

Tesis de Posgrado

Comportamiento sexual y comunicación intraespecífica en la vinchuca, *Triatoma infestans*

Manrique, Gabriel

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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:

Manrique, Gabriel. (1997). Comportamiento sexual y comunicación intraespecífica en la vinchuca, *Triatoma infestans*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2899_Manrique.pdf

Cita tipo Chicago:

Manrique, Gabriel. "Comportamiento sexual y comunicación intraespecífica en la vinchuca, *Triatoma infestans*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2899_Manrique.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

***COMPORTAMIENTO SEXUAL Y
COMUNICACIÓN INTRAESPECÍFICA
EN LA VINCHUCA *Triatoma infestans****

Autor: Lic. Gabriel Manrique
Director: Dr. Claudio R. Lazzari

**Laboratorio de Fisiología de Insectos
Departamento de Ciencias Biológicas**

**Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas**

1997

9

COMPORTAMIENTO SEXUAL y COMUNICACIÓN INTRAESPECÍFICA EN LA VINCHUCA *Triatoma infestans*

Tesis Doctoral de Gabriel Manrique
Dirigida por Claudio R. Lazzari

RESUMEN

Se analizó el comportamiento sexual y el papel de las señales olfativas y vibratorias en la comunicación intraespecífica de la vinchuca *Triatoma infestans*. Se distinguieron diferentes tipos de comportamiento de rechazo realizados por la hembra frente a los intentos de cópula del macho, concluyéndose que la receptividad de la misma es un factor de importancia que afecta el éxito de la cópula en esta especie. Se presentan evidencias comportamentales y electrofisiológicas que apoyan la existencia de una señal química sexual producida durante el apareamiento, la cual promueve la agregación de machos en torno a una pareja en cópula. La respuesta de orientación de los machos hacia la pareja en cópula, ocurriría por un gradiente químico y no a través de una respuesta anemotáctica. Se demostró que el canal vibratorio es utilizado para la comunicación intraespecífica en *T. infestans*, ya que las señales vibratorias producidas por la hembra no receptiva fueron altamente efectivas en rechazar al macho que intenta aparearse. Las estridulaciones realizadas en un contexto defensivo difirieron de las de rechazo de la cópula en: duración de las sílabas, tasa de repetición y frecuencia portadora principal. Se sugiere que las estridulaciones por perturbación estarían relacionadas con el rechazo a depredadores.

PALABRAS CLAVES

Triatoma infestans, comportamiento sexual, comunicación intraespecífica, comunicación química, feromonas, agregación, comunicación vibratoria, estridulación, Mal de Chagas.

SEXUAL BEHAVIOUR AND INTRASPECIFIC COMMUNICATION IN THE BLOOD-SUCKING BUG *Triatoma infestans*

Dissertation by Gabriel Manrique
Supervised by Claudio R. Lazzari

ABSTRACT

The sexual behaviour and the role of olfactory and vibratory signals in the intraspecific communication of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, was analyzed. Different kinds of female rejection behaviour in response to male copulatory attempts were distinguished, demonstrating the importance of female receptivity as a factor affecting copulation success in this species. We present behavioural and electrophysiological evidences that support the existence of a chemical sex signal produced during mating, which promotes the aggregation of males around the mating couple. The orientation response of the males towards the mating couple would occur by way of a chemical gradient, but not through an anemotactic response. We demonstrated that the vibratory channel is used in intraspecific communication in *T. infestans*, since the vibratory signals produced by a non-receptive female were highly effective in rejecting the male copulatory attempts. The stridulations performed in a defensive context differed from male-detering stridulations in: syllable duration, repetition rate and main carrier frequency. We suggest that disturbance stridulations would be shaped to deter predators.

KEY WORDS

Triatoma infestans, sexual behaviour, intraspecific communication, chemical communication, pheromones, aggregation, vibratory communication, stridulation, Chagas' disease.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Claudio R. Lazzari, quien además de haberme brindado la posibilidad de trabajar en el Laboratorio de Fisiología de Insectos, dirigió este trabajo de Tesis y me aconsejó y estimuló permanentemente.

Quisiera agradecer también al Maestro Dr. Josué A. Núñez quien me brindó toda su experiencia y afecto y por su actitud crítica.

A Gaby de Brito Sánchez y a Flavio Roces por su participación en los experimentos de electrofisiología y vibrometría, respectivamente y a Claudio Lazzari y al Flaco Walter por haber corregido el manuscrito de este trabajo.

A Martín Giurfa, Walter Farina y Flavio Roces por sus sugerencias, críticas y discusiones que contribuyeron en gran medida a la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio de todos estos años quienes además de aguantarme compartieron conmigo trabajo, discusiones y momentos inolvidables, Pablito Guerenstein, la Flores, la Lorenza, Pablo Schilman, Negro Lorenzo, Juan Ianowski, Carolina Reisenman, Tere Insausti, Marcelo Roca, Martín Giurfa, Flaco Walter, Gaby de Brito, Flavio Roces, Luciano Moffat, Roxy Josens, Fernando Grosclaude, y a Héctor y Angel Vidal.

Al Prof. Deszö Varjú por la donación del equipo de electrofisiología que se utilizó en esta Tesis.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Fisiología de Insectos (Dpto. de Ciencias Biológicas, FCEyN-UBA). Durante el desarrollo de la Tesis fui becario del CONICET. La financiación del trabajo provino de subsidios otorgados a nuestro laboratorio por UNDP/WORLD BANK/WHO, TDR, la Universidad de Buenos Aires y el CONICET.

A todos mis amigos tanto de adentro como de afuera de la universidad, quienes me brindaron y brindan su apoyo y afecto. A Marcelita por el vaso, la gota y muchas cosas más.

Al CASLA por las alegrías pasadas y futuras.

A mis viejos Theda y José Luis por su cariño y paciencia, y a mis hermanos Diego, Gonzalo y Laura por su cariño y apoyo en las buenas y en las malas. También a Uca, Eña, Celia, Santi, Martín, Leti y Alberto por todo su cariño.

A Gaba mi mujer por todo su amor, comprensión y paciencia, y a mis hijos Nati, Rodri y a la pollita que llega en mayo, por todo lo que significan para mí.

A Gaba

A Nati, Rodri y la pollita que viene

ÍNDICE

	pág.
CAPITULO 1: Introducción.....	10
<u>Introducción general.....</u>	10
<u>Introducción al comportamiento de los triatominos.....</u>	12
<u>El concepto de comunicación.....</u>	14
<u>Comunicación química.....</u>	15
Terminología y definiciones.....	15
Feromonas sexuales.....	17
Quimiorrepción: Sentido del olfato en Insectos.....	21
Comunicación química en Triatominae.....	23
<u>Comunicación vibratoria.....</u>	27
Sonido y vibración.....	28
Vibraciones de contacto.....	30
Vibraciones por movimiento del medio en el campo cercano.....	32
Vibraciones de borde en superficies de interfase.....	33
Características generales de las señales vibratorias.....	35
Comunicación vibratoria en Triatominae.....	36
<u>Objetivos del trabajo.....</u>	38
 CAPITULO 2: Modulación del comportamiento de apareamiento de	
<i>Triatoma infestans.....</i>	40
<u>Introducción.....</u>	40
<u>Materiales y métodos.....</u>	41
Insectos.....	41
Dispositivo experimental.....	41

Procedimiento.....	43
<u>Resultados</u>	44
Comportamiento del macho durante el apareamiento.....	44
Probabilidad de cópula y receptividad de la hembra.....	47
El comportamiento de rechazo de las hembras.....	50
<u>Discusión</u>	52
Comportamiento de apareamiento.....	52
Receptividad de la hembra y éxito del apareamiento.....	52
Estridulación en el contexto sexual.....	54
CAPITULO 3: Comportamiento de agregación durante el apareamiento en <i>Triatoma infestans</i>	56
<u>Introducción</u>	56
<u>Materiales y métodos</u>	57
Diseño y procedimiento experimental.....	57
<u>Resultados</u>	59
Distribución espacial de machos y hembras en presencia o ausencia de una pareja en cópula.....	59
<u>Discusión</u>	62
CAPITULO 4: Existencia de una feromona sexual en <i>T. infestans</i>: Correlatos electrofisiológicos	65
<u>Introducción</u>	65
<u>Materiales y métodos</u>	66
Diseño y procedimiento experimental.....	66
<u>Resultados</u>	69
<u>Discusión</u>	71

CAPITULO 5: Convergencia multimodal y respuestas de orientación a señales sexuales en *T. infestans*.....73

Introducción.....73

i.- Papel de las corrientes de aire en la orientación de machos frente a fuentes de señales sexuales.....74

Introducción.....74

Materiales y métodos.....75

Insectos.....75

Diseño experimental.....75

Procedimiento experimental.....77

Resultados y discusión.....77

ii.- Papel de la visión en la respuesta de machos de *T. infestans* a señales sexuales.....78

Introducción.....78

Materiales y métodos.....80

Diseño y procedimiento experimental.....80

Resultados y discusión.....81

iii.- Papel de la clave vibratoria en la respuesta de machos de *T. infestans* a señales sexuales.....83

Introducción.....83

Materiales y métodos.....83

Insectos.....83

Diseño y procedimiento experimental.....83

Resultados y discusión.....85

Conclusiones.....85

CAPITULO 6: Comportamiento sexual y comunicación vibratoria en *T. infestans*.....87

Introducción.....87

Materiales y métodos.....90

Insectos.....90

Diseño y procedimiento experimental.....	90
<u>Resultados</u>	91
<u>Discusión</u>	101
CAPITULO 7: Conclusiones generales	106
<u>Comportamiento de apareamiento</u>	106
<u>Comportamiento sexual y comunicación química intraespecífica</u> ...	106
<u>Comportamiento sexual y comunicación vibratoria</u>	107
<u>Transferencia de los resultados y su posible aplicación</u>	108
CAPITULO 8: Bibliografía	109

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Introducción general

La obtención de información del medio ambiente resulta vital para la subsistencia de los seres vivos. Según la teoría de la información tradicional elaborada independientemente por Shannon (1949, *citado por Dusenbery, 1992*) y Wiener (1948, *citado por Dusenbery, 1992*), la transmisión de **información** implica la "pérdida de incertidumbre".

La adquisición de información por parte de los organismos acerca del ambiente al que están expuestos se realiza a través de órganos sensoriales, denominándose **información sensorial** a este tipo de información. La transmisión de información es la interacción entre una **fuerza** (o emisor) y un **receptor**. Entre ambos existe un **canal** de transmisión, el cual involucra un movimiento de materia o energía desde la fuente al receptor. En Biología, el receptor es un organismo, la fuerza puede ser el ambiente (circunstancialmente otro organismo), y el canal de transmisión incluye un estímulo de cualquier modalidad (*e. g.*, visual, olfativo, mecánico) junto con los factores ambientales que lo afectan. Las interacciones entre un organismo y el medio ambiente (incluidos otros organismos) pueden dividirse en tres categorías, esto es, tróficas, físicas e informacionales. Sintéticamente, las interacciones físicas son aquellas que pueden ser predichas por las leyes físicas y que no están mediadas por procesos bioquímicos. Las tróficas involucran intercambio de materia y energía y tienen efectos específicos en el metabolismo del receptor, y las informacionales proveen información del medio ambiente a un organismo o la transmite de este a otro individuo.

La metodología que se empleará en esta Tesis es la clásica utilizada en Fisiología del Comportamiento, la cual consiste en analizar las relaciones funcionales entre los elementos componentes del sistema que media entre una entrada sensorial y una salida de comportamiento. Para ello, se considera al animal como un sistema constituido por cajas negras cuya función y conexiones deben deducirse del análisis de las relaciones entrada-salida. En un extremo encontramos el estímulo, el cual constituye un cambio del estado físico o químico del medio ambiente o en el propio organismo. Este cambio puede ser detectado por un receptor (órgano o célula sensorial), dando lugar como salida a una reacción de comportamiento reconocible por un observador.

Más precisamente, el **estímulo** es un patrón específico de actividad dentro del canal a través del cual es transmitido, que adquiere un significado por estar asociado con algún estado del ambiente que es relevante para el receptor (Wiley & Richards, 1978, *citado por Dusenbery, 1992*). El término **señal** es utilizado para los casos en que un estímulo ha sido modelado o mantenido por selección natural debido a que lleva información a otros organismos (Otte, 1974). En cambio, a las características que llevan información pero que no se encuentran modeladas o mantenidas por selección o a las características del ambiente físico que pueden ser percibidas, este autor indica la conveniencia de referirlas con expresiones más neutrales como, **información, claves, signos o estímulos disparadores**. La diferencia sustancial entre señales y claves radica en que las primeras son generadas en forma deliberada, dado que son modeladas por selección natural, mientras que las claves no lo son.

En muchas ocasiones, la transmisión de información se realiza a través de claves que median interacciones entre organismos. Como ya ha sido mencionado, esto puede llevarse a cabo mediante la utilización de canales de distinta modalidad (*e. g.*, químico, visual, sonoro, vibratorio etc.). Dentro de la

amplia gama de información disponible y utilizable por los organismos con el fin de orientar eficientemente su comportamiento se encuentran las claves olfativas y vibratorias.

En este primer capítulo introductorio se realiza una breve revisión del comportamiento de la chinche hematófaga *Triatoma infestans*, para luego hacer hincapié en aspectos generales de la comunicación química, así como también de la comunicación vibratoria intraespecífica.

La intención de este trabajo de tesis es analizar el comportamiento sexual bajo condiciones experimentales controladas y la participación de ambos tipos de señales en estos vectores de la enfermedad de Chagas. En este marco, el desarrollo de este trabajo se centra en el estudio de las relaciones funcionales existentes entre los estímulos, mecanismos y respuestas de la comunicación. Sin embargo, cuando corresponda se discutirán las posibles implicancias evolutivas, *i.e.*, tanto el origen como el mantenimiento de las posibles adaptaciones de un determinado comportamiento.

Introducción al comportamiento de los triatominos

La chinche hematófaga, *T. infestans*, es el principal vector del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas en Sudamérica (Lent & Wygodzinsky, 1979 y Zeledón & Rabinovich, 1981).

Este redúvido, perteneciente a la subfamilia Triatominae, es una especie casi totalmente restringida a ambientes domésticos y peridomésticos de viviendas rurales humanas. Durante el día las vinchucas desarrollan poca actividad y suele encontrárselas en un estado de inmovilidad denominado *akinesis*. Los insectos permanecen de esta manera agregados en estrecho contacto con el sustrato y con otros miembros de la población (*tigmotaxis*), en

grietas y sobre superficies rugosas que ofrece el tipo de viviendas mencionadas (Zeledón & Rabinovich, 1981). Este comportamiento permite a estos insectos evitar a depredadores potenciales, principalmente aves, anfibios y algunas especies de mamíferos (Núñez, 1987). Durante la noche despliegan la mayor parte de su actividad, *i.e.*, alimentación, búsqueda de refugio y en el caso de los adultos, posiblemente el apareamiento (Núñez, 1987; Lazzari, 1992; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994 y Lorenzo & Lazzari, 1996).

Al igual que otros triatominos, la vinchuca *T. infestans* está adaptada a alimentarse de sangre de vertebrados de sangre caliente, a los que deben localizar en el espacio para orientarse hacia ellos. Para la orientación a distancia, estos insectos son capaces de seguir corrientes de aire que transportan olores del hospedador (*anemotaxis*, Kennedy, 1977). A distancias menores podrían guiarse por gradientes químicos de olores (*quimiotaxis*) o utilizando el calor emitido por el cuerpo del hospedador (*termotaxis*) (Núñez, 1987; Lazzari & Núñez, 1989 y Flores & Lazzari, 1996). Luego de que la vinchuca se alimenta, tiene lugar una copiosa diuresis y, en las horas previas al amanecer, inicia la búsqueda de refugio (Lorenzo & Lazzari, 1993). Dicha búsqueda está asistida por marcas químicas dejadas por los insectos en los accesos de los refugios, por medio de sus excrementos (Lorenzo & Lazzari, 1996). Un refugio con heces jóvenes implica la existencia de alimento en las cercanías. También en el refugio, además de encontrar protección y otros individuos de la misma especie, les es posible hallar microorganismos simbiotes y, en el caso de los adultos, pareja sexual.

El comportamiento sexual de los triatominos ha sido poco estudiado. Sólo existen algunas referencias relacionadas con el comportamiento de apareamiento de *Panstrongylus megistus*, *T. mazzottii* y *T. phyllosoma* (Lima *et al.*, 1986a; Rojas *et al.*, 1990 y 1992). Los trabajos realizados por estos autores consistieron en la descripción de los eventos comportamentales que

ocurren en los momentos previos, durante y posteriores a la cópula, mediante la confección de etogramas de las especies mencionadas. En *T. infestans* esta descripción del comportamiento de apareamiento aún no ha sido realizada. En particular, resulta relevante conocer la participación que podrían tener las claves de distinta modalidad (e.g., visuales, olfativas, vibratorias etc.) en los sistemas de comunicación de esta especie.

El concepto de comunicación

El análisis de los canales de comunicación involucrados en el comportamiento sexual de *T. infestans* hace necesario discutir el concepto de *comunicación*. En primer lugar, al menos dos individuos deben participar, como emisor y receptor, respectivamente, para que la comunicación biológica sea posible y reconocible. En segundo lugar, es requisito indispensable la disponibilidad del medio a través del cual el mensaje es transmitido. Según Hawkins & Myrberg (1983) comunicación se define como "la transferencia de información entre un individuo emisor y otro receptor, en donde ambos concuerdan y cooperan con el significado del mensaje transmitido". La comunicación ocurre "cuando la acción o clave dada por un organismo es percibida, alterando la probabilidad de ocurrencia de un patrón de comportamiento en otro individuo de manera adaptativa a uno o ambos participantes" (Wilson, 1975). Otra característica de importancia de la comunicación biológica es que debe estar "mediada por señales, i.e., información sensorial, más que por factores físicos o tróficos o por información genética" (Dusenbery, 1992).

Para identificar la existencia de comunicación, usualmente es necesario determinar que un comportamiento particular en el organismo emisor ha

generado una señal que influencia el comportamiento del organismo receptor. El comportamiento es adaptativo para el emisor debido a los efectos generados por la señal emitida, siendo también la respuesta adaptativa para el organismo receptor (Dusenbery, 1992). Como ya ha sido mencionado, la transmisión de información resulta de la interacción entre una fuente (o emisor) y un receptor a través de un canal de comunicación determinado. Esta interacción puede ser el resultado de la comunicación entre miembros de la misma especie, *i.e.*, *comunicación intraespecífica*, la cual se distingue de la comunicación entre miembros de especies diferentes, esto es, *comunicación interespecífica*.

Comunicación química

Terminología y definiciones

Hablamos de comunicación química cuando la transmisión de información se realiza mediante la emisión de compuestos químicos desde la fuente hacia el receptor, a través del canal químico de comunicación.

Los compuestos químicos que transportan información están involucrados en numerosas respuestas tanto fisiológicas como comportamentales, como por ejemplo en la búsqueda de alimento, de sitios de oviposición, en la localización de la pareja sexual, en el marcado de un área etc. La terminología utilizada para definir a este tipo de compuestos, llamados en forma general *infoquímicos* (o semioquímicos), ha sufrido numerosas modificaciones debido a que cada nueva definición fue originalmente desarrollada y propuesta en un contexto específico, dando lugar a interpretaciones heterogéneas (Dicke & Sabelis, 1988). Estos autores definen *infoquímico* a un compuesto químico que, en un contexto natural, transporta

información en una interacción entre dos individuos, evocando en el receptor una respuesta fisiológica o comportamental que es adaptativa para uno de los interactuantes o para ambos. Los infoquímicos incluyen tanto a las feromonas como a los aleloquímicos. Karlson y Lüscher (1959), definieron al término *feromona* como una sustancia química emitida al medio ambiente y que ejerce su acción sobre otros individuos de una misma especie modificando su comportamiento. De este modo, estos autores pudieron distinguir a este tipo de señales químicas de las hormonas. En realidad, la composición química de las feromonas puede consistir de uno o varios componentes, conformando un complejo (*bouquet*) en el que los distintos constituyentes pueden tener un efecto modulador entre sí (Kaissling, 1987). Cuando hablamos de feromonas nos estamos refiriendo a un fenómeno de comunicación química intraespecífica, es decir, son liberados por y afectan a individuos de la misma especie. La utilización de feromonas resulta ser el modo más importante de comunicación intraespecífica en insectos, en comparación con las otras dos modalidades más utilizadas, *i.e.*, visión y sonido (Shorey, 1973). Las feromonas actúan como verdaderos mensajeros químicos y son utilizadas por los insectos para modificar distintos comportamientos, como por ejemplo, el apareamiento, la búsqueda de alimento, agregación y alarma o defensa, entre otros. Son producidas por glándulas exócrinas y su producción y síntesis es regulada por factores exógenos y endógenos (Chapman, 1982). Aunque muchas veces es muy difícil conocer la estructura química de las feromonas, esta ha sido revelada en diversos insectos. La mayoría son fenoles, terpenos, terpenoides e hidrocarburos. Las feromonas pueden ser producidas por la larva, la hembra, el macho o por ambos sexos y pueden actuar en un intervalo amplio de distancias. Como ha sido mencionado, además de las feromonas existen otros infoquímicos denominados *aleloquímicos* que se diferencian de aquellas por mediar interacciones entre dos organismos pertenecientes a

especies diferentes. A su vez, los aleloquímicos pueden clasificarse en tres categorías considerando los costos y beneficios para el emisor y receptor, esto es, alomonas, kairomonas y synomonas (Dicke & Sabelis, 1988). Las *alomonas* evocan en el receptor una respuesta fisiológica o comportamental que resulta adaptativamente favorable para el emisor pero no para el receptor. Usualmente las alomonas son descritas como repelentes aunque también pueden servir como atractantes de presas como ocurre en algunas especies de arañas boleadora. Estas arañas emiten componentes de mezclas de feromonas sexuales de varias de sus presas (polillas), las cuales son atraídas y posteriormente capturadas (Yeorgan, 1994). Por otra parte, las *kairomonas* evocan en el receptor una respuesta que resulta adaptativamente favorable para éste pero no para el emisor. Por ejemplo en los coleópteros taladradores de cortezas (Scolytidae) existe una feromona que promueve la agregación de estos insectos sobre el árbol hospedador. Sin embargo, esta feromona puede funcionar también en interacciones interespecíficas como kairomona ya que actúa, en este caso, como attractante de depredadores de estos escarabajos (Dicke & Sabelis, 1988). El otro tipo de aleloquímico, esto es, las *synomonas*, evocan en el receptor una respuesta adaptativamente favorable tanto para el emisor como para el receptor. Las esencias florales que atraen a insectos polinizadores constituyen un ejemplo de este tipo de infoquímico (Dusenbery, 1992).

Feromonas Sexuales

Aunque la comunicación química no es la única modalidad utilizada para la comunicación entre sexos, ésta resulta de vital importancia para el comportamiento reproductivo de muchas especies. Los machos y hembras de diversos insectos se comunican entre sí, previamente o durante el

apareamiento, mediante la liberación de compuestos volátiles. Basándonos en el concepto de *feromona* establecido por Karlson y Lüscher (1959), definimos *feromona sexual* como una sustancia o mezcla de sustancias químicas secretadas al exterior por un individuo emisor, que desencadena una respuesta de comportamiento sexual inmediata en otro individuo receptor de su misma especie. Más de 200 feromonas sexuales han sido identificadas (la mayoría en Lepidoptera) siendo la mayor parte de estas secretadas por las hembras (Tamaki, 1985).

En general, el procedimiento para la identificación de los compuestos feromonales consta de las siguientes etapas: 1) producción y extracción de la muestra original de la feromona, *e.g.*, extractos de insectos, o de sus productos o captura de compuestos volátiles liberados sobre un sustrato, 2) fraccionamiento de la muestra original por métodos cromatográficos, 3) realización de bioensayos para poner a prueba la actividad de las distintas fracciones solas y combinadas, 4) identificación de la molécula o moléculas de feromona mediante métodos químicos y espectrométricos, 5) síntesis de los compuestos identificados para verificar su autenticidad y 6) ensayos de campo de la feromona sintetizada para probar su eficacia y posterior comparación con el producto natural (Borden, 1985).

Resulta difícil encontrar en la literatura un esquema común de clasificación de feromonas en general, y de feromonas sexuales en particular. Sin embargo, las feromonas sexuales suelen ser clasificadas según la respuesta biológica que evocan. De este modo, las feromonas sexuales de insectos pueden ser agrupadas, a grandes rasgos, en dos clases de señales: una de ellas “positiva” (*e.g.*, attractante, estimulante) y la otra “negativa” (*e.g.*, rechazo o inhibición).

Sigue a continuación un listado de tipos de feromonas sexuales y algunos ejemplos característicos extractados de Schneider (1984):

a) *atractantes sexuales*: el primer atractante sexual aislado, purificado e identificado fue el *bombycol*, feromona sexual del gusano de seda *Bombyx mori* (Butenandt *et al.*, 1959). Está formado por un conjunto de compuestos, cuya composición química principal es (E,Z)-10,12-hexadecadienol y es secretado en una glándula ubicada en el extremo posterior del abdomen de la hembra de la especie. Los machos reciben el mensaje acerca de la presencia de una hembra conespecífica, a través de receptores altamente sensibles y específicos ubicados en las antenas. Una vez recibido el mensaje, los machos son atraídos por la feromona sexual e inician la búsqueda de la hembra por orientación de cara al viento, *i.e.*, muestran *anemotaxis positiva* desde una distancia de kilómetros y finalmente se lleva a cabo la cópula. La hembra no posee receptores sensoriales para su propio atractante, esto es, el *bombycol*. La feromona sexual liberada por la hembra de *B. mori* presenta un segundo componente llamado *bombycal*, el cual se halla en una proporción diez veces menor que el *bombycol*. El modelo propuesto por Kaissling (1987) explica la acción de este segundo componente de la feromona sexual en el comportamiento sexual de esta especie. El *bombycal* actúa como antagonista, inhibiendo la acción del *bombycol*, permitiendo de esta manera, aumentar el intervalo de concentración de la feromona sexual que, a su vez, permite el incremento del intervalo de acción de la misma, ya que la presencia de la feromona sin el *bombycal* satura la respuesta de los receptores del macho.

