

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

**"ESTRATEGIAS DE FORRAJEО DEL
PARASITOIDE *DIACHASMIMORPHA
LONGICAUDA* (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) CRIADO SOBRE UNA LÍNEA
SEXANTE DE *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA:
TEPHRITIDAE)"**

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

**Autor: Diego Fernando Segura
Director de Tesis: Jorge Luis Cladera
Director Asistente: Juan Carlos Corley**

**Laboratorio de Insectos. Instituto de Genética 'E. A. Favret'
INTA Castelar**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, 2006.

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

**"FORAGING STRATEGY OF THE
PARASITOID *DIACHASMIMORPHA
LONGICAUDA* (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE) REARED ON A SEXING
STRAIN OF *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA:
TEPHRITIDAE)"**

**Thesis presented to obtain the PhD. at
Universidad de Buenos Aires**

**Author: Diego Fernando Segura
Advisor: Jorge Luis Cladera
Co-Advisor: Juan Carlos Corley**

**Laboratorio de Insectos. Instituto de Genética 'E.A. Favret'
INTA Castelar**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, 2006.

A Inés

Agradecimientos

Durante la realización de esta Tesis conté con la ayuda de muchas personas a las cuales deseo hacer llegar mi agradecimiento:

A mi Director, Jorge L. Cladera, con quien trabajo desde mis inicios como estudiante, por brindarme su entero apoyo desde el primer día, por su bondad y capacidad de guía, y por estar siempre dispuesto a abrir nuevas puertas.

A las autoridades de INTA, en particular al Director del Instituto de Genética, el Ing. Alberto Prina, por permitirme realizar mi trabajo en el Laboratorio de Insectos.

A mis Co-Directores, Sergio M. Ovruski (frente a CONICET) y Juan C. Corley (frente a la FCEN, UBA) por seguirme de cerca de pesar de la distancia, y por ayudarme a mejorar los diseños experimentales, y a interpretar y discutir los resultados obtenidos.

A Maria Busch, mi Consejera de Estudios, por avalar los cursos que realicé como parte de mi formación académica de postgrado.

A Mariana M. Viscarret y M. Teresa Vera, por ayudarme desde el inicio a definir el plan de trabajo, y de ahí en más estar siempre dispuestas a darme una mano con los diseños experimentales, con los informes, con la estadística, etc. Y por mostrarme siempre el valor del trabajo.

A Fanny Manso, por abrirme las puertas del laboratorio, por prestarme libros y tesis varias, y por mostrarme que la fecha de nacimiento puede ser sólo un número en el DNI.

A Leonela, por ser la observadora *de auxilio* en los primeros experimentos, y por tantos pequeños y grandes favores, desde preparar el mate diario, hasta ayudarme a lidiar con todo el papelerío relacionado a esta tesis.

A Fernanda y a Fabián, quienes me ayudaron durante los experimentos más que nadie, y a quienes espero poder devolver tantos favores.

A Marcela Castelo, Claudio Lazzari, Javier López de Casenave, Valeria Fernández Arhex, Pablo Montoya, Jorge Cancino, y Daniel Tapia, por los buenos consejos brindados durante las distintas etapas de la tesis.

A Gabriela Grigioni y Fernando Carduza, del Instituto de Tecnología de Alimentos (INTA Castelar), por permitirme usar el Colorímetro.

Al *comuñe*, por los *papers* difíciles y sus dedicatorias personalizadas (demasiado).

A mis compañeros de INTA, Alejandro, Cecilia, Clara, Cynthia, M. Eugenia, Fabián, Francisco, Germán, Hernán, Leonela, Mariana, Marianela, Pamela, Patricia, Romina,

Silvia 1, Silvia 2, y Silvina. Por su compañía diaria, por su buen humor, por los almuerzos grupales, y por que.... ¿quién no me habrá armado un frasco con bichos alguna vez?

A los bibliotecarios del INTA, Estela Favret, Beatriz Quarterolo, Liliana Barchetta, y Daniel Bassi, por todos los trabajos raros y viejos que me han facilitado.

A los alfareros (a todos -por que son muchos- pero en especial a Cristina y a Andrea) y a “los de enfrente” (Gabriela, Lorena, Paula, Sara, Ezequiel, Emiliano, y otros). A todos, por no poner nunca mala cara cuando se acercaba este manguero compañero que les tocó en (buena?) suerte.

A las secretarias del IGEEAF, Edith García, Graciela Moglie, y Mariela Trazar, por estar siempre dispuestas a darme una mano con llamados, faxes, papeles, y demás cosas así de horripilantes.

