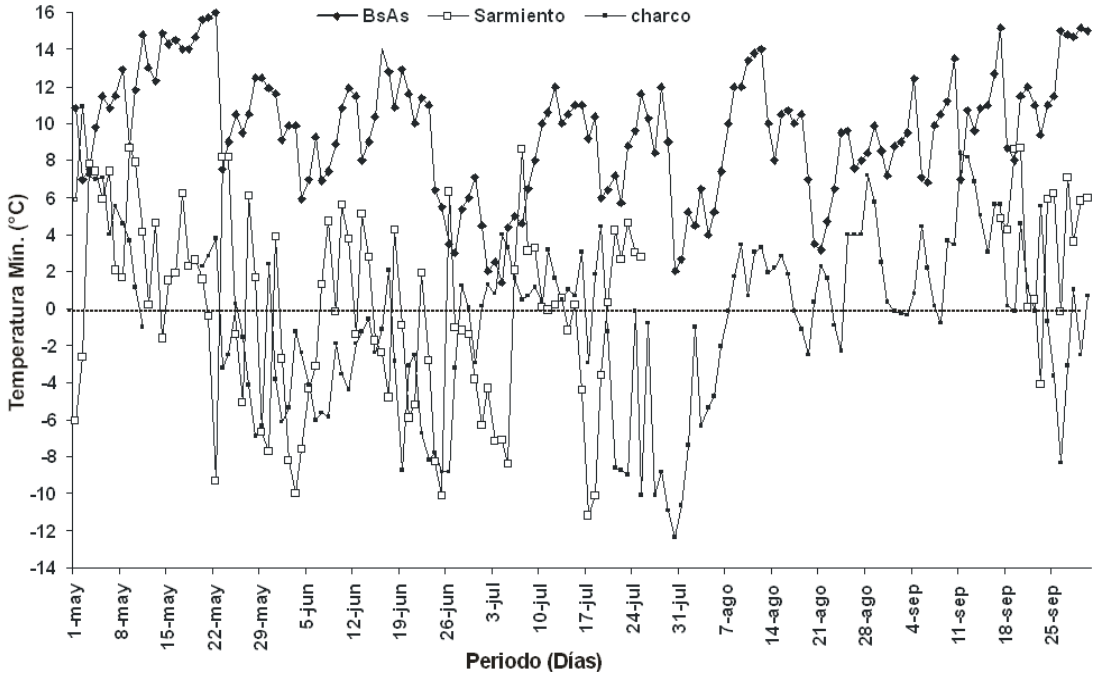


Fig. **II**. 4. Temperatura mínima absoluta diaria del aire registrada durante el periodo invernal 2011 en las dos regiones estudiadas (Bs As-rombo lleno- y Sarmiento-cuadrado vacío-) y temperatura mínima absoluta diaria a nivel del suelo de un charco efímero productor de larvas durante el periodo invernal 2009 (cuadrado lleno).

Las temperaturas mínimas diarias para el suelo del charco de Sarmiento, registradas por los sensores Hobo® (Data loggers) demostraron temperaturas mínimas absolutas entre -12.4 y 11 ºC (Fig. II 4) y de los 145 días evaluados un 49 % se halló por debajo del punto de congelación 12-19 mayo: sin datos).

La duración promedio del evento de congelamiento nocturno (tiempo en horas bajo 0ºC) de cada mes demostró una máxima en junio de 10 horas mientras que el rango más bajo de temperaturas mínimas absolutas fue entre -4.4 y -12.4 ºC (julio) (Fig. II. 5.).

La duración máxima y temperatura absoluta mínima (10 Hs y -12 ºC) sirvieron de modelo de un típico evento de congelación del invierno patagónico. Estos datos fueron los utilizados como referencia para el experimento de laboratorio.

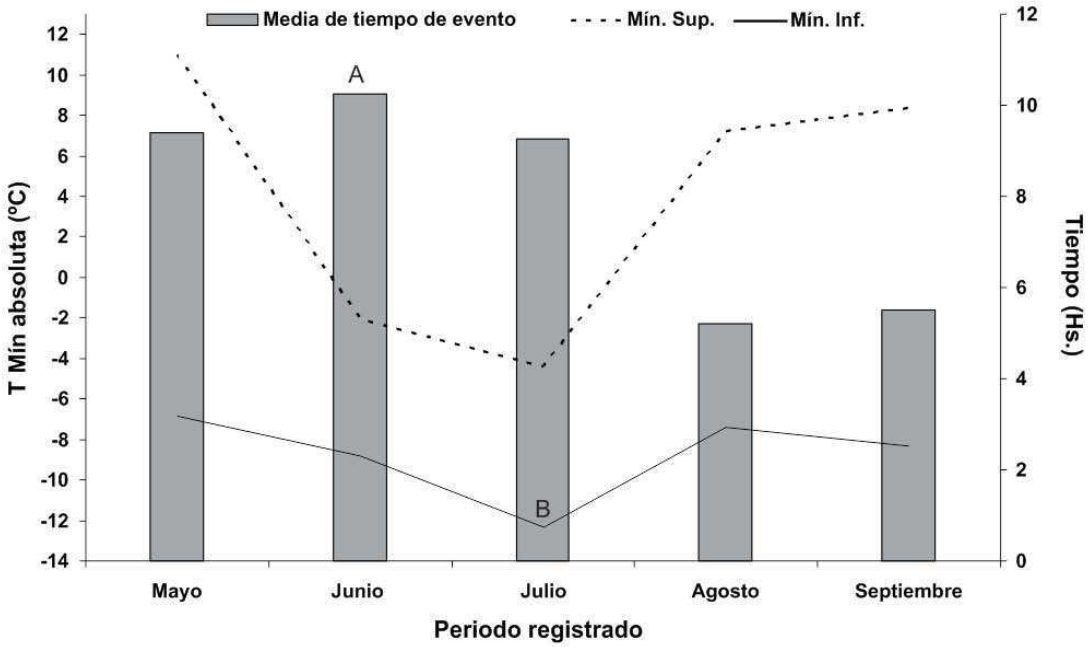


Fig. II. 5. Rango de temperatura mínima absoluta mensual (T. Mínima inferior: línea continua; T. Mínima superior: línea punteada) a nivel del suelo durante el periodo invernal mayo-septiembre de 2009 en un charco efímero, productor de larvas, en Sarmiento, Chubut. Tiempo promedio de la duración de un evento de exposición a temperaturas de congelación por mes (barras grises). A y B indica los valores de tiempo y temperatura elegidos para representar una condición térmica de invierno en Sarmiento.

Eclosiones, Huevos embrionados y Supervivencia embrionaria

Del total de huevos utilizados, el porcentaje de eclosión, luego de la primera inundación, osciló entre 66.8 y 84.6 % para cualquiera de los tratamientos. ($N_{Sar\ <ºC}$=310; $N_{Sar\ control}$=201; $N_{BsAs\ <0ºC}$= 231; $N_{BsAs\ control}$=200). El porcentaje de eclosión luego de la segunda inundación no supero el 0.5%, respecto al número inicial. Por otro lado, los huevos embrionados que no eclosionaron fueron menos del 6 % y los huevos no embrionados representaron de un 10 a un 31.9 % (Fig.II.6).

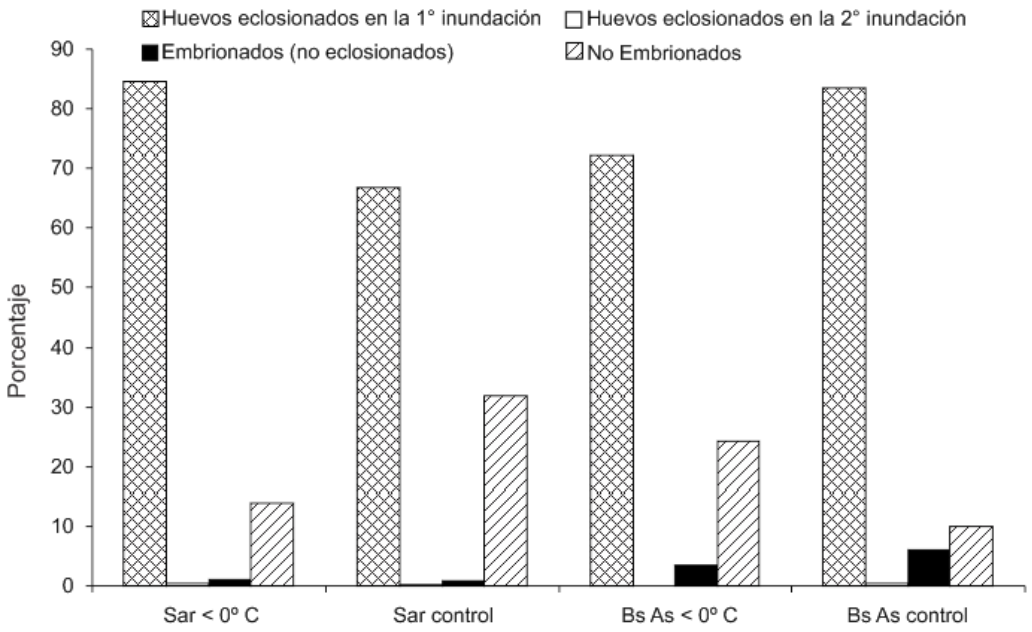


Fig. **II**. 6. Situación de eclosión de los huevos, en base al número total utilizado, de las diferentes áreas (Sar: Sarmiento y Bs As: Buenos Aires) bajo diferentes tratamientos (Control y < 0 ºC: exposición a un evento de congelamiento).

La proporción de huevos embrionados no mostró diferencias significativas entre poblaciones (Anova, p>0.05) y resultó con una media 83 % para los de Buenos Aires y del 78 % para los huevos patagónicos (Tabla.II.1).

Tabla.**II**.1. Éxito de eclosión de huevos bajo diferentes condiciones térmicas

	Proporción de huevos embrionados		Proporción de supervivencia embrionaria	Eclosionados en 1° inundación (%)	N_{stock}
Bs As <0ºC	52-99		88-99 (93.5)	100 (100)	114; 117
Bs As control	85-95	(83)	92-95 (93.5)	99-100 (99.5)	100; 100
Sarmiento <0ºC	83-88		97-100 (98.5)	99-100 (99.8)	36; 41; 42; 82
Sarmiento control	55-80	(78)	97-100 (98.7)	98-100 (99.3)	100; 100; 100

Rango de huevos embrionados (embrionados / huevos totales); supervivencia embrionaria (eclosionados / embrionados) y huevos eclosionados luego de la primera inundación (1° eclosión /eclosionados totales x100). Los números entre paréntesis indican los promedios.

La proporción de huevos embrionados que eclosionaron (supervivencia embrionaria) no se vio afectada significativamente por la temperatura extrema (<0ºC) ni por el origen de la población (Kruskall Wallis, p>0.05). La media de cada tratamiento osciló entre un 94 y

99%. Por otro lado, no se observan signos de interacción entre los factores analizados (Tabla.II.1).

Del total de huevos que eclosionaron, entre el 98 y el 100 % lo hicieron luego de la primera inundación independientemente del origen y el tratamiento (Kruskall Wallis, $p>0.05$) (Tabla.II.1).

II. DISCUSION

Se ha demostrado que los huevos de *Oc. albifasciatus* tendrían la capacidad de sobrevivir bajo condiciones de congelamiento y que esta propiedad seria mantenida incluso en poblaciones donde dichas condiciones son poco frecuentes.

Durante el invierno, las temperaturas del aire por debajo del punto de congelación fueron más frecuentes e intensas en Patagonia que en Buenos Aires. Las condiciones térmicas a nivel del suelo alcanzaron valores por debajo del punto de congelación, sugiriendo que los huevos de Sarmiento estarían expuestos naturalmente bajo escenarios extremadamente fríos.

El tiempo promedio de exposición a temperaturas bajo cero en el sustrato representa en numerosos casos el 25 a 42 % de la duración de un día. En laboratorio se ha observado para pupas de Agromyzidae (díptera) que las exposiciones durante 12 horas a -10 ºC sin previa aclimatación al frío (a 5 ó 10 ºC) provocó la mortalidad del 98 % de los individuos testeados (Chen & Kang 2004). En huevos de culícidos esto podría significar que los eventos de congelación en el sustrato podrían causar mortalidad si éstos no se encuentran previamente aclimatados o en diapausa.

La viabilidad embrionaria sugiere que este estadio del ciclo de vida, independientemente de su origen, es resistente al congelamiento (Cold hardiness), al menos para una noche de invierno patagónico. Esta característica de resistencia se ha observado en especies de insectos en otras regiones frías (Bliss & Gill 1933; Bale 2002).

La capacidad de los huevos de resistir a las condiciones de congelamiento y el poco probable fenómeno de dispersión por viento (Bejarán et al. 2008) desde la matriz desértica periférica, podrían indicar que las primeras cohortes hacia finales de la primavera de *Oc. albifasciatus* en Sarmiento provienen de la eclosión de huevos locales

que han sobrevivido a las condiciones del invierno, y por lo tanto, se trataría de una población endémica.

La resistencia al congelamiento sería un carácter conservado en la población de Buenos Aires, ya que dichas condiciones térmicas durante las estaciones frías, son comparativamente de menor intensidad y escasa frecuencia en esta región. Por lo tanto la supervivencia y proliferación de esta especie en esta localidad podría ser limitada por la escasez de precipitaciones, en lugar de las bajas temperaturas. Y a diferencia de Sarmiento, el fenómeno de dispersión desde zonas aledañas podría ser un fenómeno recurrente que podría explicar la presencia de adultos en los espacios verdes de la ciudad de Buenos Aires donde los criaderos podrían ser escasos o estar ausentes (Bejarán et al 2008). Para esta última situación se podría conjeturar con la teoría de fuente-sumidero, donde los parques de las ciudades podrían actuar como sumideros, mientras que las zonas aledañas (grande espacios verdes) como fuentes.

La supervivencia a temperaturas de congelación fue observada para especies del genero *Aedes* que habitan en las regiones árticas. Se propuso que las estrategias para evitar mortalidad por congelación en estas especies se debería a mecanismos para tolerar o evitar las temperaturas extremadamente bajas (Danks et al. 1994; Strathdee & Bale 1998; Bale 2002). Para *Ochlerotatus albifasciatus* podría sugerirse mecanismos de tolerancia, ya que dichas estrategias han demostrado ser las más económicas energéticamente, estables y frecuentes entre los insectos (Strathdee & Bale 1998).

Las temperaturas mínimas históricas de Buenos Aires suelen ser menos extremas que las de Patagonia (Fig. II. 3), con algunas excepciones. Sin embargo, dichas condiciones térmicas regionales no habrían ejercido algún tipo de presión selectiva sobre el carácter de resistencia al congelamiento. Por el contrario éste parece ser un carácter conservado en la especie, tal vez debido a su origen.

Lane (1953) sugirió una posible región patagónica entre los siete centros de endemismo y dispersión de culícidos en la región Neotropical (Morrone 2014).

Algunas posibles explicaciones para que no actuara alguna fuerza selectiva sobre el carácter de resistencia podrían ser: i) un mínimo flujo génico entre las dos poblaciones, lo cual permitió mantener el carácter ii) un periodo de tiempo evolutivo insuficiente para observar alguna adaptación térmica local para dicho carácter, a pesar del aislamiento geográfico debido a la matriz desértica periférica y iii) una fuerte selección para la conservación del carácter y su arquitectura genética (Gandon et al.1998, Kawecki & Ebert 2004).

Los huevos de *Oc. albifasciatus* no mostraron evidencia de una adaptación a las condiciones térmicas locales a pesar de las diferencias climáticas entre estas regiones de la Argentina. Sin embargo esto sí ha sido observado para huevos de *Aedes albopictus*, una especie invasora en EEUU, donde las cepas de mayores latitudes expuestos naturalmente a condiciones de invierno tuvieron mayor supervivencia que las cepas de menores latitudes (Hawley et al. 1989).

El tiempo de exposición y la temperatura (10hs, -12ºC) podrían haber sido insuficientes para observar efectos sobre la supervivencia de los huevos de *Oc. albifasciatus* de origen patagónico pero no para los de la región templada húmeda. Además, tiempos de exposición a temperaturas similares han mostrado letalidad en otras especies, tales como *Ae. albopictus* de Europa (Thomas et al. 2012).

En los organismos resistentes a temperaturas bajo 0ºC, ocurre deshidratación durante el proceso de congelamiento (Storey & Storey 1996), por lo tanto, se ha sugerido que la adaptación a este último fenómeno fue evolutivamente secundario (Danks et al. 1994). En Buenos Aires, debido a los escasos registros por debajo de cero grados, las sequías estacionales podrían afectar más la supervivencia de los huevos. En Sarmiento, las condiciones adversas que afectarían la supervivencia de huevos serían las temperaturas

extremadamente bajas junto con el aire seco (aridez). En ambos casos la adaptación de *Oc. albifasciatus* a las condiciones climáticas adversas le permiten mantenerse y proliferar como población endémica.

En el caso de Buenos Aires la tolerancia al congelamiento podría volverse un carácter útil frente a condiciones climáticas frías extremas.

En la región patagónica y a veces en la región templada de Buenos Aires, las temperaturas invernales llegan a ser extremadamente bajas. Si bien en el campo el enfriamiento o la formación de cristales de hielo (congelamiento) es un factor de terminación más común en muchas diapausas de invierno (Kostál 2006), podría pensarse en la necesidad de temperaturas gélidas para mejorar la tasa de eclosión de los huevos de *Oc. albifasciatus*, en analogía con algunas semillas de ambientes fríos que necesitan de un periodo de bajas temperaturas para la germinación (Cold stratification) (Chien et al. 1998; Walck et al. 2000; Penfield et al. 2005). Sin embargo, el porcentaje de eclosión fue elevado independientemente de la exposición a la temperatura de congelación, sugiriendo que este evento térmico extremo no influyó en el porcentaje de eclosión en ninguna de las dos poblaciones. Además los elevados porcentajes de eclosión luego de la primera inundación resultaron similares a los hallados por Campos (2008) –sin exposición al congelamiento- , lo que podría indicar que no habría diferencias regionales en cuanto al éxito de eclosión.

En La Plata, Buenos Aires Campos & Sy (2006) observaron una eclosión del 80.4 % de un total de 4222 huevos luego de la tercera inundación, mientras que el 81.5 % (674) del remanente de huevos no eclosionados estaban embrionados. El resto, aproximadamente un 5% no tenían signos de encontrarse embrionados y fueron interpretados como no fertilizados. En esta experiencia las proporciones de huevos embrionados en ambas poblaciones resultaron por debajo (78 -83 %) que lo registrado para La Plata (96% del total), indicando una variabilidad en la embriogénesis entre poblaciones.

Por otro lado, una supervivencia embrionaria del 93-98% de los embriones sugiere una alta tasa de nacimiento larval independientemente del pasaje por condiciones de congelación y del origen latitudinal de cada población. Resultados diferentes se hallaron en langostas y moscas de China, donde el grado de resistencia al congelamiento dependió del origen latitudinal de la población (Jing & Kang 2003; Chen & Kang 2004).

La capacidad de *Ochlerotatus albifasciatus* de sobrevivir ante un evento de congelación, y probablemente a más de uno en los inviernos patagónicos, podría explicar su amplia distribución territorial en el región más austral del planeta, llegando incluso hasta Tierra del Fuego. Esta capacidad en las regiones templadas podría explicar los antecedentes de eclosiones observadas en pleno invierno (Fava et al. 2001).

Los niveles de abundancia relativa dependen de las condiciones climatológicas (precipitaciones) en la región templada húmeda y de los deshielos que provocan anegamientos de los suelos altas latitudes y a elevadas altitudes. Sin embargo, en los valles patagónicos la actividad antrópica, necesaria para subsistir, fomentaría la proliferación de esta especie. Es decir, que por medio del sistema de riego utilizado para la actividad agropecuaria, se generarían criaderos constantes que favorecerían el desarrollo de este culícido de inundación.

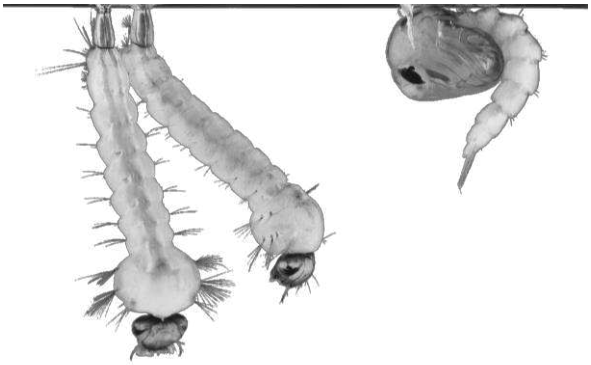
El conocimiento sobre la biología de *Oc. albifasciatus*, en especial en los valles patagónicos, es importante para un futuro planeamiento ambiental que pueda controlar y mitigar las molestias ocasionadas por las altas abundancias de estos mosquitos durante cada verano.

Las futuras líneas de investigación podrían dirigirse hacia el conocimiento de otras características de la biología de los huevos como las temperaturas mínimas letales en función del tiempo de exposición, tolerancia al congelamiento para huevos sin aclimatación, fisiología del tipo de estrategia utilizada para resistir a las temperaturas de

congelación, y finalmente, desde el punto de vista poblacional, estudios genéticos filogeográficos entre las poblaciones estudiadas.

Capítulo III

Respuestas térmicas en la biología pre-imaginal de *Ochlerotatus albifasciatus*



III. RESUMEN

Los procesos biológicos en mosquitos pueden variar en respuesta a las características climáticas locales. Se evaluaron los efectos térmicos sobre el tiempo y la tasa del desarrollo, supervivencia de los estadios inmaduros, y tamaño de los adultos en dos poblaciones locales de *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart) (Diptera: Culicidae). Una de las poblaciones corresponde a una región árida (Sarmiento) y la otra a una región templada (Buenos Aires) de la Argentina. Las larvas nacidas de huevos de ambas regiones fueron colocadas en baños térmicos de cría (rango: 11-32ºC). El desarrollo y la supervivencia fueron registrados diariamente hasta la emergencia de los adultos. El umbral de desarrollo y la constante térmica para Sarmiento (4.59±3.08°C, 204.08±7.83°D) fue menor y más alta que para Buenos Aires respectivamente (8.06±1.81°C, 149.25±2.6°D). A temperaturas frías (11-16°C), las larvas de Sarmiento demostraron mayor supervivencia (56%) que las de Buenos Aires (15%) y completaron su desarrollo en menor tiempo (5 días), mientras que a temperaturas cálidas (20-32ºC) resultaron hasta dos días más lentas y con similar supervivencia (16% vs 18%). El estimador de tamaño (ala) no mostró diferencias entre poblaciones.

Los parámetros “supervivencia de las formas inmaduras”, “tiempo de desarrollo”, “umbral” y “constante de desarrollo” de *Oc. albifasciatus* demostraron respuestas térmicas que podrían indicar una adaptación local.

III. INTRODUCCION

Los procesos biológicos en los insectos se desenvuelven dentro un determinado rango térmico, acotado por umbrales. Un incremento en la temperatura del medio, superior al umbral inferior, resulta en un aumento de la tasa metabólica del organismo (Williams & Felmate 1992). En consecuencia, la temperatura de cría de los estadios inmaduros repercute sobre la velocidad del desarrollo y el tiempo de emergencia de los imagos (Ross & Merrit 1978, Sweeney & Vannote 1981).