Las feromonas atractantes usualmente provocan una secuencia estereotipada de comportamientos, que empiezan con la activación desde un estado de akinesis, sigue con el inicio del vuelo o locomoción hacia la fuente de estimulación, y finaliza con la cópula. Se asume que cada paso sucesivo de la secuencia es evocado por concentraciones crecientes de la feromona. Cabe destacar que en algunos pasos de la secuencia pueden actuar otro tipo de claves (visual, táctil, auditiva, vibratoria etc.) sumadas a, o luego de, la

estimulación por la feromona. Sin embargo, estas claves no químicas en su mayoría operan en un intervalo corto de distancias, aunque también pueden intervenir durante la orientación en vuelo o en la locomoción de cara al viento.

b) *feromonas sexuales de agregación*: Este tipo de compuestos se definen como sustancias producidas por miembros de uno o ambos sexos que promueven la agregación de insectos en un área determinada en donde posteriormente se lleva a cabo la reproducción. Es el caso en que la misma feromona que promueve la agregación induce también el desarrollo del comportamiento de apareamiento. Esto ocurre en los coleópteros taladradores de cortezas (Scolytidae) en donde ambos sexos (*e.g.*, productos de la hembra en *Dendroctonus*, o del macho en *Ips*) promueven primero la invasión en masa de ambos sexos, y luego la reproducción y posterior colonización del árbol hospedador (Priesner, 1973 y Wood, 1982, citados por Schneider, 1984).

c) *feromonas sexuales de dispersión*: Estas feromonas provocan la dispersión de individuos de la misma especie desde un área determinada, impidiendo el encuentro entre los sexos. Por ejemplo, en algunas especies del género *Dendroctonus*, luego de colonizar un árbol y después del apareamiento, el macho produce una sustancia odorífera (*verbenone*) que impide nuevos arribos tanto de machos como de hembras (Renwick & Vité, 1970, citado por Shorey, 1973).

d) *afrodisíacos*: Son feromonas estimulantes de la actividad sexual que actúan en un intervalo corto de distancias y facilitan el comportamiento de cópula, después de que otras señales (de cualquier modalidad) reúnen a la pareja. En esta categoría puede incluirse a las *seducinas* secretadas por los machos de las cucarachas (Priesner, 1973, citado por Schneider, 1984). Según este autor, las hembras atraen a los machos mediante un attractante desde cierta distancia y luego las mismas deben obligadamente alimentarse con la secreción del macho antes de que pueda ocurrir el apareamiento.

e) *antiafrodisíacos*: Aunque estas sustancias probablemente estén ampliamente distribuidas, raramente son estudiadas. Gilbert (1976, citado por Thornhill & Alcock, 1983) describió la acción de un antiafrodisíaco emitido por la hembra de *Heliconius*. Según este autor, la pupa de esta mariposa hembra emite una feromona atractante de machos antes de su eclosión, y luego de la cópula la misma secreta una sustancia que provoca el alejamiento de otros machos, evitando así nuevas cópulas.

No siempre resulta fácil determinar una función específica a una feromona. Por ejemplo la feromona secretada por las glándulas mandibulares de la abeja reina genera distintas respuestas en diferentes contextos. Fuera de la colmena actúa como feromona de atracción sexual, atrayendo hacia sí a los zánganos. En cambio dentro de la colmena la misma sustancia controla, entre otros comportamientos, el surgimiento de nuevas reinas, inhibiendo el desarrollo ovárico en las obreras (Shorey, 1976, citado por Schneider, 1984).

Quimiorrecepción: Sentido del olfato en Insectos

En los insectos, la estimulación a través de sustancias químicas puede ocurrir de distintas formas según la fase y concentración en la que se encuentren. Por un lado, si la sustancia en cuestión se halla en fase líquida o en solución y a una alta concentración relativa, hablamos de *quimiorrecepción de contacto* (antes “*gusto*”). Por otra parte, la sustancia puede encontrarse en fase gaseosa y a una muy baja concentración relativa, en este caso nos estamos refiriendo a *olfación* (Morita & Shiraishi, 1985).

El sentido del olfato depende de la habilidad de células altamente especializadas en responder a través de impulsos nerviosos a la presencia de sustancias químicas presentes en el medio ambiente. Esto requiere primero de la habilidad de estas células para reconocer sustancias químicas del medio

ambiente, basándose esto en la afinidad de pegado de las moléculas de la señal química a receptores de la membrana celular. Segundo, las células olfativas deben tener también la capacidad de transducir la señal química en una respuesta con significado, esto es, en un impulso nervioso que se propaga hacia el cerebro (Farbman, 1994). Otra característica importante de la célula olfativa es que ésta puede responder tanto a la intensidad del estímulo así como también a su calidad.

Los receptores olfativos de los insectos están localizados usualmente en las antenas, aunque suele encontrárselos también en maxilas, palpos labiales y patas. La unidad funcional receptora es la sensilia olfativa. Existen diversos tipos de sensilias diferenciadas fundamentalmente por su morfología, *e.g.*, trichoideas, basicónicas, coelocónicas, placodeas etc. (Chapman, 1982 y Kaissling, 1987). Una sensilia olfativa típica contiene una o varias células sensoriales primarias (receptores olfativos) cuyas dendritas están localizadas dentro de estructuras cuticulares, las cuales poseen numerosos poros. Los poros conectan a la hemolinfa receptora ubicada en el lumen del pelo, la cual contiene a las dendritas receptoras, con el exterior (Farbman, 1994 y Kaissling, 1987).

De acuerdo con los modelos más recientes (Kaissling, 1987), la quimiorrecepción ocurriría como sigue: la sustancia química es adsorbida en la superficie del pelo, penetra luego por los poros mediante transporte pasivo y llega a la hemolinfa receptora, donde se une a proteínas transportadoras. El complejo sustancia odorífera - proteína transportadora viaja por la linfa del receptor hasta la superficie de la dendrita, donde se une a un receptor específico. Es el receptor de membrana de la célula sensorial el que determina la especificidad de la respuesta. Una vez que la sustancia hace contacto con el receptor de membrana, si la concentración de la sustancia es suficiente para superar cierto valor umbral, la información se propaga mediante potenciales de

acción por las terminales del nervio antenal hacia el sistema nervioso central (Kaissling, 1994). En el caso del gusano de seda *B. mori*, la activación de un único receptor en la membrana de la dendrita por una molécula de *bombycol* (feromona sexual de la especie) desencadena el disparo de un potencial de acción por la célula (Kaissling, 1987). En el sistema nervioso central la información es procesada e integrada (codificación de olores, comparación con la información existente) generándose o no una respuesta comportamental determinada. El estímulo inicial, *i.e.*, la unión de la sustancia con el receptor de membrana, es inactivado por un cambio en la proteína transportadora, que pasa del estado reducido a oxidado, cesando de esta manera la estimulación.

La sensibilidad de las neuronas quimiorreceptoras a diferentes olores es muy variable. Algunas son altamente sensibles a un único tipo de molécula odorífera y relativamente insensibles a otras moléculas poco diferentes. Estas son conocidas como células olfativas especialistas. Otras neuronas son sensibles a un amplio grupo de diferentes sustancias (*e.g.*, reaccionan ante un grupo funcional común a varias sustancias) y se las conoce como receptores generalistas. En general, los receptores feromonales son especialistas y están asociados a situaciones muy específicas, como por ejemplo el contexto sexual. Esto es, a señales que tienen un significado inequívoco. Como ya ha sido mencionado, los receptores especialistas más estudiados son los receptores de *bombycol* (feromona sexual de la especie), presentes en el macho del gusano de seda *B. mori* (Kaissling, 1987).

Comunicación química en Triatominae

La evidencia existente sobre comunicación química en Triatominae está referida principalmente a la presencia de sustancias volátiles que actúan promoviendo comportamientos de agregación y alarma. Por otro lado también

existe cierta evidencia acerca de compuestos volátiles que afectan el comportamiento sexual en algunas especies de triatomíneos. Schofield & Patterson (1977) sugirieron la existencia de una feromona juvenil de agregación presente en las heces de ninfas de *T. infestans* y de la chinche venezolana *Rhodnius prolixus*. Según estos autores, esta feromona promueve la atracción de ninfas ayunadas hacia las heces depositadas, mientras que no ocurre este comportamiento en ninfas alimentadas. Ondarza *et al.* (1986) sugirieron la existencia de al menos dos feromonas de agregación en *T. mazzottii*, una presente en las heces de ninfas y hembras que actuaría en hembras y ninfas ayunadas, y otra presente en las heces de machos que afectaría el comportamiento de machos tanto alimentados como ayunados. Cruz-López *et al.* (1993) estudiaron la respuesta de agregación frente a productos volátiles presentes en las heces en *T. barberi*, *R. prolixus* y en tres especies del complejo *T. phyllosoma*. Estos autores concluyeron que dichas sustancias tendrían un efecto interespecífico, lo cual sugiere que la feromona de agregación presente en las heces sería similar en las distintas especies. En otro trabajo, Lorenzo Figueiras *et al.* (1994) estudiaron la respuesta de *T. infestans* a sustancias volátiles presentes en las heces, así como también la dinámica del comportamiento de agregación inducido por las mismas. En experimentos realizados en una arena experimental de elección, las ninfas de esta especie se agregaron alrededor de papeles impregnados con heces secas. El mismo resultado fue obtenido cuando estos autores utilizaron un olfatómetro de discriminación simultánea. En este caso, cuando una corriente de aire pasaba por un papel impregnado con heces secas, las ninfas fueron atraídas, mientras que las heces húmedas fueron rechazadas. En cuanto al patrón temporal de este comportamiento, fue posible relacionarlo con el pico máximo de agregación observado en esta especie al comienzo de la fotofase, mientras que la máxima dispersión observada ocurrió durante la escotofase

(Lazzari 1992). Estos autores también encontraron que el cambio en la respuesta, de la indiferencia a la atracción, se observó dentro de las 24hs después de la alimentación pero no inmediatamente luego de alimentarse. Este último resultado permitió explicar aquellos de Schofield & Patterson (1977), relativos a la respuesta diferencial de insectos ayunados y alimentados.

El significado biológico de esta señal de agregación presente en las heces de *T. infestans* fue estudiado por Lorenzo & Lazzari (1996). Dichos autores describieron un comportamiento estereotipado de defecación. Las vinchucas salen fuera del refugio para defecar y como resultado de este comportamiento, una alta concentración de deyecciones fue encontrada en los accesos del refugio. En experimentos de elección de refugios, los mismos autores demostraron que las vinchucas prefieren los refugios asociados a heces, y sugirieron la existencia de una marca química presente en las mismas que ayudaría a la selección de refugios por parte de estos insectos. Esta preferencia por refugios marcados con heces podría brindar a los insectos sitios donde encontrar individuos conespecíficos, pareja sexual, simbiontes, alimento cercano y protección frente a eventuales depredadores.

Como ya hemos mencionado, la información existente sobre comunicación química en triatomíneos también involucra comportamientos de defensa. Las vinchucas poseen mecanismos de protección pasiva contra potenciales depredadores durante los períodos de inactividad, permaneciendo inmóviles (akinesis), manteniendo un estrecho contacto con el sustrato y con conespecíficos (tigmotaxis) y/o teniendo preferencia por lugares oscuros (escototaxis). En varias especies de triatomíneos se ha descrito, además, un comportamiento de "camuflaje", *i.e.* los insectos cubren su cuerpo con tierra y detritos y logran confundirse con el entorno (Zeledón *et al.*, 1973). Además de estos mecanismos, las vinchucas disponen también de mecanismos activos de defensa, tales como feromonas de alarma y estridulación (Games *et al.*, 1974;

Schofield, 1979; Ward, 1981 y Rossiter & Staddon, 1983). La aparición en los adultos de glándulas metatorácicas y de Brindley trae aparejada la aparición de sustancias químicas con aparentes funciones defensivas y de alarma, ausentes en las ninfas. Cuando los adultos son perturbados emiten una secreción, liberada por las glándulas de Brindley, cuyo principal componente es el ácido isobutírico (Games *et al.*, 1974). Esta sustancia es corrosiva y actuaría como repelente de posibles depredadores (Schofield, 1979). Por otra parte, a bajas concentraciones, el ácido isobutírico parecería actuar en la comunicación intraespecífica, *i.e.*, como feromona de alarma para otros miembros de la población (Ward, 1981). Otro componente activo, identificado como 3-metil-2-hexanona, también secretado por las glándulas metatorácicas de la chinche *Dipetalogaster maximus*, podría actuar como una segunda sustancia de alarma, útil para repeler depredadores (*e. g.*, hormigas) o para la comunicación intraespecífica (Rossiter & Staddon, 1983).

La posible existencia de claves olfativas ligadas al comportamiento sexual y la atracción a distancia entre sexos en *T. infestans*, *R. prolixus*, *P. megistus* y *T. mazzottii*, han sido estudiadas por diversos autores (Velázquez Antich, 1968; Baldwin *et al.*, 1971; Schofield & Moreman, 1976; Neves & Paulini, 1981; Ondarza *et al.*, 1986, 1987 y Rojas *et al.*, 1991). Sin embargo, con la excepción de *R. prolixus* (Baldwin *et al.*, 1971), las evidencias aportadas no son concluyentes, y llegan a ser contradictorias en ciertos casos (ver, Ondarza *et al.*, 1986 y Rojas *et al.*, 1991). La posibilidad de comunicación por medio de feromonas fue considerada por Velásquez Antich (1968). Este autor, intentando dilucidar la presencia de atracción química entre los sexos de *R. prolixus*, concluyó que las hembras eran atraídas por olores provenientes de los machos. Lamentablemente, dicha conclusión se basa en escasos datos experimentales. Baldwin *et al.* (1971) postularon la existencia de una sustancia volátil que atraería a los machos de *R. prolixus* hacia la pareja

hacia la pareja en cópula. Según estos autores, esta sustancia tendría además características "afrodisíacas" ya que fueron observados intentos de cópulas entre los machos. Schofield & Moreman (1976) convalidaron el hallazgo en *R. prolixus*. Al someter a *T. infestans* al mismo esquema experimental y obtener resultados negativos, estos autores postularon la ausencia de feromonas sexuales en esta especie. Más tarde, Núñez (1987) utilizando un olfatómetro de discriminación simultánea observó una tendencia (aunque muy variable) de las hembras de *R. prolixus* a orientarse hacia los machos. Ondarza *et al.* (1986 y 1987) sugirieron la existencia de una feromona de atracción sexual producida por las hembras de *T. mazzottii* durante la cópula que atraería a los machos. Sin embargo, Rojas *et al.* (1991) revisando los resultados de Ondarza *et al.* (1986 y 1987) y utilizando su misma metodología llegaron a la conclusión de que dicha feromona no existiría en esta especie.

Como se ha mencionado, la presencia de sustancias volátiles involucradas en el comportamiento sexual no resulta evidente en *T. infestans* (Schofield & Moreman, 1976). A pesar de ello, dado que surgen indicios de la posible existencia de comunicación sexual en Triatominae, estos resultados merecen ser revisados. Entonces, resta aún establecer fehacientemente la existencia de dicha comunicación y las claves químicas que podrían estar involucradas en el comportamiento sexual de esta especie.

Comunicación vibratoria

Las investigaciones llevadas a cabo en el campo de la comunicación vibratoria son relativamente recientes si se las compara con los estudios en el área de la comunicación química. Debido a esto, las señales vibratorias constituyen un aspecto de la comunicación animal poco estudiado, y por ello el

significado biológico de estas señales ha sido sujeto a diversas interpretaciones. Además, este canal de comunicación ha sido considerado por mucho tiempo de poco interés debido a la considerable dificultad de realizar mediciones, aún con equipos de alta sensibilidad para este tipo de señales. Pese a ello, en los últimos años se ha incrementado el estudio de la comunicación vibratoria, especialmente en invertebrados.

Sonido y vibración

El concepto de vibración muchas veces no está claro en la literatura. Esto se debe principalmente a que resulta difícil encontrar una separación estricta entre sonido y vibración. Se define sonido como un estado alternado de compresión y relajación de un medio elástico (*e.g.*, aire, agua), que se propaga en forma de ondas de presión. Las ondas de sonido se propagan en forma longitudinal, *i.e.*, las partículas del medio oscilan, variando la presión, en la dirección de propagación de la onda. La señal sonora puede entonces ser detectada por receptores sensibles a presión o a diferencias de presión. Esto es, membranas que sufren deformaciones de acuerdo con diferencias de presión entre ambas caras de la misma. En los insectos, dichas membranas aparecen en forma de **tímpanos**, de los que se conocen dos tipos funcionales. Uno corresponde a aquellos que actúan como receptores de presión (*i.e.*, una cara está comunicada con el exterior, mientras que la otra con una cámara cerrada), como por ejemplo los presentes en las mariposas Noctuidae (Michelsen, 1983). En otros insectos, los tímpanos actúan como receptores de gradientes de presión (*i.e.*, ambas caras de la membrana tienen comunicación con el exterior y son alcanzadas por las ondas sonoras), y se encuentran presentes en grillos y otros insectos (Huber, 1983). La explicación de las diferencias funcionales entre ambos tipos requiere de conceptos biofísicos y de

acústica, que exceden el marco de esta Tesis. Sólo diremos que el segundo tipo de receptores es más eficiente para la localización espacial de la fuente, en animales en que los órganos auditivos bilaterales están ubicados relativamente cercanos, en razón del tamaño de los insectos (Michelsen, 1983).

Las ondas sonoras son normalmente generadas por la acción de una estructura que vibra en el medio circundante. En los animales, la emisión de sonido está frecuentemente limitada por dos factores: la frecuencia de contracción muscular y el tamaño del emisor. Si las estructuras emisoras de sonido vibran directamente por contracción muscular, el intervalo de frecuencias de sonidos biológicos están limitados a frecuencias por debajo de 1kHz. Sin embargo, la mayoría de los animales productores de sonido son tan pequeños que no son capaces de emitir sonido de intensidad suficiente a frecuencias por debajo de 1kHz. Para que la emisión de sonido sea eficiente, el diámetro de la fuente sonora debe ser aproximadamente del mismo orden de magnitud que la longitud de onda del sonido o mayor. Mediante el uso de algún mecanismo amplificador de la frecuencia de emisión, muchos animales pequeños pueden compensar la limitante de su tamaño para emitir sonidos. Sin embargo, algunos insectos son tan pequeños que deben comunicarse por medio de frecuencias muy altas si "pretenden" utilizar el aire como medio de propagación de las señales sonoras, las que, por otra parte, sufren una gran atenuación en el medio (Michelsen, 1983). Existe una alternativa para estos animales, *i.e.*, utilizar otro medio de transmisión. De esta manera, la energía emisora puede ser mayor si las ondas son transmitidas en un medio más denso que el aire. El suelo, el agua y la madera presentan densidades aproximadamente 1000 veces mayores que el aire. Muchos insectos pequeños se comunican entre sí a través de las ramas de su planta hospedadora por medio de señales del orden de kHz que difícilmente pueden propagarse a través del aire (Michelsen, 1983). Otros insectos pueden emitir ondas tanto a

través del aire como a través de un sustrato sólido pero utilizan diferentes frecuencias en los distintos medios, *e.g.*, ciertos ortópteros que combinan señales acústicas y vibratorias, que se propagan por distintos medios, durante interacciones sexuales o agresivas (Markl, 1983).

Como conclusión, las ondas sonoras transmitidas a través del aire resultan ser una vía eficiente de comunicación para el hombre y muchos otros animales. Sin embargo para animales de pequeño tamaño como los insectos es difícil el uso de las ondas sonoras transmitidas a través del aire para comunicarse. En cambio, las señales vibratorias parecen ser una mejor elección. Entonces, por razones físicas, los animales acuáticos o los que viven en un sustrato sólido (suelo o madera) pueden emitir eficientemente señales vibratorias, las cuales pueden propagarse fácilmente en dichos medios.

Lamentablemente, la definición de *vibración*, en términos de fisiología sensorial, no es sencilla. Usualmente se define vibración por la negativa, *i.e.*, si un sentido mecánico no es tacto, audición, percepción de la gravedad, de la aceleración angular o de corrientes del medio, involucra entonces vibración (Markl, 1983). Este autor propone una clasificación de tipos de vibración involucradas en la comunicación animal, que varían de acuerdo al intervalo de acción. Esto es, la distancia a la que la energía mecánica, que oscila en forma rítmica, puede ser transmitida desde un emisor a un receptor. Esta clasificación reconoce: 1) vibraciones de contacto, 2) vibraciones por movimiento del medio en el campo cercano (*nearfield medium motion*) y 3) vibraciones de borde en superficies de interfase.

Vibraciones de contacto

En este caso, el emisor estimula al receptor directamente en forma rítmica. Por definición, este tipo de vibración es efectiva sólo cuando existe

contacto físico directo entre el emisor y el receptor. De esta manera, la intensidad de la señal emitida y la sensibilidad del receptor no resultan de gran importancia para la detección de la señal, ni para la localización de la fuente de emisión. En cambio sí resulta vital para el receptor la identificación de la señal y del emisor.

En particular, en insectos existen muchos ejemplos de vibraciones de contacto *e.g.*, tamborileo con las patas, sacudimiento del cuerpo (abejas, hormigas, avispas, estridulación (escarabajos y hormigas, Masters, 1979). Este tipo de vibraciones pueden cumplir un papel importante en distintos contextos en las fases de contacto durante distintos comportamientos, *e.g.*, sexual, de agresión, interacciones depredador - presa, interacciones de dominancia, trofalaxia etc. Es importante destacar que, en ciertos casos, aún cuando un animal produce señales sonoras audibles, la señal biológicamente relevante puede ser la vibración por contacto directo, constituyendo el sonido un epifenómeno físico no funcional (Markl, 1983). Por otra parte, este tipo de señales vibratorias muchas veces sólo son efectivas cuando están asociadas a otros estímulos (*e.g.*, químicos de contacto o visuales). Un ejemplo característico de comunicación vibratoria por contacto entre los interactuantes es el caso de la hormiga cosechadora *Pogonomyrmex*. Durante el apareamiento la hembra de esta especie estridula en señal de rechazo al intento de cópula realizado por el macho (Markl *et al.*, 1977). La transmisión de información no se realiza a través del aire ni a través del sustrato sino a través del contacto directo de los cuerpos del macho y la hembra.

Este tipo de comunicación podría estar relacionado, *i.e.*, haber derivado, al menos en algunos casos, con ciertos mecanismos de defensa. Muchos insectos producen señales vibratorias por contacto directo, cuando estridulan ante una perturbación, por ejemplo cuando son capturados por depredadores, tales como aves, telas de arañas, etc. (Masters, 1979). En este caso, no se

trataría de comunicación intraespecífica, sino de producción de vibraciones que perturban mecánicamente al atacante y tienden a lograr la liberación de la presa.

Otra característica importante de las vibraciones de contacto es que son contexto dependientes, esto es, que ejercen su efecto sólo cuando ocurren en un tiempo específico de una secuencia comportamental de una interacción determinada. Precisamente, esta característica hace que sea dificultoso el análisis experimental de este tipo de señales.

Vibraciones por movimiento del medio en el campo cercano

En el caso de las señales vibratorias en el campo cercano, los movimientos rítmicos ejercidos por el emisor producen un movimiento del medio circundante (agua o aire), el cual puede ser percibido dentro del campo cercano por detectores de movimiento del receptor, tales como tricobotrias o el órgano de Johnston.

Como fue indicado anteriormente, el concepto de vibración no es utilizado en forma uniforme entre los diferentes autores. En particular, algunos especialistas consideran a este tipo señal vibratoria como "sonido" (*e.g.*, Dreller & Kirchner, 1995). Quienes utilizan este criterio distinguen la física de propagación en el campo cercano y en el campo lejano, pero considerando una única modalidad de señal, esto es, sonido. Esta diferencia es la que lleva a otros autores a considerar dos modalidades distintas, *i.e.*, vibración de movimiento del medio en el campo cercano, en proximidad del emisor y sonido, a distancia de este. En particular, esto último está referido a los casos de comunicación biológica en que el sonido no cumple un papel funcional. En este trabajo de Tesis no se pretende resolver esta disyuntiva, aunque se ha

optado por el segundo criterio, siguiendo las definiciones propuestas por Markl (1983).

Vibraciones de borde en superficies de interfase

En este caso, el emisor genera ondas por impacto rítmico, las cuales ponen al medio en movimiento y son transmitidas a cierta distancia al receptor a través de una interfase entre dos medios de distinta densidad, como ser, sólido/agua, sólido/aire o agua/aire. De esta manera, los animales perciben las señales como vibraciones de dicha interfase. En el contexto del presente trabajo, interesan particularmente las vibraciones de borde en materiales sólidos.

La física de las ondas mecánicas transmitidas en sólidos y que se propagan a través de la interfase entre dos medios es sumamente complicada. En principio, distintos tipos de ondas en superficies de interfase pueden potencialmente estimular detectores de movimiento. Existe un considerable número de estos tipos de ondas, *e.g.*, ondas longitudinales, cuasi longitudinales, torsionales, transversales, de flexión, ondas de Rayleigh, etc., las cuales difieren en sus características físicas y dependen para su propagación, de las propiedades mecánicas del medio y del tamaño y forma de los materiales involucrados. Estas ondas se caracterizan por tener diferentes tipos de movimiento en relación a la dirección y velocidad de propagación, y, dependiendo del material y su geometría, por las diferentes atenuaciones con que se propagan. Por ejemplo, en las telas de araña las vibraciones longitudinales son transmitidas a alta velocidad, con una mínima atenuación y con una pronunciada direccionalidad, de tal manera que las arañas reaccionan a estas vibraciones con una alta sensibilidad (Markl, 1983). Es importante destacar que una única fuente de emisión puede fácilmente generar en forma

simultánea diferentes tipos de vibraciones en un dado sustrato dependiendo de sus características físicas. Por ejemplo, las cucarachas que se entierran generan ondas longitudinales y de Rayleigh y el escorpión depredador *Paurocotonus* las detecta y localiza desde varios decímetros de distancia con pelos tarsales y órganos liriformes (Brownell & Farley, 1979, citado por Markl, 1983). La atenuación de la señal vibratoria con la distancia depende del tipo de onda, de las características mecánicas y forma del material a través del cual se propagan y de la energía espectral que contiene la señal. Por esto, el coeficiente de atenuación (expresado en $\text{dB} \times \text{cm}^{-1}$) debe ser medido en cada tipo particular de sustrato y para cada tipo específico de señal. Por este motivo, es difícil realizar generalizaciones. Entonces puede concluirse que la transmisión de vibraciones para comunicarse a través de materiales sólidos es, en general, eficiente para un intervalo de distancias que va desde centímetros a decímetros.