A toda mi familia, por el apoyo. A mis padres, Mimí y Tito, y a mis hermanos, cuñadas, y sobrinos: Adriana, Andrea, Marcela, María Sol, Felipe, Gabriel, y Pedro. Y a mi nueva familia: Inés, Néstor, Malena y Fernando.

A mis amigos de antes y de después de pasar esta facultad (a quienes no nombro porque sé que jamás mirarán esta tesis).

A Ninita, quien me acompañó fielmente durante la redacción de la Tesis, pidiendo a cambio únicamente agua y alimento balanceado (y algún que otro mimo de a ratos).

A muchos que probablemente esté olvidando.....

Y a Inés, quien estuvo junto a mí desde el inicio. Tenerla en mi vida hace que la inspiración, la motivación, la pasión, y el deseo de superación me acompañen a diario. Por eso es que, aún desde antes de existir, esta Tesis estuvo dedicada a ella.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción General	3
1.1. Sistemas hospedador-parasitoide.....	3
1.2. Comportamiento de búsqueda de hospedadores.....	4
1.3. Variación en la respuesta ante estímulos durante el forrajeo	6
1.4. Importancia relativa de estímulos innatos y aprendidos.....	8
1.5. El parasitoide de moscas de los frutos <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	9
1.6. Comportamiento de forrajeo del parasitoide <i>D. longicaudata</i>	10
1.7. <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> como biocontrolador de <i>Ceratitis capitata</i>	11
2. Objetivos e Hipótesis.....	14
2.1. Objetivos.....	14
2.1.1. Objetivo General	14
2.1.2. Objetivos Específicos	14
2.2. Hipótesis	14
2.2.1. Sobre la orientación hacia el hábitat del hospedador	14
2.2.2. Sobre la orientación hacia el hospedador una vez detectado el hábitat.....	15
2.2.3. Sobre el éxito asociado a la elección de las hembras	15
2.2.4. Sobre diferencias entre cepas	15
3. Claves visuales utilizadas por <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> durante la búsqueda de hospedadores.....	16
3.1. Introducción.....	16
3.2. Objetivos.....	17
3.2.1. Objetivo general	17
3.2.2. Objetivos específicos.....	18
3.3. Materiales y Métodos	18
3.3.1. Insectos	18
3.3.2. Condiciones experimentales	18
3.3.3. Procedimiento general	18
3.3.4. Experimentos realizados.....	20

3.3.5. Análisis de datos.....	22
3.4. Resultados.....	22
3.4.1. Experimento 1. Importancia del color como clave visual	22
3.4.2. Experimento 2. Importancia de la forma como clave visual	23
3.4.3. Experimento 3. Importancia del tamaño como clave visual.....	28
3.4.4. Experimento 4. Preferencia Grises	29
3.5. Discusión	32
4. Importancia de la experiencia previa en la utilización de claves visuales por	
<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	38
4.1. Introducción.....	38
4.2. Objetivos.....	39
4.2.1. Objetivo general	39
4.2.2. Objetivos particulares	39
4.3. Materiales y Métodos	40
4.3.1 Insectos	40
4.3.2. Condiciones experimentales	40
4.3.3. Experimentos realizados.....	42
4.3.4. Análisis de datos	46
4.4. Resultados.....	48
4.4.1. Control de posición.....	48
4.4.2. Experimento 1. Influencia de la experiencia previa en la preferencia por	
color.....	48
4.4.3. Experimento 2: Influencia de la experiencia previa en la preferencia por	
forma.....	49
4.4.4. Experimento 3:Controles	51
4.4.5. Experimento 4. Duración del aprendizaje	52
4.4.6. Experimento 5: Influencia del número de eventos de entrenamiento.	53
4.4.7. Experimento 6. Ventajas del aprendizaje	54
4.4.8. Experimento 7. Interacción entre claves visuales: color y tamaño.....	55
4.5. Discusión.....	55
5. Claves químicas utilizadas por <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> durante la búsqueda	
de hospedadores.....	62
5.1. Introducción.....	62