El tiempo disponible para la acumulación de biomasa depende del tiempo de desarrollo (TD). Se ha estudiado que individuos criados a altas temperaturas (TD cortos) resultan en adultos de menor talla respecto de aquellos criados a bajas temperaturas (TD largos) (Wise 1980). Por otro lado, el tamaño corporal de los imagos hembras correlaciona positivamente con la fecundidad (Cliffort & Boerger 1974), por lo que podría afirmarse que la temperatura es el principal factor regulador de la velocidad de crecimiento poblacional.

La relación aproximadamente lineal entre la inversa del TD (1/TD) y la temperatura de cría, ha permitido estimar la temperatura umbral (inferior) y la constante térmica del desarrollo para diferentes especies de insectos (Campbell et al 1974, Trimble & Lund 1983, Mottram & Fanning 1994, Tun Lin 2000, Teng & Apperson 2000). Aunque con cierto margen de error en su estimación (Sharpe & De Michelle 1977), estos parámetros suelen ser utilizados para detectar restricciones sobre el desarrollo por efectos geográficos, taxonómicos y alométricos (Honek 1999).

Entre las distintas especies de culícidos, *Ochlerotatus albifasciatus* se caracteriza, (entre otras particularidades), por proliferar en “aguas de inundación” (“floodwater mosquitoes”, Service, 1993) de distintas regiones climáticas en el sur de Sudamérica,

Es de esperar que una especie con una amplia distribución latitudinal y que ha podido adaptarse tanto a zonas cálidas como en áreas frías (Bachmann & Bejarano 1960, Burroni

et al. 2011) haya evolucionado con diferentes características biológicas locales (Trimble & Smith 1978).

Por ejemplo en *Culex pipiens molestus* el menor tiempo de desarrollo se registró entre las cepas provenientes de regiones tropicales cuando las condiciones de cría eran cálidas (Olejnicek 2000). Sin embargo, en otros culícidos se ha observado que poblaciones de clima frío completan su desarrollo más rápido que poblaciones de climas más cálidos en todo el rango térmico (Tauthong & Brust 1977, Trimble & Smith 1978).

En los "floodwater" mosquitos el tiempo de desarrollo ha demostrado un incremento o decrecimiento en su magnitud de acuerdo a las características del hábitat, las cuales incluyen tanto factores físicos como bióticos (Schafer & Lundström 2006), las cuales varían de acuerdo a latitud y la altitud.

Para *Oc. albifasciatus* no hay estudios sobre variaciones geográficas en la ecología del desarrollo entre poblaciones de diferentes latitudes.

III. OBJETIVO

Estudiar comparativamente los efectos de la temperatura sobre el tiempo y las tasas de desarrollo larval, la supervivencia de los distintos estadios inmaduros y el tamaño de los adultos al tiempo de la emergencia para *Ochlerotatus albifasciatus* provenientes de dos regiones climáticas diferentes dentro de su área de distribución.

III. MATERIALES Y METODOS

Colección y preparación del material biológico

Los sitios de estudio donde se colectaron los mosquitos fueron espacios verdes en la ciudad de Buenos Aires y en la zona agrícola del valle de Sarmiento.

Las hembras de *Ochlerotatus albifasciatus* fueron colectadas mediante un capturador (aspirador) eléctrico durante diciembre-enero (2010-2012) en Buenos Aires y enero-febrero 2011 en Sarmiento. Luego de capturadas, fueron dispuestas y acondicionadas en cajas de cría. Para lograr la puesta de huevos, se les brindó una fuente de sangre y un sitio para la ovispostura. Los huevos fueron dejados a temperatura ambiente (≈ 23 ºC) durante uno diez días para asegurar el desarrollo embrionario (Fava et al. 2001) y luego almacenados a aproximadamente 5 ºC para mejorar la eclosión durante los experimentos (*ver Materiales y métodos generales*)

Las larvas de primer estadio fueron obtenidas a partir de los huevos almacenados. Para ello estos fueron previamente retirados de las condiciones frías (5 ºC) y colocados durante dos semanas a temperatura ambiente (≈ 23 ºC) y a un fotoperíodo de 14:10 (L:O) para aclimatarlos y revertirlos de un posible estado de diapausa (Campos & Sy 2006). Una vez aclimatados los huevos fueron colocados en recipientes de plástico (12x12x6 cm) e inundados hasta sumersión con agua de red mezclada con una alícuota de 10 ml solución de levadura de cerveza para estimular la eclosión (Campos & Sy 2006, Campos 2008).

Tratamiento

Las larvas del primer estadio nacidas dentro de las primeras 14 Hs posteriores a la sumersión fueron colocadas individualmente en recipientes cilíndricos de 3 cm de diámetro y 5 cm de largo con 10 ml de agua de red declorada.

El diseño experimental consistió en colocar grupos entre 30 y 40 larvas (recipientes) bajo diferentes temperaturas constantes (tratamiento) utilizando bandejas térmicas (Fig. III. 1) (Loetti et al. 2001). Cada larva fue asignada aleatoriamente a un determinado tratamiento. El rango de temperaturas de cría fue de 12 - 29 ºC para Buenos Aires y de 11 - 32 ºC para Sarmiento. Inicialmente se buscó que los rangos testeados sean los mismos para ambas poblaciones, sin embargo, la temperatura del ambiente (laboratorio) afectó la regulación de los termostatos. Por lo tanto, se colocaron data loggers térmicos (Hobo®) en las bandejas, y se consideró como referencia las temperaturas medias registradas en vez de lo que indicaban los sensores de los termostatos del sistema.

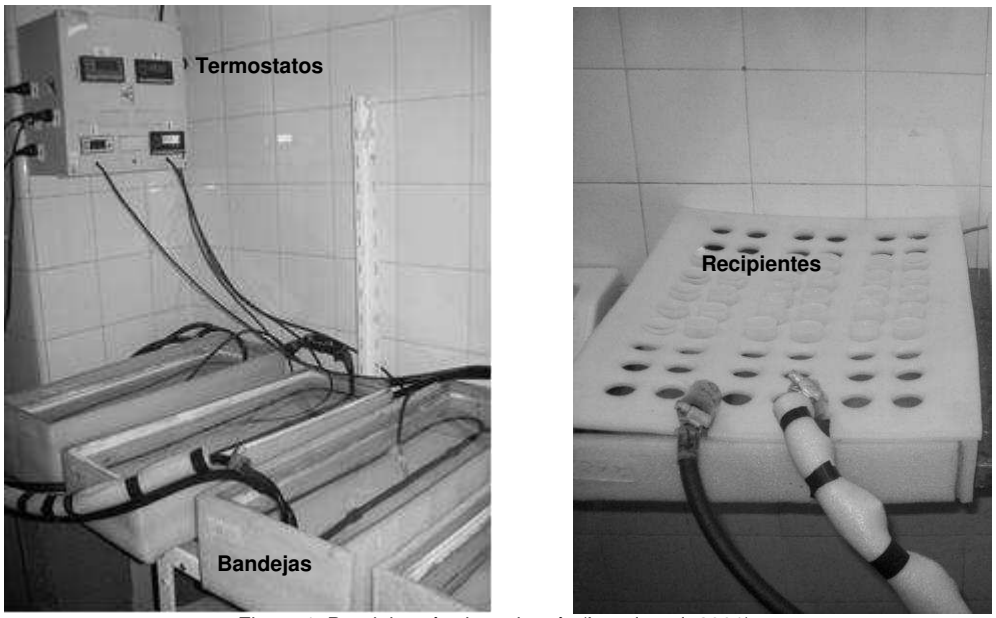


Fig.III.1. Bandejas térmicas de cría (Loetti et al. 2001).

El fotoperíodo utilizado fue de 14:10 (L:O). Las larvas fueron alimentadas diariamente con una alícuota de alimento balanceado para perros (Purina®) de acuerdo a Gerberg et al. (1994) para estadios de Aedes (I: 0.2 mg/día, II: 0.3 mg/día, III: 0.4 mg/día, IV: 0.6 mg/día). El nivel de agua en los recipientes individuales se mantuvo constante mediante el agregado de un volumen equivalente de agua evaporada.

Para no alterar (estresar) las larvas en los recipientes, se realizó solo mantenimiento (limpieza, recarga de agua, etc.) en lugar de reemplazar totalmente el agua durante el experimento.

El estadio larval fue registrado diariamente, a la misma hora. Aquellas larvas que se encontraban en proceso de muda fueron consideradas en el estadio hacia el que iban a mudar. Las larvas y pupas muertas, al igual que las exubias, fueron retiradas y fijadas en alcohol al 97%. Una vez alcanzado el estadio pupal se colocó un tapón de algodón para evitar el escape del imago.

Los adultos emergentes fueron colocados en un freezer (-12 ºC) durante una hora. El ala izquierda fue removida y luego fotografiada utilizando una cámara (Leica® DFC 295)

montada en un microscopio estereoscópico (Leica® S8 APO). La longitud del ala fue utilizada como indicador del tamaño del cuerpo del adulto (Clements 1992). La medición fue realizada desde la base del alula hasta el ápice, extremo de R3, como se indica en la Fig. III. 2.

En estudios preliminares también se consideró la longitud del fémur del 3° par de patas como estimadora del tamaño (Clements 1992). Por cuestiones operativas, ambas mediciones (Ala y Fémur) fueron correlacionadas con el objetivo de elegir sólo una como estimadora.

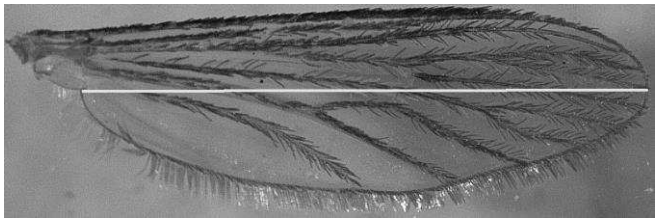


Fig. **III**. 2. Referencia de la longitud del ala como estimador del tamaño corporal.

Análisis de datos

La duración del desarrollo completo se calculó en base al tiempo (en días) transcurrido desde la eclosión de los huevos hasta la emergencia de los adultos. Mientras que el tiempo de desarrollo por estadio fue calculado como la diferencia entre el día en que se alcanzó un determinado estadio y el día en que paso al siguiente. Se tomó como tiempo cero (D=0) al momento de inicio del tratamiento y a partir de allí el tiempo fue medido como Día 1 (a las 24 hs), Día 2 (a las 48 hs), etc. Cada individuo (por recipiente) por bandeja fue considerado como réplica.

El tiempo de desarrollo total fue graficado como función de la temperatura de cría para realizar un análisis descriptivo de la respuesta, mientras que para poder comparar (estadísticamente) entre poblaciones se linealizó la función (ver análisis estadístico).

Para estimar el umbral de desarrollo inferior y la constante térmica para cada población se realizó un análisis de regresión lineal de la tasa de desarrollo (reciproca del tiempo de desarrollo =1/TD) vs la temperatura, de acuerdo a Campbell et. al (1974) y Teng & Apperson (2000). El rango térmico utilizado para las estimaciones fue de 11- 25ºC, debido a que temperaturas superiores a 25 ºC revelaron tasas aproximadamente constantes.

La supervivencia total por temperatura de cría fue calculada como el número de adultos emergentes relativo al número inicial de larvas del primer estadio. La supervivencia por estadio (dada una temperatura), fue calculada como la proporción de individuos que pasan al siguiente estadio respecto de los que iniciaron el estadio actual.

Para intentar explicar las diferencias entre poblaciones respecto del desarrollo y la supervivencia total, se analizaron comparativamente los tiempos de desarrollo y supervivencia a nivel estadio. Para ello se agruparon los individuos de acuerdo a tres rangos térmicos arbitrarios: Frío (11-16ºC), Templado (17-22ºC) y Cálido (25-32ºC).

Para cada población, se graficó la longitud del ala izquierda (asumiendo simetría con el ala derecha) en función de la temperatura y se ajustó a una función lineal.

<u>Análisis estadístico</u>

La relación tiempo de desarrollo vs temperatura fue linealizada transformando los datos de la variable respuesta al logaritmo natural (Ln (TD)) (Zar 1996). De esta manera el modelo de análisis de regresión resultó:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i \ .$$

Y la función estimada:

$$y_i = c + mx_i \ ,$$

Donde y_i es el Ln (TD), x_i es la temperatura de la bandeja de cría, "c" la ordenada al origen y "m" la pendiente de la recta.

Para cada función de regresión fue estimada la banda de confianza y el coeficiente de determinación (r^2) (Zar 1996). Mientras que para comparar las pendientes de las regresiones obtenidas se realizó la prueba de paralelismo u homogeneidad de pendientes (Chatterjee et al, 2000). En el análisis de tiempo de desarrollo en función de la temperatura por estadios se aplicó un test no paramétrico, Mann-Whitney U (Zar 1996). Para la supervivencia total y por estadio se aplicó un test de proporciones para muestras independientes (Fleiss 1981).

La relación entre el tamaño en función de la temperatura fue analizada por medio de una regresión lineal simple (Zar 1996). Para comprar los patrones respuesta entre poblaciones se realizó una prueba de paralelismo entre pendientes (Chatterjee et al 2000).

III. RESULTADOS

Tiempos de desarrollo

La relación entre el tiempo de desarrollo y la temperatura resultó de forma exponencial negativa. En ambas poblaciones se observa que el tiempo de desarrollo disminuye en forma exponencial con el incremento de la temperatura de cría ($r^2_{Bs\ As}$: 0.91 y r^2_{Sar}: 0.92). Los valores del TD van desde 6 días a 29 °C hasta 42 días a 12°C para Buenos Aires. Mientras que para la población de Sarmiento el rango de valores fue de 7 a 39 días para 32 °C y 11°C respectivamente (Fig. III. 3).

Las rectas del ajuste lineal del Ln (TD) vs la temperatura de Buenos Aires (r^2=0.91, m=-0.1, p_m<0.0001, c=4.6, N=104) y Sarmiento (r^2=0.93, m=-0.07, p_m< 0.0001, c=4.14, N=109) resultaron con pendientes significativamente diferentes (prueba de paralelismo, p<0.0001) (Fig. III. 4). A bajas temperaturas (11-16º C), el tiempo de desarrollo estimado de los ejemplares provenientes de Buenos Aires resultó hasta 4-5 días más lento respecto de las de Sarmiento. Mientras que a temperaturas templado-cálidas (20-32º C) las larvas de Buenos Aires desarrollaron, hasta 2 días más rápido, (Fig. III. 5). Aproximadamente a los 18º C ambas poblaciones mostraron tiempos de desarrollo similares.

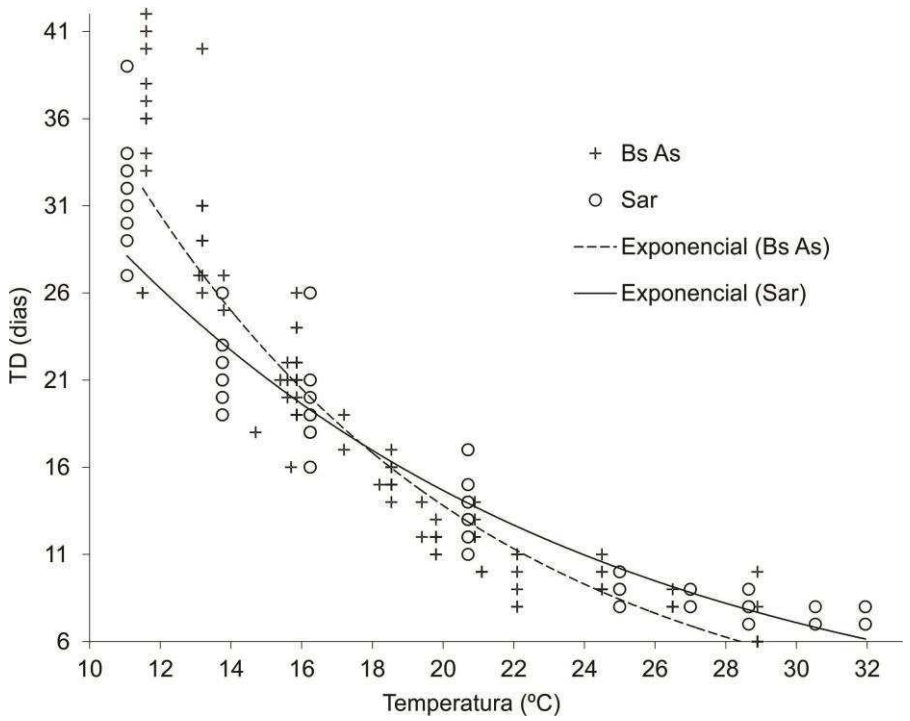


Fig. **III**. 3. Tiempo de desarrollo de *Oc. albifasciatus* en función de la temperatura (constante) de cría para individuos de Buenos Aires y Sarmiento, con sus respectiva ajustes de tendencias exponenciales.

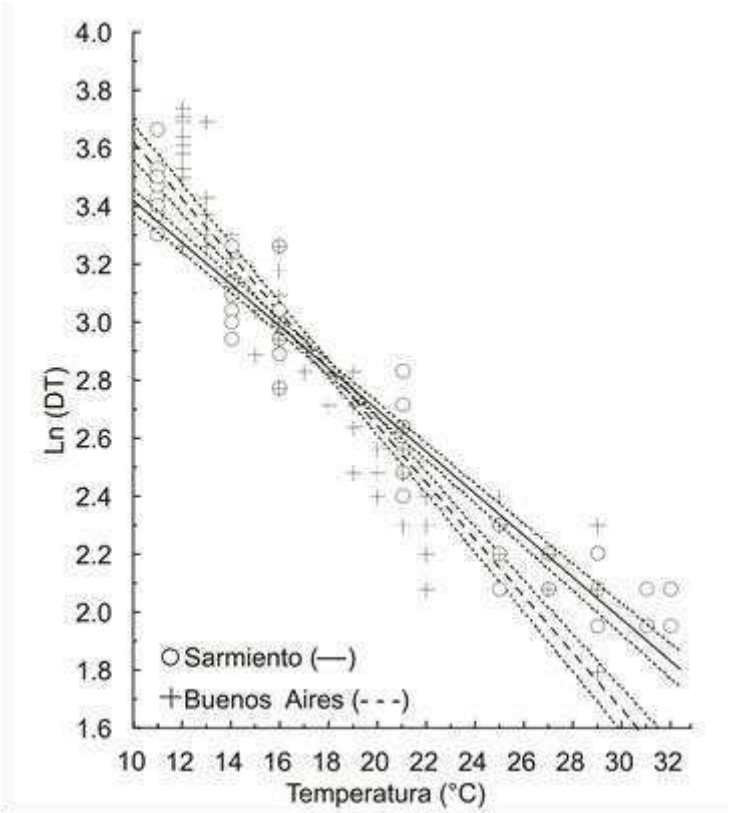


Fig. **III**. 4. Logaritmo natural del tiempo de desarrollo (Ln (TD)) en función de la temperatura constante de cría para ambas poblaciones. Las bandas de confianza se indican con línea continua para Sarmiento y puenteada para Buenos Aires.

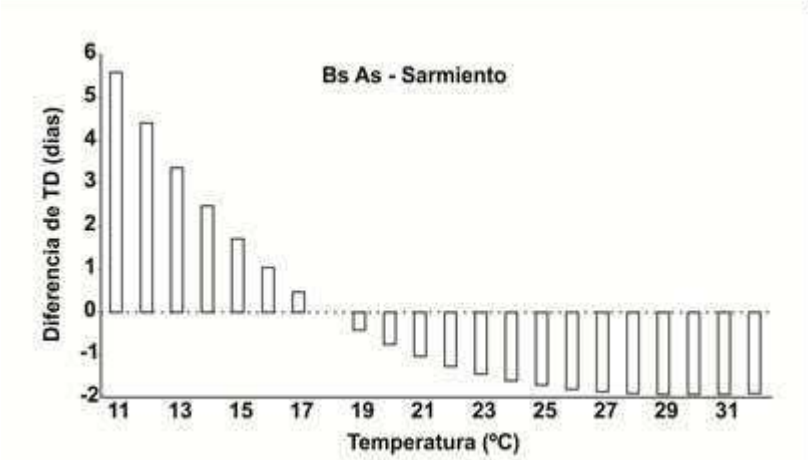


Fig. **III**. 5. Diferencia entre Buenos Aires y Sarmiento respecto del tiempo de desarrollo (TD) de *Oc. albifasciatus* (Eje Y = $TD_{Bs\ As} - TD_{Sar}$). En este caso, los TD fueron estimados a partir de la ecuación de la regresión lineal.

En ambas poblaciones (templada y árida) el TD de cada estadio mantuvo la relación inversa con la Temperatura (Fig. III. 6).

Los estadios que mejor explicaron las diferencias en el tiempo de desarrollo total resultaron I, IV y pupa a temperaturas frías, los estadios II, III y IV a templadas y sólo el estadio I para las temperaturas cálidas (Tabla. III. 1). Sin embargo, a bajas temperaturas (frías), el estadio II de Sarmiento resultó más lento en el desarrollo que Buenos Aires.

A partir de 25 ºC se minimizó el efecto sobre el tiempo de desarrollo con el incremento de la temperatura de cría, y se utilizó un rango hasta dicho valor para calcular los umbrales térmicos inferiores.

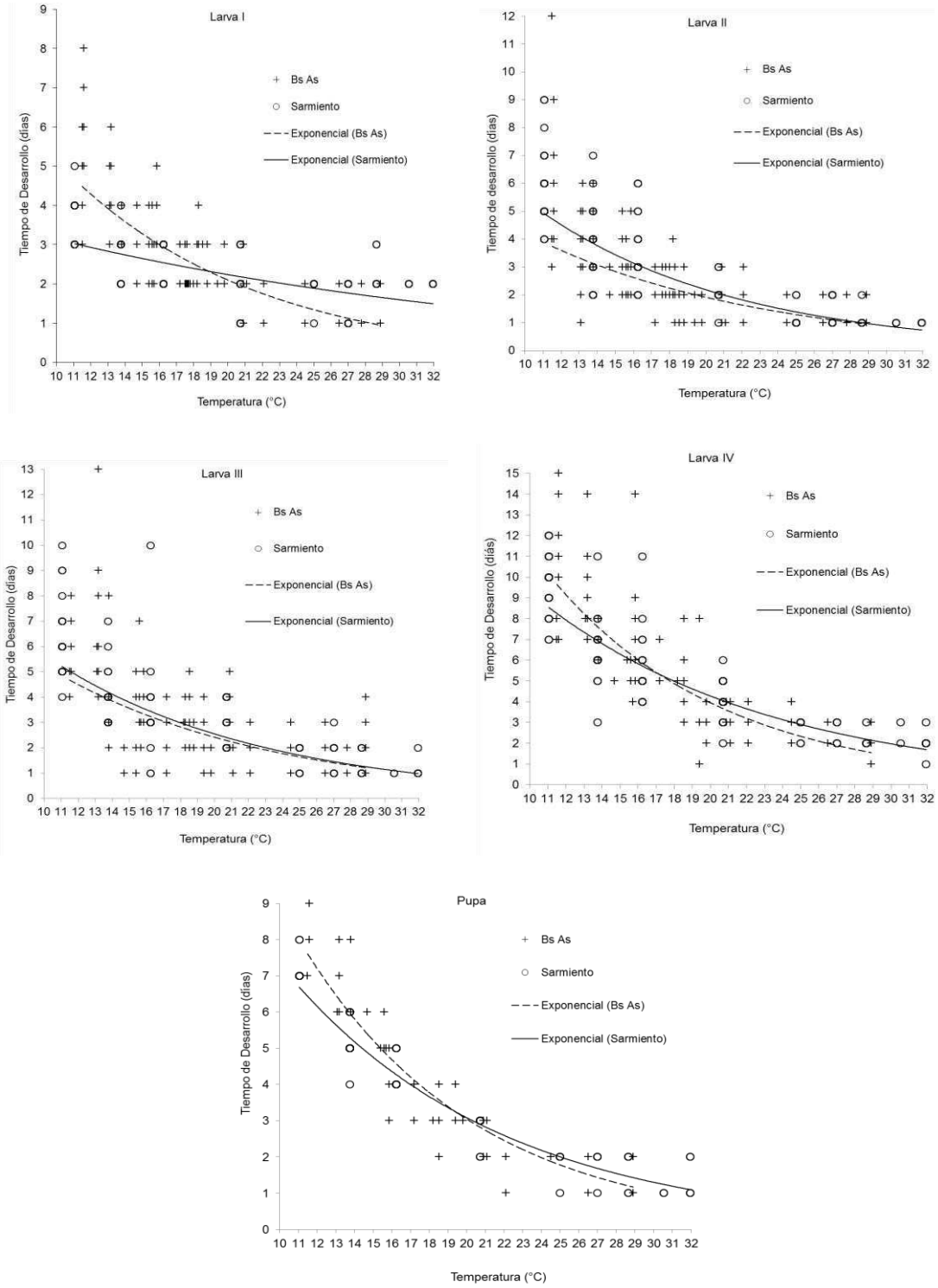


Fig. **III**. 6. Tiempo de desarrollo de *Oc. albifasciatus* en función de la temperatura constante de cría por estadio. Individuos de Buenos Aires (+) y Sarmiento (O) y líneas de tendencias para Buenos Aires (---) y Sarmiento (–).