Los mecanismos de producción y las funciones biológicas de las señales vibratorias en sustratos sólidos son variables como los materiales utilizados para la transmisión. Estas señales son utilizadas en cortejos por uno o ambos sexos y en insectos sociales como señal de alarma. La forma más común de producir este tipo de vibraciones es golpear el sustrato con alguna parte del cuerpo o con todo el cuerpo. También algunos animales golpean hojas o ramas de plantas, las cuales conducen eficientemente ondas de torsión (Michelsen *et al.*, 1982). En otros casos la producción de señales ocurre por estridulación, *e.g.* durante el cortejo en Orthoptera (Kältring & Kune, 1980, citado por Markl, 1983), o en Heteroptera (Gogala *et al.*, 1974 y Michelsen *et al.*, 1982). Otro ejemplo es el de las hormigas que estridulan cuando son enterradas como señal de alarma, o para estimular la recolección de alimento y para defender la colonia (Markl & Holldobler, 1978, citado por Markl, 1983 y Roces *et al.*, 1993). En todos estos casos raramente ha sido investigado que tipo de

vibración (*i.e.*, que tipo de onda) lleva la señal biológicamente relevante. Sin embargo, Michelsen *et al.* (1982) concluyeron que los cydnidos y algunos ortópteros, que transmiten vibraciones a través de las plantas durante el cortejo, generan exclusivamente ondas de torsión. Estos autores especularon que estas ondas pueden, teóricamente, ser utilizadas por el receptor, para obtener información de la dirección y distancia de la fuente emisora de la señal.

En esta Tesis hacemos hincapié en las vibraciones de contacto y en las vibraciones de borde en materiales sólidos ya que, parecen ser el tipo de señales más adecuadas para ser utilizadas por las chinches terrestres, dado su modo de vida y ambientes que ocupan.

Características generales de las señales vibratorias

La gran mayoría de las señales de comunicación vibratoria son producidas por mecanismos que aplican energía mecánica en el medio, a través del cual son transmitidas en forma de impulsos mas o menos breves que contienen rápidos estados transitorios. Esto resulta válido tanto para mecanismos de impacto, *e.g.*, golpear el sustrato, como para mecanismos de generación de vibraciones por estridulación, o por vibración de todo el cuerpo o parte de él. Los mecanismos generadores de vibración y los receptores de vibración deben, obviamente, estar adaptados uno al otro para que la comunicación sea eficiente. Otra característica relevante es que el patrón temporal de las series de pulsos vibratorios que se generan (modulación de amplitud) es importante para el reconocimiento de la señal y para su discriminación por el receptor.

En invertebrados, la energía vibratoria puede variar mucho dependiendo mayoritariamente del tamaño del emisor de la señal. La intensidad puede

variar de 10^{-16} W en *Drosophila*, a 10^{-8} W en hormigas que estridulan, o 10^{-1} W en escarabajos y hasta 10 W en cangrejos (Markl, 1983). Por otra parte, la sensibilidad a vibraciones varía según la especie y la frecuencia. Los umbrales de aceleración medidos van de 10^{-2} cm.s⁻² a algunos cientos de cm.s⁻² con frecuencias desde 100 a pocos miles de Hz. Inclusive la sensibilidad puede variar por la posición en que se hallan las patas que contienen a los receptores (Aicher *et al.* 1983, en el cangrejo violinista y Schnorbus 1971, en cucarachas, citados por Markl 1983).

La intensidad de la señal, su atenuación durante la transmisión y la sensibilidad del receptor definen el alcance espacial (r) de las señales vibratorias. El valor del alcance espacial puede ser 0, como en el caso de las vibraciones de contacto, puede ser de pocos milímetros, cubrir varios centímetros hasta alcanzar una distancia de metros, *e.g.*, señales vibratorias conducidas a través de hojas y ramas en plantas.

Es posible concluir entonces, a partir del análisis de las propiedades físicas de este tipo de señal, que la eficiencia de la comunicación vibratoria está restringida a distancias relativamente cortas, en comparación con otras claves (Markl, 1983).

Comunicación vibratoria en Triatominae

Es bien conocido que tanto larvas como adultos de Triatominae poseen un órgano estridulatorio y que varias especies utilizan dicho órgano para producir estridulaciones (Hase, 1933 y Schofield, 1977), sin embargo, su significado biológico no resulta claro hasta el presente. Una función defensiva de la estridulación contra diferentes tipos de depredadores ha sido demostrada en diversos insectos, incluidos algunos Heteroptera (Leston, 1957, citado por Schofield, 1977 y Masters, 1979). Por otra parte, observaciones de Radio

(1927) le atribuyen a la estridulación con el rostro por parte de las hembras una función de rechazo a la cópula. Observaciones realizadas en nuestro laboratorio en *T. infestans*, mostraron que una hembra puede copular repetidas veces. Sin embargo, transcurridos siete días desde la primera cópula, cuando las hembras se encuentran listas para oviponer, rechazan los intentos de cópula de los machos estridulando con el rostro (Lazzari com. pers.).

Además del órgano estridulatorio ubicado en el prosterno, en nuestro laboratorio fueron hallados en los Triatominae adultos dos posibles nuevos órganos estridulantes, esto es, timbal y stridulitrum-plectrum alar (Lazzari y Núñez, obs. no publicadas). La presencia de estos órganos ya había sido descrita en otros Geocorisae (Gogala, 1984).

Hasta el presente, las señales vibratorias emitidas por las vinchucas han sido registradas en condiciones de perturbación (*i.e.*, sujetándolas con pinzas) e interpretadas como ondas de presión (sonoras) que viajan a través del aire, midiéndose frecuencias de hasta 100 kHz (Schofield, 1977). Sin embargo, las vinchucas parecen carecer de receptores capaces de recibir señales sonoras en estas frecuencias medidas. Como se indicó anteriormente, las ondas sonoras requieren de tímpanos para su recepción. Además, no existe aún evidencia comportamental que demuestre que las vinchucas respondan a ondas transmitidas a través del aire (Schofield, 1977).

Los análisis biofísicos de la comunicación acústica en muchos insectos, incluidas las chinches terrestres (Geocorisae), demuestra que el canal de comunicación es la vibración del sustrato, de los cuerpos de los interactuantes en contacto (vibraciones de contacto), o de la masa de aire que rodea al emisor (vibraciones por movimiento del medio en el campo cercano) y no las ondas sonoras que viajan por el aire (Leston & Pringle, 1963; Gogala, 1984; Michelsen, 1983 y Markl, 1983). Las vinchucas disponen de órganos semejantes a los subgenuales (Debaisieux, 1935 y 1938), órganos de Johnston

y de tricobotrias que podrían operar en la frecuencia de las señales vibratorias y ser estimulados por estas ondas. Por lo tanto, la posible existencia de comunicación vibratoria en las vinchucas es un tema que no ha sido investigado considerando los posibles canales reales de propagación de la señal.

Objetivos del trabajo

- Caracterizar cuantitativamente el comportamiento sexual de *T. infestans*.
- Analizar la posible existencia de distintos canales de comunicación intraespecífica ligados al comportamiento sexual, bajo condiciones experimentales controladas, estudiando:
 - i. la existencia de claves olfatorias en el marco del comportamiento sexual en *T. infestans*, y
 - ii. la estridulación como un posible mecanismo de comunicación entre los sexos.

En particular, este trabajo de tesis intenta responder los siguientes interrogantes:

- 1) ¿Que características presenta el comportamiento sexual de *T. infestans*? ¿Sigue el comportamiento de apareamiento el modelo descrito para otros Triatominae?. ¿Qué papel tiene cada sexo en la probabilidad de ocurrencia de la cópula? (Capítulo 2).
- 2) ¿Afecta la presencia de una pareja en cópula el comportamiento de otros individuos de la población? ¿Como es esa modificación? ¿Qué papel juegan las claves química, visual y vibratoria?. ¿Qué mecanismo/s de orientación están involucrados? ¿Cuál podría ser el significado biológico de dicha modificación del comportamiento? (Capítulos 3, 4 y 5).

3) ¿Utiliza *T. infestans* la clave vibratoria para la comunicación intraespecífica?. ¿En que contextos lo hace? ¿Existen diferencias en las señales vibratorias producidas en diferentes contextos? ¿Que significado biológico tendrían en cada caso? (Capítulo 6).

CAPITULO 2

MODULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE APAREAMIENTO DE *Triatoma infestans*

Introducción

Actualmente, existe poca información acerca de los factores que afectan el comportamiento sexual de la chinche hematófaga *T. infestans* y de otros triatominos. Tampoco existe una descripción detallada de dicho comportamiento en esta especie. Regis *et al.* (1985) estudiaron la edad a la cual los machos de *T. infestans* realizan su primera cópula, y Malo *et al.* (1993) analizaron la influencia de la edad y de la alimentación de los machos en la primera cópula de *T. mazzottii*. Sin embargo, el papel de la hembra de los triatominos en el éxito de la cópula ha sido relativamente ignorado. Sólo observaciones ocasionales de respuestas de rechazo de hembras frente a intentos de cópula de machos fueron mencionados por Lima *et al.* (1986a) en *P. megistus* y por Rojas *et al.* (1990) en *T. mazzottii*, aunque no fueron cuantitativamente analizadas.

Por otra parte, Lima *et al.* (1986a) describieron el cortejo y la cópula en *P. megistus* y consideraron también otros factores relacionados con el comportamiento sexual de esta especie, *i.e.*, alimentación, duración de la cópula, fecundidad, fertilidad y longevidad (Lima *et al.*, 1986b, 1987a y b). Además, la descripción del comportamiento sexual de *T. mazzottii* fue realizada por Rojas *et al.* (1990) y Rojas & Cruz López (1992) compararon el comportamiento sexual de dos especies del complejo *T. phyllosoma*.

En el presente capítulo se realiza en primera instancia una descripción detallada del apareamiento de *T. infestans*. También se investigan los factores

que afectan el desarrollo de dicho comportamiento, estudiando el papel de las hembras como condicionantes de la ocurrencia de la cópula.

Materiales y métodos

Insectos: Larvas del 5to. estadio de *T. infestans*, criados en el laboratorio a 28°C y 75% de HR fueron separados por sexos en distintos recipientes hasta la ecdisis imaginal. Los adultos emergidos fueron alimentados *ad libitum* con sangre de caprino citratada, utilizando un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990). Luego de alimentados, los adultos vírgenes fueron separados individualmente en recipientes de plástico (4,5 cm de altura x 4,5 cm de diámetro), que contenía cada uno un trozo de cartón corrugado como sustrato y una malla de nylon como cubierta y piso.

El tiempo transcurrido entre la muda imaginal del primer y último individuo no excedió los 20 días en cada grupo experimental.

Dispositivo experimental: La arena experimental utilizada consistió de un aro de PVC (1,5 cm de altura x 11 cm de diámetro) cubierto por un vidrio (18 cm x 18 cm) transparente con un orificio de entrada (2 cm de diámetro) en el centro. Como sustrato se utilizó una base de cartón (16 cm x 16 cm) (Fig. 1).

Los experimentos comenzaron siempre a las 6:00 p.m., *i.e.*, al comienzo de la escotofase, cercano al pico de máxima actividad desarrollada en esta especie (Lazzari, 1992). La temperatura del cuarto experimental fue mantenida a 25±1°C y una iluminación difusa de 100 lux de intensidad fue provista por una lámpara de tungsteno.

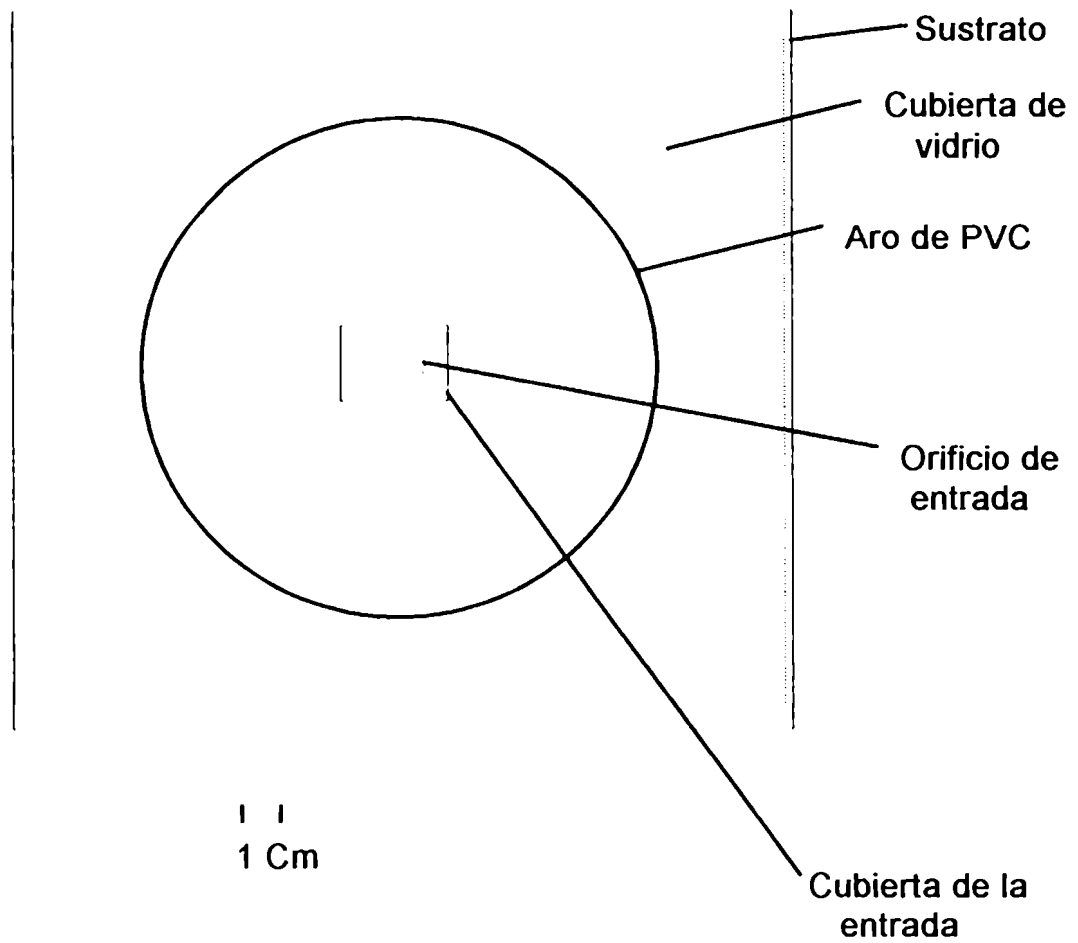


Figura 1: Diseño experimental utilizado para analizar el apareamiento de *Triatoma infestans*.

Procedimiento: Se utilizaron únicamente adultos vírgenes. Los insectos fueron ubicados en el cuarto experimental 1 hora antes de iniciar los ensayos. Una hembra y un macho fueron introducidos cuidadosamente en la arena experimental a través del orificio de entrada. El orificio fue inmediatamente cerrado con un rectángulo de vidrio (3 cm x 2,5 cm) y el comportamiento de la pareja fue registrado mediante observación directa.

La duración de cada ensayo fue de 10 minutos, a menos que el macho haya contactado la genitalia de la hembra con el órgano copulador antes de finalizado este tiempo. El tiempo de observación fue elegido teniendo en cuenta ensayos preliminares los cuales mostraron que bajo idénticas condiciones experimentales, las parejas maduras copulan en pocos minutos.

Durante la observación fueron registrados el número de parejas que "copularon", el número de intentos de cópula realizados por el macho y la ocurrencia y tipos de rechazo exhibidos por la hembra. Se consideró que las parejas "copularon" cuando los machos protruyeron su órgano copulatorio y contactaron la genitalia de las hembras, en este punto la pareja fue inmediatamente separada. De esta manera, los insectos permanecieron vírgenes en los ensayos subsecuentes. Los experimentos comenzaron el primer día postingesta y finalizaron cuando fue alcanzado un valor asintótico. Se utilizó un total de 33 parejas.

Por otro lado, a otras 14 parejas se les permitió la realización de la cópula para describir los componentes comportamentales de la cópula en esta especie.

Algunos experimentos fueron registrados con una cámara de video y en registros de audio, para el posterior análisis del comportamiento y sonidos producidos por las parejas. De esta manera, la ocurrencia de verdadera estridulación fue confirmada por registros simultáneos de audio y video.

Las diferentes etapas comportamentales de la cópula son aquí descriptas utilizando la misma nomenclatura empleada por los autores previos (Lima *et al.*, 1986a y Rojas *et al.*, 1990), con el objeto de hacer nuestra descripción del apareamiento de *T. infestans* comparable a aquellas de otras especies.

Resultados

Comportamiento del macho durante el apareamiento

La pareja se apareó por iniciativa del macho en el 100% de los casos, *i.e.*, los machos manifestaron siempre la primera señal comportamental de percepción de la presencia del otro sexo (ver abajo). El patrón de apareamiento consistió esencialmente de siete etapas comportamentales realizadas por el macho (Fig. 2). Después de un corto período (hasta 2 minutos), donde los insectos recorren la arena, los mismos realizan un comportamiento estereotipado y constante:

- (a) *posición vigilante*: el macho deja de caminar y mueve sus antenas, apuntando las mismas hacia la hembra. Si la hembra se mueve, el macho sigue la dirección de su movimiento con sus antenas.
- (b) *salto o montada*: el macho se acerca a la hembra y repentinamente salta sobre ella o se coloca sobre su zona dorsal lentamente.
- (c) *rotación*: una vez que está parado sobre la región dorsal de la hembra, el macho puede realizar un giro de 360° (este comportamiento es poco frecuente).
- (d) *posición dorsolateral*: el macho se localiza dorsolateralmente respecto a la hembra, indistintamente por el lado derecho o por el izquierdo de la misma. En esta posición la hembra permanece inmóvil, atrapada dorsal y ventralmente mediante los tres pares de patas del macho. Algunas veces

el macho extiende su rostro colocándolo sobre la cabeza de la hembra con un ángulo aproximado de 90°. En esta posición dorsolateral, la porción posterior del abdomen del macho se coloca por debajo de la porción posterior del abdomen de la hembra, exponiendo luego el macho su genitalia.

(e) *cópula*: el macho atrae hacia sí la porción posterior del abdomen de la hembra utilizando su tercer par de patas. Los parámetros del macho asisten en la inmovilización de la genitalia de la hembra, permitiendo así la introducción del órgano copulador. La duración de la cópula varió entre 2 y 10 minutos siendo la media 6' 24" \pm 1' 57" (N=14).

(f) *sujeción*: luego de la separación de la genitalia, el macho vuelve a colocarse sobre la zona dorsal de la hembra y permanece por pocos minutos sobre la misma sujetándola con sus patas. En esta posición la hembra puede caminar con el macho sobre su zona dorsal.

(g) *separación*: el macho desciende de la hembra y se separa.

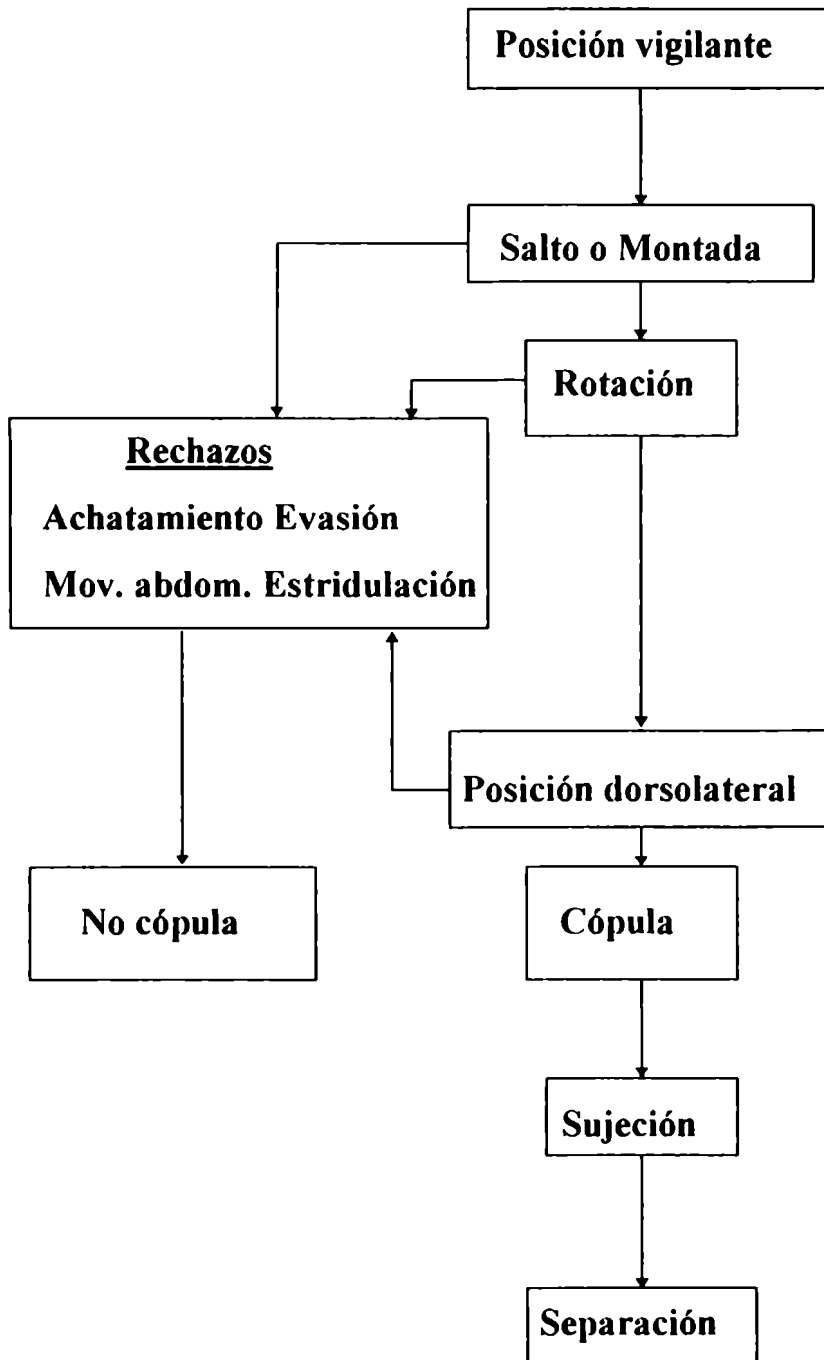


Figura 2: Esquema representativo de las etapas comportamentales que ocurren durante el apareamiento de *T. infestans*.

Probabilidad de cópula y receptividad de la hembra

La figura 3 muestra la variación de la probabilidad de cópula en función del tiempo transcurrido desde la ingesta. Bajo las condiciones experimentales establecidas, el 100% de probabilidad de cópula fue alcanzado aproximadamente a los 16 días posteriores a la primera ingestión como adultos (ANOVA de Regresión, $y = - 0,31 + 5,63x$, g.l. 1, 28, $F = 89,47$, $P < 0,001$). La menor probabilidad de cópula encontrada en los días previos no significa la ausencia de intentos de cópula por parte de los machos. Los machos intentaron copular desde el primer día, pero fueron rechazados por las hembras. A partir del 16to. día la cópula siempre se llevó a cabo, aunque algunas hembras siguieron mostrando cierto comportamiento de rechazo antes de la ocurrencia de la cópula. Esto significa que, a partir de este momento, cuando ocurrió, el rechazo exhibido por las hembras no fue efectivo. La frecuencia de intentos de cópula realizados por los machos no varió a lo largo del tiempo experimental (ANOVA de Regresión, n.s.), manteniendo un valor promedio de 1,9 intentos por macho por ensayo (Fig. 4). El análisis del comportamiento de las hembras reveló que la proporción de rechazos frente a los intentos de cópula de los machos decreció significativamente con el tiempo (ANOVA de Regresión, $y = 0,97 - 0,02x$, g.l. 1, 12, $F = 19,2$, $P < 0,001$, Fig. 4). De esta manera, la baja probabilidad de cópula observada hasta el 16to. día postingesta puede ser atribuido al comportamiento de rechazo de las hembras.

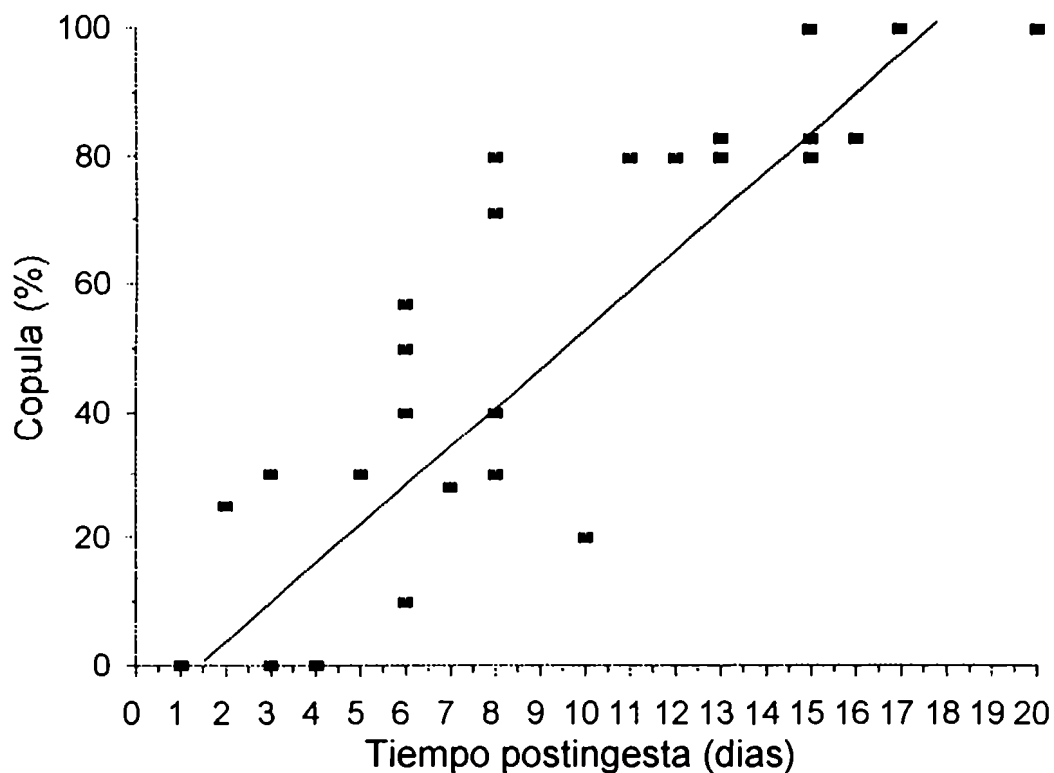


Figura 3: Parejas que copularon (expresadas en %) en función del tiempo transcurrido desde la ingesta de alimento. Los puntos corresponden a datos de 33 parejas. La línea de regresión representa la variación de la probabilidad de cópula en función del tiempo (ANOVA de Regresión, $y = -0,31 + 5,63x$, g.l. 1, 28, $F = 89,47$, $P < 0,001$).

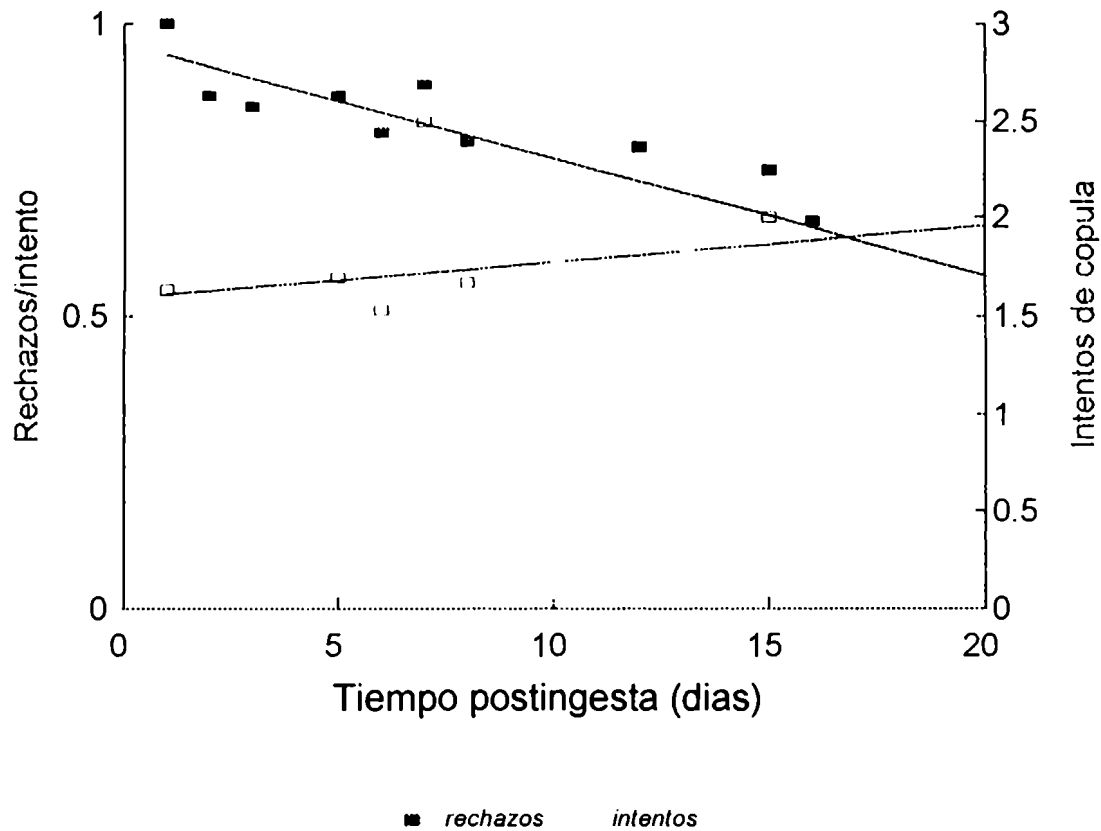


Figura 4: Frecuencia relativa de rechazos por intento de cópula (ANOVA de Regresión, $y = 0,97 - 0,02x$, g.l. 1, 12, $F = 19,2$, $P < 0,001$) (■, ordenada izquierda) y frecuencia de intentos de cópula de los machos (ANOVA de Regresión n.s.) (□, ordenada derecha), en función del tiempo postingesta (N=18).

El comportamiento de rechazo de las hembras

Frente a los intentos de cópula de los machos (etapas comportamentales b-f), las hembras respondieron exhibiendo los siguientes cuatro tipos de comportamientos de rechazo:

(a) *movimientos abdominales*: la hembra mueve sus patas y cuerpo de abajo hacia arriba y viceversa. Como resultado de este movimiento, el macho abandona a la hembra.

(b) *achatación*: la hembra achata su cuerpo contra el sustrato y realiza movimientos sacádicos laterales, de manera que el macho montado no puede establecerse en la región dorsal de la hembra, estando de esa manera imposibilitado de alcanzar la genitalia femenina.

(c) *evasión*: la hembra esquiva el salto del macho moviéndose velozmente.

(d) *estridulación*: la hembra frota la porción terminal del rostro sobre el surco estridulatorio. La estridulación puede ocurrir una vez que el macho está en contacto físico con la hembra (etapas comportamentales b-e). Cuando la hembra estridula el macho interrumpe su intento manteniéndose inmóvil, independientemente de la etapa comportamental que este realizando en ese instante. Luego, cuando la hembra interrumpe la estridulación, el macho continúa con la secuencia comportamental. En el caso de que la hembra vuelva a estridular, el macho interrumpe nuevamente su intento. Finalmente, luego de varios rechazos el macho abandona a la hembra. Sólo en pocas ocasiones el macho continuó con la secuencia comportamental a pesar de la estridulación de la hembra.

Como fue anteriormente explicado, el comportamiento de rechazo de las hembras no siempre previene la ocurrencia de la cópula. Sin embargo, cuando

son eficientes, los cuatro tipos de rechazo pueden provocar la interrupción de la secuencia comportamental realizada por los machos.

Las frecuencias de ocurrencia de los diferentes tipos de rechazo se muestran en la figura 5. El análisis no reveló una secuencia temporal fija para estos cuatro eventos. Mientras los rechazos por achatamiento y evasión exhiben una frecuencia de ocurrencia similar en todos los ensayos, los rechazos mediante estridulación y movimientos abdominales mostraron una variabilidad considerable en su ocurrencia entre ensayos.

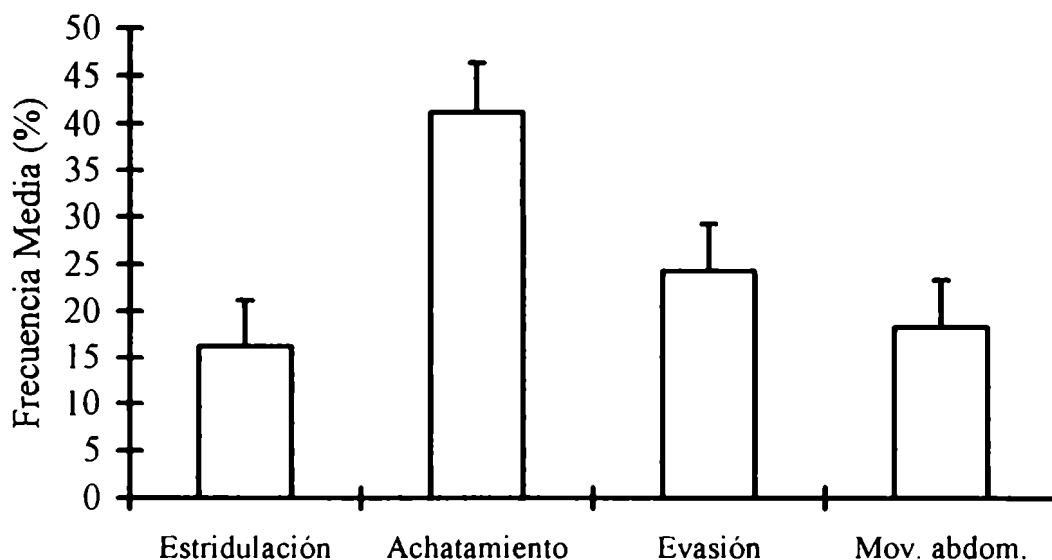


Figura 5: Frecuencia relativa de la ocurrencia de los diferentes tipos de comportamiento de rechazo desplegados por las hembras (N=18).

Discusión

Comportamiento de apareamiento

El comportamiento de apareamiento de *T. infestans* sigue el modelo general descrito para otros triatominos. Sin embargo, es posible reconocer algunas diferencias. Rojas *et al.* (1990) informaron la existencia en el 100% de los casos, de un suave movimiento de la hembra de *T. mazzottii* realizado por delante del macho antes de que el mismo salte sobre ella o la monte. Estos autores concluyeron que este desplazamiento de la hembra sirve como disparador para la continuación de la secuencia de apareamiento. En las hembras de *T. infestans* también fue observado este movimiento previo al salto pero no en forma regular. Además, fue observada la continuidad de la secuencia comportamental del macho, aún cuando la hembra permanecía inmóvil. Otras diferencias menores fueron observadas entre el comportamiento de *P. megistus* (Lima *et al.*, 1986a), *T. mazzottii* (Rojas *et al.*, 1990) y *T. infestans* (esta Tesis). La duración de la cópula, el ángulo del rostro extendido por el macho o la frecuencia de ocurrencia de la rotación parecen ser distintos. Las diferencias observadas entre especies permanecen, hasta el presente, como descriptivas, no pudiendo deducirse su valor funcional.

Receptividad de la hembra y éxito del apareamiento

Bajo las condiciones experimentales aquí establecidas, la probabilidad de cópula de *T. infestans* dependió del tiempo transcurrido desde la primera ingesta como adultos. Las bajas probabilidades de cópula se debieron mayormente al comportamiento de rechazo de las hembras. Todos los trabajos previos sobre el tema informaron el papel importante que tendría la edad de los

machos, como condicionante de la ocurrencia de la primera cópula (Regis *et al.*, 1985 y Malo *et al.*, 1993). Sin embargo, en los experimentos aquí presentados el comportamiento de los machos no fue el factor responsable de la variación de la probabilidad de apareamiento. Esto evidencia, entonces, la importancia de la receptividad de la hembra como un factor que afecta el éxito de la cópula en *T. infestans*.

Nuestros resultados no concuerdan, a primera vista, con los trabajos previos de otros autores. Regis *et al.* (1985) concluyeron que el éxito de la cópula en *T. infestans* depende principalmente de la edad de los machos, y que las hembras podrían ser receptivas desde el 4to. día posterior a la muda imaginal. Malo *et al.* (1993) arribó a una conclusión similar en *T. mazzottii*. Cabe destacar que en los experimentos aquí presentados, los adultos no fueron alimentados inmediatamente después de la muda imaginal, sino que lo hicieron a tiempos variables (hasta un máximo de 20 días). Salomón (1988) estableció que en hembras ayunadas la reabsorción de oocitos autogénicos comienza al 9^{mo} día postecdisis. No se dispone de información que permita inferir hasta qué punto el estado fisiológico del ovario podría afectar el comportamiento de apareamiento de las hembras. Sin embargo, esto puede tenerse en cuenta para las diferencias encontradas entre estos resultados y aquellos de Regis *et al.* (1985). Además, el método experimental aquí utilizado difiere de los previos. Los autores arriba mencionados evaluaron el éxito de la cópula de parejas permanentemente juntas (esto es, mantenidas todo el tiempo en el mismo recipiente), a través de la presencia de espermatozoides, durante varios días. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos fueron basados en observación directa de parejas, que sólo estuvieron juntas durante un breve intervalo de, a lo sumo, 10 minutos.

Por otro lado, los trabajos previos sólo mencionan incidentalmente la ocurrencia de comportamientos de rechazo en hembras de otras especies (Lima

et al., 1986a y Rojas *et al.*, 1990). Con el diseño experimental aquí utilizado, se pudieron distinguir diferentes tipos de comportamiento de rechazo realizados por las hembras de *T. infestans* aunque las distintas modalidades de rechazo no siguieron un orden secuencial ni mostraron una clara relación entre parámetros contextuales (como la secuencia comportamental realizada por el macho).

Estridulación en el contexto sexual

Previo a estos estudios, era ya conocido que los triatominos estridulan frotando el extremo de la proboscis sobre el surco estriado ubicado en el prosterno (Schofield, 1977; Di Luciano, 1981 y Gogala, 1985), aunque el significado biológico de la estridulación permanecía desconocido. La estridulación en triatominos fue frecuentemente observada y registrada como respuesta de los insectos frente a una perturbación mecánica, *e.g.*, sujetándolos con pinzas (Schofield, 1977). En nuestro trabajo se informa, por primera vez la ocurrencia espontánea (no forzada) de estridulación, en contraste con la estridulación inducida por una perturbación externa. Por otra parte, por primera vez en Triatominae, la ocurrencia de estridulación fue regularmente observada en un contexto de comportamiento sexual.

Schofield (1977) analizó las ondas transportadas a través del aire provocadas por estridulaciones ocasionadas por perturbación mecánica en varias especies de Triatominae. Este autor interpretó la señal como "producción de sonido", *i.e.*, ondas de presión que se propagan a través del aire, y midió frecuencias que alcanzaron 100 kHz. Este autor especuló que las chinches pudieron recibir la señal a través de las antenas (a través del órgano de Johnston), y que la misma correspondía a ondas transportadas a través del aire. Sin embargo, existen otras interpretaciones posibles. En particular, ha

sido demostrado que algunas chinches terrestres utilizan el canal vibratorio para la comunicación (Gogala & Cokl, 1983; Gogala, 1984 y 1985). Esto significa, ondas que se propagan a través del sustrato o a través del cuerpo de los individuos en contacto, así como también como ondas vibratorias transportadas en el campo cercano (*nearfield medium motion*). De esta manera, la comunicación vibratoria podría estar involucrada en redúvidos en el contexto sexual. Como ya ha sido explicado, las ondas vibratorias, propagándose en el campo cercano, son transmitidas como ondas a través del aire, pero difieren en sus propiedades físicas con las ondas de presión de sonido (Markl, 1983 y Michelsen, 1983). Esto significa que la percepción de la señal a través de las antenas (Schofield, 1977) podría no necesariamente corresponder a percepción de sonido (*i.e.*, variaciones de presión), sino a desplazamiento de las partículas del medio.

Se brinda aquí evidencia que sugiere fuertemente un papel comunicativo de la estridulación entre sexos durante el apareamiento, relacionado con el rechazo de la cópula por las hembras. Esta función ha sido sugerida por primera vez por Readio (1927), quien atribuyó un significado defensivo a la estridulación en redúvidos argumentando que las hembras estridularían durante la cópula como "protesta".

En el Capítulo 6 de esta Tesis retomaremos este tema, analizando la señal vibratoria emitida en el contexto sexual y en el defensivo.

CAPITULO 3

COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN DURANTE EL APAREAMIENTO EN *Triatoma infestans*

Introducción

En el capítulo anterior se realizó un estudio descriptivo del apareamiento de *T. infestans* y se analizaron cuantitativamente factores que afectan el comportamiento sexual en esta especie. Se establecieron, además, condiciones experimentales tales, que permiten obtener individuos con alta disposición para copular. Durante el desarrollo de este capítulo se analizará el comportamiento de agregación de machos en presencia de una pareja en cópula, mediante experimentos de comportamiento.

Como ha sido mencionado en el capítulo introductorio, hasta el presente, la existencia de comunicación intraespecífica ha sido demostrada en *T. infestans* en relación a la respuesta frente a sustancias volátiles presentes en las heces, las cuales promueven un comportamiento de agregación (Schofield & Patterson, 1977; Ondarza *et al.*, 1986; Núñez, 1987; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994 y Lorenzo & Lazzari, 1996).

Por otra parte, se ha explorado repetidamente en triatominos la posibilidad de la existencia de señales químicas (feromonas) que afecten la comunicación intraespecífica en el contexto sexual. Cierta evidencia de atracción química entre machos y hembras ha sido informada por Neves & Paulini (1981) en *T. infestans* y *P. megistus*, y por Velázquez Antich (1968) en *R. prolixus*. Hasta el presente, la demostración experimental más concluyente de una señal química asociada al contexto sexual en triatominos, es aquella comunicada por Baldwin *et al.* (1971). Estos autores, describieron la

existencia, en *R. prolixus*, de un factor liberado durante la cópula, que afecta la distribución espacial de machos, promoviendo su agregación alrededor de la pareja en cópula. Otros autores se han dedicado a la búsqueda de un factor similar en otras especies de vinchuca. Schofield & Moreman (1976), luego de repetir los ensayos de Baldwin *et al.* (1971), pero utilizando *T. infestans*, comunicaron la aparente ausencia de feromonas sexuales en esta especie. Por otra parte, los estudios llevados a cabo sobre el particular utilizando como modelo experimental a *T. mazzotti*, rindieron resultados altamente contradictorios. Mientras Ondarza *et al.* (1986 y 1987) informaron la existencia de feromonas de atracción sexual a distancia en esta especie, basados en resultados de elección altamente significativos, pocos años más tarde, Rojas *et al.* (1991) concluyeron que no existen dichos factores en esa especie.

En el presente estudio se pone a prueba la existencia, en *T. infestans*, de un factor similar al hallado en *R. prolixus*, el cuál sería liberado durante la cópula, induciendo la agregación de machos. Para ello, se evaluó la modificación de la distribución espacial de individuos de ambos sexos en presencia o en ausencia de parejas en cópula.

Materiales y Métodos

El estudio fue diseñado para cuantificar la agregación de machos y hembras, en presencia de una pareja en cópula. Se utilizaron adultos vírgenes con alta disposición para copular (ver Capítulo 2). Los insectos fueron criados a 28°C y alimentados en un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990) con sangre de caprino heparinizada.

Diseño y procedimiento experimental: Los experimentos fueron realizados en una arena experimental que consistió de un recipiente de vidrio rectangular (24

cm x 16 cm x 6 cm de altura). Un papel de filtro (24 cm x 16 cm) fue utilizado como sustrato. La temperatura fue mantenida a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una iluminación difusa de 35 lux de intensidad fue provista por una lámpara de tungsteno.

Se realizaron tres series experimentales. Los individuos fueron liberados en el centro de la arena en todas las series. En la primera serie, cuatro machos fueron liberados en la arena experimental y luego de 15 minutos, se introdujo una hembra (4 réplicas). En la segunda serie, cuatro machos fueron liberados en la arena experimental y luego de 15 minutos, se introdujo un macho marcado con pintura acrílica blanca (5 réplicas). En la tercera serie, cuatro hembras fueron liberadas en la arena experimental y luego de 15 minutos, se introdujo un macho marcado con pintura acrílica blanca (4 réplicas). El comportamiento de los insectos fue registrado por medio de videofilmaciones. Las coordenadas x - e y - correspondientes a cada insecto (centro del pronoto como referencia) fueron leídas cuadro a cuadro e ingresadas en una computadora mediante un método de digitalización (Flores & Lazzari, 1996). La distancia entre cada insecto presente en la arena y el individuo introducido posteriormente fue calculada, en todas las series experimentales, en función del tiempo.

Se realizó un análisis cuantitativo del desplazamiento de estos insectos estudiando las variaciones en la distancia al individuo referente en función del tiempo, previo, durante y posterior a la cópula.

Resultados

Distribución espacial de machos y hembras en presencia o ausencia de una pareja en cópula

Cuando la cópula se lleva a cabo, los machos en la arena muestran una tendencia a agregarse en las proximidades de la pareja (Fig. 6). La distancia entre los machos y la hembra decrece a través del tiempo disminuyendo progresivamente luego del inicio de la cópula (Fig. 7, serie 1).

Se observaron diferencias significativas en la distribución de los insectos entre series ($F = 15,2$, g.l. 2, 425, $P < 0,001$) así como a través del tiempo ($F = 6,7$, g.l. 8, 425, $P < 0,001$) (ANOVA de dos factores). También se encontró una interacción significativa entre factores ($F = 2$, g.l. 16, 425, $P = 0,013$), demostrando una variación diferencial del parámetro medido en función del tiempo en los tres grupos experimentales.

Cuando se sometió a prueba la agregación de machos sobre un macho marcado (serie 2), la distancia de los machos al macho marcado también disminuyó a través del tiempo, demostrando una tendencia espontánea a agregarse, aún en ausencia de una pareja en cópula (Fig. 7). Sin embargo, se observa una diferencia significativa en la dinámica del comportamiento cuando se la compara en ambas situaciones, *i.e.*, en ausencia o en presencia de una pareja en cópula (comparación pareada de Scheffé, $P < 0,05$). Además, la distancia entre los machos y la hembra posteriormente introducida decreció a una tasa más rápida, comparado con el decremento en la distancia de los machos al macho marcado. De esta manera, en presencia de una pareja en cópula, la agregación presenta un componente direccional, con los machos agregándose alrededor de la pareja en cópula, mientras que en ausencia de cópula la agregación fue azarosa.

Cuando la agregación de hembras alrededor de una pareja en cópula fue puesta a prueba (serie 3), no se observó un cambio significativo en la distancia al macho introducido, *i.e.*, las hembras no se agregaron (Fig. 7). La dinámica de la distribución difirió significativamente de las otras dos situaciones (comparación pareada de Scheffé, $P < 0,05$ en ambas situaciones).

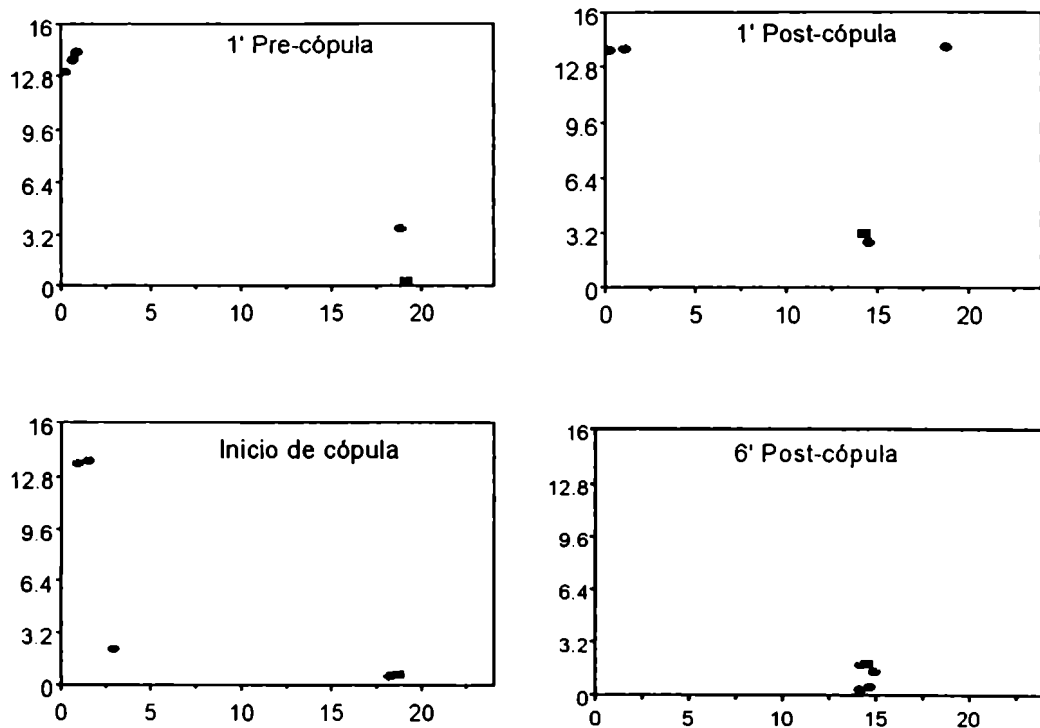


Figura 6: Ejemplo que muestra la distribución espacial de una hembra (■) y cuatro machos (●) en la arena experimental, 1 min. antes del inicio de la cópula, al inicio de la cópula y 1 y 6 min. posteriores al inicio de la cópula. Los valores de los ejes x - e y - están expresados en cm.