Tabla. **III**. 1: Tiempos de desarrollo promedio ± DE (días) por estadio para las poblaciones de *Oc. albifasciatus* de Buenos Aires y de Sarmiento a diferentes rangos térmicos.

	Frio 11-16 (ºC)		Templado 17-22 (ºC)		Cálido 25-32 (ºC)	
Estadio	Buenos Aires	Sarmiento	Buenos Aires	Sarmiento	Buenos Aires	Sarmiento
I	*3.73±1.35 (209)	2.91±0.72 (119)	2.14±0.46 (174)	1.97±0.46 (38)	1.09±0.29 (158)	*1.88±0.40 (80)
II	3.56±1.43 (165)	*4.27±1.56 (105)	1.69±0.51 (138)	*2.03±0.29 (36)	1.22±0.42 (128)	1.13±0.34 (68)
III	4.47±1.93 (101)	4.49±1.79 (95)	2.24±0.91 (75)	*2.71±0.82 (31)	1.65±0.66 (60)	1.46±0.55 (46)
IV	*8.32±2.62 (59)	7.44±2.59 (81)	3.56±1.43 (41)	*4.08±0.88 (24)	2.35±0.75 (33)	2.35±0.55 (31)
P	*6.24±1.64 (48)	5.48±1.20 (67)	2.82±0.72 (34)	2.90±0.31 (20)	1.74±0.45 (24)	1.587±0.51 (22)

El tamaño de la muestra se indica entre paréntesis.
Los asteriscos (*) indican diferencias significativas cuando se compararan las dos poblaciones por estadio y para cada rango termal.

Las tasas de desarrollo en función de la temperatura (Fig. III. 7) demostraron un ajuste lineal significativo ($p< 0.0001$) para Buenos Aires (m: 0.0067, c: -0.0540, r^2:0.90) y para Sarmiento (m: 0.0049, c: -0.0225, r^2:0.89).

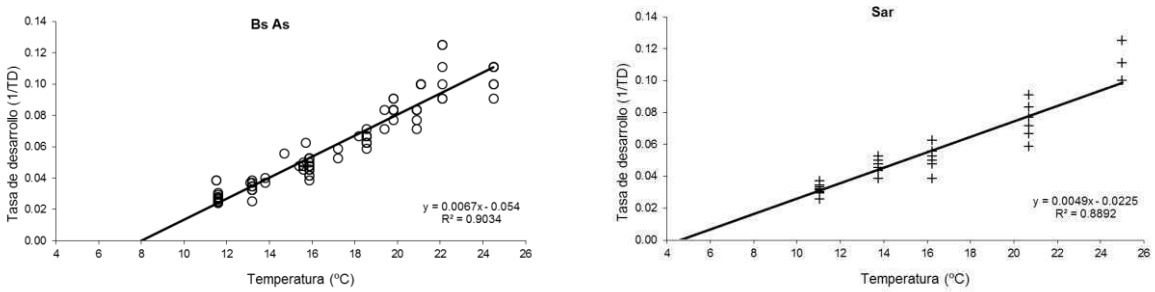


Fig. **III**. 7. Tasa de desarrollo (inversa del TD) de *Oc. albifasciatus* vs temperatura de cría para Buenos Aires (Bs As) y Sarmiento (Sar).

El umbral de desarrollo (-c/m) estimado para la población de clima templado, Buenos Aires (8.06±1.81 ºC), resultó mayor respecto de la población desértica patagónica (4.59±3.08 ºC). La constante térmica (1/m) fue mayor para la población de Sarmiento (204.08±7.83 grados día) que para la población de Buenos Aires (149.25±2.6 grados día).

Supervivencia

Las supervivencias totales (Adultos emergentes / larvas I iniciales) de los ejemplares provenientes de Buenos Aires resultaron similares en todo el rango de condiciones térmicas (0,15-0,18) (Tabla. III. 2). Mientras que para los de clima árido (Sarmiento) se observaron supervivencias significativamente mayores a temperaturas templadas (0,50) y frías (0,56) respecto de las temperaturas cálidas (0,16) (Tabla. III. 2). Al ajustar una línea de tendencia (por ejemplo un polinomio) sobre los datos de supervivencia de Sarmiento se pudo observar una tendencia máxima hacia las regiones frías del rango térmico (Fig. III. 8). Una función tipo regresión segmentada hubiera sido mas precisa pero al no tener con que comparar no fue realizada.

Para Buenos Aires no se hallaron líneas de tendencia con coeficientes de determinación aceptables (r^2 muy bajos).

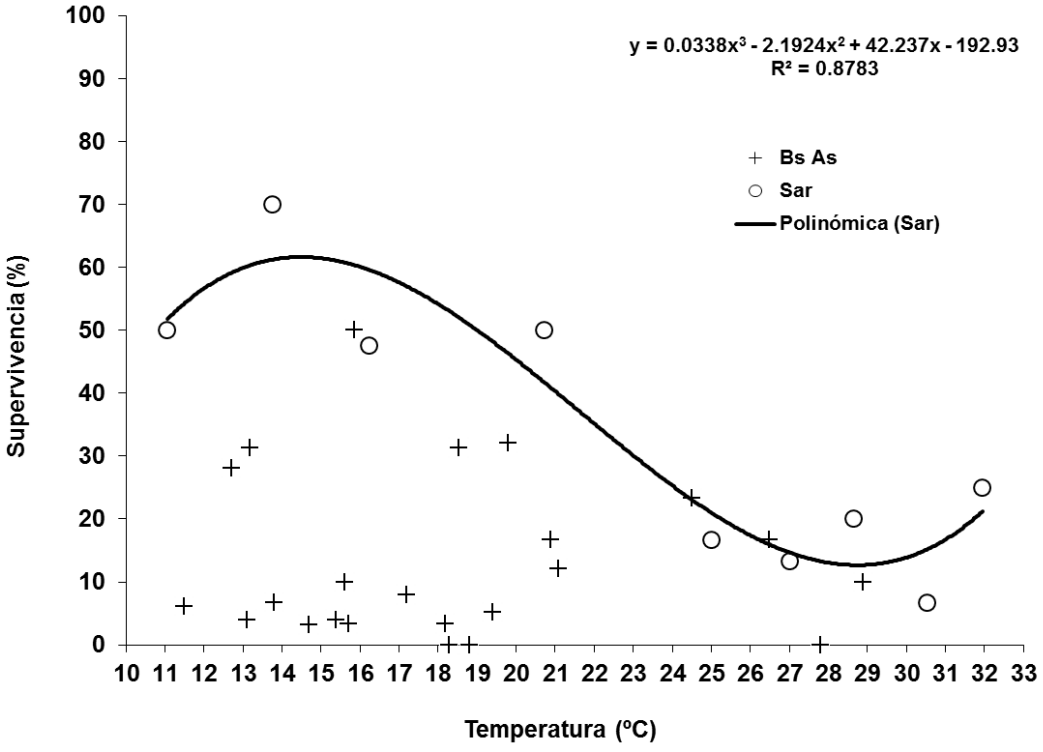


Fig. **III**. 8. Valores de supervivencia de *Oc. albifasciatus* ajustados a una línea de tendencia polinómica obtenida para la población de Sarmiento.

En larvas del primer estadio se observó un patrón diferente de supervivencias en las dos regiones (Tabla. III. 2). Para Buenos Aires la supervivencia del estadio I incrementó significativamente con la temperatura, mientras que para Sarmiento la supervivencia a temperaturas cálidas fue significativamente menor respecto de las templadas y frías. Las larvas III de Buenos Aires y las larvas III y IV de Sarmiento mostraron una supervivencia significativamente mayor a temperaturas frías.

Tabla. **III**. 2: Supervivencia total y por estadio de *Oc. albifasciatus* bajo diferentes rangos térmicos para Buenos Aires y Sarmiento.

	Buenos Aires			Sarmiento		
Estadio	11-16º C (Frio)	17-22ºC (Templado)	25-32ºC (Cálido)	11-16ºC (Frio)	17-22ºC (Templado)	25-32ºC (Cálido)
I	0.70 a (299)	0.81 b (215)	0.97 c (163)	0.99 A (120)	0.95 A (40)	0.57 B (140)
II	0.79 a (209)	0.79 a (174)	0.81 a (158)	0.88 A (119)	0.95 A (38)	0.85 A (80)
III	0.61 a (165)	0.54 ab (138)	0.47 b (128)	0.90 A (105)	0.86 AB (36)	0.68 B (68)
IV	0.58 a (101)	0.59 a (75)	0.55 a (60)	0.85 A (95)	0.77 AB (31)	0.67 B (46)
P	0.82 a (59)	0.83 a (44)	0.73 a (33)	0.83 A (81)	0.83 A (24)	0.70 A (31)
Total	0.15 a (299)	0.18 a (215)	0.15 a (163)	0.56 A (120)	0.50 A (40)	0.16 B (140)

El tamaño de la muestra se indica entre paréntesis.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre rangos térmicos para la supervivencia en cada estadio

Tamaño

El estudio preliminar sobre la relación entre longitud del ala y del fémur arrojo como resultado una correlación significativa (Prueba de Spearman: $r=0.89$; $p<<<0.05$; $N=89$). Razón por la cual se optó por medir en adelante sólo el ala.

La longitud del ala (estimador del tamaño del adulto) mostró una relación lineal inversa respecto de la temperatura para Buenos Aires (r^2=0.78; $p_{m=0}$<0.0001, N=97) y para Sarmiento (r^2=0.79; $p_{m=0}$<0.0001, N=99). En ambas poblaciones los rango de tamaño resultaron entre 2.8-4.5 mm (Fig.III.9).

Ambas pendientes (m_{Sar}= -0.05; m_{BsAs}= -0.06) mostraron superposición en sus intervalos de confianza, indicando que no habría diferencias entre la tasa de cambio del tamaño en función de la temperatura (prueba de paralelismo: p= 0.2202, NS). La ordenada al origen de ambas funciones (c_{Sar}=4.69±0.13; c_{BsAs}=4.91±0.16) se superpuso en sus intervalos de confianza.

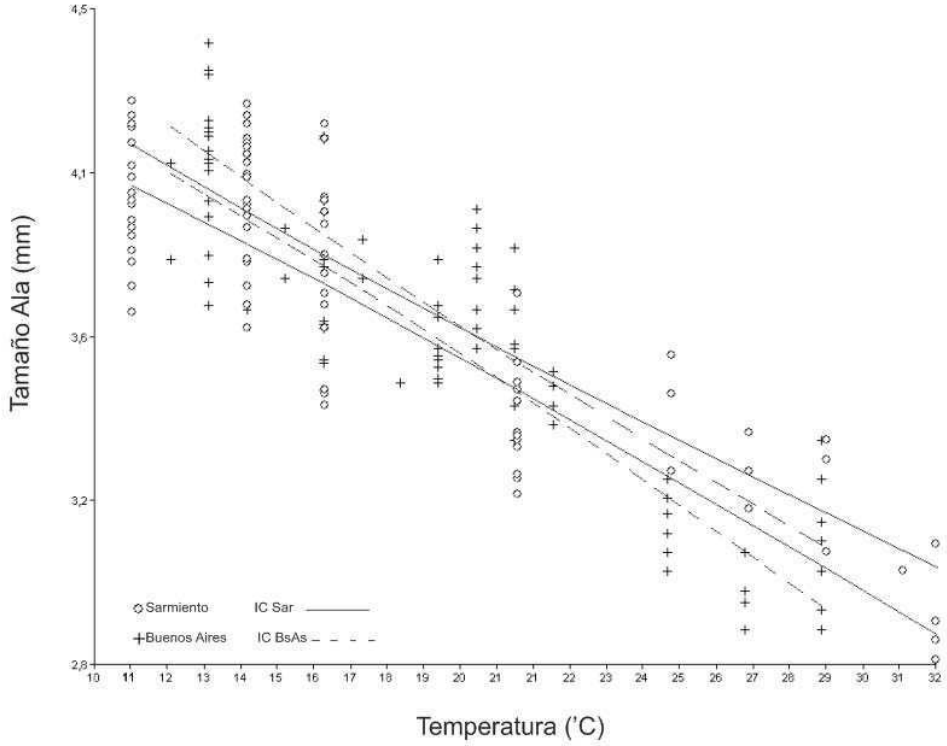


Fig. III. 9. Tamaño del ala (estimador del tamaño del cuerpo) de *Ochlerotatus albifasciatus* en función de la temperatura de cría para Buenos Aires y Sarmiento. La línea del ajuste lineal atraviesa por el medio del intervalo de confianza de Sarmiento (IC Sar) y Buenos Aires (IC Bs AS).

III. DISCUSION

La relación inversa entre temperatura y el tiempo de desarrollo, observada para ambas poblaciones, fue la esperada para los insectos en general (Wigglesworth 1972, Trimble & Lund 1983) y similar a la observada en diferentes especies de mosquitos (Clements 1963, Brust 1967, Trimble & Smith 1978, Tun Lin et al. 2000, Su & Mulla 2001, Loetti 2007).

Comparativamente los individuos de la población patagónica (Sarmiento) parecen presentar patrones de respuestas favorables frente a las características térmicas frías, mientras que las poblaciones del clima templado (Buenos Aires) frente a las temperaturas cálidas. Dichas diferencias podrían resultar de posibles optimizaciones en el ciclo de vida para afrontar las condiciones térmicas regionales.

En la población de Sarmiento esto fue reflejado en tiempos de desarrollo más cortos, mayores tasas de supervivencia a temperaturas frías y un menor umbral térmico para el desarrollo. Mientras que en la población de Buenos Aires se observó que a temperaturas cálidas, los tiempos de desarrollo resultaron de menor duración y el umbral mínimo de desarrollo fue mayor. La supervivencia no mostró una temperatura óptima.

Aunque el éxito de la población podría depender fuertemente de la supervivencia de los estadios inmaduros, un tiempo desarrollo más corto podría asegurar o favorecer el éxito reproductivo de la especie, como por ejemplo, al completar el desarrollo antes de la evaporación de un charco.

Trabajos en *Tx. septentrionales* y *Ae. triseriatus* han sugerido similares tipos de respuesta adaptativa frente a las condiciones térmicas locales, las cuales dependen en muchos casos de la latitud geográfica (Trimble & Smith 1978, Trimble & Lund 1983, Teng & Apperson 2000). La estrategia de desempeñarse mejor a temperaturas frías por parte de los individuos de clima árido fue observada en otros mosquitos de regiones de clima fríos y desérticos (Danks 1994).

Oc. albifasciatus es la única especie de mosquito de inundación adaptado al extremo sur de Sudamérica. Lane (1953) sugirió a la región patagónica como un posible centro de endemismo y dispersión para los culícidos en la región neotropical (Morrone 2014). Bajo este concepto, *Oc. albifasciatus* podría conservar algunas características en ambas poblaciones estudiadas, tales como la resistencia al congelamiento de los huevos (Garzón et al. 2013). Sin embargo, otras características del ciclo de vida podrían mostrar patrones que ajusten a las diferentes condiciones locales tales como un incremento en la supervivencia larval y un desarrollo de menor duración a bajas temperaturas. Esta plasticidad de respuesta a condiciones térmicas particulares podría ser una característica que permita explicar la amplia distribución geográfica de la especie, desde latitudes templadas hasta latitudes frías, como la pampa húmeda y la región patagónica. Sin embargo, el límite de distribución restringido hacia el norte del continente sugiere que habría otros factores bióticos (alimentación, competencia, depredación, parasitismo, etc.) que podrían ser más relevantes.

A bajas temperaturas, los estadios inmaduros I, IV y pupa podrían llegar a explicar las diferencias de los TD completos entre Buenos Aires y Sarmiento. A temperaturas templadas las diferencias podrían explicarse por las diferencias entre los estadios II-IV, mientras que para el rango frio sólo por el estadio I. En algunos estadios, el desarrollo no se vio favorecido por algún rango térmico y en el caso más extremo no se pudo explicar por qué las larvas del segundo estadio de regiones templadas desarrollaron más rápido que las de regiones frías cuando se someten a bajas temperaturas.

Respecto de los parámetros del desarrollo, la constante térmica obtenida para la población de la región templada fue menor que para la patagónica, es decir los individuos de verano de Buenos Aires requieren en teoría una menor cantidad de grados-día acumulados para completar el desarrollo larval y por lo tanto estarían mejor adaptados a los regímenes de secado de los charcos El umbral de desarrollo para Sarmiento fue

menor que el de Buenos Aires. Es decir, que los individuos de la región patagónica tendrían la capacidad metabólica de desarrollar a temperaturas menores que los de la región templada. Esta diferencia de respuesta podría ser otro indicio de adaptación local a las condiciones térmicas de origen.

Para los individuos de latitudes altas, un menor umbral térmico implicaría la capacidad de desarrollo al inicio de la estación favorable donde aún se registran temperaturas bajas. Además esta característica permitiría continuar con el desarrollo en Sarmiento durante las jornadas frescas o por las noches durante el verano.

Para el hemisferio norte, Trudgill & Perry (1994) demostraron que especies adaptadas a latitudes altas, tuvieron un menor umbral térmico y una mayor tasa de desarrollo a bajas temperaturas. Mientras que aquellas especies de menores latitudes demostraron umbrales más altos y un desarrollo más rápido a temperaturas cálidas.

Otro tipo de respuesta se observó en pupas de *Tx. septentrionales* de regiones frías, latitudes altas, donde el requerimiento térmico fue menor tanto para temperaturas frías como cálidas, sugiriendo una adaptación fenológica a los veranos más cortos (Trimble & Smith 1978).

En *Oc. albifasciatus* como en la mayoría de los poiquilotermos multivoltinos, distribuidos a los largo de un gradiente latitudinal, la variación en los parámetros del ciclo de vida podría contribuir a afrontar la variedad de climas, en cuanto a longitud de la estación favorable (Roff 1980). Por ejemplo, reducción del tiempo de desarrollo y del umbral térmico para mayores latitudes. Estas variaciones geográficas obedecerían a una regla de “mayor latitud, menor umbral de desarrollo y mayor constante térmica” demostrada a nivel ínter específico (Honek 1996) y con algunos ejemplos a nivel intraespecífico. El presente trabajo sugiere que las poblaciones estudiadas de *Oc. albifasciatus* aportarían otro ejemplo a este último nivel.

Si el rango de temperaturas estudiado representara el periodo estival para Sarmiento y todo el año Buenos Aires, los resultados sugieren que bajo condiciones de campo, y sin otros factores de mortalidad, la supervivencia de los individuos de *Oc. albifasciatus* de Sarmiento se vería favorecida por temperaturas más bajas al comienzo del verano. Mientras que en Buenos Aires la supervivencia durante todo el año, no mostraría un rango de temperaturas favorables.

Las claves para entender los patrones de supervivencia total estarían a nivel de los estadios. Por ejemplo, en las larvas de I, III y IV estadio de Sarmiento se observó una mayor supervivencia a bajas temperaturas y un patrón inverso para las larvas de primer estadio de Buenos Aires. Los patrones de supervivencia entre los individuos de *Oc. albifasciatus* provenientes de diferentes poblaciones sugieren una plasticidad de respuesta a las condiciones térmicas de acuerdo a la región de origen, tal como se ha observado entre cepas de *Aedes aegypti* de distintas regiones de Estados Unidos (Tun Lin 2000) y entre poblacionales de *Ae. albopictus* (Ayres et al 2002, Monteiro 2007).

El efecto de la acumulación de la biomasa durante el desarrollo larval suele observarse en el tamaño resultante de los adultos, que a su vez correlaciona con la fecundidad (Tun Lin et al., 2000; Armbruster & Hutchinson 2002, Lehmann et al., 2006). En *Oc. albifasciatus*, como en otras especies, elevadas temperaturas de cría resultaron en desarrollos más rápidos y en adultos de menor talla y viceversa (Rueda 1990). Por lo tanto, es esperable un efecto del tamaño sobre la fecundidad como consecuencia del tiempo de desarrollo dependiente de la temperatura, lo cual podría ser evaluado en futuros experimentos.

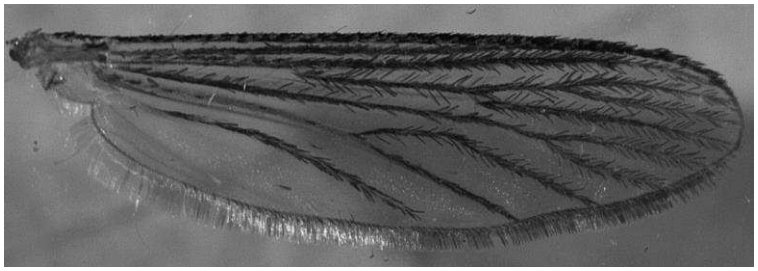
Los tamaños corporales en función de la temperatura de cría no difirieron entre ambas poblaciones. Sin embargo a bajas temperaturas el tiempo de desarrollo de la población árida resultó menor que la de la región templada y viceversa. Esto podría sugerir una mayor eficiencia en la acumulación de biomasa a bajas temperaturas para Sarmiento y temperaturas cálidas para Buenos Aires. Hipótesis a corroborar en futuros experimentos.

Comparativamente, se podría concluir que algunos parámetros (tiempo de desarrollo y eficiencia en la acumulación de biomasa) para *Oc. albifasciatus* de la región templada, indicarían una temperatura óptima dentro de un rango térmico cálido. Mientras que para Sarmiento, el tiempo de desarrollo, la supervivencia y la eficiencia para la acumulación de biomasa, indicarían una temperatura optima dentro del rango de las frías.

La información del efecto de la temperatura sobre el desarrollo y la supervivencia de los estadios inmaduros de mosquitos son necesarios para el diseño de modelos de poblaciones y estrategias de control (Rueda 1990).

Capítulo IV

Morfometría geométrica en alas de *Ochlerotatus albifasciatus*



IV. RESUMEN

La amplia distribución biogeográfica de *Ochlerotatus albifasciatus* podría suponer un cierto grado de variabilidad intraespecífica. Se buscaron diferencias morfológicas entre las subpoblaciones de Buenos Aires (pampa húmeda) y Sarmiento (estepa patagónica) aplicando morfometría geométrica en las alas.