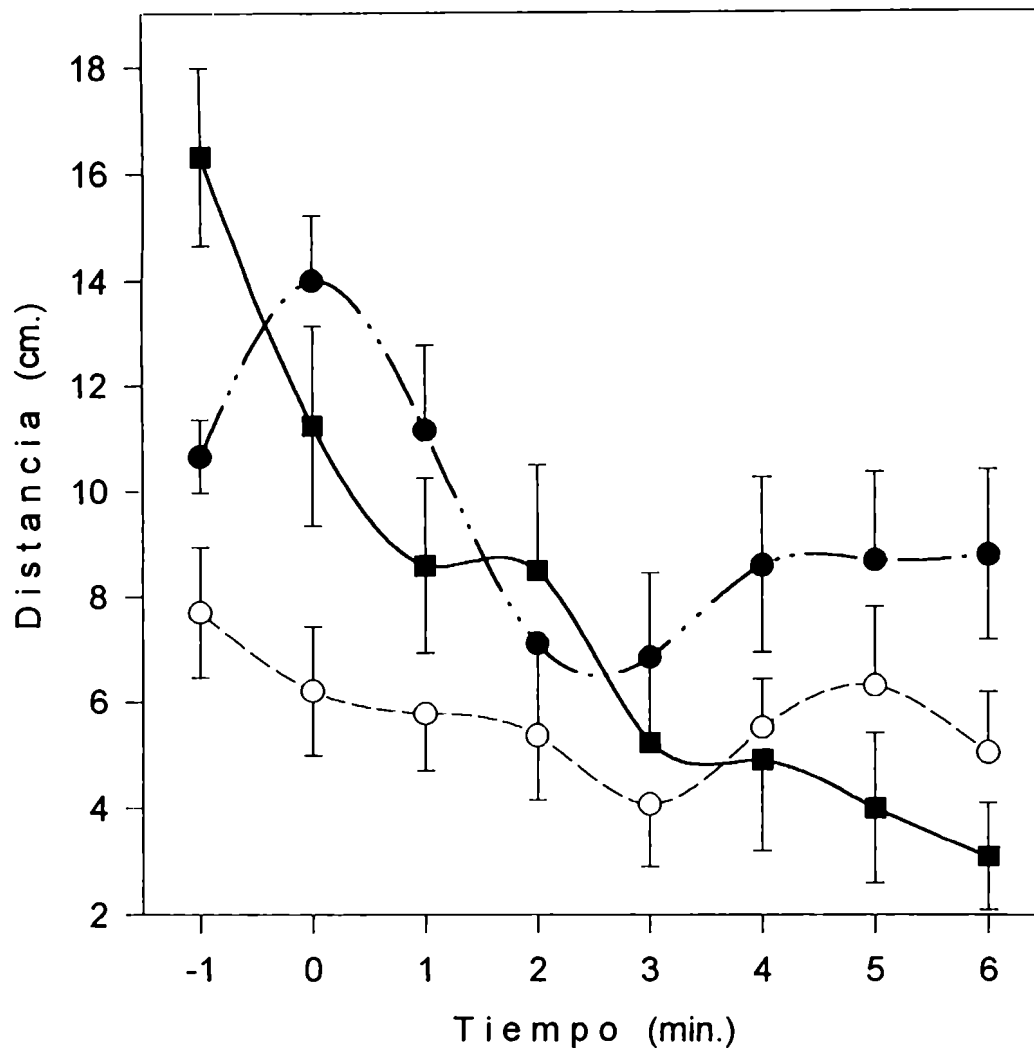


Figura 7: Distancia media \pm error estándar de los insectos en la arena en las tres series experimentales en función del tiempo: (■) distancia de cuatro machos a la hembra, (●) de cuatro machos a un macho marcado, y (○) de cuatro hembras a un macho marcado. El tiempo 0 corresponde al inicio de la cópula en la primera y tercera serie experimental. En la segunda serie el tiempo 0 fue establecido calculando el intervalo medio de tiempo transcurrido entre la introducción del macho o hembra y el inicio de la cópula en las otras series.

Discusión

Estos resultados apoyan la hipótesis acerca de la existencia de un factor de agregación producido durante la cópula en *T. infestans*. Esta señal, producida por uno o ambos miembros de la pareja en cópula, promueve la agregación de machos en torno a la misma, mientras que las hembras no muestran este comportamiento. Superpuesto a una cierta tendencia espontánea de los machos a agregarse azarosamente, el análisis detallado de los resultados demostró el efecto de la señal sexual producida durante la cópula. Los machos tienden a agregarse en ausencia de hembras, pero la dinámica de dicho comportamiento de agregación fue diferente en ambas situaciones, *i.e.*, en presencia o en ausencia de una pareja en cópula. En el primer caso, el comportamiento de los machos podría estar mediado por la tendencia espontánea a mantener un alto contacto corporal con el sustrato y con conespecíficos (tigmotaxis, Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994), mientras que en el segundo caso podrían también estar involucradas claves químicas.

Los trabajos previos sobre comportamiento sexual de *T. infestans* sugirieron la ausencia de feromonas sexuales de agregación (Schofield & Moreman, 1976). La diferencia entre estos resultados y los nuestros, podrían ser atribuidos a las distintas aproximaciones experimentales. Mientras Schofield & Moreman (1976) fotografiaron una arena experimental con insectos cada 5 minutos durante 18 hs., en el presente estudio se obtuvo un registro continuo mediante videofilmaciones, de los momentos previos y posteriores a la cópula. En algunos de nuestros ensayos, la duración de la cópula fue de 6 minutos o menos, lo cuál representa un período de tiempo cercano al intervalo de muestreo elegido por dichos autores. Por lo tanto, la escasa resolución temporal empleada, (esto es, 5 min) podría haber resultado en la pérdida del fenómeno en los registros de Schofield & Moreman (1976).

Este estudio comportamental sugiere fuertemente la existencia de feromonas sexuales en *T. infestans*, las que liberadas por uno o ambos sexos, modificarían el comportamiento de otros machos, promoviendo su agregación sobre la pareja en cópula. El significado biológico de esta señal sexual de *T. infestans* y la modificación del comportamiento de los machos está lejos de ser comprendido. Algunos autores (Baldwin *et al.*, 1971; Schofield, 1979; Ondarza *et al.*, 1986 y 1987) atribuyeron a esta señal en otros triatomíneos una función *afrodisíaca*. Esta interpretación está basada en: (1) que la señal es liberada durante la cópula (Ondarza *et al.*, 1986 y 1987), y (2) que en presencia de una pareja, los machos de *R. prolixus* intentan copular con otros machos (Baldwin *et al.*, 1971). En el primer caso, es difícil comprender el significado de la modificación comportamental de los machos sólo como resultado de la existencia de individuos copulando. Si la función es la de estimular a otros machos, para inducirlos a copular con alguna hembra disponible, no es fácil comprender como ha evolucionado. Con respecto al segundo punto, en nuestros experimentos también se observaron intentos de cópula entre machos en presencia de una pareja en cópula. Sin embargo, este comportamiento fue observado también en su ausencia. Algunos experimentos preliminares mostraron que los machos agregados copularon uno después del otro con la misma hembra (Lazzari obs. no publicadas). De esta manera, la señal sexual podría estar relacionada con la existencia, en triatomíneos, de *poliandria*, el cual es un sistema de fecundación peculiar en insectos (Thornhill & Alcock, 1983).

El análisis del curso temporal de la agregación de machos alrededor de una pareja en cópula constituye un bioensayo simple y específico, útil para poner a prueba los diferentes grados de fraccionamiento de la feromona putativa, *e.g.*, sexo, glándulas, fracciones químicas, etc. El eventual aislamiento y caracterización de el/los componente/s activo/s podría proveer

elementos novedosos para el desarrollo de nuevas estrategias de control de los vectores de la enfermedad de Chagas.

CAPITULO 4

EXISTENCIA DE UNA FEROMONA SEXUAL EN *T. infestans*: CORRELATOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Introducción

En el capítulo anterior, experimentos basados en evidencia comportamental, mostraron que los machos de *T. infestans* se agregan alrededor de una pareja en cópula. En virtud de este resultado, ha sido sugerida la existencia de una señal química sexual, la que sería liberada por uno o ambos miembros de una pareja en cópula.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la existencia de feromonas que afectan el comportamiento sexual de triatominos ha sido comunicada en *R. prolixus* (Baldwin *et al.*, 1971), mientras que la aparente ausencia de feromonas sexuales ha sido informado en *T. infestans* por Schofield & Moreman (1976). Por otra parte, evidencia contradictoria ha sido comunicada en *Triatoma mazzottii* (Ondarza *et al.*, 1986 y 1987 y Rojas *et al.*, 1991).

En *R. prolixus*, esta feromona es liberada durante la cópula y promueve la agregación de machos en torno a la pareja en cópula. En la sección precedente se ha relatado evidencia que apoya la existencia, en *T. infestans*, de un factor similar a aquel descrito para *R. prolixus*. Sin embargo, a pesar de haberse demostrado la ocurrencia del mismo fenómeno comportamental, *i.e.*, la agregación de machos sobre una pareja en cópula, el diseño experimental no permitió excluir otras señales de tipo visual o vibratorias. Por lo tanto, no puede, en este punto, afirmarse con absoluta certeza que el factor de agregación de machos de *T. infestans* sea una feromona. Se hace necesario,

entonces, complementar dichos experimentos con otros que permitan poner a prueba la existencia de otros tipos de claves (ver Capítulo 5).

En este capítulo se investigaron los correlatos electrofisiológicos, a nivel de las antenas, asociados con las respuestas comportamentales de machos de *T. infestans*. Se intenta constatar si el estímulo provisto por una pareja en cópula afecta la actividad eléctrica a nivel del nervio antenal.

Materiales y Métodos

Diseño y procedimiento experimental: Se utilizaron *T. infestans* con alta disposición para copular (ver Capítulo 2), criados a 28°C y alimentados semanalmente con sangre de caprino heparinizada por medio de un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990).

Dado que sólo los machos mostraron una respuesta comportamental asociada con una pareja en cópula (Capítulo 3), los registros electrofisiológicos fueron realizados en este sexo. Los insectos fueron fijados ventralmente a una caja de Petri con plastilina, mientras que sus antenas permanecieron libres. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se abrió una pequeña ventana en el tubérculo antenífero y la cutícula fue removida, exponiéndose el nervio antenal antes de su bifurcación (Insausti, 1994). Un electrodo de registro, confeccionado en tungsteno, fue cuidadosamente colocado sobre el nervio antenal, verificándose esto bajo el microscopio. El electrodo de referencia, también de tungsteno fue insertado en el ojo compuesto del insecto. La señal eléctrica obtenida fue filtrada, amplificada y monitoreada en un osciloscopio con memoria, desde cuya pantalla fue grabada en video para su posterior análisis (Fig. 8). Este método fue seleccionado por el tipo de impulsos registrados, lo cual permitió su grabación en cintas de video sin pérdida de información (ver más abajo). Las respuestas comportamentales de las parejas

utilizadas como estímulo, fueron registradas simultáneamente de manera que la ocurrencia de cópula pudo ser correlacionada con los eventos electrofisiológicos.

Una corriente de aire de flujo constante (10 ml/min), producida por una pequeña bomba fue conducida a través de una caja de plástico (10 cm x 10 cm x 6 cm de altura) donde fueron colocados los estímulos. La corriente fue dirigida sobre las antenas del macho fijado, por medio de conexiones de goma (5 mm de diámetro, 40 cm de largo desde la bomba hasta la caja, y 50 cm desde la caja hasta el insecto). El flujo de aire fue regulado mediante un sistema de válvulas y verificado con un flujómetro construido *ad hoc*.

La actividad eléctrica basal fue medida en ausencia de estímulos (*i.e.*, sin corriente de aire) y también en presencia de una corriente de aire limpio (sin insectos en la caja). A modo de estímulo, se ubicaron insectos adultos con alta disposición para copular (ver Capítulo 2) en la caja por donde la corriente de aire fluía hacia los machos experimentales, de los cuales fueron obtenidos los registros. Los siguientes estímulos fueron presentados en la caja: (a) dos machos, (b) dos hembras o, (c) un macho y una hembra. Esto último fue monitoreado continuamente a lo largo del experimento con el fin de determinar el momento en que ocurrió la cópula. Es importante destacar que, aún cuando todos los insectos se encontraban altamente motivados para copular, algunas parejas no se aparearon durante el experimento. Por lo tanto, la presentación del estímulo de cópula no pudo ser controlada por el experimentador, sino registrada su ocurrencia.

Cuando se llevó a cabo la cópula, los registros fueron descompuestos en intervalos correspondientes al tiempo previo (3 minutos), durante y posterior (5 minutos) a la misma.

La frecuencia de los impulsos fue computada en las diferentes condiciones experimentales y comparada con la actividad observada en

machos estimulados con una corriente de aire limpio (control), mediante una prueba de t para muestras pareadas.

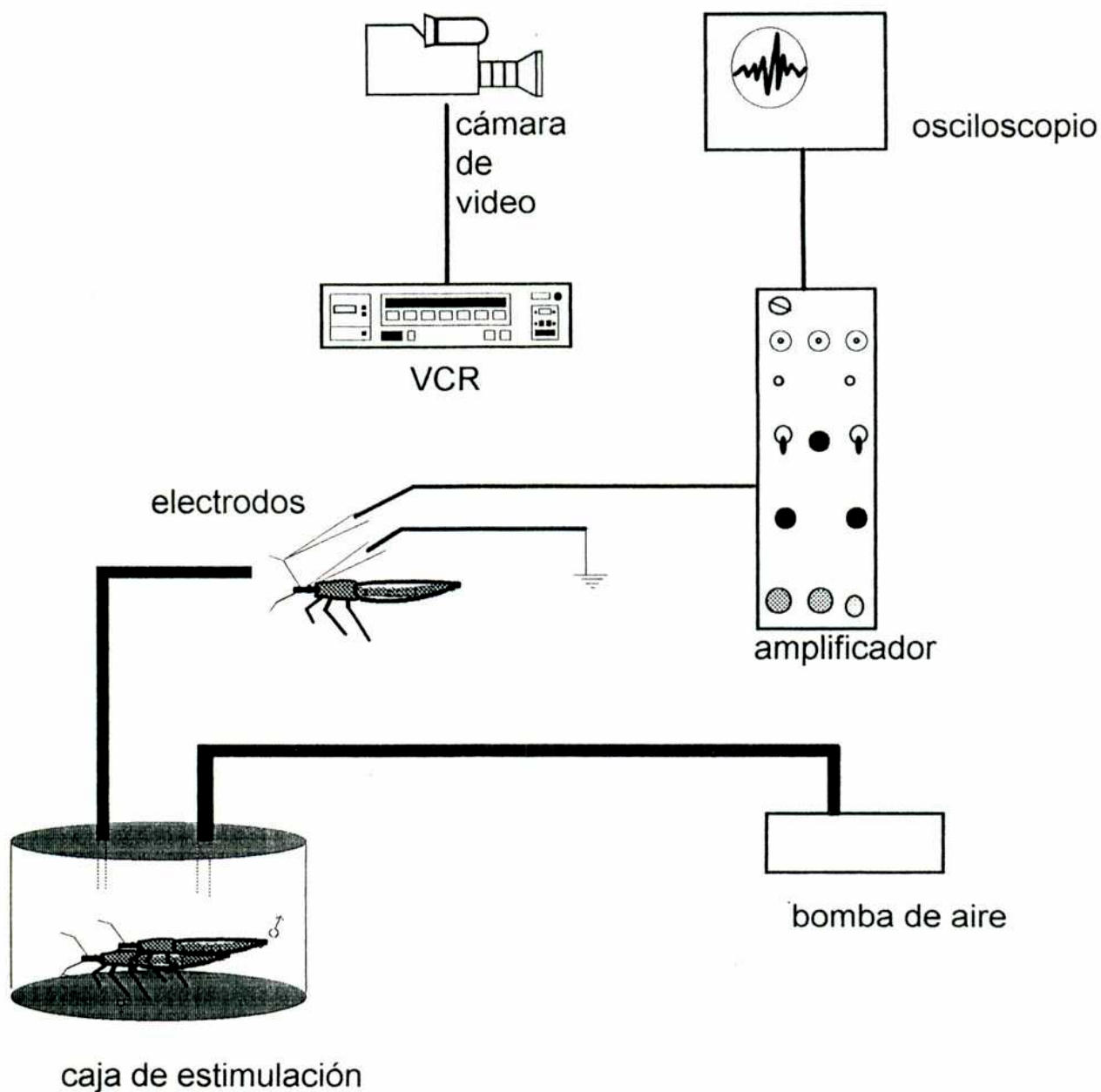


Figura. 8: Esquema del dispositivo experimental utilizado para registrar la actividad eléctrica del nervio antenal.

Resultados

La respuesta electrofisiológica se caracterizó por la ocurrencia de impulsos compuestos bifásicos, de una amplitud de 400 μV pico a pico, que aparecían con una frecuencia baja, de 1-12 por min.

No se observó variación significativa en la actividad nerviosa de las preparaciones, frente a la presentación de una corriente de aire limpio (*i.e.*, actividad basal vs. corriente de aire limpio). Resultados similares fueron obtenidos cuando los machos fijados recibieron un flujo constante de aire conducido a través de la caja que contenía a dos machos, dos hembras o a una pareja que no copuló (Fig. 9). No obstante, se observó un incremento significativo en la frecuencia de impulsos cada vez que una pareja copuló en la caja ($t = 10,15$, $N = 46$, $P < 0,01$, prueba de t para muestras pareadas). El análisis de los ensayos a lo largo del tiempo, mostró además, que la actividad eléctrica durante la cópula fue mayor que los minutos previos y posteriores a la misma (Fig. 9).

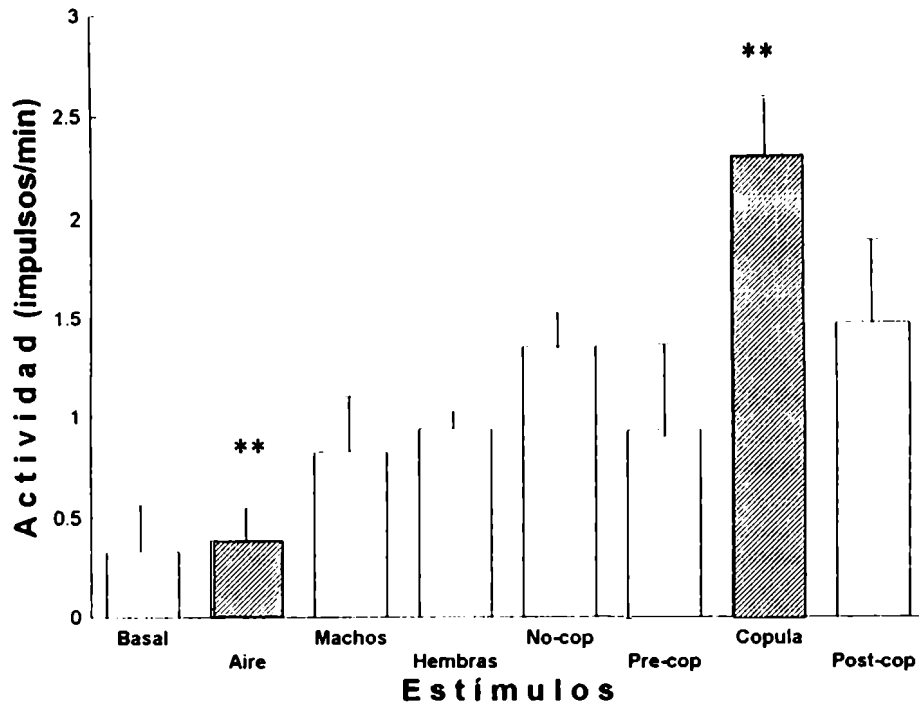


Figura 9: Actividad electrofisiológica evocada en machos por diferentes estímulos: aire (corriente de aire limpio, $n = 6$, 3 min.); basal (sin corriente de aire, $n = 6$, 3 min.); machos ($n = 6$, 10 min.); hembras ($n = 5$, 10 min.), no-cop (parejas que no copulan, $n = 6$, 10 min.); pre-cop (previamente al inicio de la cópula, $n = 6$, 3 min.); cópula (durante la cópula, $n = 6$, 6 min.); y post-cop (posteriormente al fin de la cópula, $n = 6$, 5 min.). Media + error estándar de un total de 46 registros realizados en tres machos. Sólo la cópula evocó un incremento estadísticamente significativo en la actividad electrofisiológica (**, $P < 0,01$, $t = 10,15$, $N = 46$, prueba de t para muestras pareadas), cuando se lo comparó con un flujo de aire limpio (control).

La posible existencia de una señal química sexual en *T. infestans*, fue investigada empleando una metodología electrofisiológica, *i.e.*, buscando cambios a nivel nervioso que se correlacionen con el comportamiento sexual. Se encontraron variaciones significativas en la actividad eléctrica asociada exclusivamente con la cópula en machos de esta especie. Los otros estímulos ensayados (*i.e.*, machos, hembras o parejas que no copularon) no modificaron la mencionada actividad.

La modalidad de registro utilizada no permitió discriminar si la actividad eléctrica registrada tenía su origen en entradas sensoriales o en salidas motoras (*i.e.*, activación de músculos antenales o corazones accesorios). Sin embargo, esto pareciera ser no relevante en el presente contexto, dado que tanto la actividad sensorial como la motora (*e.g.*, movimientos antenales) ocurren en presencia de estímulos atractantes en esta especie (Lazzari & Núñez, 1989 y Flores & Lazzari, 1996). También la frecuencia cardíaca puede ser afectada por la presencia de ciertos estímulos en las vinchucas (Chiang *et al.*, 1992).

Por ende, la evidencia electrofisiológica aquí presentada es consistente con la hipótesis que postula la existencia de señales olfativas liberadas por uno o ambos sexos durante la cópula en *T. infestans*. Dado que en nuestros experimentos el estímulo sólo podía alcanzar la antena del macho viajando en una corriente de aire, la única modalidad posible de estimulación capaz de explicar los cambios en las respuestas electrofisiológicas registradas es la olfativa.

Estos resultados se correlacionan positivamente con el comportamiento de agregación alrededor de una pareja exhibido por los machos cuando la cópula tiene lugar (Capítulo 3). Dicha respuesta comportamental sólo es exhibida por los machos y no por las hembras. Como los estudios

electrofisiológicos fueron llevados a cabo utilizando machos, no es posible discernir a qué nivel se expresan las diferencias entre el comportamiento de ambos sexos (*i.e.*, sensilias, receptores, filtros centrales o salidas comportamentales).

CAPITULO 5

CONVERGENCIA MULTIMODAL Y RESPUESTAS DE ORIENTACIÓN A SEÑALES SEXUALES EN *T. infestans*

Introducción

La orientación de un animal hacia una meta está mediada, frecuentemente, por claves de más de una modalidad. Esta convergencia de estímulos de diferente naturaleza puede tener lugar a distintos niveles en la cadena de recepción, integración y análisis de la información sensorial, o incluso a nivel de la salida motora (Horn, 1985). Son múltiples y muy variados los casos de convergencia multimodal que han sido descritos en los insectos. En algunos casos, dos estímulos deben actuar simultáneamente para evocar una respuesta de comportamiento, mientras que en otros los mismos deben ocurrir en forma sucesiva. Por ejemplo, la presentación simultánea de una corriente de aire y del olor del hormiguero de la especie hospedadora, es necesaria para que ciertos escarabajos mirmecófilos sean capaces de orientarse hacia la colonia que los albergará (Horn, 1985). Por otra parte, la transposición de información visual (*i.e.*, posición del sol) durante el viaje de recolección en información mecánica (*i.e.*, posición respecto a la vertical) durante la danza en la colmena de la abeja doméstica, implica la integración de dos estímulos de distinta modalidad, que actúan en momentos diferentes (von Frisch, 1967).

En el contexto del presente trabajo, y en virtud de que los capítulos precedentes se han restringido al análisis de una única modalidad química de señal, resulta relevante el estudio del posible papel de otras claves que pudiesen estar involucradas en la respuesta de agregación de los machos. En particular, es importante conocer la eventual participación de estímulos

mecánicos, en la forma de corrientes de aire y de señales vibratorias, y de estímulos visuales. Dicho análisis no sólo permite conocer la interacción entre claves de distinta modalidad, sino que puede brindar información sobre los mecanismos de orientación involucrados. Este conocimiento reviste importancia crucial, si se pretende, como en este caso, que las claves que resultan atractivas para las vinchucas puedan ser incluidas en el futuro en el diseño de nuevas estrategias de control de los vectores del Mal de Chagas.

i.- Papel de las corrientes de aires en la orientación de machos frente a fuentes de señales sexuales

Introducción

En los capítulos precedentes, hemos realizado un análisis detallado de la comunicación química intraespecífica de la vinchuca *T. infestans* en el contexto sexual. Se ha comprobado mediante experimentos de comportamiento que los machos de *T. infestans* se agregan en torno a una pareja en cópula. Mediante técnicas electrofisiológicas se ha puesto en evidencia un incremento en la actividad nerviosa de los machos, frente a olores liberados por parejas en cópula. Ambas evidencias apoyan la existencia, en esta especie, de una feromona sexual liberada por uno o ambos miembros de la pareja. La comprensión del significado biológico de esta señal y su eventual utilización en estrategias de control de vinchucas necesita del conocimiento de, por un lado, los mecanismos involucrados en la orientación de los machos y, por el otro, del papel que podrían cumplir otras señales eventualmente presentes durante la interacción sexual. En esta sección se comenzará por la evaluación de la respuesta de orientación a distancia de los machos de *T.*

infestans, frente a señales sexuales transportadas por corrientes de aire (*i.e.*, respuesta anemotáctica).

Materiales y Métodos

Insectos: Se utilizaron individuos adultos de *T. infestans* con alta disposición para copular (ver Capítulo 2). Los mismos se mantuvieron en cámaras a 28°C y con circulación constante de aire (Núñez & Segura, 1987). Los insectos fueron alimentados en un alimentador artificial diseñado en el laboratorio (Núñez & Lazzari, 1990) con sangre heparinizada de bovino.

Diseño experimental: Los estudios se realizaron utilizando un olfatómetro de discriminación simultánea diseñado por Núñez (1987). Dado que en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) no existen instalaciones especiales para el trabajo en Ecología Química, fue necesario realizar algunas adaptaciones en nuestro laboratorio. Las mismas consistieron de la provisión de aire limpio, termostatizado y saturado de vapor de agua, necesario para los estudios de las respuestas de los insectos a estímulos químicos. El sistema fue construido en base a la experiencia recogida de laboratorios extranjeros con experiencia en la especialidad (Institut de Zoologie de la Université de Neuchâtel/Suiza y Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie de Seewiesen/Alemania). Nos ocupamos, en primer lugar, del diseño, construcción y puesta en funcionamiento de un filtro de carbón activado, a fin de disponer de corrientes de aire limpio. El aire, proveniente de la red de aire a presión del edificio, es filtrado y conducido por tubos de teflon (4,2 mm de diámetro interno) hacia un baño termostatizado a 25°C, donde, además, se satura de humedad. El aire es dirigido entonces hacia una válvula solenoide que dirige el aire hacia una de dos tubuladuras que llegan a sendos recipientes

de vidrio (200 ml) donde se introducen los estímulos, cuyas salidas se conectan con cada una de las ramas del olfatómetro. El flujo de aire (100 ml/min) es dirigido alternativamente a cada uno de ambos recipientes (experimental y control), generándose de esta manera, en cada rama del olfatómetro, pulsos de aire de 0.5 s de duración, mediante un dispositivo electrónico (Fig. 10).

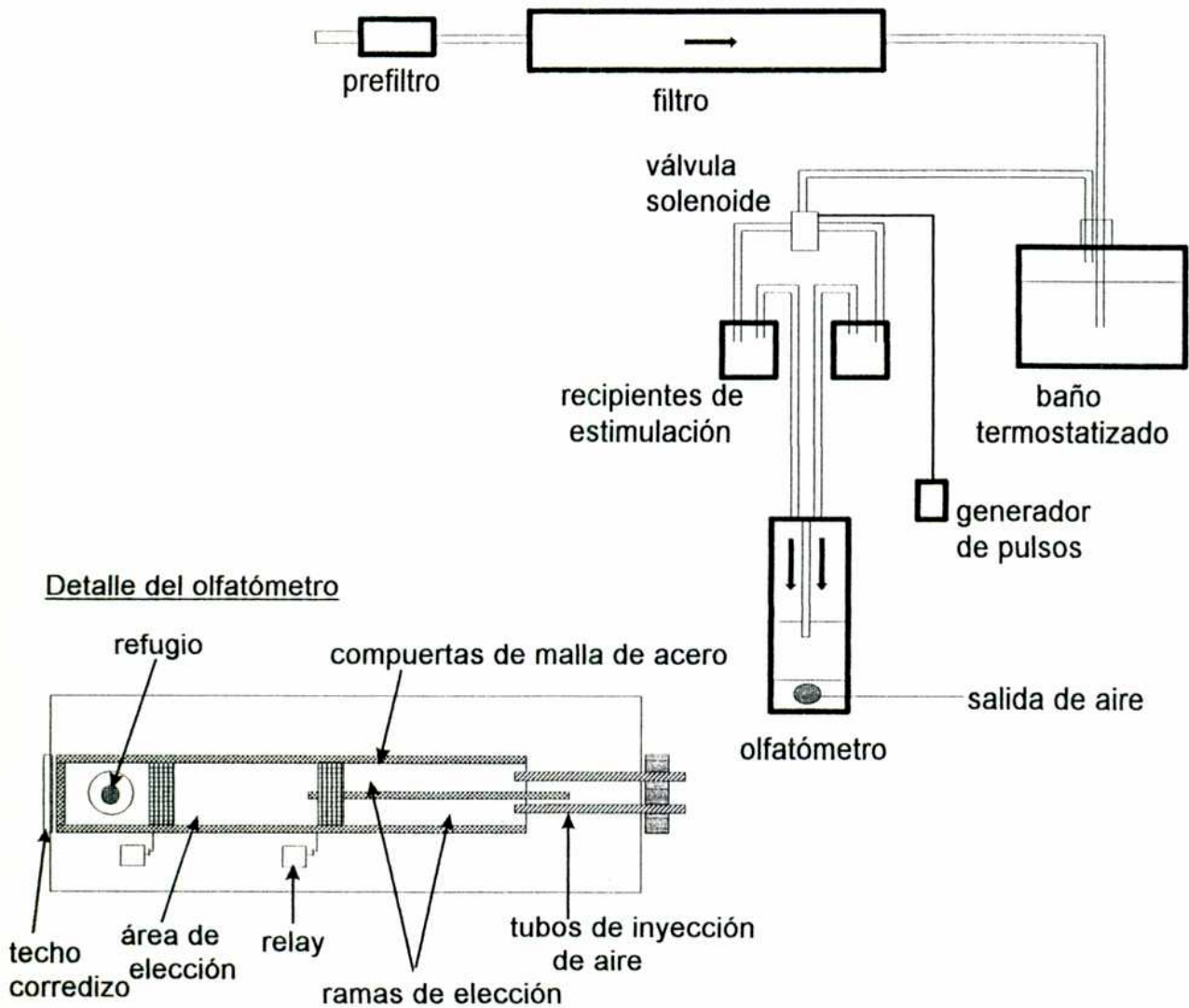


Figura 10: Esquema del dispositivo utilizado para evaluar la respuesta de orientación a distancia de machos de *Triatoma infestans* frente a señales sexuales.

Procedimiento experimental: Se introdujo un macho virgen en el “refugio” del olfatómetro y luego de 3 minutos se colocó un macho y una hembra en uno de los recipientes con papel de filtro como sustrato (experimental). En el otro recipiente (control) sólo se introdujo un trozo de papel de filtro. Una vez iniciada la cópula, se conectó el flujo de aire y se esperó 3 minutos, luego de los cuales se abrieron las puertas del refugio y de las ramas del olfatómetro, permitiendo el libre movimiento del insecto experimental. El criterio utilizado para cuantificar la respuesta del insecto fue la primera elección realizada por el mismo, considerando que una rama fue elegida cuando el macho traspasó una de las puertas de acceso, al menos en una distancia igual a la longitud de su cuerpo. Antes de cada ensayo se lavó con aire limpio durante al menos 5 minutos todo el dispositivo. Por otra parte, se alternó al azar tanto a los frascos (control y experimental), como la orientación de los tubos de teflon que llegan a las ramas izquierda y derecha del olfatómetro, de modo de evitar cualquier artefacto debido a asimetrías del diseño. Los ensayos (N = 12) fueron realizados en oscuridad funcional para los insectos (*i.e.*, utilizando iluminación infrarroja), a una temperatura ambiente de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, y monitoreados empleando una cámara sensible a la luz infrarroja y videofilmados para su posterior análisis. El equipo de videofilmación se lo utilizó para registrar y monitorear los ensayos, independizando así al investigador del ambiente de experimentación.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos mostraron que la respuesta de orientación de los machos de *T. infestans* frente a olores provenientes de parejas en cópula no difirió de la esperada para una elección el azar. En 6 ensayos la elección fue la rama experimental (olor proveniente de la pareja en cópula) y en 6 ensayos la

elección fue la rama control (aire limpio). Estos resultados nos permiten formular las siguientes hipótesis: 1) no existiría orientación a distancia durante la agregación de machos en presencia de una pareja en cópula; 2) la señal involucrada no sería transportada por corrientes de aire; 3) la señal química no evocaría en los insectos una respuesta anemotáctica; 4) la señal química controlaría la orientación de los machos según un gradiente de concentraciones. Todas estas alternativas involucran diferencias en el mecanismo de control de la orientación de *T. infestans*, cuyo discernimiento reviste crucial importancia, si se pretende utilizar este tipo de señales en estrategias de control de vinchucas.

ii.- Papel de la visión en la respuesta de machos de *T. infestans* a señales sexuales

Introducción

Como fue indicado al comienzo del presente Capítulo, la orientación de los insectos hacia una fuente de estímulos está mediada, frecuentemente, por claves de más de una modalidad. La respuesta del animal es guiada, entonces, por la convergencia multimodal de estímulos de distinta naturaleza (*i.e.*, química, mecánica, visual, etc.).

Las vinchucas muestran una marcada respuesta de evitación a la luz (Reisenman & Lazzari, 1996) y despliegan la mayor parte de su actividad durante las horas de la noche (Lazzari, 1992) o en refugios ofrecidos por grietas en paredes y techos adonde la penetración de la luz es limitada. Estos hechos, han inducido a diversos autores a subestimar la importancia de la visión de estos insectos, así como a descartar *a priori* la posible participación

de la clave visual en las respuestas de orientación de las vinchucas. Sin embargo, las características de su sistema visual, constituido en el insecto adulto por los ojos compuestos y 2 ocelos bien desarrollados (Insausti & Lazzari, 1996), sumado a la complejidad de determinadas respuestas visuales (Lazzari & Varjú, 1990), hacen necesario que las claves visuales sean consideradas y puestas a prueba, antes de ser excluidas como co-responsables de una dada respuesta.

En caso de estar involucrada, pueden postularse *a priori* dos posibles papeles de la visión en la respuesta de orientación. Por un lado, pueden asistir a la orientación hacia un objeto, mediante una respuesta de *fijación*. Esto es, el objeto, un elemento conspicuo en el panorama, es fijado en la retina frontal del ojo compuesto y mantenido en esa posición durante la aproximación. Por otra parte, la visión puede jugar un papel importante en el mantenimiento de una trayectoria, mediante la compensación de movimientos de rotación de grandes porciones del campo visual, mediante la *reacción optomotora*. En el primer caso, la ausencia de la entrada visual afectará la localización del objetivo en el espacio y la aproximación hacia el mismo. En el segundo caso, el efecto será menos importante, ya que sólo interferirá con el establecimiento de una trayectoria rectilínea, pero no la localización y orientación del insecto, lo que será responsabilidad de otra clave.

A fin de analizar el papel que cumple la clave visual en el contexto de la agregación de machos en torno a la pareja, se comparó la respuesta de insectos intactos, con aquellos a los que se les privó de la entrada visual, cubriéndoles los ojos.

Materiales y Métodos

El estudio fue diseñado para cuantificar la agregación de machos privados de claves visuales, en presencia de una pareja en cópula. Se utilizaron adultos vírgenes con alta disposición para copular (ver Capítulo 2). Los insectos fueron criados a 28°C y alimentados en un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990) con sangre de bovino heparinizada.

Diseño y procedimiento experimental: Los experimentos fueron realizados en una arena experimental que consistió de un recipiente de vidrio rectangular (24 cm x 16 cm x 6 cm de altura). Un papel de filtro (24 cm x 16 cm) fue utilizado como sustrato. La temperatura fue mantenida a $25\pm 1^\circ\text{C}$ y una iluminación difusa de 35 lux de intensidad fue provista por una lámpara de tungsteno.

Los machos, con sus ojos y ocelos pintados con pintura acrílica negra, fueron liberados en el centro de la arena. Cuatro machos fueron liberados en la arena experimental y luego de 15 minutos, se introdujo una hembra. El comportamiento de los insectos fue registrado por medio de videofilmaciones. Las coordenadas x - e y - correspondientes a cada insecto (centro del pronoto como referencia) fueron leídas cuadro a cuadro y almacenadas en una computadora mediante un método de digitalización desarrollado en nuestro laboratorio (Flores & Lazzari, 1996). La distancia entre cada macho presente en la arena y la hembra introducida posteriormente fue calculada en todos los ensayos. Se realizaron 5 réplicas del ensayo.

A continuación, se realizó un análisis cuantitativo del desplazamiento de estos insectos, estudiando las variaciones en la distancia al individuo referente (la hembra) en función del tiempo, previo, durante y posterior a la cópula. Los datos también fueron analizados estadísticamente mediante pruebas de ANOVA.

Resultados y discusión

Cuando la cópula se lleva a cabo, los machos con ojos cubiertos en la arena muestran una tendencia a agregarse en las proximidades de la pareja, como lo hacen los insectos normales. La distancia entre los machos y la hembra decrece significativamente a través del tiempo ($F = 2,85$, g.l. 6, 202, $P < 0.01$) (ANOVA de 2 factores), disminuyendo progresivamente luego del inicio de la cópula (Fig. 11).

No se observaron diferencias significativas entre grupos en la distribución de los insectos cuando se compara la agregación de machos normales (ver Capítulo 3) con la agregación de machos con ojos y ocelos pintados ($F = 2,10$, g.l. 1, 202 $P > 0,05$). Sin embargo se encontró una interacción significativa entre factores ($F = 2.77$, g.l. 6, 202, $P = 0,013$), indicando una variación diferencial del parámetro medido en función del tiempo en los dos grupos experimentales. Este efecto es esperable, si, tal como se indicó precedentemente, la entrada visual es utilizada para guiar las trayectorias de los insectos en cualquier contexto (reacción optomotora). Su exclusión durante la agregación hacia una pareja en cópula pudo haber afectado el mantenimiento de un curso recto hacia la fuente de estímulo.

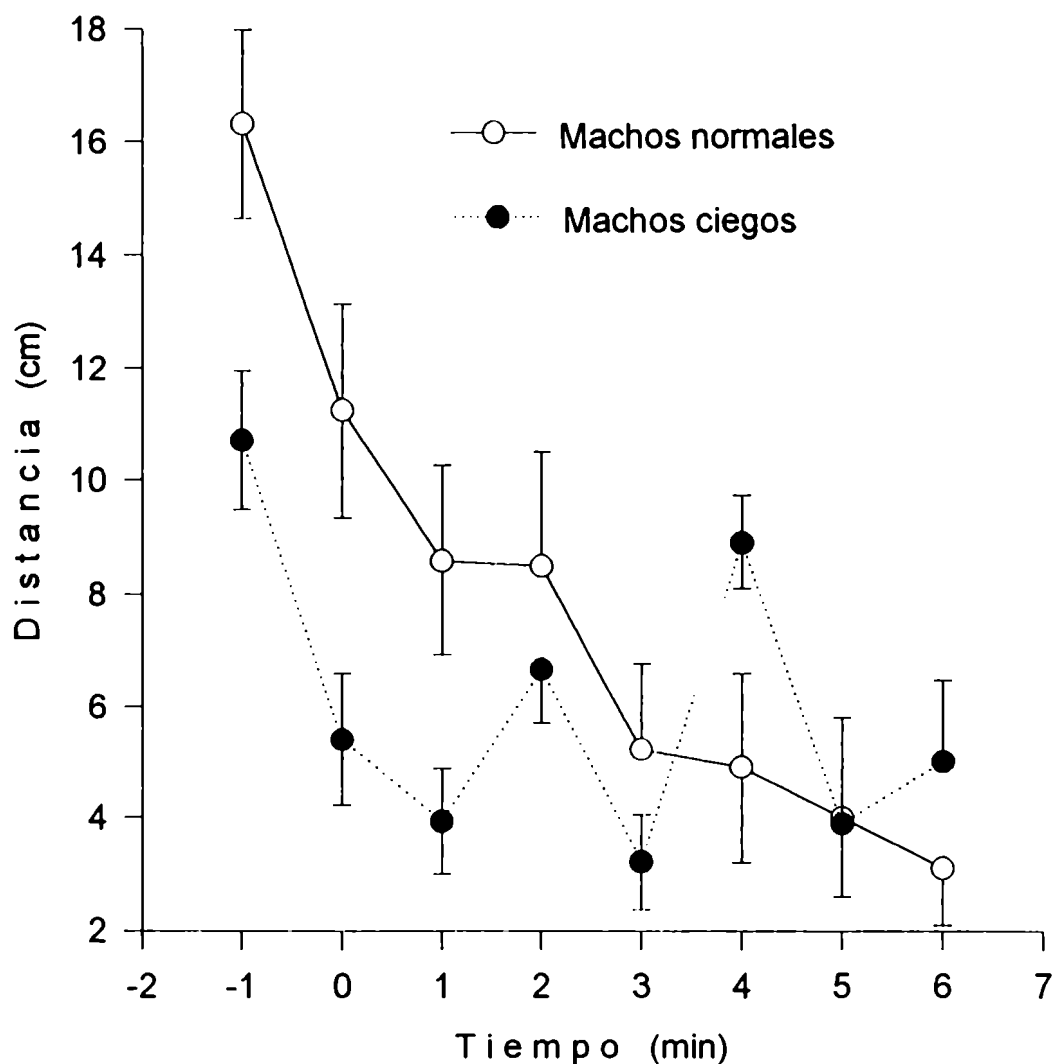


Figura 11: Media \pm error estándar de los insectos en la arena en los dos grupos experimentales en función del tiempo: (●) distancia de cuatro machos con ojos y ocelos cubiertos a una hembra; (○) de cuatro machos normales a una hembra. El tiempo 0 corresponde al inicio de la cópula en ambos grupos.

iii.- Papel de la clave vibratoria en la respuesta de machos de *T. infestans* a señales sexuales

Introducción

En el Capítulo 2 del presente trabajo de Tesis se ha señalado que las hembras de *T. infestans* son capaces de emitir vibraciones mediante estridulación, con el fin de rechazar los intentos de cópula de los machos. Como se verá en el Capítulo 6, el canal vibratorio constituyen un verdadero canal de comunicación, utilizado por las vinchucas en el contexto sexual.

Si bien los resultados expuestos hasta ahora, en particular de los experimentos electrofisiológicos, permiten asumir la naturaleza química de la clave que provoca la respuesta de agregación de los machos, estos no permiten excluir alguna participación de señales vibratorias. Por lo tanto, se realizó un experimento con el fin de poner a prueba la participación de algún patrón vibratorio específico durante el comportamiento de cópula. Para ello, se utilizó un acelerómetro para detectar y analizar las eventuales vibraciones que pudieran ser producidas por una pareja en cópula.

Materiales y Métodos

Insectos: Se utilizaron *T. infestans* machos y hembras con alta disposición para copular (ver Capítulo 2). Los insectos fueron criados en el laboratorio a 28°C y alimentados con sangre de bovino heparinizada en un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990).

Diseño y procedimiento experimental: Para registrar las eventuales señales vibratorias producidas por *T. infestans*, un macho y una hembra fueron

introducidos en un recipiente de vidrio (6 cm de diámetro x 4,5 cm de altura) y se les permitió interactuar libremente (Fig. 12, temperatura: $25\pm 1^\circ\text{C}$, iluminación: 25 lux). Un acelerómetro (*Brüel & Kjaer 4383*) fue adherido externamente con plastilina al piso del recipiente, de manera que las posibles vibraciones migrarían a través de las patas del insecto hasta alcanzar el sustrato, desde dónde podrían ser registradas por el acelerómetro. La salida del acelerómetro es voltaje proporcional a la aceleración instantánea de un objeto en movimiento. El mismo fue conectado a un amplificador, y su salida fue registrada en el canal de audio de un videograbador. Las interacciones entre los insectos fueron simultáneamente videofilmadas. Se registraron un total de 5 parejas.

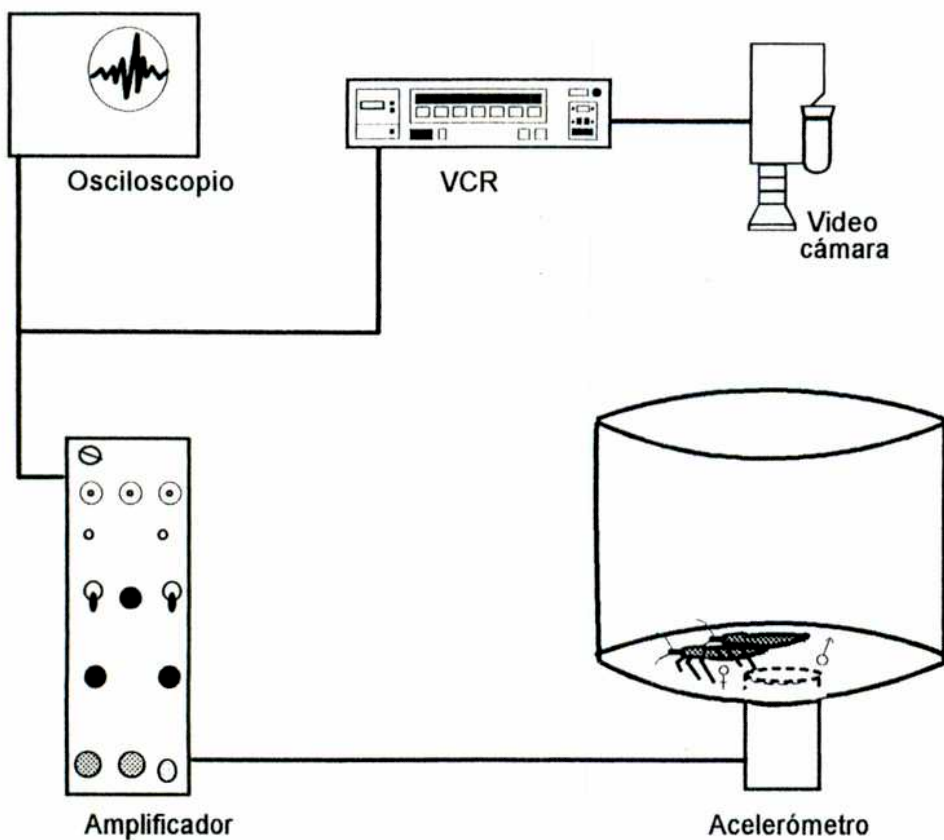


Figura 12: Dispositivo experimental utilizado para medir señales vibratorias en *T. infestans*.

Resultados y discusión

Ninguna de las 5 parejas de *T. infestans* utilizadas durante los ensayos produjo patrón vibratorio alguno durante la cópula, *i.e.*, no pudo encontrarse una señal diferente al ruido externo. No se registró ni estridulación, ni ningún otro tipo de vibración regular producida por otros órganos específicos (*e.g.*, timbal). Recordemos que, bajo condiciones experimentales similares, la vibración producida por *T. infestans* mediante estridulación, en la respuesta de rechazo de las hembras no receptivas, pudo distinguirse claramente, ya que resulta evidente el movimiento de la cabeza de los insectos tanto por observación directa como en las videofilmaciones.

En virtud de la evidencia negativa, puede concluirse que la clave vibratoria no juega un papel en el contexto de agregación de machos alrededor de una pareja en cópula. Debe recordarse, sin embargo, que las estridulaciones juegan un papel en el comportamiento sexual de las vinchucas, relacionado con el rechazo, por parte de las hembras no receptivas, de los intentos de cópula realizados por los machos (Capítulo 2).

Conclusiones

Las evidencias comportamentales y electrofisiológicas obtenidas precedentemente apoyan la hipótesis acerca de la existencia de una señal química sexual que promueve la agregación de machos de *T. infestans* en torno a una pareja en cópula. En el presente Capítulo se estudiaron otras claves de orientación que pudieren ser utilizadas por los machos de esta especie cuando se agregan en el contexto sexual, así como los mecanismos de orientación involucrados en esta respuesta.

Los resultados del experimento de comportamiento obtenidos en la arena experimental con machos con ojos y ocelos pintados mostraron que la agregación aún ocurre en ausencia de claves visuales. Al excluir la respuesta anemotáctica y las claves visual y vibratoria, los resultados obtenidos hasta el presente, bajo las condiciones experimentales establecidas, estarían indicando que la orientación de los machos de *T. infestans* se realizaría exclusivamente por un gradiente químico de concentraciones de algún compuesto liberado por alguno o ambos miembros de la pareja.

Es esperable, por lo tanto, que la señal actúe en un intervalo limitado de distancias. Esta limitación estaría determinada por la modalidad de la clave, ya que, en ausencia de claves auxiliares, los gradientes químicos, además de difusos, muestran un decaimiento marcado sólo en proximidad. Dependiendo de la concentración y tensión de vapor de la sustancia, la dilución dependiente de la distancia se vuelve muy elevada y el gradiente muy poco marcado, como para aportar información direccional. Se ha demostrado que la orientación química a grandes distancias (metros o aún kilómetros) de los insectos es posible gracias a la utilización de corrientes de aire (anemotaxis) como clave auxiliar (Kennedy, 1977).

CAPITULO 6

COMUNICACIÓN VIBRATORIA Y COMPORTAMIENTO

SEXUAL EN *T. infestans*

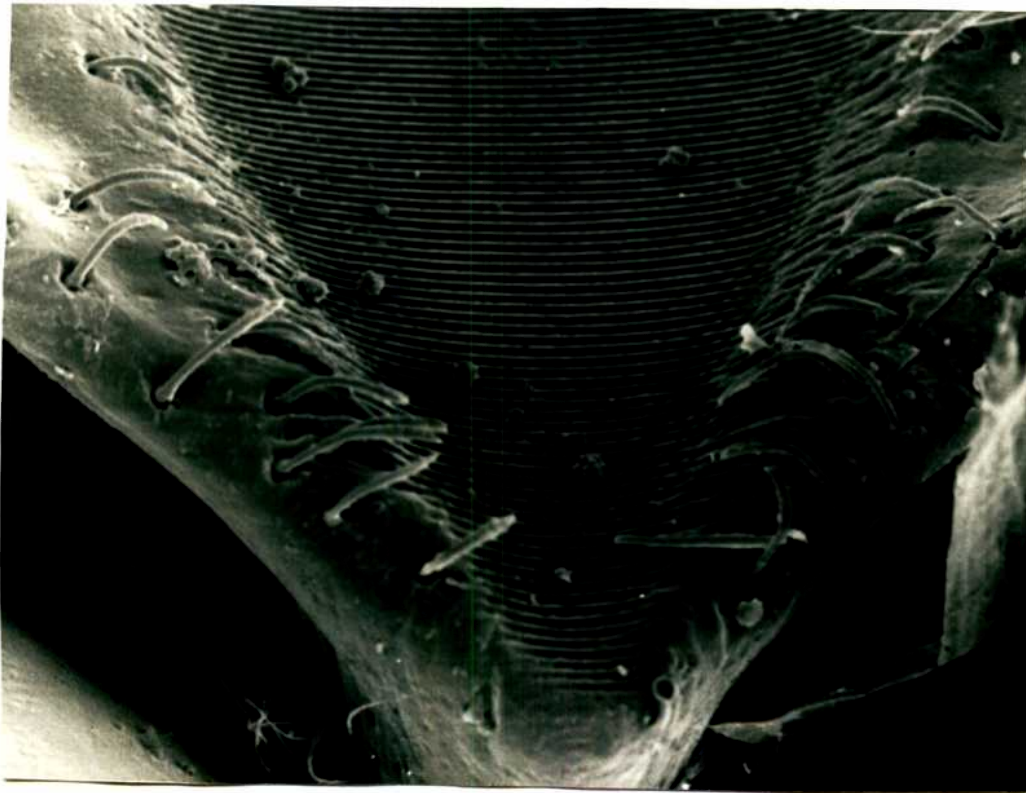
Introducción

En el Capítulo 2 se hizo mención a la ocurrencia de estridulación en el contexto sexual como un tipo de rechazo exhibido por las hembras no receptivas de *T. infestans*, ante los intentos de cópula realizados por los machos. En este capítulo se caracterizará la señal producida por las hembras y se discutirá su significado en la comunicación intraespecífica.

La producción de señales vibratorias en el contexto de comportamiento sexual ha sido observado en varias especies de insectos (Markl, 1973 y Gogala *et al.*, 1974). Algunos insectos utilizan el canal vibratorio con el fin de atraer y encontrar a sus parejas, así como también para determinar su sexo (Gogala & Hocevar, 1990). En este caso, el intervalo de comunicación utilizando vibraciones transmitidas a través del sustrato podría estar limitado a unos pocos centímetros en un medio con alta humedad, como el suelo compacto, aunque puede alcanzar distancias que superen metros en insectos sobre plantas (Michelsen *et al.*, 1982). Los miembros de otros grupos de insectos, por lo contrario, se comunican mediante vibraciones de contacto, *i.e.*, vibraciones que son producidas cuando dos individuos están en contacto físico, por ejemplo cuando una hembra no receptiva estridula para inhibir la cópula (*e.g.*, hormigas: Markl *et al.*, 1977, vinchucas: esta Tesis).