Imágenes fotográficas de las alas fueron caracterizadas con 17 puntos de referencia (Landmark: LM). Los LM fueron utilizados como set de datos para el cálculo de un estimador del tamaño (Centroid Size: CS) y de variables de conformación (Shape). La conformación del ala no resultó afectada por el tamaño, sugiriendo que los LM utilizados mantendrían una propiedad isométrica. El tamaño de las alas no difirió entre poblaciones. Las alas de las hembras resultaron significativamente de mayor tamaño que los machos. Sólo en la población de Sarmiento La conformación de las alas resultó diferente entre sexos, más delgada en los machos, indicando un dimorfismo sexual. También se detectaron diferencias significativas entre las dos poblaciones. Por otro lado, un análisis discriminante permitió separar significativamente entre poblaciones y entre sexos con un error de clasificación menor al 25 %.

Las diferencias de conformación alar halladas en este estudio podrían deberse a las características climáticas y/o condiciones ecológicas locales sumado un posible aislamiento geográfico.

IV. INTRODUCCION

La variabilidad intraespecífica se ha observado en muchas especies de insectos y particularmente en mosquitos (Hribar 1994, Honek 1996, Rubio Palis 1998, Ambruster et al. 2001, Jing & Kang 2003, Vinogradova 2003, Chen & Kang 2004, Ambruster & Conn 2006, Khlatchikian et al. 2009). Para *Oc. albifasciatus* se ha demostrado la existencia de variaciones en las distancias genéticas evaluadas a nivel molecular que correlacionaron positivamente con las distancias geográficas. En el centro de Argentina, existiría una clina norte – sur de por lo menos 500 km, indicando una restricción al flujo génico entre las áreas de cría de poblaciones locales (De Sousa et al. 1996, De Sousa et al. 1999). Estas diferencias genéticas podrían resultar en diferencias morfológicas que permitan diferenciar anatómicamente a los ejemplares de poblaciones de diferentes regiones. Por otra parte las características de regiones climáticas contrastantes, como las ecoregiones de estepa patagónica y la pampa húmeda (Burkart et al. 1999), podrían favorecen variaciones locales (Trimble & Smith 1978, Ayres & Scriber 1994, Bardshaw et al. 2000, Stacey & Fellowes 2002).

El análisis por morfometría geométrica, aplicado en el área de la taxonomía, se ha complementado exitosamente a los estudios moleculares y las descripciones morfológicas clásicas (Solano et al. 1999, De la Riva et al. 2001, Dvorak et al. 2006, Mutanen & Petrorius et al. 2007, Calle et al. 2008, Gafur & Ajizah 2008, Morais et al. 2010). Esta metodología resulta de mayor ecuanimidad para detectar diferencias morfológicas intra o interespecíficas (Calle et al. 2002, Mutanen & Petrorius et al. 2007, Vidal et al 2011, Soto Vivas 2011, Vásquez & Liria 2012), y para evaluar diferentes efectos, como condiciones de cría, líneas de laboratorio, variación geográfica, etc (Jirakanjanakit & Dujardin 2005, Jirakanjanakit et al. 2007, Soto Vivas et al. 2007, Jirakanjanakit et al. 2008, Aytekin et al. 2009, Stephens & Juliano 2012).

En teoría, las características del ala podrían ser reflejo de las condiciones micro ambientales locales que impondrían un arreglo óptimo de las partes del ala (Henry 2010), la cual podría variar intra-especificamente en tamaño y conformación de una región a otra.

IV. OBJETIVO

Explorar las posibles variaciones morfológicas entre sub-poblacionales de *Ochlerotatus albifasciatus* de eco-regiones contrastantes (pampa húmeda vs estepa patagónica), aplicando técnicas de morfometría geométrica en alas.

IV. MATERIALES Y METODOS

Población de origen

Las dos sub-poblaciones de *Oc. albifasciatus* en estudio, Buenos Aires (34° 36' S, 58° 26' O) y Sarmiento (45° 35' S, 69° 05' O), forman parte de las ecoregiones de Argentina con mayor proporción de superficie total en el territorio de Argentina: Pampa húmeda 15.7% y Estepa patagónica 20.1%. La primera ecoregión, donde se ubica la ciudad de Buenos Aires, posee un clima templado-húmedo, mientras que la segunda, donde se ubica la ciudad de Sarmiento, posee un clima árido de estepa (Peel et al. 2007). Ambas poblaciones se encuentran separadas entre sí por una matriz desértica, a una distancia de aproximadamente 1400 Km.

Alas

Los mosquitos adultos utilizados para el análisis se desarrollaron a partir de larvas provenientes de eclosiones inducidas en laboratorio. Los "pooles" de huevos utilizados fueron obtenidos a partir hembras capturadas en el campo en ambas localidades.

Los estadios inmaduros fueron criados en laboratorio bajo un rango de temperaturas 12-29° C, un fotoperiodo 14:10 Hs. (L:O) y alimentados diariamente con una alícuota de alimento balanceado para perros (Purina®) de acuerdo a Gerberg et al. (1994). Una vez completado el desarrollo, los adultos fueron "freezados" y los que se encontraron en mejor estado fueron seleccionados para la posterior disección. El ala izquierda de cada individuo fue extraída del tórax con la ayuda de una pinza fina, colocada entre porta y cubreobjetos

y fotografiada con una cámara (Leica® DFC 295) acoplada un microscopio estereoscópico (Leica® S8 APO).

En total se obtuvieron registros fotográficos de 135 alas: 24 Machos y 36 Hembras para Buenos Aires y 32 Machos y 43 Hembras para Sarmiento. Una vez obtenida la imagen fotográfica digital se seleccionaron 17 puntos del ala –Landmarks (LM)- (Fig. IV. 1) y con el software tps-DIG 2.16 (Rohlf 2010) se generaron coordenadas cartesianas en dos dimensiones, que caracterizaron a cada individuo.

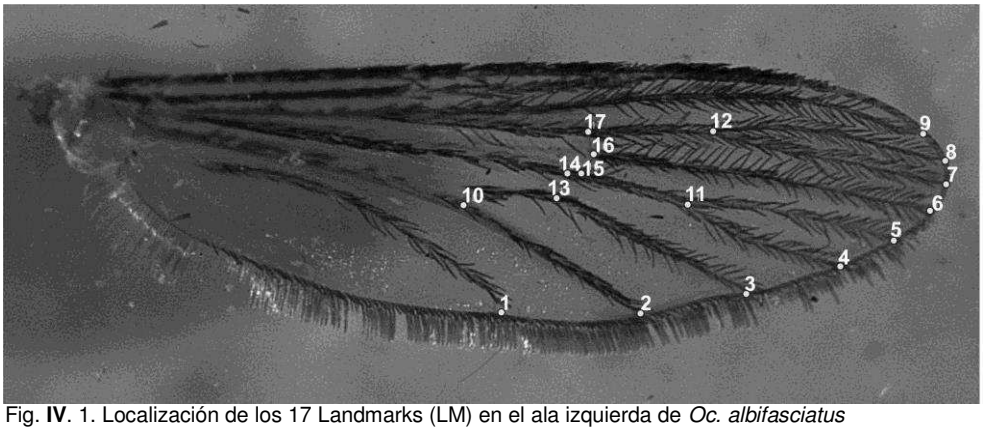


Fig. **IV**. 1. Localización de los 17 Landmarks (LM) en el ala izquierda de *Oc. albifasciatus*

<u>Tamaño de centroide y Conformación</u>

Para comparar el tamaño total del ala entre los diferentes grupos (sexo/población), se utilizó el estimador isométrico del tamaño conocido como *Tamaño del Centroide* (Centroid Size: CS) derivado de los datos de coordenadas cartesianas. El CS es definido como la raíz cuadrada de la suma del cuadrado de las distancias entre el centro de la configuración de los LM (Centroide) y cada LM (Bookstein 1991).

Las configuraciones de LM obtenidas fueron trasladadas, rotadas y escaladas de acuerdo al método de superposición Procrustes (Bookstein 1991) utilizando el software MorphoJ®

1.05 (Klingenberg 2011). De esta manera se generaron las coordenadas Procrustes, las cuales fueron utilizadas como variables de conformación (Shape).

Análisis estadísticos

Para evaluar la existencia de alometría de la conformación, se realizó una prueba de regresión multivariada utilizando al CS como variable independiente y a la conformación (Shape) como variable dependiente (Rolhf 1993, Zelditch et al. 2004).

Las diferencias de CS entre grupos fueron testeadas estadísticamente usando el test de Wilcoxon (no paramétrico, Zar 1996), previa logaritmación de los datos [Ln (CS)].

Las coordenadas de conformación derivadas del algoritmo de Procrustes se utilizaron para comparar entre los grupos: sexos y población (macho,Sar/ hembra,Sar/ macho, BsAs/ hembra,BsAs). La comparación se realizó mediante un análisis componentes principales (PCA) y un análisis discriminante de a pares (AD) (Zelditch et al. 2004). Para asociar niveles de inferencia estadística a las diferencias entre poblaciones, se utilizaron los componentes principales (CP) para una prueba t (Machos) o Mann-Whitney U (Hembras) (Zar 1996). En todos los casos se utilizó un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

El software MorphoJ® 1.05 (Klingenberg 2011) fue utilizado para visualizar los cambios de conformación de las alas entre los grupos a lo largo del CP1. Esto consistió en el cálculo de una configuración consenso, grillas sobre un plano deformado (thin-plate spline), vectores de deformación y un modelo de trazado de líneas –wareframe- (Zelditch et al. 2004).

IV. RESULTADOS

La regresión multivariada de la conformación (Shape) en función del tamaño (CS) resultó significativa sólo para la población de Bs As ($p<0.05$). Sin embargo, en todos los grupos la varianza de la conformación explicada por el modelo (r^2) resultó menor al 8.5 % (Tabla. IV. 1). Por lo tanto la conformación resultó independiente del tamaño.

Tabla.IV.1. Prueba de alometria [Shape en función del CS]

Sexo-Población	Varianza Total	Varianza Predicha	Varianza Residual	n	% predicho	p-valor
H Bs As	0.05186	0.00369	0.04817	36	7.1	0.005
H Sar	0.04348	0.00106	0.04242	43	2.4	0.395
M Bs As	0.02490	0.00212	0.02279	24	8.5	0.038
M Sar	0.02953	0.00154	0.02799	32	5.2	0.086

Nivel de significancia ($\alpha=0.05$)

El tamaño de las alas no mostró diferencias entre poblaciones (Machos: *Prueba de Kruskal Wallis,* K=2.969, p=0.085; Hembras: *Prueba de Kruskal Wallis,* K=0.002, p=0.969). Sólo para Sarmiento las alas de las hembras resultaron de mayor tamaño que la de los machos (*Prueba de Kruskal Wallis,* K=16.4838, p=0.00005). Por otro lado, se observó una variabilidad de tamaño mayor para la población de Buenos Aires (Fig. IV.2). Probablemente la no detecciones de outliers podría explicar la diferencia de distribuciones del tamaño, mas amplia para Buenos Aires .

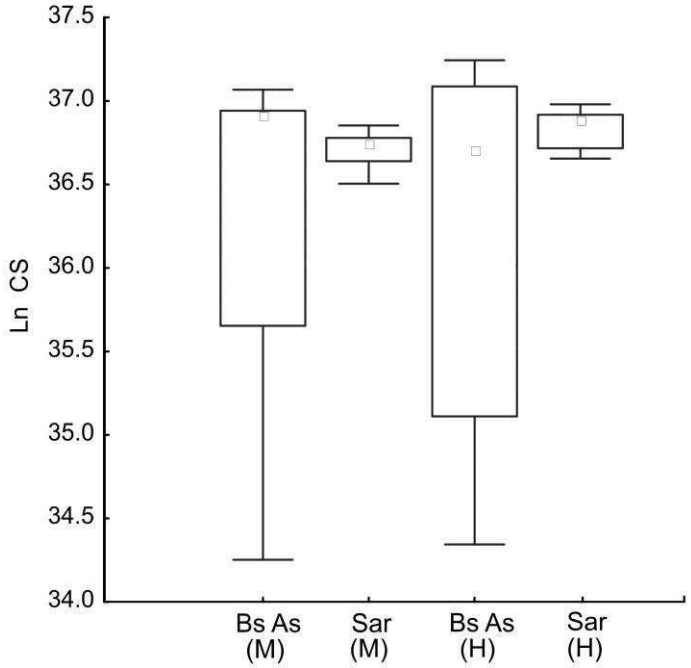


Fig.IV.2. Logaritmo natural del estimador isométrico del Tamaño (Ln (CS)) para los cuatro grupos de estudio.

Respecto de la conformación del ala, la primera componente principal explicó el 71% de la varianza total y separó mejor los sexos que las poblaciones. Por otro lado, variabilidad en Sarmiento resultó menor que en Buenos Aires, indicado por la elipse de confianza del 90% (Fig.IV.3). La comparación entre poblaciones para cada sexo mostró diferencias significativas (Machos: Prueba t, p=0.0003; Hembras: Prueba Mann-Whitney U, p=0.0009).

La grilla deformada y los vectores de deformación permitieron visualizar las diferencias en la conformación, a lo largo del CP1, como variaciones de los 17 landmarks elegidos respecto de la configuración consenso. Los mayores efectos de deformación se observaron en los vectores pertenecientes a los puntos 1 (intersección: A_1 y borde) y 12 (intersección: R_2 y R_3), y en menor medida en 11(intersección: M_1 y M_2). Tanto 11 como 12 se desplazan hacia la base del ala, mientras que 1 lo hizo en sentido contrario (Fig.IV.4). La mayor deformación se observó en el centro y en el borde inferior.

Las diferencias más visibles en la conformación se observó entre sexos para cada una de las poblaciones, siendo la forma más ahusada o delgada para los machos (Fig.IV.5).

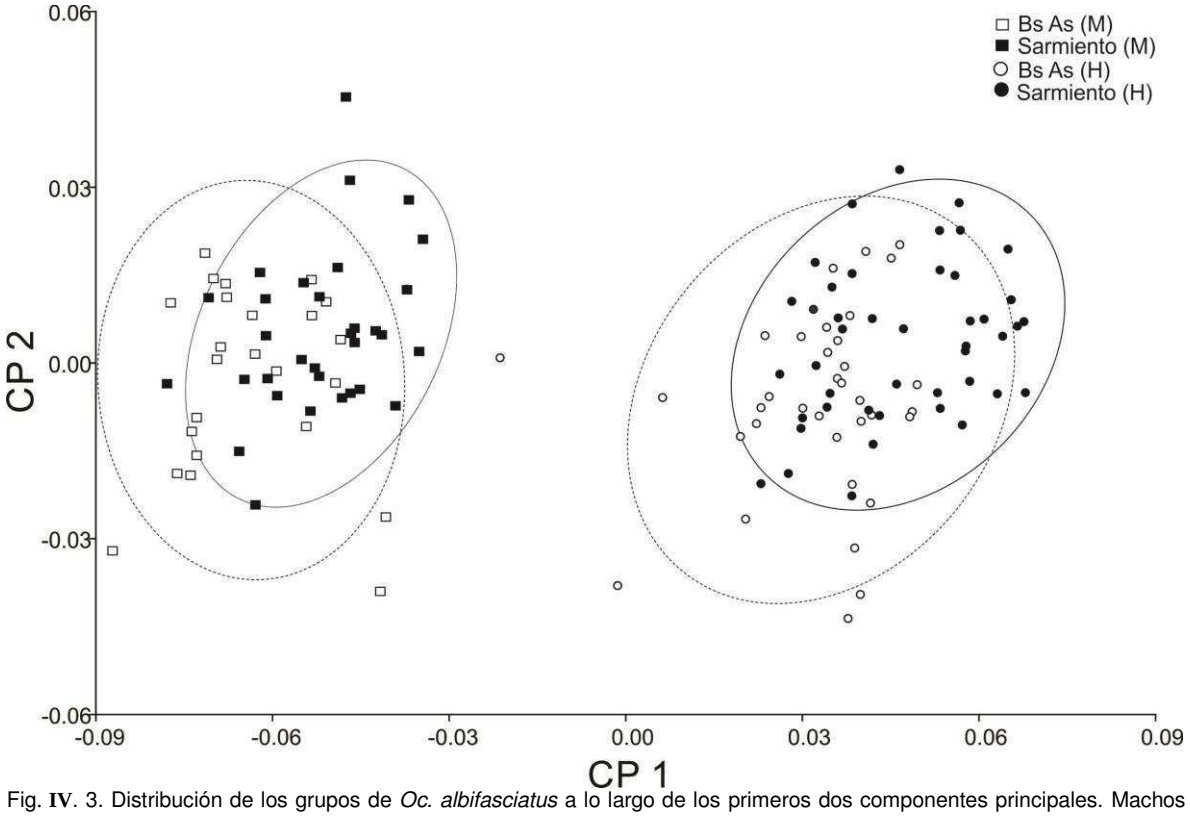


Fig. IV. 3. Distribución de los grupos de *Oc. albifasciatus* a lo largo de los primeros dos componentes principales. Machos Bs As (cuadrado vacío) y Sarmiento (cuadrado lleno); Hembras Bs As (circulo vacío) y sarmiento (circulo lleno).

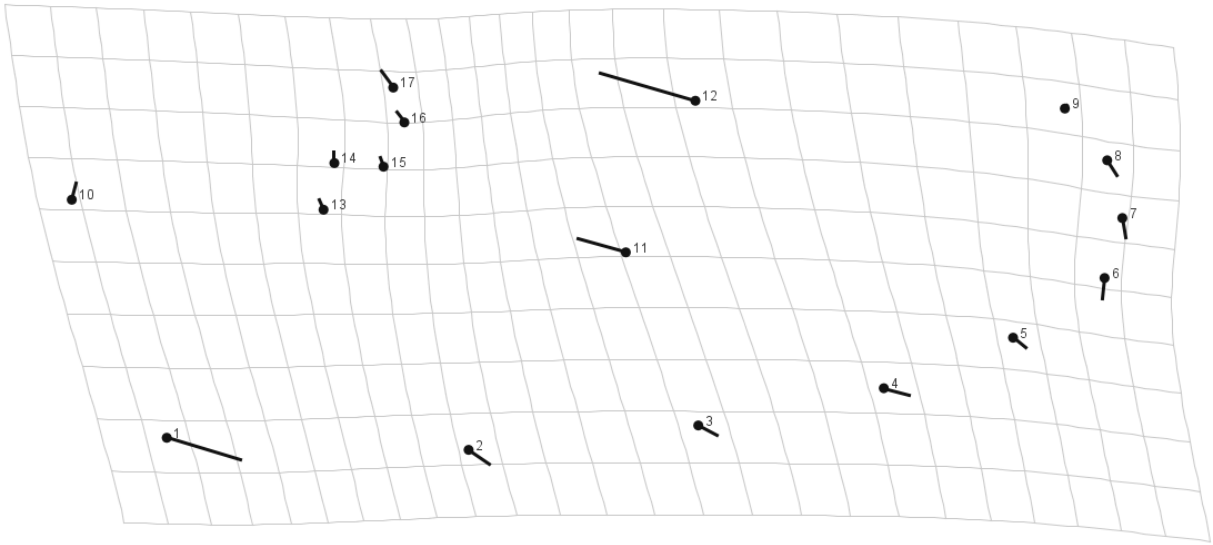


Fig. IV. 4. Grilla sobre plano deformado mostrando la diferencia entre la conformación media del ala de *Oc. albifasciatus* y los vectores de deformación (varianza).

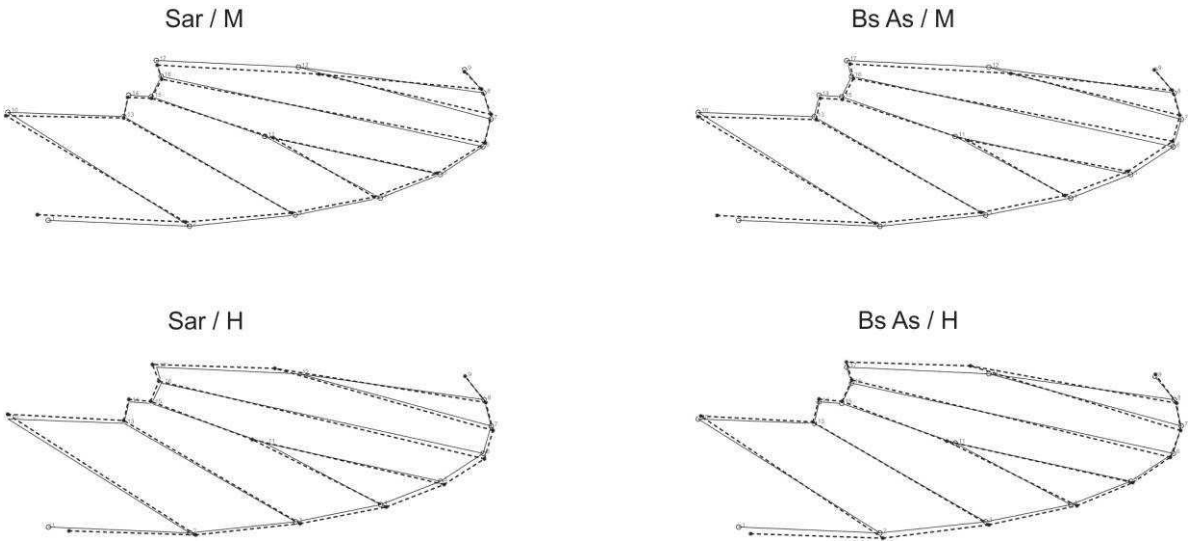


Fig. IV. 5. Modelo de trazado de líneas (Wireframe) para la conformación del ala promedio (línea continua) y la tendencia de la variación (Líneas punteadas) en alas de *Oc. albifasciatus*. (Sar: Sarmiento; Bs As: Buenos Aires; M: Macho; H: Hembra)

El análisis discriminante permitió separar las poblaciones, para el mismo sexo, y los sexos dentro de la misma población ($p<<0.05$). Se omitieron las comparaciones cruzadas entre sexo y población (ejemplo: HBsAs-MSar) por no poseer sentido ecológico.

La separación entre los grupos fue evaluada por la tabla de clasificación de validación cruzada (Tabla. IV. 2), ya que el tamaño de la muestra resultó relativamente pequeño en relación a las variables a analizar (17 LM). El error de clasificación solo fue observado en la comparación entre poblaciones. En hembras, el 25 % de los ejemplares pertenecientes a Buenos Aires fueron clasificados *"erróneamente"* como de Sarmiento, mientras que el 21 % de las pertenecientes a Sarmiento lo fueron como de Buenos Aires. En machos, el 33% de Buenos Aires fue clasificado como de Sarmiento y el 28 % de Sarmiento lo fue como de Buenos Aires. Entre sexos no se observaron errores de clasificación y las distancias entre sus centroides fueron aproximadamente tres veces mayores (11,7 y 12.7) que entre las poblaciones (3.8 y 4.4).