Además de utilizar claves químicas para localizar a la pareja, las chinches hematófagas producen vibraciones durante el comportamiento sexual. Los triatominos poseen un órgano estridulatorio ubicado en el prosterno que

consiste en un surco longitudinal cuticular compuesto por un número de crestas transversales (Fig. 13). La estridulación se produce cuando el extremo de la proboscis es frotada sobre el surco (Moore, 1961; Schofield, 1977 y Di Luciano, 1981).



200µm

Figura 13: Fotografía de la sección posterior del surco estridulatorio de una hembra de *T. infestans*, donde se observan las crestas transversales que eventualmente pueden ser frotadas por el extremo de la proboscis para producir señales vibratorias.

Ha sido observado que los individuos estridulan cuando son perturbados o manipulados (Moore, 1961 y Schofield, 1977), así como también cuando están comprometidos en la cópula (Moore, 1961). Durante los intentos de cópula del macho, observaciones comportamentales indican que las hembras no receptivas de *T. infestans* estridulan para rechazarlos. La probabilidad de rechazar a un macho decrece con el incremento del tiempo transcurrido desde la primer ingestión de los adultos, la cual está relacionada con un incremento de la receptividad de la hembra (Capítulo 2).

En los estudios de Moore (1961) y Schofield (1977), los “cantos” de los triatominos fueron registrados como señales transportadas a través del aire, y fueron provocados sujetando a las chinches con pinzas, de tal manera que se las puede considerar como "estridulaciones por perturbación" (Masters, 1980). Si estas estridulaciones por perturbación son relevantes como señales de comunicación intraespecífica es una pregunta abierta. Además, como ya ha sido mencionado, hasta el presente no existe evidencia comportamental que demuestre que los triatominos responden a sonidos transportados a través del aire (Schofield, 1977). Como consecuencia de esto, las vibraciones transportadas a través del sustrato son buenos candidatos a tener un papel en la comunicación intraespecífica, como ocurre en muchas otras especies de insectos (Markl, 1983). En este estudio se registraron las vibraciones estridulatorias producidas por hembras de *T. infestans* en dos contextos diferentes, y se realizó la comparación de su estructura temporal y espectro: primero, en el contexto natural de comunicación sexual, cuando las hembras estridulan espontáneamente para rechazar los intentos de cópula realizados por los machos (de aquí en más llamadas "estridulaciones de rechazo"). Segundo, en el contexto de un comportamiento defensivo, cuando las vinchucas estridulan si son manipuladas o sujetadas (de aquí en más "estridulaciones por perturbación").

Materiales y Métodos

Insectos: Se utilizaron machos vírgenes (3-5 meses de edad) con alta disposición para copular, y hembras vírgenes no receptivas de *T. infestans* (ver Capítulo 2). Los insectos fueron criados en el laboratorio a 28°C y alimentados con sangre de chivo heparinizada en un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990).

Diseño y procedimiento experimental: Para registrar las estridulaciones de rechazo producidas por la hembra se utilizó el mismo dispositivo y el mismo procedimiento experimental descritos en el capítulo 5 (ver Fig. 12). Las señales vibratorias fueron analizadas utilizando un conversor A/D (*CED 1401, Science Products*) y un programa de análisis (*CED Spike 2, Science Products*). Se videofilmaron un total de 20 intentos de cópula realizados por 4 machos diferentes frente a una única hembra.

Para registrar estridulaciones por perturbación, una hembra fue sujeta con pinzas y suavemente ubicada dorsalmente sobre el acelerómetro. Cuando las vinchucas son manipuladas de esta manera, las estridulaciones por perturbación son fácilmente evocadas. Se analizaron tres secuencias estridulatorias realizadas por una hembra. Los parámetros temporales de ambos tipos de estridulaciones, por perturbación y de rechazo, fueron comparados mediante una prueba de *t* para muestras pareadas.

Cabe destacar que mientras las estridulaciones por perturbación fueron registradas directamente sobre el acelerómetro, las estridulaciones de rechazo debieron ser transmitidas a través de las patas previamente a ser registradas. No se conoce aún si las patas actúan como filtros para algunas frecuencias de

la señal. Con el fin de controlar esta posibilidad, se registraron estridulaciones por perturbación sujetando a la hembra con pinzas y contactando el acelerómetro solo con sus patas, comparándose luego con las señales registradas en forma directa (apoyando la región dorsal).

Resultados

Como fue descrito anteriormente (Capítulo 2), la cópula en *T. infestans* es típicamente iniciada por un salto o montada del macho sobre la hembra, y continúa con la introducción de la genitalia masculina. En los 20 intentos de cópula registrados, la hembra no receptiva estriduló siempre que fue contactada físicamente por el macho. Con respecto a la percepción de las estridulaciones, se observó que el macho permaneció inmóvil sobre la hembra por algunos segundos, o bien abandonó el intento y se retiró. Estas estridulaciones de rechazo fueron muy efectivas: sobre un total de 20 intentos, no ocurrió ninguna cópula. La producción de estas estridulaciones de rechazo en el tiempo se presentan en la figura 14, donde se indican tanto el salto como el retiro del macho (arriba). En este ejemplo, las estridulaciones fueron concentradas en tres intervalos de tiempo (Fig. 14, flechas vacías), donde se correlacionaron con los intentos de cópula del macho previos a su retiro. Las estridulaciones de rechazo consistieron en series largas de sílabas repetidas, cada una compuesta por dos chirridos: el análisis de las videofilmaciones reveló que la frotación del extremo de la proboscis sobre el surco con un movimiento postero-anterior, produjo el chirrido postero-anterior, el cual fue menos intenso, y con un movimiento antero-posterior, el chirrido antero-posterior. La repetición de cuatro sílabas consecutivas (8 chirridos), así como también la amplificación de una única sílaba se presenta en la figura 14, lo cual permitirá futuras comparaciones con las estridulaciones por perturbación.

Como se muestra en la figura, el chirrido menos intenso (aceleración del sustrato en el intervalo de 0,5 - 0,8 cm/s² pico - pico) fue producido durante el movimiento postero-anterior, y fue aproximadamente 50% menos intenso que el chirrido producido durante el movimiento antero-posterior de la proboscis. El chirrido antero-posterior fue leve pero significativamente más largo que el chirrido postero-anterior (muestra pareada de *t*, *t* = 3,2, *P* < 0,005, ver tabla 1) y estuvieron separados por una pequeña pausa (media = 9,0 ms) promediando el intervalo inter-sílabas los 7,5 ms. Como consecuencia de esto, las estridulaciones de rechazo fueron repetidas a una tasa media de 23,8 sílabas por segundo (intervalo: hasta 30, n = 12, Tabla 1).

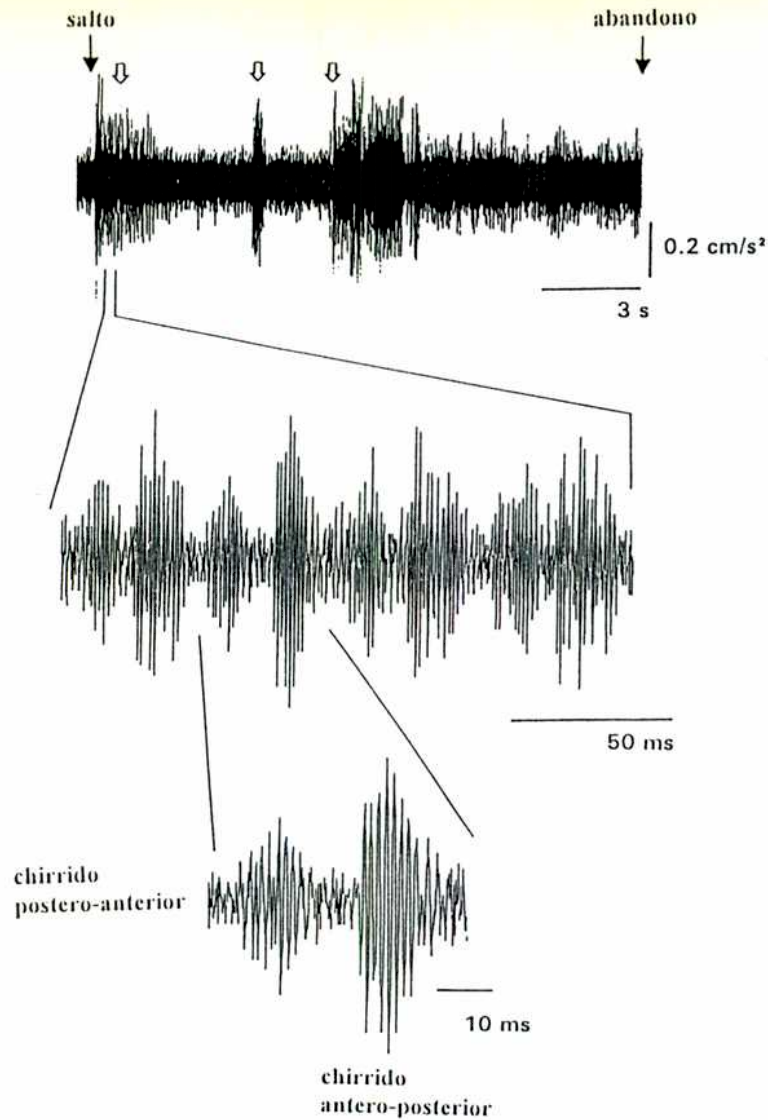


Figura 14: Producción de estridulaciones de rechazo por una hembra en función del tiempo, registradas como aceleración del sustrato. La barra de calibración (aceleración en cm/s^2) es válida para los tres intervalos de tiempo. Las flechas negras indican el salto del macho sobre la hembra y su posterior retiro. Las flechas blancas indican intentos de cópula del macho previos al retiro del mismo. Las señales fueron filtradas entre 400 y 5000 Hz.

Debido al método de registro, las estridulaciones por perturbación fueron ampliamente más intensas que las estridulaciones de rechazo, debido a que fueron directamente transmitidas al acelerómetro a través de la cutícula dorsal de la hembra sujeta con pinzas. La figura 15 presenta una serie repetitiva de sílabas, con un decaimiento característico de la intensidad con el transcurso del tiempo (Fig. 15 arriba). Al igual que en las estridulaciones de rechazo, el análisis de las videofilmaciones reveló que tanto el movimiento de la proboscis postero-anterior como el antero-posterior produjeron un chirrido. La duración media de la sílaba fue significativamente mayor que aquella de las estridulaciones de rechazo (Tabla 1, comparaciones entre la duración del chirrido, notar también la diferente longitud de las barras de tiempo en las figuras 14 y 15). Tanto el chirrido postero-anterior como el antero-posterior de las estridulaciones por perturbación también difirieron en la duración, siendo el chirrido postero-anterior considerablemente más corto (muestra pareada de t , $t = 25,9$, $P < 0,001$, ver Tabla 1), y aproximadamente 30% menos intenso (aceleración media = $1,0 \text{ cm/s}^2$ pico - pico) que el chirrido antero-posterior (aceleración media = $3,2 \text{ cm/s}^2$). La pausa entre chirridos así como también el intervalo inter-sílabas fueron significativamente más largos que aquellos de las estridulaciones de rechazo (Tabla 1), de manera que las estridulaciones por perturbación fueron repetidas a una tasa menor que la de estridulaciones de rechazo, promediando 8,1 sílabas por segundo (intervalo 6-10 sílabas/s, $n = 4$ secuencias estridulatorias, Tabla 1).

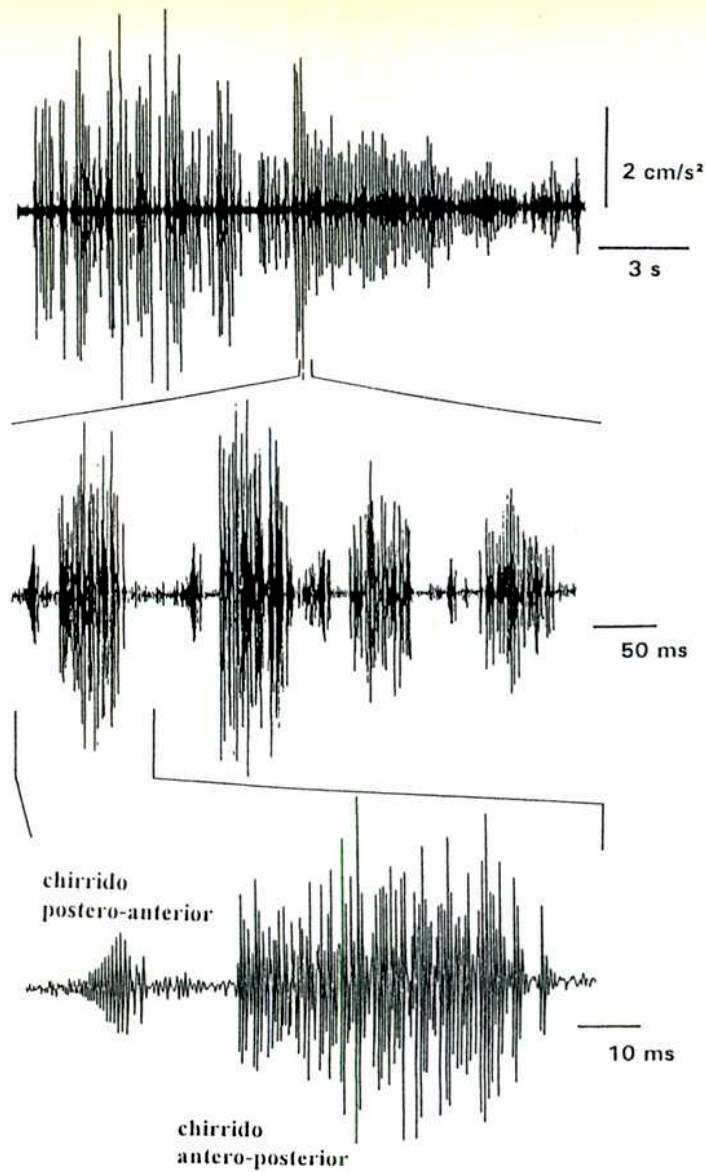


Figura 15: Producción de estridulaciones por perturbación por una hembra sujeta con pinzas en función del tiempo, registradas directamente por la cutícula dorsal como aceleración del sustrato. La barra de calibración (aceleración en cm/s^2) es válida para los tres intervalos de tiempo. Las señales fueron filtradas entre 400 y 5000 Hz.

Tabla 1

Parámetros temporales de estridulaciones de rechazo y por perturbación cuantificados en la hembra de *T. infestans* (media \pm D. E.). N = 34 sílabas por intervalo temporal de medida. La tasa media de repetición está basada en 12 secuencias estridulatorias para las estridulaciones de rechazo, y en 4 secuencias para las estridulaciones por perturbación.

		Estridulaciones de rechazo	Estridulaciones por perturbación	<i>p</i>
Duración del chirrido (ms)	Chirrido postero-anterior	10,6 \pm 6,4	25,1 \pm 8,2	<0,001
	Chirrido antero-posterior	14,5 \pm 4,5	54,33 \pm 10,6	<0,001
		<i>p</i> < 0,005	<i>p</i> < 0,001	
Intervalo entre chirridos (ms)		9,0 \pm 3,6	11,1 \pm 4,6	<0,01
Intervalo entre sílabas (ms)		7,46 \pm 4,5	22,46 \pm 9,5	<0,001
Tasa de repetición (sílabas/s)		23,8 \pm 4,5	8,1 \pm 1,7	<0,001

En la figura 16 se presentan los espectros de las estridulaciones de rechazo y de las estridulaciones por perturbación. En las estridulaciones de rechazo, la mayor energía vibratoria se encontró en el intervalo de frecuencias de 700-800 Hz (arriba). Contrariamente, la energía vibratoria de las estridulaciones por perturbación se concentró en el intervalo de 1200-1700 Hz, y fue aproximadamente similar en las registradas ya sea en forma directa o vía las patas de la hembra (centro y abajo).

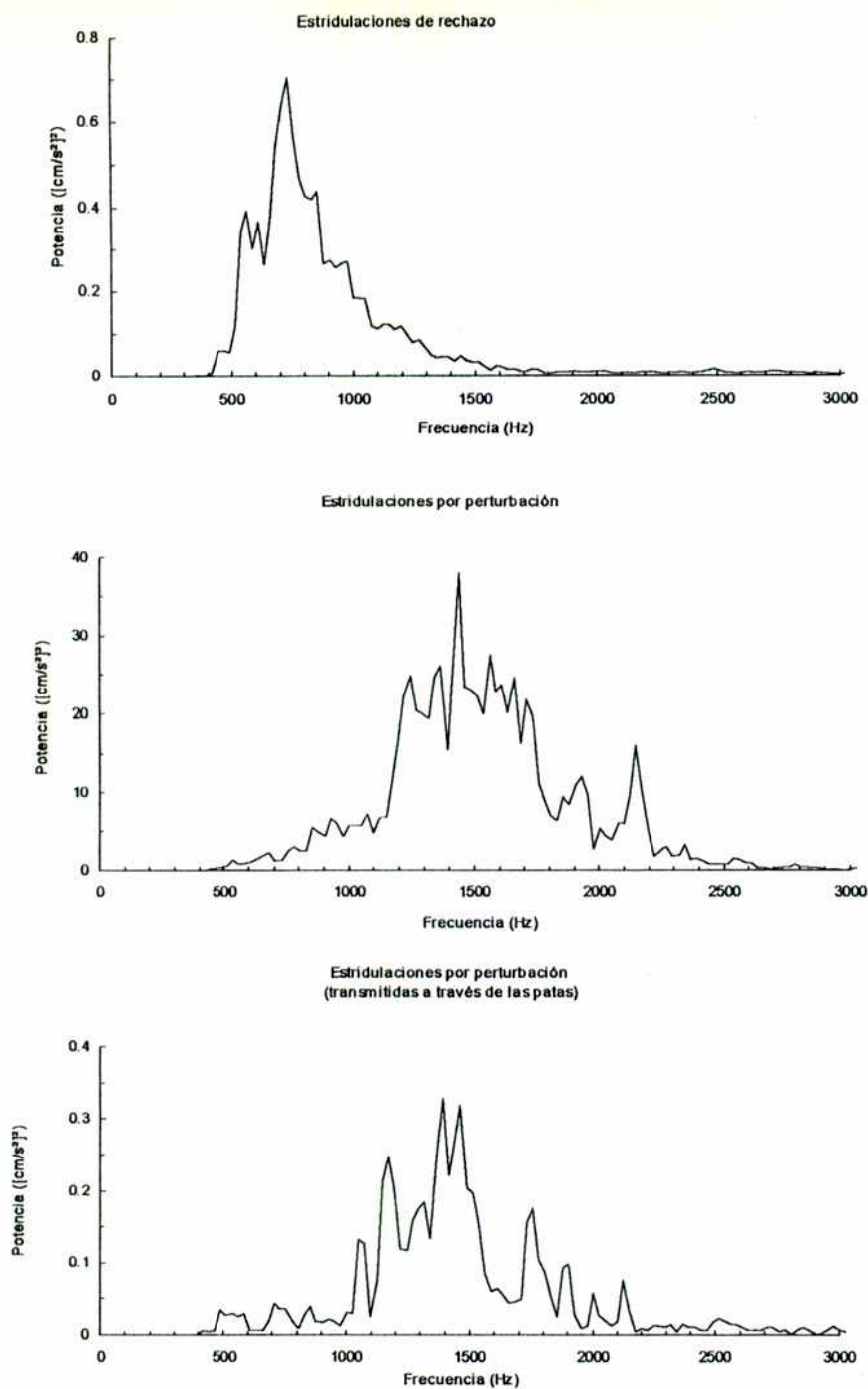


Figura 16: Espectro de potencia de las estridulaciones de rechazo (arriba), y de las estridulaciones por perturbación, registradas directamente de la cutícula dorsal de la hembra (centro), o cuando la hembra está en contacto con el acelerómetro solo con las patas (abajo). Ocho registros independientes fueron promediados para las estridulaciones de rechazo, tres para los registros a través de la cutícula dorsal para las estridulaciones por perturbación y uno para aquellos transmitidos a través de las patas. Las señales fueron amplificadas 10^4 veces, y filtradas entre 400 y 5000 Hz.

¿Producen las vinchucas señales con diferente frecuencia principal portadora por frotar distintas regiones del órgano prosternal a una velocidad similar? ¿O frotan la proboscis a diferentes velocidades en una dada región del surco?. Con el fin de decidir por una de estas dos alternativas, el número total de crestas existentes en el surco y la distancia entre crestas fueron medidas a lo largo de todo el surco en hembras de *T. infestans* con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido (ver Fig. 13). Dado que el número de pulsos en un chirrido es el resultado del número de crestas golpeadas causado por cada movimiento de la proboscis, puede decidirse si diferentes regiones del surco podrían ser responsables de las diferencias observadas entre los espectros de las estridulaciones de rechazo y por perturbación.

De un total de $153 \pm 13,5$ crestas existentes en el surco de hembras adultas (media \pm d. e., $n = 3$, Di Luciano (1981) informó un valor medio de 167,8 crestas) aproximadamente 80-100 crestas fueron frotadas durante las estridulaciones por perturbación (chirrido antero-posterior, Fig. 15 abajo), mientras que solo 8-10 crestas lo fueron durante las estridulaciones de rechazo (para chirridos postero-anterior y antero-posterior, Fig. 14 abajo). Las distancias entre crestas a lo largo del surco de hembras de *T. infestans* se presentan en la Tabla 2. Las crestas se encuentran notablemente agrupadas solo en el extremo anterior del surco como ha sido previamente comunicado (Schofield, 1977 y Moore, 1961), y esta región abarca aproximadamente el 20% del número total de crestas, *i.e.*, aproximadamente 30 crestas (notar el intervalo de las distancias entre crestas en la Tabla 2, y la dispersión de los valores en el quinto anterior del surco). Sin embargo, la mayoría de las crestas están separadas por aproximadamente 6-8 mm, y con poca variabilidad. Como resultado de lo antedicho, es poco probable que la región anterior del surco sea particularmente frotada para producir estridulaciones de alta frecuencia como las causadas por perturbación.

Tabla 2

Distancias medias (\pm d. e.) entre las crestas del órgano estridulatorio ubicado en el prosterno de hembras de *T. infestans*. Con el fin de buscar variaciones en la densidad de crestas, cinco áreas con igual número de crestas (aproximadamente 30 crestas) fueron arbitrariamente definidas a lo largo del surco, y 10 distancias fueron medidas al azar por cada quinto de surco. Se obtuvieron datos de 3 hembras.

	Distancia intercresta (μm)	Intervalo (μm)	n
quinto anterior del surco	4,0 \pm 1,1	3,1 - 6,2	50
segundo quinto del surco	6,4 \pm 0,2	6,1 - 6,9	50
tercer quinto del surco	7,0 \pm 0,3	6,8 - 7,3	50
cuarto quinto del surco	7,3 \pm 0,2	7,0 - 7,5	50
quinto posterior del surco	7,9 \pm 0,2	7,4 - 8,1	50

Discusión

Aunque la producción de vibraciones por medio de estridulación en los triatomíneos es conocida desde hace mucho tiempo (Readio, 1927), los registros previos a este trabajo fueron obtenidos como sonidos transportados a través del aire. Por otra parte, hasta el presente se ha trabajado con vinchucas sujetadas con pinzas, de tal manera que no se habían realizado mediciones de ocurrencia espontánea de estridulación (Moore, 1961 y Schofield, 1977). El nuestro es el primer estudio donde la estridulación en vinchucas ha sido registrada en condiciones no restringidas en el contexto de comportamiento sexual, y además como vibraciones transportadas a través del sustrato. Por otra parte, los registros de estridulación de vinchucas sujetadas con pinzas nos permitió caracterizar y comparar ambos tipos de señales.

En el contexto de comportamiento sexual, la hembra no receptiva de *T. infestans* estriduló espontáneamente estando en contacto físico directo con un macho que intentaba llevar a cabo la cópula. Estas señales vibratorias, consistentes en sílabas compuestas por un chirrido correspondiente al movimiento postero-anterior del rostro y otro asociado al desplazamiento antero-posterior, fueron efectivas en rechazar al macho. Por otro lado, en el contexto de perturbación la hembra estriduló cuando se la sujetó, pero estas estridulaciones difirieron con las de rechazo en la duración de la sílaba, la tasa de repetición, así como también en su frecuencia portadora principal.

El patrón temporal registrado se ajusta bien dentro de la caracterización de las estridulaciones por perturbación realizada por Masters (1980). Estas estridulaciones fueron consideradas como respuestas defensivas de los insectos frente a ataques de depredadores, y existe evidencia comportamental que indica que realmente rechazan a sus depredadores. Un ejemplo de ello son los escarabajos estriduladores que son liberados más frecuentemente por la

lavandera común que los individuos conespecíficos artificialmente silenciados (Bauer, 1976), o las arañas depredadoras que son menos persistentes en sus ataques sobre un insecto que estridula comparado con uno que no lo hace (Masters, 1979).

La estructura de la onda de las estridulaciones por perturbación en un número de especies de insectos contiene un máximo de energía a una frecuencia determinada por la tasa de impacto de las crestas, usualmente de 1000 Hz. Se ha especulado que estas características comunes permitirían a los depredadores a tratar de la misma forma, a los insectos que producen estridulaciones, como una forma de mimetismo acústico (Masters, 1980).