Tabla. IV. 2. Validación cruzada para los cuatro grupos de *Oc. albifasciatus*, a partir del Análisis Discriminante

	Proporción de clasificación errónea				Distancia Mahalanobis	T-cuadrado	p-valor
	H BsAs	H Sar	M BsAs	M Sar			
HBsAs-HSar	9/36	9/43			3.76	276.92	<.0001
MBsAs-MSar			8/24	9/32	4.41	266.69	0.0003
HBsAs-MBsAs	0/36		0/24		11.70	1970.48	<.0001
HSar-MSar		0/43		0/32	12.68	2948.57	<.0001

Nivel de significancia (α=0.05)

IV. DISCUSION

En este estudio se pudo diferenciar poblaciones desde el punto de vista morfométrico de *Oc. albifasciatus* pertenecientes a dos ecoregiones. Estas diferencias podrían resultar de las características y condiciones ecológicas locales sumado a un posible aislamiento geográfico (Sumann et al 2009, Yurttas et al 2005).

La variación de la conformación alar no resultó afectada por el tamaño (Tabla 1). Esto sugiere que cualquier factor que influya en el tamaño, como la temperatura de cría, no afectaría la conformación.

El dimorfismo de tamaño no se pudo relacionar con el dimorfismo de la conformación, ya que el tamaño entre poblaciones fue el mismo. Esto último podría significar una conservación genética del tamaño ya que los individuos de ambas poblaciones fueron criados bajo las mismas condiciones y recursos (de laboratorio), es decir, independientes de las condiciones microambientales naturales. Por lo tanto si hubiera diferencias de tamaño en individuos capturados en campo seria por causas ambientales.

En *Oc.albifasciatus* las diferentes conformaciones alares de las poblaciones locales sugieren como en otros culícidos cierto grado de divergencia genética (Gafur & Ajizah 2008). Aunque mínimas visualmente, estas diferencias se manifestaron en las distancias entre los centroides de las coordenadas (distancia Mahalanobis) y el porcentaje de clasificación correcta.

En los mosquitos el tamaño es un determinante del “fitness” con mayor relevancia en las hembras, las cuales serían más sensibles a las condiciones ambientales (Teder & Tamaru 2005). En la población de Sarmiento se comprobó un dimorfismo sexual de tamaño (hembras más grandes que machos), no observado para Buenos Aires. Posiblemente, las características ambientales generen fuerzas selectivas que determinen (o no) dimorfismos sexuales. Estas diferencias adaptativas de tamaño podrían favorecer el éxito reproductivo.

En *Oc. albifasciatus* criado bajo condiciones de laboratorio, el tamaño del ala no contribuyó a diagnosticar variaciones a nivel intraespecífico como si se ha observado en otros insectos (Dvorak 2006). Por otro lado, estudios de campo para culícidos han sugerido diferencias de tamaño entre poblaciones de diferentes regiones (Henry et al 2010), sin embargo las conclusiones de estos trabajos deberían ser tomadas con precaución ya que el tamaño de los adultos podría estar afectado por las distintas variables ambientales locales (temperatura, calidad de alimento, depredadores, competidores, parásitos, etc.). El presente estudio, la cría de ambas poblaciones de *Oc. albifasciatus* se sometió a las mismas condiciones, Por lo que los resultados sugieren para el carácter "tamaño corporal " una fuerte conservación genotípica. La falta de variaciones de tamaño supone que no se hayan favorecido ecotipos en respuesta a los dos ambientes estudiados (Clements 1992, Begon et al. 2006).

La conformación alar permitió distinguir claramente entre machos y hembras de *Oc. albifasciatus*, aun con mayor precisión que entre poblaciones. Las alas de las hembras fueron más amplias en el sentido antero-posterior que la de los machos. La configuración "*wireframe*" ha confirmado esta diferencia, observada previamente bajo lupa, y sugiriere un dimorfismo sexual de conformación que ha permanecido invariable en las dos sub-poblaciones. Este resultado representaría otro ejemplo evolutivo del tipo de dimorfismo que produce cambios en partes homólogas (Horsfall & Anderson 1964), no siempre presente en los insectos (Dvorak et al 2006).

En particular en Sarmiento, el dimorfismo sexual de tamaño fue acompañado por un dimorfismo sexual de conformación.

Las diferencias de conformación alar entre ecoregiones indicarían un polimorfismo geográfico en *Oc. albifasciatus*. Las diferencias son sutiles en los machos y un poco más visibles entre las hembras, las cuales muestran diferencias en la delgadez del ala (Fig.

.IV. 5). Agregar una tercera población al estudio podría mejorar la separación y correlacionar mejor con la geografía.

Estos resultados serían otro aporte al concepto teórico que sugiere que las diferencias de conformación entre poblaciones deberían ser en el mismo sentido en ambos sexos, ya que deberían ser el reflejo de las condiciones ambientales características de cada región (Dvorak et al 2006, Ancca et al. 2008).

La arquitectura de los caracteres morfológicos responde al compromiso entre las demandas del entorno (biótico y abiótico) y las del genoma (individual y del grupo) (Ancca et al. 2008). En *Oc. albifasciatus*, como se ha observado en otras especies de culícidos (Calle et al 2002, Jirakanjanakit & Dujardin 2005), la conformación sugiere una diferencia biogeográfica dentro de su distribución que respondería a dichos compromisos ambientales y genéticos. Los primeros se verían reflejados en el tamaño y los segundos en la conformación de las alas (para individuos desarrollados en el campo).

En vista de nuestros resultados la morfometría geométrica provee una herramienta objetiva para identificar variaciones a nivel intraespecífico en comparación con la tradicional identificación visual de la morfología clásica. Por otro lado, estas variaciones halladas en *Oc. albifasciatus* deberían ser complementadas o contrastadas con futuros estudios moleculares, que en caso de ser consistentes con estos resultados, reforzarían los fundamentos para la utilización de esta técnica más simple y de menor costo.

Capítulo V

Comparación de los tiempos de desarrollo de *Ochlerotatus albifasciatus* en laboratorio (temperatura constante) y en campo (temperatura fluctuante)

V. RESUMEN

La fluctuación diaria de temperaturas en los charcos influye sobre parámetros del ciclo de vida de los mosquitos que allí crían. Frecuentemente los tiempos de desarrollo (TD) estimados en laboratorio se basan en condiciones de temperaturas constantes ($T°_c$), los cuales podrían diferir de los estimados en campo bajo temperaturas fluctuantes ($T°_f$). El objetivo fue comparar los TD de *Ochlerotatus albifasciatus* en laboratorio ($T°_c$) y en campo ($T°_f$). Se criaron formas inmaduras de Buenos Aires y Chubut a $T°_c$ (rango: 12-22, 25, 27 y 29°C) y se utilizaron registros de TD obtenidos de la bibliografía y por seguimiento de cohortes en campo. Previo a la comparación, se buscó una relación entre la temperatura de un charco (expuesto al sol y a la sombra) y la del aire registrada por estaciones meteorológicas según los protocolos oficiales (SMN). Finalmente, se utilizaron parámetros del desarrollo para predecir la emergencia de cohortes. Las ecuaciones de equivalencia de la temperatura del agua a partir de las del aire resultaron: $T°_{agua}=0.4684*T°_{aire}+10.9ºC$ para el charco expuesto al sol y $T°_{agua}=0.45*T°_{aire}+10.3ºC$ para el charco a la sombra. Para temperaturas superiores a 17-18 ºC, el desarrollo en campo duró menos (hasta 6 días) que en laboratorio, mientras que por debajo ocurrió lo inverso (hasta 3 días de diferencia). La predicción de emergencia mostró un retraso de 4 días respecto de la cohorte observada en campo. El registro de las diferencias entre los TD en campo y los de laboratorio, podrían aportar en la corrección necesaria para estimar mediante una predicción más real la emergencia de adultos en campo. El TD más corto, bajo condiciones fluctuantes, estaría relacionado con la historia de vida de esta especie, ya que los estadios inmaduros suelen desarrollar en microambientes con temperaturas variables. Es probable que los organismos entren en situación de estrés térmico bajo temperatura constante y por lo tanto resulte en un retraso en el desarrollo.

V. INTRODUCCION

Los ambientes acuático naturales, como los charcos temporarios donde cría *Ochlerotatus albifasciatus*, son caracterizados por las fluctuaciones diarias de temperaturas, las cuales varían espacialmente en función de la profundidad y temporalmente de acuerdo a la estación climática o condiciones meteorológicas (Ward 1982). Estas fluctuaciones afectan al desarrollo y la supervivencia de las formas inmaduras independientemente a los factores nutricionales o el fotoperíodo (Ward 1982, Beck 1983).

Los resultados obtenidos sobre tiempos de desarrollo en culícidos se basan en experiencias en laboratorio bajo condiciones de temperatura constante (Brust 1967, Shelton 1973, Lyimo et al 1992, Su & Mulla 2001, Bayoh & Lindsay 2004, Monteiro et al 2007). A partir de la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura fija de cría, surgen los cálculos de los "umbrales térmicos del desarrollo" y la cantidad calor necesaria para completar el desarrollo ("constante térmica"), medido en grados días (Campbell et al 1974, Trimble & Lund 1983, Tauber et al 1987, Stacey & Fellowes 2002, Urra & Apablaza 2005).

El tiempo de desarrollo de los insectos puede diferir significantemente si son criados a temperaturas constantes o fluctuantes (Huffaker et al 1984, Mironidis 2008) y estas diferencias son más acentuadas si las temperaturas fluctuantes tienen elevadas amplitudes térmicas (Messenger 1964, Ratte 1985).

Los rangos térmicos utilizados en campo para la estimación de los tiempos de desarrollo de *Oc. albifasciatus* (Fontanarrosa et al. 2000; Fava *et al*., 2001) u otras especies de insectos se basan en el promedio diario de temperatura del aire, que es la información disponible por los servicios meteorológicos. En el caso de los mosquitos la temperatura del agua sería la variable más apropiada para evaluar su efecto sobre el tiempo de desarrollo de estadios inmaduros.

Los parámetros estimados a partir de los registros en campo (temperatura variable) tienen la ventaja de ser más realistas respecto a las estimaciones de laboratorio (temperaturas fijas), ya que los caracteres de los ciclos de vida en insectos pueden variar sensiblemente con los ciclos térmicos diarios (Miyashita 1971, Beck 1983).

V. OBJETIVOS

Comparar los tiempos de desarrollo de *Ochlerotatus albifasciatus* estimados en laboratorio, bajo temperaturas constantes, con los estimados en campo (charco), bajo temperaturas fluctuantes.

Hallar una relación entre la temperatura de un charco donde cría *Oc. albifasciatus* y del aire en el área cercana a dicho ambiente.

Predecir la emergencia de cohortes en campo aplicando la teoría de grados días acumulados.

V. MATERIALES Y METODOS

Registros térmicos

Durante tres semanas de la temporada primavera-verano (2009 y 2012), se registró simultáneamente la temperatura de un charco y del aire del entorno inmediato. Para ello se utilizaron data-loggers térmicos HOBO®-onset (cada media hora). Este procedimiento fue realizado en dos charcos temporarios/efímeros, utilizados históricamente como criadero, y en un cuerpo de agua permanente.

En ambos charcos temporarios, la temperatura se registró a 30-40 cm de profundidad. Uno de los microambientes estuvo expuesto bajo una insolación diaria de aproximadamente 15 horas (Ch: Sol, Fig.V.1.A), mientras que el otro estuvo a la sombra de la vegetación arbórea con una insolación diaria de aproximadamente 7 horas (Ch: Sombra, Fig.V.1.B).

A B

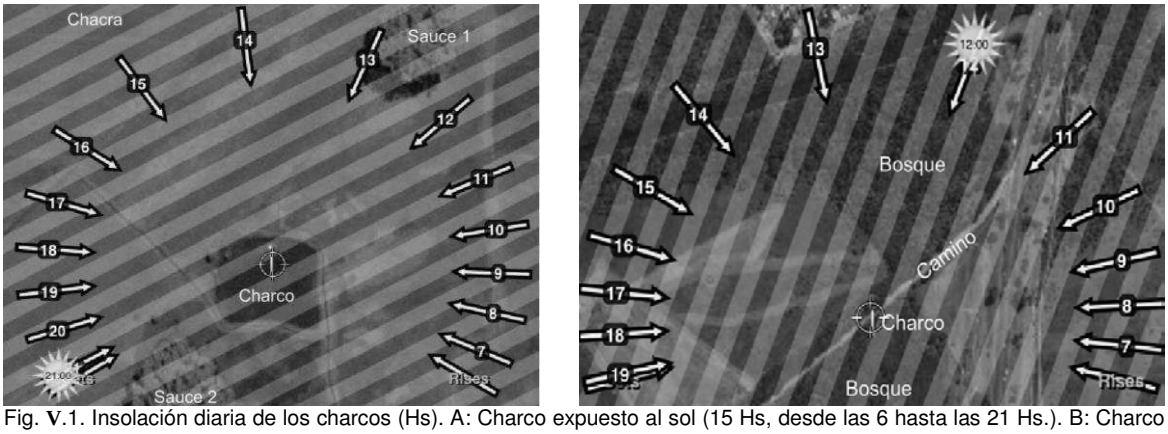


Fig. V.1. Insolación diaria de los charcos (Hs). A: Charco expuesto al sol (15 Hs, desde las 6 hasta las 21 Hs.). B: Charco a la sombra (7 Hs. de exposición al sol, desde las 12 hasta las 19 Hs.). En la parte central se ubica el charco efímero. Las franjas más claras indican la dirección de los rayos del sol, mientras que las flechas indican el sentido desde el amanecer hasta la puesta. [Sun Seeker ©].

En el cuerpo de agua permanente (la mayor parte del día expuesto al sol), la temperatura fue registrada a un metro y medio de profundidad durante aproximadamente un año

(2010). Este ambiente fue utilizado como bebedero para ganado y nunca funcionó como criadero de *Oc. albifascatus*.

Tiempos de desarrollo

Se utilizaron entre 30 y 40 larvas I de *Ochlerotatus albifasciatus*, a partir de huevos de hembras capturadas en campo (Buenos Aires y Sarmiento, Chubut). Luego de la eclosión inducida en laboratorio las larvas fueron colocadas en bandejas térmicas (Loetti *et al*., 2001). Los tiempos de desarrollo de los individuos de Buenos Aires, fueron estimados en un rango de temperaturas constantes: 12 - 29º C. Para la población de Sarmiento, el rango de cría fue de 11 a 32 ºC. El estadio larval fue registrado diariamente hasta la emergencia de los adultos. El fotoperíodo utilizado fue de 14:10 Hs. (L:O) y las larvas fueron alimentadas diariamente con una alícuota de alimento balanceado para perros (Purina®) de acuerdo a Gerberg et al (1994).

Los tiempos de desarrollo en campo se obtuvieron de distintas fuentes:

a) tres cohortes de campo (1 de Buenos Aires y 2 de Sarmiento) originadas luego de la inundación de un terreno por precipitación (Buenos Aires) y por riego (Sarmiento). Las temperaturas fueron registradas directamente del agua con data-loggers térmicos HOBO®-onset.
b) Una aproximación a los datos reales fue estimada a partir de Fontanarrosa et al., (2000) basado en la temperatura promedio del aire (13-25ºC) brindada por el Servicio Meteorológico Nacional (SMN).

Para la predicción de la emergencia de adultos, a partir de los grados días acumulados en campo, se utilizaron datos de temperaturas medias diarias del SMN.

Análisis de datos

Se aplicó un modelo de regresión lineal simple (RLS) para explorar la relación térmica aire-agua utilizando los valores promedios diarios. Para observar el efecto regulador del agua se comparó la recta de regresión con la diagonal de temperaturas agua-aire exactamente iguales (pendiente = 1).

Para uno de los charcos (Ch: sol) se graficaron los valores de la temperatura del aire y del agua cada media hora para describir el efecto amortiguador del agua.

A partir de la ecuación resultante del análisis de regresión entre el agua y el aire (en Ch: sol y Ch: sombra), se predijo la temperatura del agua obtenida a partir las temperaturas del aire citadas en Fontanarrosa et al. (2000).

Todas las comparaciones de los TD se realizaron con el Ln (TD) para linealizar y normalizar la función. Posteriormente se realizó un ajuste lineal y se realizaron las pruebas de paralelismo de pendientes (Zar 1996, Chatterjee et al. 2000). Se utilizaron los valores estimados a partir de las ecuaciones del ajuste lineal para visualizar mejor las diferencias entre los TD.

Para la predicción de emergencia en campo se calculó, en primer término, el calor acumulado por día o grados día (GD), calculada como la diferencia entre la temperatura media diaria menos el valor del "umbral mínimo de desarrollo". En segundo término, la suma diaria de calor acumulado o grados días acumulados (GDA) hasta alcanzar el valor de la constante térmica (cantidad de calor necesario para alcanzar el desarrollo completo).

Ambos parámetros térmicos (Umbral y Constante térmica) fueron estimados en laboratorio (capítulo 3). El umbral de desarrollo para Sarmiento resultó igual a 4.59±3.08º C, mientras que para Buenos Aires fue de 8.06±1.81º C. Por otro lado, la constante

térmica fue de 204.08±7.83º D y 149.25±2.6º D para Sarmiento y Buenos Aires respectivamente.

Las estimaciones sobre el día emergencia de los adultos a partir de los GDA fueron comparadas con lo observado en campo para ambas poblaciones.

V. RESULTADOS

Regulación térmica del agua

Tanto para los charcos efímeros como para el cuerpo de agua permanente, la pendiente del ajuste lineal (temperatura charco vs aire) no coincidió con la línea diagonal de pendiente igual a uno (Fig. V. 2 y Fig. V. 3). Para valores inferiores a la intersección de ambas rectas (Ch: Sol ≈20.5ºC; Ch: Sombra ≈18.6ºC y charco permanente ≈5ºC) la temperatura del agua fue superior a la del aire y para valores superiores se produjo el efecto inverso (Fig. V. 2 y Fig. V. 3).

En el microambiente de agua permanente, a bajas temperaturas del aire, las temperaturas medias del agua se mantuvieron alrededor de los 5ºC (Fig. V. 3). La amplitud térmica del agua del charco temporario/efímero resultó menor a la del aire (Fig. V. 4).

Las ecuaciones de predicción de la temperatura del agua a partir de las del aire resultaron:

T_{agua}=0.47*T_{aire}+10.9ºC, para el charco expuesto al sol (Ch: Sol)

T_{agua}=0.45*T_{aire}+10.3ºC, para el charco expuesto a la sombra (Ch: Sombra)

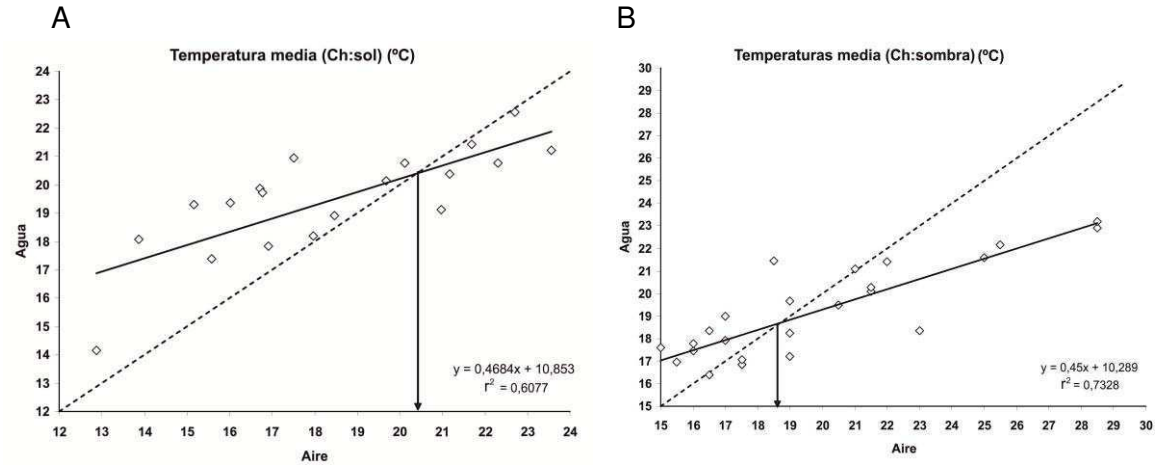


Fig. V. 2. Temperatura promedio del aire vs Temperatura promedio del agua en un charco expuesto al sol (A) y bajo sombra (B). Se proyecta el ajuste lineal (línea negra) y la línea de pendiente igual a uno (línea punteada). La flecha hacia abajo indica la temperatura donde ambas temperaturas coinciden.

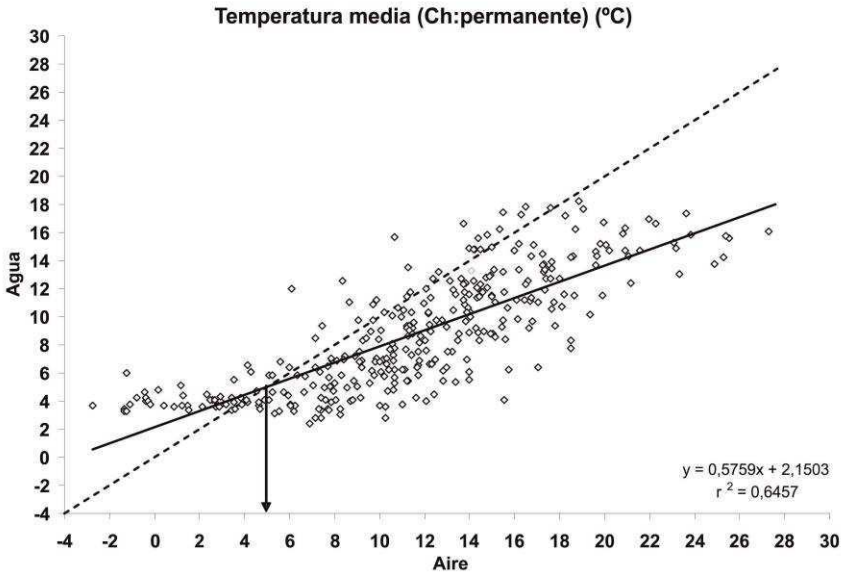


Fig. V. 3. Temperatura promedio del aire vs Temperatura promedio del agua en un charco permanente. Se proyecta el ajuste lineal (línea negra) y la línea de valores iguales (línea punteada). La flecha hacia abajo indica la temperatura donde ambas temperaturas coinciden.

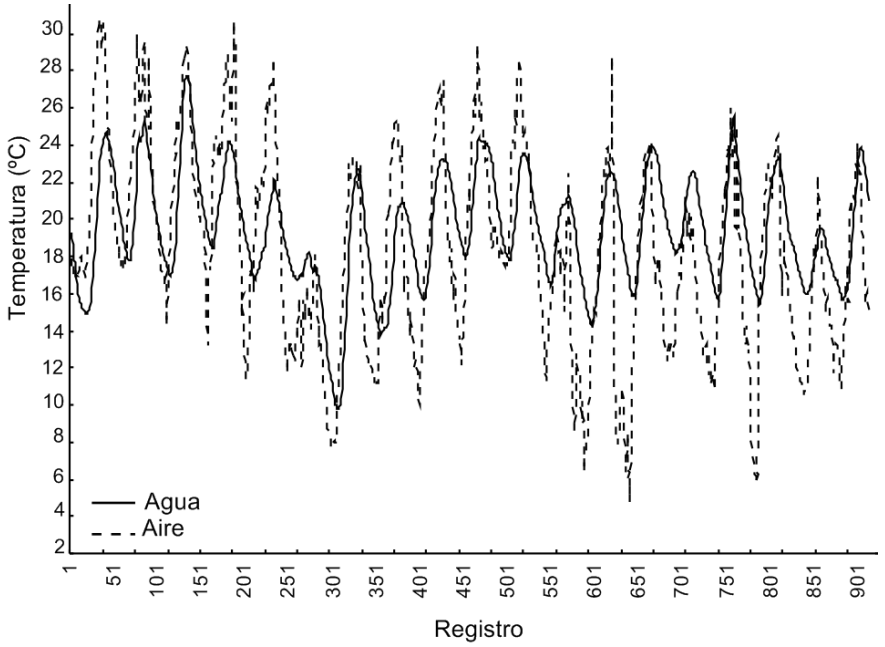


Fig. V. 4. Temperatura del aire (punteado) y agua (continuo) registrada cada media hora durante un año (2010) en un charco temporario.

Los TD de las cohortes de Buenos Aires criadas a temperaturas constantes de laboratorio (Fig. V. 5. A: r^2= 0,8908; p < 0,001; y = 4,6349 - 0,0993x) fueron mayores a los TD de las cohortes de campo basadas en las temperaturas del aire [SMN] (Fig. V. 5. B: r^2 = 0,9087; p<0,001; y = 4,989 - 0,1377x). Las pendientes resultaron estadísticamente diferentes (test

de paralelismo, $p<0.05$). Para el rango 13-25º C las diferencias fueron de 4 - 5 días (Fig. **V**. 6).

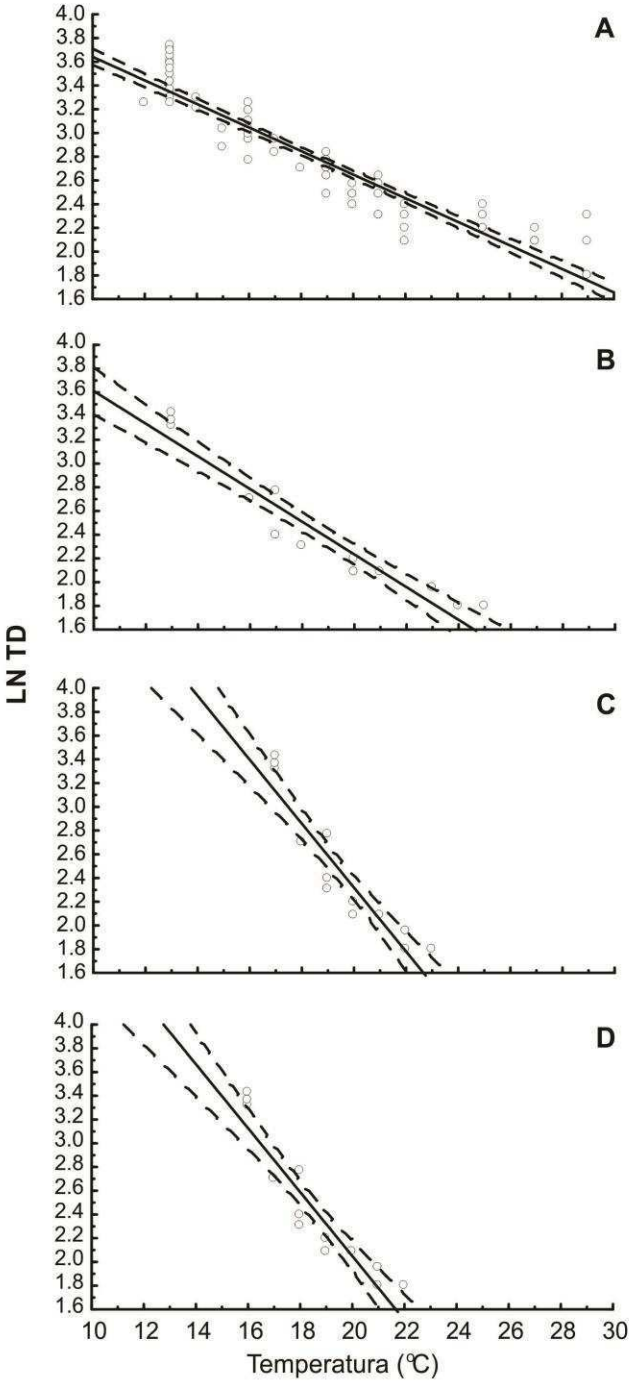


Fig. **V**. 5. Logaritmo natural del Tiempo de desarrollo (Ln TD) para la población de Buenos Aires en función de A: temperatura constante de laboratorio, B: temperatura promedio del aire (SMN), C: temperatura promedio del agua obtenida a partir de la relación aire-agua en charco al sol y D: temperatura promedio del agua obtenida a partir de la relación aire-agua en charco a la sombra.

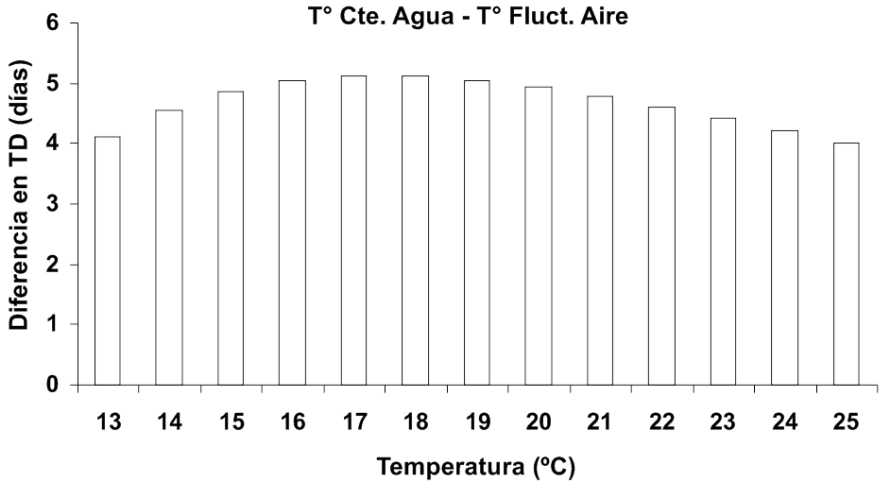


Fig. V. 6. Diferencias en el TD en función de temperaturas constantes de laboratorio vs temperaturas fluctuantes del aire en campo (SMN).

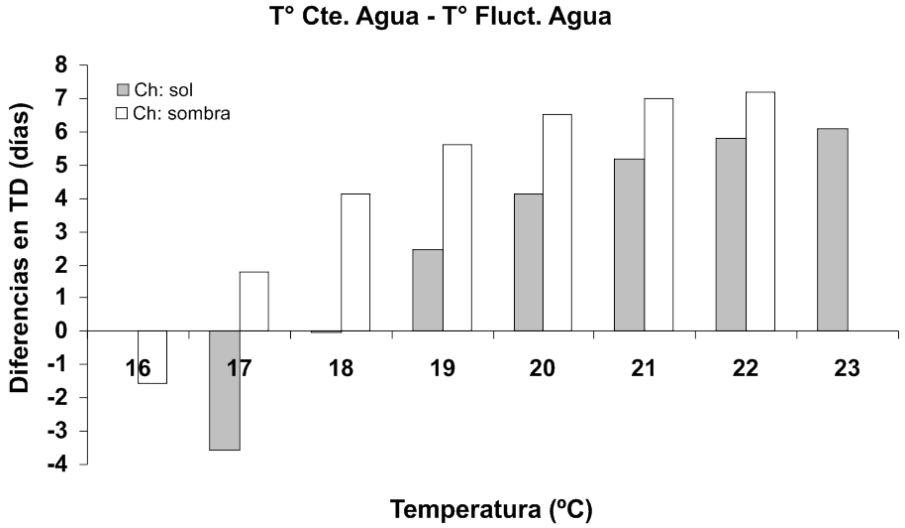


Fig. V. 7. Diferencias en el TD en función de temperaturas constantes de laboratorio vs temperaturas variables o fluctuantes del agua en campo (T de aire corregido). Temperatura variable del aire con corrección en base a charco al sol (barra llena) y Temperatura variable del aire con corrección en base a charco a la sombra (barra vacía).

Los tiempos de desarrollo en función de la temperatura del agua, predicha a partir de la temperatura del aire corregida (con ecuaciones de predicción), se muestran para las poblaciones de Buenos Aires en la Fig. V. 5 (C y D).

Para temperaturas superiores a 18ºC, y aplicando corrección de Ch:Sol, los TD en campo en función de la temperatura fluctuante del agua resultaron más rápidos (hasta 6 días) que los de laboratorio (Fig. V. 4, C: r^2 = 0,8542; p << 0.001; y = 7,7093 - 0,2695x), mientras que por debajo de dicho valor los TD fueron 3.6 días más lentos (Fig. V. 7).

Un resultado similar ocurrió cuando se corrigieron las temperaturas con el charco a la sombra. Por encima de los 17º C los TD de campo (Fig. V. 4, D: r^2 = 0,8542; p << 0,001; y=7,4398 - 0,2695x) resultaron más cortos (hasta 7 días) que los de laboratorio, mientras que debajo de dicha temperatura ocurrió lo opuesto con diferencias aproximadamente de 2 días (Fig. V. 7).

Los TD de las dos cohortes de Sarmiento medidos en campo y tomando en cuenta la temperatura variable del agua (promedio ≈20º C) resultaron más cortos que en laboratorio bajo condiciones térmicas constantes (Fig. V. 8). Una de las cohortes tardo 10 días y la segunda 11 días, ambas a una temperatura promedio de 19.6 ºC, mientras que el TD para esa misma temperatura (pero constante) fue ≈14 días (Fig. V. 8).

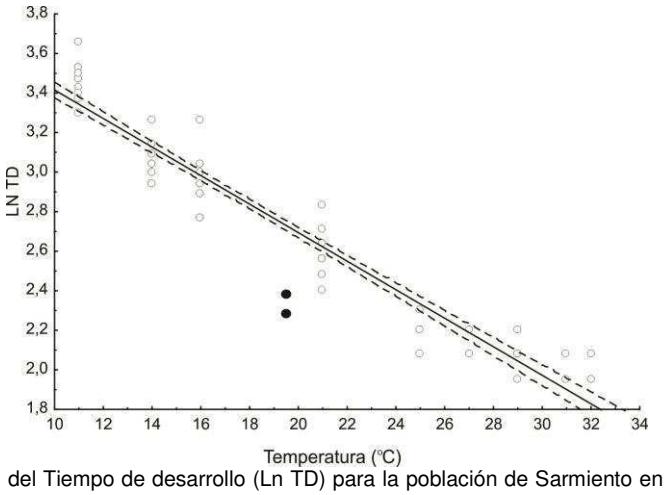


Fig. V. 8. Logaritmo natural del Tiempo de desarrollo (Ln TD) para la población de Sarmiento en función de la temperatura constante de laboratorio (círculos vacíos) y en función de temperaturas promedio del agua para dos cohortes criadas en campo (círculos rellenos).

La predicción de la emergencia de las cohortes en campo aplicando la teoría Grados Día Acumulados resultó sobre-estimada (retraso de 4 días, Tabla. V. 1, sombreado gris) respecto de lo observado (Tabla. V. 1, en negrita). Las diferencias fueron similares a las halladas entre el TD evaluado con las temperaturas del aire (SMN) vs el TD evaluado con temperaturas fijas de laboratorio.

Tabla. V. 1. Predicción de la emergencia de dos cohortes de *Oc. albifasciatus* en campo vs teórico (GDA)

	Sarmiento			Bs As		
Dia	T media	GD	GDA	T media	GD	GDA
1	21,0	16,39	**16,39**	18,5	10,44	**10,44**
2	23,6	18,97	**35,36**	15,8	7,74	**18,18**
3	22,3	17,72	**53,08**	16,9	8,84	**27,02**
4	22,7	18,12	**71,2**	18,7	10,64	**37,66**
5	21,2	16,58	**87,78**	11,4	3,34	**41,00**
6	18,5	13,87	**101,65**	12,7	4,64	**45,64**
7	12,9	8,29	**109,94**	16,1	8,04	**53,68**
8	16,9	12,32	**122,26**	19,1	11,04	**64,72**
9	18,0	13,38	**135,64**	19,6	11,54	**76,26**
10	20,1	15,52	**151,16**	20,3	12,24	**88,50**
11	21,7	17,11	**168,27**	16,1	8,04	**96,54**
12	19,7	15,1	183,37	16,4	8,34	**104,88**
13	13,9	9,29	192,66	15,2	7,14	**112,02**
14	15,2	10,57	203,23	17	8,94	**120,96**
15	17,5	12,93	216,16	17	8,94	129,90
16	16,0	11,42	227,58	17,8	9,74	139,64
17	16,7	12,12	239,7	16,5	8,44	148,08
18	16,8	12,19	251,89	14,8	6,74	154,82

U_{Sar}= 4.59±3.08º C y $U_{Bs\ As}$= 8.06±1.81º C. Constante térmica de Sarmiento 204.08±7.83º D y de Buenos aires 149.25±2.6º D.
T media= temperatura promedio del aire a partir del SMN (Servicio Meteorológico Nacional). GD=grados días. GDA = grados días acumulados
Sombreado Gris: predicción aplicando Grados Día acumulados
Negrita: emergencia obtenida en condiciones de campo.

V. DISCUSION

La intersección donde la temperatura promedio del aire coincidió con la del agua resultó superior (≈20.5 ºC) en el charco expuesto al sol respecto del charco a la sombra (≈18.6ºC). Estos valores representan puntos de equilibrio alrededor del cual la temperatura del agua regularía los incrementos o disminuciones excesivas de las temperaturas del aire. Esta termodinámica de los ambientes acuáticos, sería una característica favorable para la cría de los estadios inmaduros de *Oc. albifasciatus*, ya que el ambiente seria más estable.

Los resultados sugieren que la temperatura del ambiente acuático donde cría esta especie podría sobre o subestimarse dependiendo de cuál sea la temperatura del aire en ese momento (Fig. V. 2). Por lo tanto, aplicando una ecuación de corrección, las verdaderas condiciones térmicas de cría, y sus efectos sobre el desarrollo, podrían ser estimadas a partir de la temperatura del aire con un menor error.

Las diferencias observadas entre los TD en función de la temperatura del aire (Fig. V. 5.B) respecto de los TD en función de las condiciones térmicas constantes (Fig.V.5.A), sugieren que las predicciones basadas en temperaturas constantes de laboratorio pueden sobreestimar el tiempo de desarrollo en 4 días o más (rango 13 - 25 ºC, Fig. V. 6). Al estimar la temperatura promedio del charco a partir de la corrección de los valores promedios del aire, fue posible realizar el análisis del efecto de la fluctuación térmica del agua (Fig. V. 5. C y Fig. V. 5. D) respecto de las condiciones térmicas constantes. En este contexto, cuando las temperaturas de cría fueron superiores a los 17-18 ºC, los tiempos de desarrollo de *Oc. albifasciatus* bajo temperaturas fluctuantes fueron más cortos respecto de las condiciones constantes (Fig. V. 7). Este efecto ha sido observado en mosquitos (Clements 1992), en otros dípteros (Dallwitz 1984) y en insectos en general (Miyashita 1971, Siddiqui 1973, Brakefield & Mazota 1995, Brakefield & Kesbeke 1997).

La aceleración o retardo del TD bajo condiciones fluctuantes de temperaturas, respecto de las constantes, dependiendo del rango térmico estudiado y de la duración de las fases alternantes fue observado en Culícidos (Bradshaw 1980, Clements 1992) y otras especies de insectos (Hagstrum 1991, Petavy et al 2001). En todos los casos, se ha sugerido que la cría tanto a temperatura fluctuante como fija afectaría a los insectos dependiendo del ambiente ecológico donde éstos estén aclimatados naturalmente (Ahmad 1936, Lyons et al. 2007). Por lo tanto, un tiempo de desarrollo mayor de Oc. albifasciatus a temperaturas constante de laboratorio (ambiente artificial) respecto del campo, podría estar relacionado con su historia de vida. Es probable que los organismos adaptados a temperaturas diarias fluctuantes, como los microambiente donde crían los estadios inmaduros de esta especie, entren en situación de estrés térmico bajo temperatura constante y resulte en un retraso en el desarrollo (Dallwitz 1984).

Cerca del punto de coincidencia (intersección) entre los TD estimados en campo y los estimados en laboratorio (17-18 ºC) las amplitudes térmicas de las condiciones fluctuantes son menores, de tal modo que se asemejan a una condición constante de temperatura.

Cuando el promedio de las temperaturas fluctuantes fué inferior a 17-18 ºC, la velocidad del desarrollo resultó menor respecto a la de temperatura constante, indicando que ciertos valores extremos de temperatura mínima (bajo condiciones fluctuantes) podrían llegar a ser perjudiciales para el desarrollo de los estadios inmaduros. Sin embargo, un TD más lento bajo temperaturas fluctuantes respecto de las constantes podría compensarse con un aumento del tamaño, y por lo tanto de la fecundidad (Tun Lin et al., 2000; Armbruster & Hutchinson 2002, Lehmann et al. 2006), implicando un mayor fitness (Bradshaw 1980).

Los tiempos de desarrollo predichos a partir de la teoría de grados día fueron sobrestimados (Tabla. V. 1), respecto de lo observado en campo. Esta diferencia resultó en el mismo orden que la comparación entre los TD en función de la temperatura ambiente (SMN) y TD en laboratorio. Esto afirmaría que la relación lineal utilizada (tasa de

desarrollo vs temperatura constante) para estimar umbrales y constantes térmicas del desarrollo, es solo una aproximación a la real dependencia del tiempo de desarrollo con la temperatura (Sharpe & De Michele 1977). De hecho la fluctuación de temperaturas, podrían influir significativamente en la estimación de estos parámetros (Bergant & Trdan 2006).

Las características del desarrollo estimadas en experimentos de laboratorio a temperatura constante, deberían ser usadas con precaución (Bergant & Trdan 2006) y se recomienda considerar experimentos con regímenes fluctuantes de temperaturas que representen las condiciones más próximas a la naturaleza (Brakefield & Mazota 1995, Brakefield & Kesbeke 1997, Vargas et al 2000). Algunos investigadores han sugeridos métodos alternativos que mejoran el ajuste entre temperaturas constantes y fluctuantes (Hagstrum 1991, Liu et al 2002). Los resultados basados en temperaturas constantes o alternadas simuladas en laboratorio, deberían ser validados en condiciones de campo (Roltsch et al 1990, Mironidis 2008) o al menos analizados críticamente como se ha intentado en este trabajo.

DISCUSION GENERAL

Las poblaciones de Ochlerotatus albifasciatus *estudiadas (clima templado y árido frío), mantienen características ecológicas en común. Observadas en estudios previos para otras regiones. Entre las características (que se mostraron conservadas) ya observadas para la especie, se conocen la eclosión sincrónica de huevos luego de un evento de inundación, la cría de estadios inmaduros en charcos temporarios o efímeros, la emergencia sincrónica de adultos, la cópula en espacios abiertos -eurigamia-, los picos de actividad, la oviposición en bordes de charcos efímeros, los huevos de resistencia a la sequía, entre otros. A lo que se pueden sumar los caracteres analizados en la presente tesis como: resistencia al congelamiento de los huevos y el tamaño de los adultos relacionada con la temperatura de cría.*
Por otro lado, algunas características o aspectos del ciclo de vida de Oc. albifasciatus *(Tiempo de desarrollo, Supervivencia, Umbral inferior y constante del desarrollo en estadios inmaduros y conformación alar) se mostraron comparativamente diferentes entre las poblaciones sugiriendo posibles respuestas adaptativas a las condiciones térmicas del clima local. La variabilidad latitudinal o geográfica de algunos parámetros del ciclo de vida de esta especie podría explicar parcialmente su presencia en regiones climáticamente contrastantes.*

Las características del paisaje agrícola del valle de Sarmiento determinan la dinámica espacial y temporal para las poblaciones de *Ochlerotatus albifasciatus* (Garzón et al. 2014). En los parches húmedos, la formación de charcos temporarios luego del riego por inundación contribuye a la generación de criaderos de alta productividad. Las inundaciones producidas en distintos sectores y en diferentes momentos son acompañados por picos locales de actividad de *Oc. albifasciatus.* Esto mantendría en forma ajustada a la actividad antrópica la presencia de adultos en el valle durante todo el período estival.

En la región templada de la pampa húmeda, *Oc. albifasciatus* ocupa una matriz extensa y homogénea formada por praderas y pastizales (Gleiser et al 2002). Las abundancias de adultos están fuertemente asociadas con la formación de charcos temporarios generados por precipitaciones (Ludueña Almeida & Gorla 1995b). Esto sugiere una dinámica espacio temporal se encuentra más ajustada a características naturales de la región.

El estadio de huevo de *Oc. albifasciatus* demostró tener la capacidad para sobrevivir bajo un evento de condiciones de temperaturas muy por debajo del punto de congelación (-12°C). Dichos resultados, podrían explicar la supervivencia invernal a condiciones térmicas adversas, como las del crudo invierno patagónico en Sarmiento. Esta capacidad se observó incluso en Buenos Aires donde dichas condiciones son comparativamente de menor intensidad y escasa frecuencia.

La supervivencia bajo cero probablemente explique su presencia tanto a muy bajas latitudes, como en Tierra del Fuego (Bachmann & Bejarano 1960, Burroni et al. 2013), como a elevados valores altitudinales, 3600 m s.n.m (Prosen et al 1962/63).

La resistencia al congelamiento en huevos de *Oc. albifasciatus* se daría junto con algún estado de dormancia, posiblemente diapausa (Campos & Sy 2006). Es probable que las bajas temperaturas y el fotoperiodo de comienzos del otoño en Sarmiento representen señales ambientales que induzcan a los adultos la deposición de huevos preparados para este estado (Kostal 2006). Los embriones dentro de los huevos podrían sobrevivir a las temperaturas de congelamiento, tolerando o evitando dichas condiciones. La estrategia de tolerar consistiría en formar cristales de hielo en sitios especializados del organismo donde no producirían daños letales; mientras que la estrategia de evitar consistiría en disminuir el punto de congelación por medio de la síntesis de moléculas orgánicas, (Strathdee & Bale 1998). Posiblemente la estrategia de tolerar sea la adoptada por *Oc. albifasciatus*, ya que sería la más habitual entre insectos, con un menor costo energético desde el punto de vista metabólico (Strathdee & Bale 1998).

El estímulo para la eclosión de los huevos de *Oc. albifasciatus* proviene de la inundación de los terrenos donde estos son depositados (Service 1993, Ludueña Almeida & Gorla 1995b). Estas inundaciones naturalmente son de origen pluvial, fluvial (Ludueña Almeida

& Gorla 1995b, Gleiser et al 2000) o del anegamiento artificial debido a prácticas agropecuarias (Burroni et al. 2007, Garzón et al 2014).

La presencia de inmaduros y de actividad de adultos, dependiendo del régimen precipitación, durante todo el año en la región templada (Fontanarrosa et al 2000, Fischer et al. 2002, Ludueña Almeida & Gorla 1995a, Ludueña Almeida & Gorla 1995b, Fava et al 2001), indicaría que las condiciones térmicas del invierno en esta región no serían una limitante para la presencia de cualquier estadio de *Oc. albifasciatus*. Por el contario, en Sarmiento, la presencia de estadios inmaduros sólo en los meses estivales (Garzón 2014) sugiere la existencia de diferencias estacionales en cuanto a la actividad (eclosión de los huevos, presencia de estadios inmaduros y actividad de adultos).

Los estadios inmaduros de *Oc. albifasciatus* de ambas zonas, criados bajo condiciones de laboratorio, mostraron una relación exponencial negativa entre el tiempo de desarrollo y la temperatura de cría, sugiriendo que la tasa metabólica respondería a la temperatura de la forma esperada para la mayoría de los insectos (Williams & Felmate 1992). Sin embargo, a bajas temperaturas se observó que los individuos de Sarmiento, tardaron menos en desarrollar respecto de los individuos de Buenos Aires. Mientras que a temperaturas cálidas ocurrió un efecto inverso. Esta respuesta diferencial estaría sugiriendo que el tiempo de desarrollo dependiente de las condiciones térmicas podría ser el resultado de una selección o adaptación local en sub-poblaciones de diferentes regiones climáticas.