Resulta interesante que la energía máxima de las estridulaciones por perturbación en *T. infestans* fue de 1500 Hz, valor bien lejano al pico de las estridulaciones de rechazo (700-800 Hz). Si bien no todas las crestas disponibles en el surco son contactadas durante la producción de la señal (aproximadamente el 50% son frotadas para producir estridulaciones por perturbación), nuestras mediciones de las distancias entre crestas hacen poco probable que las diferencias en la frecuencia portadora entre las estridulaciones de rechazo y por perturbación sea el resultado del uso de distintas regiones del órgano estridulatorio. En cambio, resulta más probable que las vinchucas froten su proboscis con diferentes velocidades con el fin de producirlas. En este contexto cabe mencionar que debido al método experimental utilizado, las estridulaciones de rechazo han sido registradas a pocos centímetros de la pareja, *i.e.*, las vibraciones tuvieron que ser transmitidas a través de las patas de la hembra sobre el sustrato para alcanzar finalmente el acelerómetro. Por el contrario, las estridulaciones por perturbación fueron transmitidas directamente desde la cutícula dorsal que vibraba hacia el acelerómetro. Se puede hipotetizar *a priori* que las diferencias entre los espectros de las estridulaciones de rechazo y por perturbación pueden ser explicadas

considerando que las patas actúan como un filtro pasabajos, filtrando los componentes de alta frecuencia de la señal. Sin embargo, el registro control de las estridulaciones por perturbación en donde solo las patas de la hembra sujeta contactaban el acelerómetro, desechó esta posibilidad (Fig. 16).

En un estudio reciente, han sido registradas estridulaciones espontáneas durante el corte de hojas, en la hormiga cortadora *Atta cephalotes* (Roces *et al.*, 1993). Estas mediciones permitieron realizar comparaciones entre *stress* o estridulaciones por perturbación producidas por *A. cephalotes* obreras siempre que eran prevenidas de moverse libremente, por ejemplo cuando eran enterradas debido a un derrumbe del nido (Markl, 1968). Respecto a la tasa de repetición de la señal, esta comparación resulta paralela a la presente en *T. infestans*: mientras las estridulaciones por perturbación fueron repetidas a una tasa baja (media = 7 sílabas por segundo, Markl, 1968), las estridulaciones durante el corte de hojas ocurrió a una tasa mayor, en un intervalo de 2 a 20 sílabas por segundo, y fueron producidas durante los movimientos mandibulares (Tautz *et al.*, 1995). Sin embargo, contrastando con *T. infestans*, ambos tipos de vibraciones estridulatorias en hormigas cortadoras de hojas no difieren en sus espectros, estando concentrada su máxima energía en un intervalo de 1000-1500 Hz.

Al igual que miembros de Coleoptera y Diptera, las chinches hemípteras no poseen órgano subgenual verdadero (Debaisieux 1935, 1938), aunque la scoloparia distal de la tibia así como también la sensilia campaniforme parecieran participar en la percepción de vibraciones transportadas a través del sustrato. Es una pregunta abierta si las estridulaciones de rechazo deben ser percibidas como estridulaciones de contacto para ser efectivas, o si las señales que migran a través del sustrato pueden también ser recibidas por receptores de vibración. La pregunta es relevante, ya que otros machos presentes en los alrededores podrían también estar informados de la presencia de una hembra

no receptiva, mediante la percepción de estridulaciones transportadas a través del sustrato. Nosotros consideramos que la amplitud de la aceleración medida en hembras sujetadas se corresponde con la percibida por el macho montado, dado que el contacto cercano asegura una transmisión no atenuada. Este valor, aproximadamente $3,2 \text{ cm/s}^2$ para el chirrido antero-posterior, está comprendido dentro del intervalo de sensibilidad medido en hormigas que estridulan (*A. cephalotes*: $2,5 \text{ cm/s}^2$, Markl, 1970). Sin embargo, es aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que el umbral de percepción medido para los receptores de las patas de *R. prolixus*, especie cercana a *T. infestans* que también estridula (umbral = 411 cm/s^2 para 400 Hz: Autrum & Schneider, 1948). Las señales de rechazo registradas a pocos centímetros de la vinchuca que estridula fueron en este estudio aproximadamente un orden de magnitud menos intensas que las estridulaciones de contacto, atenuadas con un coeficiente de amortiguación de aproximadamente 15 dB/cm. Como resultado de esto, aún si se asume una alta sensibilidad a vibraciones, similar a la que ocurre en las hormigas, para *T. infestans*, estas vibraciones transportadas a través del sustrato podrían estar fuera del intervalo de sensibilidad de los receptores, y podrían ser irrelevantes para machos vecinos. Desafortunadamente, no existen estudios sobre sensibilidad a vibraciones transmitidas a través del sustrato en *T. infestans*. Con respecto a la sensibilidad a distintas frecuencias, el mínimo de la curva umbral de *R. prolixus* se situó alrededor de 400 Hz, y no se obtuvo respuesta eléctrica para frecuencias mayores (Autrum & Schneider, 1948). En la chinche *Nezara viridula* (Pentatomidae), las respuestas electrofisiológicas de los receptores tibiales de vibraciones transmitidas a través del sustrato frente a su "canto de llamada", mostraron una máxima sensibilidad en el intervalo de 750-1000 Hz, en una neurona de alta frecuencia y en otros dos tipos de neurona que responden a frecuencias aún menores (Cokl, 1983).

Basándonos en la información disponible, se puede especular que las estridulaciones de rechazo de baja frecuencia podrían corresponderse con el intervalo de sensibilidad de los receptores de *T. infestans*. Por su parte, las estridulaciones por perturbación, de alta frecuencia, con valores lejanos al intervalo de máxima sensibilidad a vibraciones, podría corresponderse con el rechazo de depredadores y no jugarían ningún papel en la comunicación intraespecífica. Futuros estudios comportamentales, así como también electrofisiológicos ayudaran a comprender el significado de la vibraciones producidas por estridulación como señales de comunicación en Triatominae, y clarificar la aparente discrepancia entre la amplitud de las señales medidas en *T. infestans* y el umbral de sensibilidad observado en *R. prolixus*.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

El estudio del comportamiento sexual de las vinchucas, en particular, de la comunicación entre los sexos, es un tema que, a pesar de su relevancia para la elaboración de estrategias de control de los vectores del Mal de Chagas, no ha recibido la suficiente atención. En esta tesis se intentó indagar en los aspectos básicos relacionados con la comunicación intraespecífica en el contexto sexual de *T. infestans*. Como resultado, han podido extraerse las conclusiones que se exponen a continuación.

Comportamiento de apareamiento

Salvo la existencia de algunas diferencias menores, el análisis detallado del comportamiento de apareamiento de *T. infestans* mostró que el mismo sigue el modelo general descrito para otros Triatominae. Por otra parte, se presentó evidencia sobre el papel de la hembra como condicionante de la ocurrencia de la cópula, pudiéndose distinguir diferentes tipos de comportamiento de rechazo realizados por la misma. De esta manera se pudo concluir que la receptividad de la hembra es al menos un factor de importancia que afecta el éxito de la cópula en *T. infestans* (Capítulo 2).

Comportamiento sexual y comunicación química intraespecífica

Se han brindado evidencias de la existencia de comunicación química intraespecífica en el contexto sexual en *T. infestans*. Se presentaron evidencias comportamentales y electrofisiológicas que apoyan la hipótesis acerca de la

existencia de una señal química sexual producida durante la cópula, que promueve la agregación de machos en torno a una pareja en cópula. Sin embargo, para convalidar esta hipótesis restaría aún reconocer la fuente emisora de la señal (sexo, glándula), su eventual aislamiento, identificación de las fracciones activas y posterior puesta a prueba de la misma en bioensayos de laboratorio y campo. Por otra parte, si bien es necesario profundizar la investigación ya iniciada, cuando se analizaron las respuestas de orientación de los machos que se agregan, *i.e.*, el mecanismo de orientación, los resultados aquí presentados indicarían que la orientación de los machos hacia la pareja ocurre por un gradiente químico y no a través de una respuesta anemotáctica (Capítulos 3, 4 y 5).

Comportamiento sexual y comunicación vibratoria

El presente, constituye el primer estudio en donde se ha puesto de manifiesto la utilización de la clave vibratoria en la comunicación intraespecífica de *T. infestans*. La estridulación en las vinchucas ha sido registrada en condiciones no restringidas, *i.e.*, ocurriendo en forma espontánea, en el contexto específico de comportamiento sexual, y además como vibraciones transportadas a través del sustrato.

Las señales vibratorias producidas por la hembra no receptiva fueron altamente efectivas en rechazar al macho. Por otra parte, en el contexto de perturbación (condiciones restringidas) la hembra estriduló cuando fue sujeta. Sin embargo, estas estridulaciones realizadas en un contexto defensivo difirieron con las de rechazo en la duración de la sílaba, la tasa de repetición, y en su frecuencia portadora principal. Se pudo concluir entonces que en el caso de las estridulaciones de rechazo, el canal vibratorio es utilizado para la comunicación intraespecífica. Por su parte, el significado biológico de

las estridulaciones por perturbación estaría relacionado con el rechazo de depredadores (Capítulo 6).

Transferencia de los resultados y su posible aplicación

La comprensión de las señales de comunicación intraespecífica en *T. infestans*, además de arrojar luz sobre el conocimiento de su biología básica, podría proveer, en forma complementaria, información útil para el desarrollo de estrategias de control de esta especie, especialmente en lo concerniente a la comunicación química.

El adecuado aislamiento y caracterización de el/los componente/s activo/s de la señal química sexual sería de suma importancia para su eventual utilización en la interferencia de la comunicación entre los sexos en poblaciones naturales de vectores de la enfermedad de Chagas. Estos podrían tanto ser empleados como cebos en trampas que podrían capturar a los machos sexualmente maduros, limitándose así la reproducción, como ser utilizados para interferir en la comunicación entre individuos en poblaciones naturales, e.g., saturando el ambiente con los mismos. Por otra parte, la detección de la presencia en el ambiente de la señal química, tal como se hace mediante electroantenogramas de campo con varios Lepidoptera, podría ser utilizada como elemento para detectar la presencia de adultos en estado reproductivo.

Manrique

CAPITULO 8**BIBLIOGRAFÍA**

- Aicher, B.; Markl, H.; Masters, W.M. & Kirschenlohr, H.L. (1983) (*citado por Markl, 1983*). Vibration transmission through the walking legs of the fiddler crab, *Uca pugilator* (Brachyura, Ocypodidae) as measured by Laser Doppler Vibrometry. *J. Comp. Physiol.*, **150**: 483-491.
- Autrum, H. & Schneider, W. (1948). Vergleichende Untersuchungen über den Erschütterungssinn der Insekten. *Z. vergl. Physiol.*, **31**: 77-88.
- Baldwin, W.F.; Knight, A.G. & Lynn, K.R. (1971). A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Entomol.*, **103**: 18-22.
- Bauer, T. (1976). Experimente zur Frage der biologischen Bedeutung des Stridulationsverhalten von Kfern. *Z. Tierpsychol.*, **42**: 57-65.
- Borden, J.H. (1985). Aggregation pheromones. En: Kerkut G.A. & Gilbert L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. IX, pp. 257-285.
- Brownell, P. & Farley, R.D. (1979) (*citado por Markl, 1983*). Orientation to vibrations in sand by the nocturnal scorpion *Pauroctonus mesaensis*: mechanism of target localization. *J. Comp. Physiol.*, **131**: 31-38.

- Butenandt, A.; Beckmann, R.; Stamm, D. & Hecker, E. (1959). Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforsch.*, **14b**: 283-284.
- Chapman, R.F. (1982). *The insects. Structure and function*. Chapman R.F. (ed.), London, pp. + 919.
- Chiang, R.G.; Chiang, J.A. & Davey, K.G. (1992). A sensory input inhibiting heart rate in an insect, *Rhodnius prolixus*. *Experientia*, **48**: 1122-1124.
- Cokl, A. (1983). Functional properties of vibroreceptors in the legs of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). *J. Comp. Physiol.*, **150**: 261-269.
- Cruz López, L.; Malo, E.A. & Rojas, J.C. (1993). Aggregation pheromone in five species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **88**: 535-539.
- Debaisieux, P. (1935). Organes Scolopidiaux des Pattes D'Insectes. I. Lepidopeteres et Trichopteres. *La Cellule*, **44**: 271-314.
- Debaisieux, P. (1938). Organes Scolopidiaux des Pattes D'Insectes II. *La Cellule*, **47**: 77-202.
- Dicke, M. & Sabelis, M.W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional Ecology*, **2**: 131-139.

- Di Luciano, V.S. (1981). Morphology of the stridulatory groove of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, **18**: 24-32.
- Dreller, C. & Kirchner, W. H. (1995). The sense of hearing in honey bees. *Bee World*, **76**: 6-17.
- Dusenbery, D.B. (1992). *Sensory ecology: how organisms acquire and respond to information*. Freeman W.H. (ed.), New York, USA, pp. + 558.
- Farbman, A.I. (1994). The cellular basis of olfaction. *Endeavour*, **18**: 2-8.
- Flores, G.B. & Lazzari, C.R. (1996). The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation toward thermal sources. *J. Insect Physiol.*, **42**: 433-440.
- Frisch, K.von (1967). *The dance language and orientation of bees*. Oxford University Press, London.
- Games, D.E.; Schofield, C.J. & Staddon, B.W. (1974). The secretion from Brindley's scent gland in Triatominae. *Ann. ent. Soc. Am.*, **67**: 820.
- Gilbert, L.E. (1976) (citado por Thornhill & Alcock, 1983). Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male contributed antiaphrodisiac? *Science*, **193**: 419-420.

- Gogala, M. (1984). Vibration producing structures and songs of terrestrial Heteroptera as systematic character. *Biol. Vestn.*, **32**: 19-36.
- Gogala, M. (1985). Vibrational songs of land bugs and their production. En: Kälring & Elsner (eds) *Acoustic and vibrational communication in insects*, Paul Parey, Berlin, pp. 143-150.
- Gogala, M & Cokl, A 1983. The acoustic behaviour of the bug *Phymata crassipes* (F.) (Heteroptera). *Rev. Can. Biol. Exptl.*, **42**: 249-256.
- Gogala, M.; Cokl, A.; Draslar, K. & Blazevic, A. (1974). Substrate-borne sound communication in Cydnidae (Heteroptera). *J. Comp. Physiol.*, **94**: 25-31.
- Gogala, M. & Hocevar, I. (1990). Vibrational songs in three sympatric species of Tritomegas. *Scopolia*, **Suppl 1**: 117-123.
- Hase, A. (1933). Über die Lauterzeugung sowie deren mutmassliche Bedeutung bei der Wanze *Panstrongylus*. *Biol. Zbl.*, **53**: 607-614.
- Hawkins, A.D. & Myrberg, A.A. (1983). Hearing and sound communication under water. En: Lewis B. (ed.) *Bioacustics*, Academic Press, New York, pp. 347-405.
- Horn, E. (1985). Multimodal convergences. En: Kerkut G.A. & Gilbert L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. VI, pp. 653-669.

- Huber, F. (1983). Neural correlates of orthopteran and cicada phonotaxis. En: Huber F. & Markl H. (eds.) *Neuroethology and Behavioral Physiology*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 108-135.
- Insausti, T.C. (1994). Nervous system of *Triatoma infestans*. *J. Morphol.*, **221**: 343-359.
- Insausti, T.C. & Lazzari, C.R. (1996). Central projections of first-order ocellar interneurons in the bug *Triatoma infestans*. *J. Morphol.*, **229**: 161-170.
- Kaissling, K.E. (1987). *R.H. Wright lectures on Insect Olfaction*. Colbow K. (ed), Simon Fraser University, Burnaby, B.C., Canada, pp. + 75.
- Kaissling, K.E. (1994). Transduction in olfactory and gustatory receptors. *Proc. 22nd Göttingen Neurobiology Conf.* En Elsner N & Breer H. (eds.), G. Thieme Verl. Stuttgart, New York, pp. 242-247.
- Kälring, K. & Küne, R. (1980) (*citado por Markl, 1983*). The coding of airborne-sound and vibration signals in bimodal ventral-cord neurons of the grasshopper *Tettigonia cantans*. *J. Comp. Physiol.*, **139**: 267-275.
- Karlson, P. & Luscher, M. (1959). 'Pheromones" a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, **183**: 155-156.
- Kennedy, J.S. (1977). Olfactory responses to distant plants and odor odour sources. En: Shorey & Mc Kelvey (eds.) *Chemical control of Insect Behaviour*, Wiley, pp. 67-91.

- Lazzari, C.R. (1992). Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.*, **38**: 895-903.
- Lazzari, C.R. & Núñez, J.A. (1989). The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.*, **35**: 525- 529.
- Lazzari, C.R. & Varjú, D. (1990). Visual lateral fixation and tracking in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Comp. Physiol. A*, **167**: 527-531.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Reduviidae, Hem.) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, **163**.
- Leston, D. (1957) (*citado por Schofield., 1977*). The stridulatory mechanisms in terrestrial species of Hemiptera. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, **128**: 369-386.
- Leston, D. & Pringle, J.W.S. (1963). Acoustical behaviour of Hemiptera. En: Busnel R. (ed.) *Acoustical Behaviour of Animals*, Elsevier, pp. 391-411.
- Lima, M.M.; Jurberg, P. & Ribeiro De Almeida, J. (1986a). Behaviour of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. I Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) in the laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**: 1-5.

- Lima, M.M.; Jurberg, P. & Ribeiro De Almeida, J. (1986b). Behaviour of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. II. Influence of feeding, lighting and time of day on the number of matings, mating speed and duration of copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**: 381-388.
- Lima, M.M.; Jurberg, P. & Ribeiro De Almeida, J. (1987a). Behaviour of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. III. Influence of the number of matings on the fecundity and fertility of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) in the laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**: 37-41.
- Lima, M.M.; Jurberg, P. & Ribeiro De Almeida, J. (1987b). Behaviour of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. IV. Fecundity, fertility and longevity of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) pairs and virgin females starved under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**: 501-509.
- Lorenzo, M.G. & Lazzari, C.R. (1993). Dynamics of the use of refuges by *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **88(Supl.)**: 265.
- Lorenzo, M.G. & Lazzari, C.R. (1996). The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J. Insect Physiol.*, **42**: 903-907.

- Lorenzo Figueiras, A.N.; Kenigsten, A. & Lazzari, C.R. (1994). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *J. Insect Physiol.*, **40**: 311-316.
- Malo, E.A.; Ramírez-Rovelo, A.; Cruz-López, L. & Rojas, J.C. (1993). Life cycle and influence of age and feeding on the first mating of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, **88**: 203-206.
- Markl, H. (1968). Die Verständigung durch Stridulationssignale bei Blattschneiderameisen. II. Erzeugung und Eigenschaften der Signale. *Z. vergl. Physiol.*, **60**: 103-150.
- Markl, H. (1970). Die Verständigung durch Stridulationssignale bei Blattschneiderameisen. III. Die Empfindlichkeit für Substratvibrationen. *Z. vergl. Physiol.*, **69**: 6-37.
- Markl, H. (1973). Leistungen des Vibrationssinnes bei wirbellosen Tieren. *Fortschr. Zool.*, **21**: 100-120.
- Markl, H. 1983. Vibrational communication. En: Huber F. & Markl H. (eds.) *Neuroethology and Behavioral Physiology*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 332-353.
- Markl, H. & Hölldobler, B. (1978) (citado por Markl, 1983). Recruitment and food-retrieving behaviour in *Novomessor* (Formicidae, Hymenoptera). II. Vibration signals. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **4**: 183-216.

- Markl, H.; Hölldobler, B. & Hölldobler, T. (1977). Mating behavior and sound production in harvester ants (*Pogonomyrmex*, Formicidae). *Ins. Soc.*, **24**: 191-212.
- Masters, W.M. (1979). Insect disturbance stridulation: its defensive role. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **5**: 187-200.
- Masters, W.M. (1980). Insect disturbance stridulation: Characterization of airborne and vibrational components of the sound. *J. Comp. Physiol.*, **135**: 259-268.
- Michelsen, A. (1983). Biophysical basis of sound communication. En Lewis B. (ed.) *Bioacoustics, a comparative approach*, Academic Press, London, pp. 3-38.
- Michelsen, A.; Fink, F.; Gogala, M. & Traue, D. (1982). Plants as transmission channels for insect vibrational songs. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **11**: 269-281.
- Moore, T.E. (1961). Audiospectrographic analysis of sounds of Hemiptera and Homoptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **54**: 273-291.
- Neves, D.P. & Paulini, E. (1981). Atração sexual em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) por feromônio. *Rev. bras. Ent.*, **25**: 301-306.

- Núñez, J.A. (1987). Behaviour of Triatominae bugs. En Brenner R.R. & Stoka A.M. (eds.) *Chagas' Disease Vectors*, CRC Press, Florida, vol II, pp. 1-28.
- Núñez, J.A. & Lazzari, C.R. (1990). Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Het., Reduviidae) in the absence of a live host. I. Some factors affecting the artificial feeding. *J. Appl. Entomol.*, **109**: 87-92.
- Núñez, J.A. & Segura, E.L. (1987). Rearing of Triatominae. En: Brenner & Stoka (eds.) *Chagas' Disease Vectors*, CRC Press, Florida, vol II, pp. 29-40.
- Ondarza, R.N.; Gutierrez-Martinez, A. & Malo, E.A. (1986). Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Econom. Entomol.*, **79**: 688-692.
- Ondarza, R.N.; Gutierrez-Martinez, A.; Malo, E.A. & Rojas, J.C. (1987). Actividad afrodisíaca de la feromona sexual de *Triatoma mazzottii* Usinger. *Southwest Entomol.*, **12**: 327-333.
- Otte, D. (1974). Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **5**: 385-417.
- Priesner, E. (1973) (citado por Schneider, 1984). Artspezifität und funktion einiger insekten pheromone. *Fortschr. Zool.*, **22**: 49-135.
- Radio, P.A. (1927). Studies on the biology of the Reduviidae of America north of Mexico. *Kans. Univ. Sci. Bull.*, **17**: 5-291.

- Regis, L.; De M Gomes, Y. & Furtado, A.F. (1985). Factors influencing male accessory gland activity and first mating in *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect. Sci. Applic.*, **6**: 579-583.
- Reisenman, C.E. & Lazzari, C.R. (1996). The phototactic response of *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **91(Supl.)**: 138.
- Renwick, J.A.A. & Vité, J.P. (1970) (citado por Shorey, 1973). Systems of chemical communication in *Dendroctonus*. *Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant Res.*, **24**: 283-292.
- Roces, F.; Tautz, J. & Hölldobler, B. (1993). Stridulation in leaf-cutting ants: short-range recruitment through plant-borne vibrations. *Naturwiss.*, **80**: 521-524.
- Rojas, J.C. & Cruz-Lopez, L. (1992). Sexual behaviour in two species of *Triatoma phyllosoma* Complex (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *J. Med. Entomol.*, **29**: 13-18.
- Rojas, J.C.; Malo, E.A.; Gutierrez-Martinez, A. & Ondarza, R.A. (1990). Mating behaviour of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **83**: 598-602.

- Rojas, J.C.; Ramirez-Rovelo, A. & Cruz-López, L. (1991). Search for a sex pheromone in *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, **28**: 469-470.
- Rossiter, M. & Staddon, B.W. (1983). 3-Methyl-2hexanone from the triatominae bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera; Reduviidae). *Experientia*, **39**: 380-381.
- Salomón, O.D. (1988). Vitelogenesis en Triatominos vectores de la enfermedad de Chagas. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, pp. 1-294.
- Schneider, D. (1984). Pheromones and insect reproduction. En: Engels W. *et al.* (eds.) *Advances in invertebrate reproduction* 3, pp. 435-439.
- Schnorbus, H. (1971) (*citado por Markl, H., 1983*). Die subgenualen Sinnesorgane von *Periplaneta americana*: Histologie und Vibrationsschwellen. *Z. vergl. Physiol.*, **71**: 14-48.
- Schofield, C.J. (1977). Sound production in some triatomine bugs. *Physiological Entomology*, **2**: 43-52.
- Schofield, C.J. (1979). The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bull. Entomol. Res.*, **69**: 363-379.
- Schofield, C.J. & Moreman, K. (1976). Apparent absence of a sex attractant in adult *Triatoma infestans* (Klug), vector of Chagas' Disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **70**: 165-166.

- Schofield, C.J. & Patterson, J.W. (1977). Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, **13**: 727-734.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949) (citado por Dusenbery, 1992). *The mathematical theory of communication*. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Shorey, H.H. (1973). Behavioral responses to insect pheromones. *Ann. Rev. Entomol.*, **18**: 349-380.
- Shorey, H.H. (1976) (citado por Schneider, 1984). *Animal communication by pheromones*. Academic Press, New York, London.
- Tamaki, Y. (1985). Sex pheromones. En: Kerkut G.A. & Gilbert L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. IX, pp. 145-191.
- Tautz, J.; Roces, F. & Hölldobler, B. (1995). Use of a sound-based vibratome by leaf-cutting ants. *Science*, **267**: 84-87.
- Thornhill, R. & Alcock, J. (1983). *The evolution of insect mating systems*. Harvard University Press, Cambridge, USA, pp. + 547.
- Velázquez Antich, A. (1968). Atracción por olor en ninfas e adultos de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Inst. Med. Trop. y Parasitol.*, **10**: 242-246.

- Ward, J.P. (1981). A comparison of the behavioural responses of the hematophagous bug, *Triatoma infestans* to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n- and isobutyric acid). *Physiol. Ent.*, **6**: 325-329.
- Wiener, N. (1948) (*citado por Dusenbery, 1992*). *Cybernetics*. Wiley, New York..
- Wiley, R.H. & Richards, D.G. (1978) (*citado por Dusenbery, 1992*). Physical constraints on the acoustic communication in the atmosphere: implications for the evolution of animal vocalizations. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **3**: 69-94.
- Wilson, E.O. (1975). *Sociobiology: the new synthesis*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass., USA, pp. + 366.
- Wood, D.L. (1982) (*citado por Schneider, 1984*). The role of pheromones, kairomones and allomones in host selection and colonization behaviour of bark beetles. *Ann. Rev. Entomol.*, **27**: 411-446.
- Yeargan, K.V. (1994). Biology of bolas spiders. *Annu. Rev. Entomol.*, **39**: 81-99.
- Zeledón, R. & Rabinovich, J.E. (1981). Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *A. Rev. Ent.*, **26**: 101-133.

Zeledón, R.; Valerio, C.E. & Valerio, J.E. (1973). The camouflage phenomenon in several species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, **10**: 209-211.