El período favorable para el desarrollo en la mayoría de los insectos se acorta a medida que aumenta la latitud, por lo cual el periodo favorable para *Oc. albifasciatus* en Sarmiento sería más corto que en Buenos Aires. Una mayor velocidad en el desarrollo a bajas temperaturas, para la población de clima más frio, podría favorecer un mayor número de cohortes en un menor tiempo antes de la llegada del periodo desfavorable. En

la región templada, donde las temperaturas medias son más elevadas, no habría estrictamente una época térmicamente desfavorable para la proliferación de *Oc. albifasciatus*, sin embargo, un desarrollo rápido a temperaturas elevadas favorecería la emergencia de los adultos antes de la extinción de los charcos (secado), evitando una posible causa de mortalidad (Fischer et al. 2002).

La relación directa entre la tasa de desarrollo y la temperatura de cría mostró una mayor pendiente en la población de Buenos Aires respecto de Sarmiento, por lo que la tasa de desarrollo frente a los cambios térmicos sería comparativamente más sensible. Esta característica podría responder a las condiciones climáticas regionales, las cuales varían con la latitud.

Como la tasa de desarrollo es proporcional a la metabólica (Ross & Merrit, 1978), estas variaciones podrían relacionarse con las velocidades de reacción dependientes de las concentraciones enzimáticas (factor cuantitativo), o de la afinidad sustrato-enzima (factor cualitativo) (Ayres & Scribe 1994). En ambos casos, la respuesta metabólica dependiente de la latitud, afectaría los parámetros térmicos del desarrollo, como el umbral mínimo y la constante de desarrollo.

En la población de Sarmiento en comparación con Buenos Aires, esta variación se traduce en un menor umbral térmico (U) y una mayor cantidad de grados días acumulados para el desarrollo (K). Es decir, que en el periodo estival de Sarmiento, con medias térmicas más bajas (17.8 °C), los estadios inmaduros comenzarían a desarrollar a menores temperaturas (U_{Sar}: aproximadamente 5°C) que en Buenos Aires aunque se requiera una mayor cantidad de calor para completar el desarrollo (K_{Sar}: aprox. 200 °D vs K_{BsAs}150 °D). Por otro lado, en los periodos estivales de Buenos Aires, con medias térmicas más cálidas (25 °C), los individuos inmaduros requerirían una menor cantidad de

calor acumulado para completar el desarrollo, a costa de iniciarlo a una temperatura más elevada (U_{BsAs}: aproximadamente 8°C).

Una mayor supervivencia a bajas temperaturas en Sarmiento, podría indicar una variación del parámetro en respuesta a las condiciones térmicas de cría. Esto sugiere un mayor fitness a bajas temperaturas (independientemente de otros factores de mortalidad) y posiblemente indicios de adaptaciones locales.

En los individuos de Buenos Aires la supervivencia fue similar para todo el rango térmico representado (cálidos a muy cálidos en verano, templados en otoño-primavera y frescas en invierno). Esto indicaría, que no habría alguna condición térmica más favorable, (sin contar otros factores de mortalidad), sino posiblemente una supervivencia baja aunque estable durante el año.

Por lo tanto, los patrones de supervivencia podrían responder a una estrategia de optimización de acuerdo al periodo favorable para la proliferación, acotado en una región (Sarmiento) y durante todo el año en la otra (Buenos Aires). Es decir que las condiciones climáticas de cada región podrían haber seleccionado dichos patrones en cada una de las poblaciones locales.

El efecto de la acumulación de la biomasa durante el desarrollo larval de los culícidos fue observado en el tamaño de los adultos, el cual correlaciona positivamente con la fecundidad (Tun Lin et al., 2000; Lehmann et al. 2006).

En ambas poblaciones de *Oc. albifasciatus*, el tamaño de los adultos, estimado a partir de la longitud del ala, mostró una relación inversa con la temperaturas de cría, siendo consistente con la teoría para los insectos (Wise 1980). Los ejemplares de mayor tamaño se obtuvieron bajo condiciones térmicas más frías, mientras que los de menor talla a temperaturas más cálidas.

La respuesta plástica de este parámetro subyace en la dependencia existente entre la tasa metabólica y la temperatura (Williams & Felmate 1992). A mayor temperatura aumenta la tasa metabólica y en consecuencia disminuye el tiempo de desarrollo y por lo tanto el tiempo disponible para la acumulación de biomasa (Rueda 1990, Laudien 1973).

Al comparar entre poblaciones, la relación tamaño-temperatura, no se observaron diferencias entre los patrones de respuesta (pendientes). Es decir, que individuos de diferentes poblaciones, criados a la misma temperatura resultarían similares en tamaño, aunque los tiempos de desarrollo fueran diferentes. Por lo tanto, a bajas temperaturas los individuos de Sarmiento tardarían menos tiempo en desarrollar que los de Buenos Aires (y viceversa), aunque ambos acumularían la misma biomasa y por lo tanto la misma capacidad reproductiva (fecundidad).

El resultado de la comparación del tamaño entre poblaciones, también fue corroborada con el análisis de morfometría geométrica. El tamaño del centroide (estimador isométrico del tamaño corporal) no demostró diferencias significativas entre poblaciones, sugiriendo una conservación genética del tamaño, ya que los individuos de ambas poblaciones, fueron criados bajo las mismas condiciones de laboratorio. No se habrían favorecidos ecotipos, respecto del tamaño, en respuesta a los ambientes locales (Clements 1992, Begon et al. 2006).

Por lo tanto, bajo condiciones naturales, adultos de mayor tamaño para la población de Sarmiento y de menor tamaño en la de Buenos Aires para el mismo periodo estudio, deberían ser reflejo del componente ambiental, como las condiciones térmicas locales. Este último patrón, podría responder a la una posible regla de Bergmann para organismos poiquilotermos (Blanckenhorn and Demont 2004), donde a mayores latitudes se observan mayores tamaños poblacionales.

Por otro lado, los resultados morfométricos de conformación del ala, indicarían una diferenciación de *Oc. albifasciatus* que podría responder a una adaptación local a las características ambientales, reforzada por un posible grado de aislamiento geográfico (Sumann et al 2009, Yurttas et al 2005).

En vista a los resultados de la presente tesis, se podría sugerir que las poblaciones estudiadas presentan algunas diferencias en ciertas características del ciclo de vida y parámetros poblacionales (tiempos de desarrollo, supervivencia, umbrales térmicos, constantes del desarrollo, periodos de proliferación, dinámica poblacional y forma de las alas). Mientras que otros caracteres se mantuvieron conservados (resistencia al congelamiento en huevos, tamaño morfométrico y longitudinal del ala).

Probablemente las diferencias entre poblaciones aquí evaluadas, en experimentos de laboratorio y en condiciones campo, sean una respuesta a las diferentes condiciones térmicas que caracterizan a cada región de origen. Las diferencias climáticas y un posible aislamiento geográfico podrían servir para explicar las diferencias halladas.

Por otro lado, una arquitectura genética y una fuerte presión selectiva podrían soportar el mantenimiento de caracteres en el tiempo (caracteres conservados).

Oc. albifasciatus es una especie muy presente y abundante en el cono sur de Sudamérica, sin embargo sus parámetros biológicos presentan dificultades operativas al momento de estudiarlas.

Para el estudio de los tiempos de desarrollo hay que partir de huevos de poblaciones naturales. Pero como se trata de una especie que copula en espacio abiertos (eurigamia) se dificulta la cría en condiciones de cautiverio. Para obtener huevos de ejemplares de esta especie es necesario capturar hembras grávidas, hambrearlas, ofrecerles una fuente de sangre y finalmente ofrecerles un sustrato de oviposición. Para *Oc. albifasciatus*, no se

han implementado aún aparatos o sistemas del tipo ovitrampas como se conocen para *Aedes aegypti*.

Las futuras líneas de investigación podrían dirigirse hacia el conocimiento de otras características del ciclo de vida.

Las diferencias locales a nivel de la supervivencia de los huevos frente a las temperaturas de congelamiento podrían evidenciarse en otros aspectos no analizados en este trabajo. A futuro podría estudiarse el periodo de tiempo máximo de resistencia a las condiciones de congelamiento y la temperatura mínima letal para los huevos. Otros estudios interesantes relacionados con los huevos de *Oc. albifasciatus* podrían explorar los efectos del fotoperiodo y la temperatura sobre la dormancia. Además debería considerarse otros procesos que podrían alterar los tiempos de desarrollo y la supervivencia de los estadios inmaduros de *Oc. albifasciatus* (competencia intra e interespecifica, tipo de alimento, depredación, efectos de la temperatura fluctuante).

Las diferencias halladas en *Oc. albifasciatus* en morfometría geométrica deberían ser complementadas o contrastadas con futuros estudios moleculares, que en caso de ser consistentes con estos resultados, reforzarían los fundamentos para la utilización de esta técnica más simple y de menor costo.

Desde el punto de vista poblacional, estudios a nivel molecular-filogeográfico entre las poblaciones estudiadas podrían contribuir al sustento de indicios de adaptaciones locales. Estudiar las características del ciclo de vida en otras poblaciones de regiones climáticas diferentes a las estudiadas aquí podría aportar más evidencias para pensar en una posible estructura de poblaciones de *Oc. albifasciatus*.

Respecto a posibles medidas de control de las poblaciones de *Oc. albifasciatus* en Sarmiento debieran considerarse posibles prácticas de manejo ambiental que podrían

incluir una modificación de los habituales sistemas de riego para disminuir la oferta de terrenos anegados para su cría y proliferación. Por ejemplo: a) aplicar un riego hasta saturación del suelo pero sin anegamiento, es decir aumentar la frecuencia de riego pero por periodos más cortos, b) en lugar de regar una vez durante todo el día, hacerlo en pocas horas durante varios días, evitando la formación de charcos y c) realizar algún sistema de drenaje de charcos de manera de eliminar el encharcamiento en menos de 10 días, ya que es el tiempo esperado que tardaría en desarrollar completamente una cohorte con un promedio térmico de 20°C.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahmad T. 1936. The influence of constant and alternating temperatures on the development of certain stages of insects. 2 (2): 67-91.

Addo-Bediako A. S. L. Chown & K. J. Gaston. 2000. Thermal tolerance, climatic variability and latitude. Proc. R. Soc. Lond. , 267: 739-745.

Addo-Bediako A., S.L. Chown & K.J. Gaston. 2002. Metabolic cold adaptation in insects: a large-scale perspective. Functional Ecology 16: 332-338.

Alencar J., Z. M. Fereira, C. M. Lopes, N. M. Serra-Freire, R. P. De Mello, J. Dos Santos Silva & A. Guimarães. 2011. Biodiversity and Times of Activity of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Biome of the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. J. Med. Entomol. 48(2): 223-231.

Almirón W. & M. Brewer. 1994. Immature stage of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected during the autumn-winter period in Córdoba Province, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89: 625-628.

Almirón W. & M. Brewer. 1995. Distribución estacional de Culicidae (Dipetra) en áreas periféricas de Córdoba (Argentina). Ecol. Austral 5: 81-86.

Ancca J., J. Pinto, S. Vega, A. G. Caceres & C. Naquira. 2008. Características morfométricas, genéticas, alimenticias y vectoriales de *Panstrongylus herreri* procedentes de Jaén (Cajamarca) y Cajaruro (Amazonas), Perú. Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica. 25(1):17-25.

Angulo A. and T.S. Olivares. 1993. Catálogo de Culícidos de Chile (Diptera Culicidae) y dos especies nuevas de *Culex (culex) Linneaus*. Bol. Soc. Biol. Concepcion, Chile, 26: 21-26.

Armbruster P., W. E. Bradshaw, K. Ruegg & C. M. Holzapfel. 2001. Geographic variation and the evolution of reproductive allocation in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomya smithii*. Evolution 55(2): 439-444.

Armbruster P. & J. E. Conn. 2006. Geographic Variation of Larval Growth in North American *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 99(6): 234-1243.

Armbruster P.& R. A. Hutchinson. 2002. Pupal Mass and Wing Length as Indicators of Fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 39(4): 699-704.

Avilés G., M. S. Sabattini & C. J. Mitchell. 1992. Transmission of western equine encephalomyielitis virus by argentine *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 29: 850-853.

Ayres M. P. & J. M. Scriber. 1994. Local Adaptation to Regional Climates in *Papilio Canadensis* (Lepidoptera: Papilionidae). Ecol. Monogr. 64(4): 465-482.

Ayres C.F.J., T.P.A. Romão, M.A.V. Melo-Santos & A.F. Furtado.2002. Genetic Diversity in Brazilian Populations of *Aedes albopictus.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97(6): 871-875.

Aytekin S., A. M. Aytekin, & B. Alten. 2009. Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. J. Vector Ecol. 34 (1): 32-42.

Bachmann, A.O. & Bejarano, J. E. R. (1960) Dispersión de Mosquitos en la Patagonia (Dipt. Culicidae-Culicinae). *Neotropica* 6, 70-71.

Bachamann A. O. & O. H. Casal. 1962. Mosquitos argentinos que se crían en aguas salobres y saladas. Rev. Soc. Entomol. Argent. 25: 21-27.

Bale J. S.. 2002. Insects and low temperatures: From molecular biology to distributions and abundance. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 357: 849-862.

Bambaradeniya, C. N. B. & F. P. Amerasinghe. 2003. Biodiversity associated with the rice field agroecosystem in Asian countries: a brief review. Working paper 63. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute (IWMI).

Bayoh M. N. & S. W. Linsday. 2004. Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. Med. Vet. Entomol. 18: 174–179.

Beck S. D. 1980. Insect photoperiodism. Academic Press, New York and London.

Beck S. D. 1983. Insect thermoperiodism. Annu. Rev. Entomol. 28: 91-108.

Begon M., C. R. Townsend & J. L. Harper. 2006. Ecology: from individuals to ecosystems,4th ed. Blackwell Publishing Ltd Cap.1.

Bejarán R., S. Fischer, A. De Marín & N. Schweigmann. 2008. Probable trayectorias associated with the transport of *Ochlerotatus albifasciatus* during a strong wind event in Buenos Aires city (Argentina). Meteorol. Appl. 15: 243-248.

Bentz B.J., J.A. Logan & J.C. Vandygriff. 2001. Latitudinal variation in *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) development time and adult size. Can. Entomol. 133: 375-387.

Benton T. G., J. A. Vickery & J. D. Wilson. 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key?. Trends Ecol. Evol. 18 (4): 182-188.

Bergant K. & S. Trdan. 2006. How reliable are thermal constants for insect development when estimated from laboratory experiments?. Entomol. Exp. Appl. 120: 251– 256.

Bidlingmayer,W.L., J. F. Day, & D. G. Evans. 1995. Effect of wind velocity on suction trap catches of some Florida mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 11: 295 - 301.

Blanckenhorn W. U. & M. Demont. 2004. Bergmann and Converse Bergmann Latitudinal Clines in Arthropods: Two Ends of a Continuum?. Integr. Comp. Biol., 44:413–424.

Bliss A. R., Jr. & J. M. Gill. 1933. The Effect of Freezing on Larvae of *Aedes aegypti*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 13: 583-588.

Bookstein F.L.. 1991. Morphometric tools for landmark data, Geometry and Biology. Cambridge University Press, NY. 1-434.

Bradshaw W. E. 1980. Thermoperiodism and the thermal environment of the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. Oecologia 46(1): 13-17.

Bradshaw W. E., S. Fujiyama & C. M, Holzapfel. 2000. Adaptation to the thermal climate of North America by the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. Ecology 81: 1262-1272.

Brakelfield P. M. & V. Mazzotta, V. 1995. Matching field and laboratory environments: effects of neglecting daily temperature variation on insect reaction norms. J. Evol. Biol. 8: 559-573.

Brakefield P. L. M. & F. Kesbeke. 1997. Genotype-environment interactions for insect growth in constant and fluctuating temperature regimes. Proc. R. Soc. Lond. B. 264, 717-723.

Briers R. A., H. M Carris & J. H.R Gee. 2003. Flight activity of adult stoneflies in relation to weather. Ecol. Entomol. 28: 31-40.

Brust R.A. 1967. Weight and development time of different stadia of mosquitoes reared at various constant temperatures. Can. Entomol. 99: 986-993.

Burkart R., N. O. Bárbaro, R. O. Sánchez & D. A. Gómez. 1999. Ecorregiones de la Argentina, Buenos Aires, Administración de Parques Nacionales.

Buono G. B. 2005. Sistema de Pastoreo Ovino-Bovino en Mallines. IDIA, 21: 41-44.

Burril R. M. 1981. The response of honey bees to variations in solar radiation and temperature. Apidologie, 12: 319-328.

Burroni, N., V. Loetti, G. Freire, O. Jensen & N. Schweigmann. 2007. New record and larval habitats of *Culex eduardoi* (Diptera: Culicidae) in an irrigated area of Patagonia, Chubut Province, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, 102(2):237-240.

Burroni N.E., M.C. Marinone, M.G. Freire, N. Schweigmann, M.V. Loetti. 2011. Invertebrate communities from different wetland types of Tierra del Fuego. Insect Conserv. Diver., 4: 39-45.

Burroni N.E., M.V. Loetti, M.C. Marinone, M.G. Freire, N. Schweigmann. 2013. Larval habitat of *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) in the southern edge of the Americas, Tierra del Fuego Island. Open J. Anim. Sci., 3: 5-10

Cabrera A.L.. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 14: 1-43.

Calle L. D. A., M. L. Quiñones, H. F. Erazo & N. Jaramillo. 2002. Morphometric Discrimination of Females of Five Species of *Anopheles* of the Subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 97(8): 1191-1195.

Calle A. D., M. L. Quiñones, H. F. Erazo & N. Jaramillo. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles (Nysorhynchus)* presentes en Colombia. Biomédica 28:371-385.

Campbell A., B. D. Frazer, N. Gilbert, A. P. Gutierrez & M. Mackauer. 1974. Temperature Requirements of Some Aphids and Their Parasites. J. Appl. Ecol. 11 (2): 431-438.

Campos R. E. & V. E. Sy. 2006. Variation in the hatching response of *Ochlerotatus albifasciatus* egg batches (Diptera: Culicidae) in the Temperate Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101: 47-53.

Campos R. E., V. E. Sy & L. Castro. 2007. Effects of continuous drought and inmersion on hatchability of *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) eggs stored at low temperature. Rev. Soc. Entomol. Argent. 66: 131-136.

Campos R. E.. 2008. Long-term storage and viability of *Ochlerotatus albifasciatus* egg (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103: 115-117.

Carrieri M., E. Montemurro, S. V. Valentino & R. Bellini. 2011. Influence of environmental and meteorological factors on the biting activity of *Leptoconops noei* and *Leptoconops irritans* (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. J. Am. Mosq. Control Assoc. 27(1):30–38, 2011.

Chandler J. A. & R. B. Highton. 1975. The succession of mosquito species (Diptera, Culicidae) in rice fields in the Kisumu area of Kenya, and their possible control. Bull. Ent. Res. 65, 295-302.

Chatterjee, S., A. S. Hadi & B. Price. 2000. Regression analysis by example, 3rd. ed. John Wiley & Sons, Inc., United States of America.

Chen B. & L. Kang. 2004. Variation in Cold Hardiness of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) Along Latitudinal Gradients. Environ. Entomol. 33: 155-164.

Chien C.T., L.L. Kuo-Huang & T.P. Lin. 1998. Changes in Ultrastructure and Abscisic Acid Level, and Response to Applied Gibeerellins in *Taxus mairei* Seeds Treated With Warm and Cold Stratification. Ann. Botany 81: 41-47.

Clements A. N.. 1963. The Physiology of Mosquitoes. Macmillan, New York.

Clements A. N.. 1992. The Biology of Mosquitoes. Vol. I. Development, Nutrition and Reproduction. Chapman & Hall, London.

Clifford H.F. & Boerger, H.(1974) Fecundity of mayflies (Ephemeroptera), with special reference to mayflies of a brown-water stream of Alberta, Canada. Can. Entomol., 106: 1111-1119.

Dallwitz R.. 1984. The influence of constant and fluctuating temperatures on development rate and survival of pupae of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina*. Entomol. Exp. Appl. 36: 89-95.

Danks H. V., O. Kukal & R. A. Ring. 1994. Insect Cold-Hardiness: Insights from the Artic. Artic 47: 391-404.

Danks H. V. 2006. Key themes in the study of seasonal adaptations in insects II. Life-cycle patterns. Appl. Entomol. Zool. 41 (1): 1–13.

De la Riva J., F. Le Pont, V. Ali, A. Matias, S. Mollinedo & J.P. Dujardin. 2001. Wing Geometry as a Tool for Studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Complex. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 96(8): 1089-1094.

De Souza, G. B., A. Jiménez, A. Blanco & C. N. Gardenal. 1996. Gene Flow in *Aedes albifasciatus* (Díptera: Culiciade) from Central Argentina. J. Med. Entomol. 33: 894-900.

De Sousa B. G., Panzetta De Dutari G. & C. N. Gardenal. 1999. Genetic Structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) Populations in Central Argentina Determined by Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Markers. J. Med. Entomol. 36(3): 400-404.

Duret J. 1954. Datos sobre culícidos de la región cuyana (Diptera: Culicidae). Rev. Sanidad Militar Argentina 53: 12-13.

Dvorak V., A. M. Aytekin, B. Alten, S. Skarupova, J. Votypka, & P. Volf. 2006. A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). J. Vector Ecol. 31 (2): 229-238.

Elissalde N.O., P.E. Rial, M. E. Llanos, J. M. Escobar y M. Mühleman. 1998. Sistema de Información Geográfica para el Sector Agropecuario del Valle de Sarmiento. Prodesar, proyecto argentino-alemán.

Fava F.D., F.F. Ludueña Almeida, W.R. Almirón, & M. Brewer. 2001. Winter biology of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) from Córdoba, Argentina. J. Med. Entomol. 36: 253-259.

Fischer S., M. C. Marinone & N. Schweigmann. 2002. *Ochlerotatus albifasciatus* in Rain Pools of Buenos Aires: Seasonal Dynamics and Relation to Environmental Variables. Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97(6): 767-773.

Fleiss J.L.. 1981. Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Focks D. A., S.B. Linda, G.B. Craig, Jr, W.H. Hawley & C.B. Pumpuni. 1994. *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae): A Statistical Modelo of the Role of Temperature,

Photoperiod, and Geography in the Induction of Egg Diapause. J. Med. Entomol. 31: 276-286.

Fontanarrosa M. S., M.C. Marinone, S, Fischer, P. W. Orellano & N. Schweigmann. 2000. Effects of flooding and temperature on *Aedes albifasciatus* development time and larval density in two rain pools at Buenos Aires Universty City. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 95(6): 787-793.

Forattini O. P. 1965. Entomologia Médica, 2. Culicini: Culex, Aedes e Psorophora, Univ. São Paulo, São Paulo.

Forman R. T. T. & M. Gordon. 1981. Patches and Structural components for a Landscape Ecology. BioScience 31(10): 733-740.

Gafur A. & A. Ajizah. 2008. The Use of Female Wing Measurements for Discrimination of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Populations from. South Kalimantan. HAYATI J. Biosci. 15(1): 8-12

Gandon S., D. Ebert, I. Olivieri & Y. Michalakis. 1998. Differential Adaptation in Spacially Heterogeneous Environments and Host-Parasite Coevolution. In: Mopper S. And S. Strauss (eds.) *Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Population*. pp. 325-342. Chapman and Hall Press, New York.

Garzón M. J., O. Jensen & N. Schweigmann. 2013. Resistance to freezing temperatures in *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart) eggs (Diptera: Culicidae) from two different climatic regions of Argentina. J. Vector Ecol. 38 (2): 339-344

Garzón M.J., O. Jensen, N. Schweigmann. 2014. Environmental factors related to the abundance and activity of *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) in an agricultural landscape of steppe arid climate. J. Med. Entomol., 51 (4): 733-741.

Gerberg E. J., D. R. Barnard & R. A. Ward. 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. American Mosquito Control Association, Inc..

Gleiser R. & D. Gorla. 1997. Abundancia de *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Diptera: Culicidae) en el sur de la laguna de Mar Chiquita. Ecol. Austral 7: 20-27.

Gleiser R.M., D.E. Gorla & G. Schelotto. 2000. Population Dynamics of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) South of Mar Chiquita Lake, Central Argentina. J. Med. Entomol. 37(1): 21-26.

Gleiser R.M., G. Schelotto & D.E. Gorla. 2002. Spatial pattern of abundance of mosquito, *Ochlerotatus albifasciatus*, in relation to habitat characteristics. Med. and Vet. Entomol. 16: 364-371.

Gray K. M., N.D. Burkett-Cadena, M. D. Eubanks & T. R. Unnasch. 2011. Crepuscular Flight Activity of Culex erraticus (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 48(2): 167-172.

Grimstad P. R., & G. R. De Foliart. 1975. Mosquito nectar feeding in Wisconsin in relation to twilight and microclimate. J. Med. Entomol. 11: 691 - 698.

Hack W. H., G. J. Torales, N. E. Bar & B. Oscherov. 1978. Observaciones etológicas sobre culícidos de Corrientes. Rev. Soc. Entomol. Argentina. 37 (1-4): 137-151.

Hagstrum D. W., G. A Milliken. 1991. Modeling Differences in Insect Developmental Times between Constant and Fluctuating Temperatures. Ann. Entomol. Soc. Am. 84(4): 369-379.

Hawley W. A., C. B. Pumpuni, R. H. Brady & G.B. Craig, Jr. 1989. Overwintering Survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Eggs in Indiana. J. Med. Entomol. 26: 122-129.

Henderson J. P., R. Westwood & T. Galloway. 2006. An Assessment of the Effectiveness of the Mosquito Magnet Pro Model for Suppression of Nuisance Mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc., 22(3):401-407.

Henry A., P. Thongsripong, I. Fonseca-Gonzalez, N. Jaramillo-Ocampo & J. P. Dujardin. 2010. Wing shape of dengue vectors from around the world. Infect. Genet. Evol. 10: 207-214.

Hoffmann, E. J. & J. R. Miller. 2003. Reassessment of the Role and Utility of Wind in Suppression of Mosquito (Diptera: Culicidae) Host Finding: Stimulus Dilution Supported Over Flight Limitation. J. Med. Entomol. 40(5): 607-614.

Honek A..1996. Geographical variation in thermal requirements for insect development. Eur. J. Entomol. 93:303-312.

Honek A.. 1999. Constraints on Thermal Requirements for Insect Development. Entomol. Sci., 2: 615-621.

Hooks C. R. R. & M. W. Johnson. 2003. Impact of agricultural diversification on the insect community of cruciferous crops. Crop Prot. 22: 223–238.

Horsfall W. R. & J. F. Anderson. 1964. Thermal stress and anomalous development of mosquitoes (Diptera: Culicidae). II. Effect of aliternating temperatures on dimorphism of adults of *Aedes stimulans*. J. Exp. Zool. 156: 61-89.

Hribar L. J.. 1994. Geographic variation of male genitalia of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Mosq. Syst. 26(3):132-144.

Huffaker R. D., R. E. Jones, & A. P. Gutierrez. 1984. Shortterm patterns of population change: the life system approach to their study. In R. D. Huffaker and R. L. Rabb [eds.], Ecological entomology. Wiley, New York. pp. 309-351.

Hunter M. D. 2002. Landscape structure, habitat fragmentation, and the ecology of insects. Agric. For. Entomol. 4: 159-166.

InfoStat. 2008. Manual del Usuario, versión 2008. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Sarmiento. 2009-2011. Sistema de Información de la Patagonia Sur (S.I.P.A.S.). Agrometeorología. (http:inta.gob.arregionpassipassipasindex.htm).

Jing X.H. & L. Kang. 2003. Geographical variation in egg cold hardiness: a study on the adaptation strategies of the migratory locust *Locusta migratoria* L. Ecol. Entomol. 28: 151-158.

Jirakanjanakit N. & J. P. Dujardin. 2005. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. Southeast Asian J. Trop. Med. Public health 36(4):858- 861.

Jirakanjanakit N., S. Leemingsawat, S. Thongrungkiat, C. Apiwathnasorn, S. Singhaniyom, C. Bellec & J. P. Dujardin. 2007. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Trop. Med. Int. Health 12 (11): 1354-1360.

Jirakanjanakit N., S. Leemingsawat , J. P. Dujardin. 2008. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. Infect. Genet. Evol. 8: 414-421.

Kawecki, T. J. & D. Ebert. 2004. Conceptual issues in local adaptation. Ecol. Lett. 7: 1225-1241.

Khatchikian C. E., J. J. Dennehy, C. J. Vitek & T. Livdahl. 2009. Climate and geographic trends in hatch delay of the treehole mosquito, *Aedes triseriatus* Say (Diptera: Culicidae). J. Vector Ecol. 34 (1): 119-128.

Klingenberg C.P. 2011. MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol. Ecol. Resour. 11: 353-357.

Kostal V.. 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. J. Insect Physiol., 52: 113–127.

Lane J. (1953) Neotropical Culicidae, Vol. 1 and 2, Sao Paulo, University of Sao Paulo, New York.

Lehmann T., Dalton, R., Kim, E H, Dahl, E, Diabate, A, Dabire, R & Dujardin, J P. 2006. Genetic contribution to variation in larval development time, adult size,and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*. Infect. Genet. Evol., 6, 410-416.

Liu S. S., G. M. Zhang, & J. Zhu. 1995. Influence of temperature variations on the rate of development in insects: analysis of case studies from entomological literature. Ann. Entomol. Soc. Am. 88: 107-119.

Liu S. S., F. Z. Chenb & M. P. Zalucki. 2002. Development and Survival of the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) at Constant and Alternating Temperatures. Environ. Entomol. 31(2):221-231.

Loetti V., A. de Garín & N. Schweigmann. 2001. Un aparato económico para la cría simultánea de mosquitos a distintas temperaturas controladas. II Jornadas Regionales sobre Mosquitos.

Loetti M.V., Burroni, N.E., Schweigmann, N. & de Garin, A. 2007. Effect of different thermal conditions on the pre-imaginal biology of *Culex apicinus* (Philipi, 1865) (Diptera: Culicidae). J. Vect. Ecol., 32, 106:111.

Lourenco de Oliveira L.. 1984. Algunos aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera. Culicidae) de uma área de planicie (granjas calabria), en Jacarepagua, Rio de Janeiro. I. Frecuencia comparativa das especies em diferentes ambientes e métodos de colecta. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, 79 (4): 479-490.

Ludueña Almeida, F. F. & D. E. Gorla. 1995a. Daily pattern of flight activity of *Aedes albifasciatus* in central Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 90(5): 639-644.

Ludueña Almeida, F. F. & D. E. Gorla. 1995b. The Biology of *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Diptera: Culicidae) in Central Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, 90 (4): 463-468.

Lyimo E.O., W. Takken & J. C. Koella. 1992. Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. Entomol. exp. appl. 63: 265-271.

Lyons C. L. 2013. Stable and fluctuating temperature effects on the development rate and survival of two malaria vectors, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. Parasites and Vectors, 6: 104.

Masaki S.. 1999. Seasonal Adaptations of Insects as Revealed by Latitudinal Diapause Clines. Entomol. Sci., 2(4): 539-549

Messenger P. S. 1964. The influence of rhythmically fluctuating temperatures on the development and reproduction of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis maculata*. J. Econ. Entomol. 57: 71-79.

Mironidis G. K. & M. Savopoulou-Soultani. 2008. Development, Survivorship, and Reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Under Constant and Alternating Temperatures. Environ. Entomol. 37(1): 16-28.

Mitchell C. J. & R. F. Jr. Darsie .1985. Mosquitoes of Argentina. Part II. Geographic distribution and bibliography (Diptera, Culicidae). Mosq. Syst. 17 (4):279-362.

Miyashita K. 1971. Effects of Constant and Alternating Temperature on the Development of *Spodoptera litura F.* (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Ent. Zool. 6(3): 105-111.

Monteiro L. C. C., J. R. B. De Souza & C. M. R. De Alburqueque. 2007. Eclosion Rate, Development and Survivorship of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) under Different Water Temperatures. Neotrop. Entomol. 36(6):966-971.

Mopper S. & S.Y.Satrauss. 1998. Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect. Chapmann & Hall. New York.

Morais S. A., C. Moratore, L. Suesdek, M. T. Marrelli. 2010. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 105(5): 672-676.

Morrone J.J.. 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. Z*ootaxa*, 3782: 001–110.

Mutanen M. & E. Pretorius. 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. Syst. Entomol. 32: 371-386.

Mottram P, Kay, B.H. & Fanning, I. D. 1994. Development and Survival of *Culex sitiens* Wiedemann (Diptera: Culicidae) in Relation to Temperature and Salinity. *Australian Journal of Entomology*, 33, 81-85.

Murillo C. B., R. V. Astaiza & P. O. Fajardo. 1998. Biologia de *Anopheles (Kerteszia) neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. Rev. Saude publ., S. Paulo, 22 (2): 109-112.

Ñancucheo, A., C. Mundet, G. Iñirrita & M. Winogrand. 2008. Desarrollo agropecuario en el valle de Sarmiento-Chubut. Concurso Argentino Rural.

Nylin S. & K. Gotthard. 1998. Plasticity in Life-History Traits. Annu. Rev. Entomol. 1998. 43:63–83.

Okogun G. R. A., B.E.B. Nwoke, A. N. Okere, J. C. Anosike & A.C. Esekhegbe. 2003. Epidemiological implications of preferences of breeding sites of mosquito species in Midwestern Nigeria. Ann. Agric. Environ. Med. 10: 217–222.

Olejnicek J. & I. Gelbic. 2000. Differences in response to temperature and density between two strains of the mosquito, *Culex pipiens molestus* Forskal. J. Vector Ecol., 25(2): 136-145.

Paruelo J.M., A. Beltrán, E. Jobbágy, O. E. Sala & R.A. Golluscio. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. Ecol. Austral 8: 85-101.

Peel M. C., B. L. Finlayson, & T. A. McMahon. 2007. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss. 4:439-473.

Penfield, S., E.M. Josse, R. Kannangara, A.D. Gilday, K. J. Halliday & I. A. Graham. 2005. Cold and Light Control Seed Germination Trought the bHLH Transcription Factor SPATULA. Curr. Biol. 15: 1998-2006.

Petavy G., J.R. David, P. Gibert & B. Moeteau. 2001. Viability and rate of development at different temperatures in Drosophila: a comparison of constant and alternating thermal regimes. J. Therm. Biol. 26(1): 29-39

Pike A. J., M. J. Cunningham & P.J. Lesteri. 2005. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) at Constant and Simultaneously Fluctuating Temperature and Humidity Conditions. J. Med. Entomol. 42(3): 266-269 (2005).

Pinto C. S., U. E.C. Confalonieri & B. M. Mascarenhas. 2009. Ecology of Haemagogus sp. and Sabethes sp. (Diptera: Culicidae) in relation to the microclimates of the Caxiuanã National Forest, Pará, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 104(4): 592-598.

Prosen A. F., A. Martínez & R. V. Carcavallo. 1960. La familia Culicidae (Díptera) de la rivera fluvial de la provincia de Buenos Aires. An. Inst. Med. Reg. 6 (1-2): 59-124.

Prosen A. F., Carcavallo RV, Martínez A 1962/1963. Culicidae de Bolivia (Diptera). An. Inst. Med. Reg. 6: 59-124

Raña J. C., O. R. Quaino & D. H. Paterno. 1971. Informe sobre daños provocados por mosquitos en la zona del Departamento San Cristóbal, limítrofe con Córdoba y Santiago del Estero. Informe Técnico INTA EERA-Rafaela.

Ratte H. P. 1985. Temperature and insect development. In K. Hoffman (ed.), Environmental physiology and biochemistry of insects. Springer, New York. pp. 36-66

Reznick D. N. & C. K. Ghalambor. 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. Genetica, 112-113.

Rodríguez M., L. Pérez, J. C. Caicedo, G. Prieto, J. A. Arroyo, H. Kaur, M. Suárez-Mutis, F. De La Hoz, J. Lines, & N. Alexander. 2009. Composition and Biting Activity of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the Amazon Region of Colombia. J. Med. Entomol., 46(2):307-315.

Roff, D. 1980. Optimizing Development Time in a Seasonal Environment: The “Ups and Downs” of Clinal Variation. *Oecologia*, 45: 202-208.

Rohlf F. J.. 1993. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In LF Marcus, E Bello, A Garcia-Valdecasas (eds), Contribution of Morphometrics, Monografias del Museo Nacional de Ciencias Naturales 8, Madrid, p. 131-159.

Rohlf F. J.. 2010. TPSDIG for Windows version 2.16. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.

Roland J., N. Keyghobadi & S. Fownes. 2000. Alpine Parnassius Butterfly Dispersal: Effects of Landscape and Population Size. Ecology 81(6): 1642-1653.

Roltsch W. J., M. A Mayse & K. Clausen. 1990. Temperature-Dependent Development Under Constant and Fluctuating Temperatures: Comparison of Linear Versus Nonlinear Methods for Modeling Development of Western Grapeleaf Skeletonizer (Lepidoptera: Zygaenidae). Environ. Entomol. 19 (6): 1689-1697.

Ross D. H. and R. W. Merrit. 1978. The larval instars and population dynamics of five species of black flies (Diptera: Simulidae) and their responses to selected environmental factors. Can. J. Zoolog., 56: 1633-1642.

Rossi G.C., E. A. Lestani & J. M. D’Oria. 2006. Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 65 (3-4): 51-56.

Rubio Palis Y.. 1998. Caracterización morfometría de poblaciones del vector de malaria *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae) en Venezuela. Bol. Entomol. Venez. 13(2):141-172.

Rueda L.M., K.J. Patel, R.C. Axtell & R.E. Steineer. 1990. Temperature-Dependent Development and Survival Rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 27(5):892-898.

Rudolfs W.. 1925. Relation Between Temperature, Humidity and Activity of House Mosquitoes. J. New York Entomol. S., 33 (3): 163-169

Schäfer, M. L. & Lundström, M.O. (2006) Different responses of two floodwater mosquito species, *Aedes vexans* and *Ochlerotatus sticticus* (Diptera: Culicidae), to larval habitat. J. Vector Ecol., 31, 123-128.

Schtickzelle N., G. Menennchez & M. Baguette. 2006. Dispersal Depression with habitat Fragmentation in the Bog Fritillary Butterfly. Ecology 87(4): 1057–1065.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN). 2013. (http://www.smn.gov.ar/).

Service M. W.. 1993. Mosquito Ecology Field Sampling Methods, Chapman & Hall, London.

Sharpe P. J. H. and D. W. De Michele. 1977. Reaction kinetics of poikilotherm development. J. Theor. Biol. 64: 649-670

Shelton R. M. 1973. The effect of temperatures on development of eight mosquito species. Mosq. News 33: 1–12.

Siddiqui W. H., C. A. Barlow & P. A. Randolph. 1973. Efects of some constant and alternating temperatures on population growth of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). Can. Ent. 105(01): 145-156.

Snow W. F. 1982. Further observations on the vertical distribution of flying mosquitoes (Diptera: Culicidae) in West African savanna. Bull. Ent. Res. 72, 695-708

Solano P., S. De la Rocque, D. Cuisance, B. Geoffroy, T. De Meeus, G. Cuny & G. Duvallet. 1999. Intraspecific variability in natural populations of *Glossina palpis gambiensis* from West Africa, revealed by genetic and morphometric analyses. Med. Vet. Entomol. 13: 401-407.

Soto Vivas A., C. Rodríguez, R. Bonfante-Cabarca & E. Aldana. 2007. Morfometría geométrica de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) de ambientes doméstico y peridoméstico, estado Lara, Venezuela. Bol. Mal. Salud Amb. 47(2): 231-235.

Soto Vivas, A., J. Liria & E. De Luna. 2011. Morfometría geométrica y filogenia en Rhodniini (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. Acta Zool. Mex. (n. s.), 27(1): 87-102.

Stacey D. A. & M. D. E. Fellowes. 2002. Temperature and the development rates of thrips: Evidence for a constraint on local adaptation?. Eur. J. Entomol. 99: 399-404.

Stearns S. C. 1994. The evolutionary links between fixed and variable traits. Acta Palaeontologica Polonica 38, 3/4, 2 15-232.

Stephens C. R. & S. A. Juliano. 2012. Wing Shape as an Indicator of Larval Rearing Conditions for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 49(4):927-938.

Storey B. K. & J.M Storey. 1996. Natural Freezing Survival in Animals. Annu. Rev. Ecol. Syst. 27: 365-386.

Strathdee A. T. & J.S. Bale. 1998. Life on the Edgde: Insect Ecology in Artic Environments. Annu. Rev. Entomol. 43: 85-106.

Su T. & Mulla M.S. 2001. Effects of temperature on development, mortality, mating and blood feeding behavior of *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae). J. Vector Ecol., 26: 83-92.

Suman D.S., A.R. Shrivastava, B.D. Parashar, S.C. Pant, O.P. Agrawal, & Shri Prakash. 2009. Variation in morphology and morphometrics of eggs of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from different ecological regions of India. J. Vector Ecol. 34 (2): 191-199.

Sweeney, B. W. and R. L. Vannote. 1981. *Ephemerella* mayflies of White Clay Creek: Bioenergetic and ecological relationships among six coexisting species. *Ecology* 62: 1353-1369.

Tauber C. A., M. J. Tauber & J. R. Nechols. 1987. Thermal Requirements for Development in Chrysopa Oculata: A Geographically Stable Trait. Ecology 68: 1479-1487.

Tauthonagn & T. A. Brust. 1976. The effect of temperature on the development and survival of two populations of *Aedes campestris* Dyar and Knab (Diptera: Culicidae). Can. J. Zool. 55: 135-137.

Teder T. & T. Tammaru. 2005. Sexual size dimorphism within species increases with body size in Insects. OIKOS 108: 321-334.

Teng H.J. & Apperson, C.S. 2000. Development and survival of immature *Aedes albopictus* and *Aedes triseriatus* in the laboratory: effects of density, food, and competition on response to temperature. J. Med. Entomol., 37: 40-52.

Thomas S. M., U. Obermayr, D. Fischer, J. Kreyling & C. Beierkuhnlein. 2012. Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasites & Vectors 5:100.

Trimble, R.M. & Smith, S.M. 1978. Geographic variation in development time and predation in tree-hole mosquito, *Toxorhynchites rutilus septentrionalis* (Diptera: Culicidae). Can. J. Zool., 56: 2156-2165.

Trimble R.M. & Lund, C.T. 1983. Intra and Interpopulation variation in the thermal characteristics of preadult development of two latitudinally diverse populations of *Toxorhynchites rutilus septentrionalis* (Diptera: Culicidae). Can. Entomol., 115, 659-662.

Trudgill, D.L. &. Perry, J.N. 1994. Thermal time and ecological strategies- a unifying hypothesis. Annals of Applied Biology, 125, 521-532.

Trpis M. & J.A. Shemanchuk. 1970. Effect of constants temperature on the larval development of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae). Can. Entomol.,102:1048-51.

Tun-Lin, W., Burkot, T.R. & Kay, B. H. 2000. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 31-37.

Tscharntke T., I. Steffan-Dewenter, A. Kruess, and C. Thies. 2002. Characteristics of insect populations on habitat fragments: A mini review. Ecol. Res. 17: 229-239.

Urra F. & J. Apablaza. 2005. Temperatura Base y Constante Térmica de Desarrollo de *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). Cien. Inv. Agr. 32(1): 19-26.

Vásquez M. & J. Liria. 2012. Morfometría geométrica alar para la identificación de *Chrysomya albiceps* y *C. megacephala* (Diptera: Calliphoridae) de Venezuela. Rev. Biol. Trop. 60 (3): 1249-1258.

Vidal P. O., M. C. Peruzin & L. Suesdek. 2011. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). Rev. Bras. Entomol. 55(1): 134–137.

Vinogradova E. B.. 2003. Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). Acta Soc. Zool. Bohem. 67: 41–50.

Vargas R., W. A. Walsh, D. Kanehisa, J. D. Stark and T. Nishida. 2000. Comparative Demography of Three Hawaiian Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) at Alternating Temperatures. Ann. Entomol. Soc. Am. 93(1): 75-81.

Walck J. L, C. C. Baskin, & J. M. Baskin. 2000. Seeds of *Thalictrum mirabile* (Ranunculaceae) require cold stratification for loss of nondeep simple morphophysiological dormancy. Can. J. Bot. 77: 1769-1776.

Ward J. V. 1982. Thermal response in the evolutionary ecology of aquatic insects. Ann. Rev. Entomol. 27: 97-117.

Wigglesworth V. B., 1972. The Principle of Physiology. 7 Ed. Champan & Hall. England.

Williams D. D. and B. W. Felmate. 1992. *Aquatic Insects*. CAB INTERNACIONAL. UK.

Wise E.J. 1980. Seasonal distribution and life histories of Ephemeroptera in a Northumbrian River. Freshwater Biol., 10: 101-111.

Yang G. J., B.W. Brook, P. I. Whelan, S. Cleland & C. J. A. Bradshaw. 2008. Endogenous and exogenous factors controlling temporal abundance patterns of tropical mosquitoes. Ecol. Appl. 18(8):2028–2040.

Yurttas H., B. Alten, & A.M. Aytekin. 2005. Variability in natural populations of *Anopheles sacharovi* (Diptra: Culicidae) from southeast Anatolia, revealed by morphometrics and allozymic analyses. J. Vector Ecol. 30: 206-212.

Zar J. H.. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, New Jersey.

Zelditch M., D.L. Swiderski, H.D. Sheets & W.L. Fink. 2004. Geometric morphometrics for biologists: A primer. Elsevier, Boston, EEUU.

APENDICE

Se adjuntan publicaciones (con referato internacional) realizadas a partir de los datos resultantes de esta tesis

- Garzón M. J., O. Jensen & N. Schweigmann.2013.Resistance to freezing temperatures in *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart) eggs (Diptera: Culicidae) from two different climatic regions of Argentina. J. Vector Ecol. 38 (2): 339-344.

- Garzón M. J., O. Jensen & N. Schweigmann. 2014. Environmental Factors Related to the Abundance and Activity of Ochlerotatus albifasciatus (Diptera: Culicidae) in an Agricultural Landscape of Steppe Arid Climate. J. Med. Entomol. 51(4): 733-741.

- Garzón M. J. & N. Schweigmann. 2015. Thermal response in pre-imaginal biology of Ochlerotatus albifasciatus from two different climatic regions. Med. Vet. Entomol. (aceptado).