5.2. Objetivos.....	66
5.2.1. Objetivo general	66
5.2.2. Objetivos específicos.....	67
5.3. Materiales y Métodos	67
5.3.1. Insectos	67
5.3.2. Condiciones experimentales.....	67
5.3.3. Metodología general.....	67
5.3.4. Experimentos realizados.....	70
5.4. Resultados.....	75
5.4.1. Control de posición.....	75
5.4.2. Comparación de MI94 y Cast191.....	75
5.4.3. Experimento 1. Efecto de la infestación de la fruta.....	75
5.4.4. Experimento 2. Importancia de la puntura en la fruta atacada	76
5.4.5. Experimento 3. Influencia de señales químicas provenientes de la comunicación o de la actividad de la mosca sobre el fruto	77
5.4.6. Experimento 4. Importancia de compuestos depositados por las hembras junto con los huevos	78
5.4.7. Experimento 5. Importancia de compuestos liberados por las larvas de <i>C. capitata</i>	79
5.4.8. Experimento 6. Influencia de compuestos provenientes de la actividad de las larvas	80
5.4.9. Experimento 7. Importancia de compuestos asociados al desarrollo de hongos en los frutos.....	81
5.4.10. Experimento 8. Importancia de compuestos liberados por la fruta en estado de pudrición.....	82
5.4.11. Experimento 9. Importancia de compuestos provenientes de la actividad de la larva utilizando dieta artificial	84
5.5. Discusión	85
6. Estudios de olfatometría	94
6.1. Introducción.....	94
6.2. Objetivos.....	97
6.2.1. Objetivo general	97

6.2.2. Objetivos específicos.....	97
6.3. Materiales y Métodos	97
6.3.1. Material Biológico.....	97
6.3.2. Condiciones experimentales.....	98
6.3.3. Descripción del olfatómetro en Y.....	98
6.3.4. Metodología general.....	101
6.3.5. Experimentos realizados.....	102
6.3.6. Análisis de datos.....	105
6.4. Resultados.....	106
6.4.1. Control posición	106
6.4.2. Claves químicas asociadas a la infestación de la fruta	107
6.4.3. Respuesta de <i>D. longicaudata</i> ante distintas especies frutales.....	109
6.5. Discusión	113
7. Éxito reproductivo asociado al forrajeo en distintos hábitats del hospedador	121
7.1. Introducción.....	121
7.2. Objetivos.....	123
7.2.1. Objetivo general	123
7.2.2. Objetivos específicos.....	123
7.3. Materiales y Métodos	124
7.3.1. Insectos	124
7.3.2. Experimentos realizados.....	124
7.3.3. Análisis de datos.....	127
7.4. Resultados.....	129
7.4.1. Experimento 1. Éxito durante el forrajeo sobre distintas especies frutales...	129
7.4.2. Experimento 2. Calidad de los hospedadores asociados a distintas especies frutales	130
7.5. Discusión	134
8. Conclusiones Generales.....	138
9. Referencias Bibliográficas.....	141

"Estrategias de forrajeo del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) criado sobre una línea sexante de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)"

Resumen

En el presente estudio se analizó el comportamiento de búsqueda de hospedadores en las hembras del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* en relación con los estímulos asociados a su hospedador: larvas de *Ceratitis capitata*. La respuesta del parasitoide fue estudiada en hembras *naïve*, y en hembras que tenían distintos niveles de experiencia, y se trató de evidenciar ventajas adaptativas asociadas a los comportamientos observados. Se utilizaron hembras criadas sobre dos cepas de *C. capitata* y los resultados obtenidos fueron comparados entre cepas. Los experimentos se realizaron bajo condiciones de laboratorio, utilizando arenas experimentales y un olfatómetro en Y. Se encontró que las hembras utilizan ciertas claves visuales del hábitat del hospedador en forma innata, mientras que otras claves son utilizadas solo después de adquirir alguna experiencia, y aparentemente, mediante aprendizaje asociativo. Se mostró que este aprendizaje es dinámico y también que confiere una ventaja frente a hembras sin experiencia. Las hembras utilizan, además, claves químicas durante el forrajeo, las cuales provienen tanto de las larvas hospedadoras como del hábitat donde estas se encuentran. Una vez sobre los frutos infestados, la presencia de las larvas y de compuestos asociados a estas, generan un aumento en la actividad de búsqueda por parte de los parasitoides. Se encontró un patrón de preferencia en el parasitoide por distintas especies frutales, cuya relación con el éxito reproductivo pudo ser evidenciada parcialmente. Por otro lado, se encontró que esta preferencia no es fija, y puede ser influenciada por el nivel de infestación y por la experiencia previa. Las diferencias que existen entre las dos cepas analizadas en el método de cría no produjeron diferencias en el comportamiento de forrajeo de los parasitoides.

Palabras clave: *Diachasmimorpha longicaudata*, moscas de la fruta, comportamiento de forrajeo, control biológico, aprendizaje asociativo

"Foraging strategy of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on a sexing strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)"

Abstract

In the present study, I analyzed cues related to the behavior of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* when the female is searching for hosts: larvae of *Ceratitis capitata*. The behavior of the parasitoids was studied in *naïve* females, and also in females that had different levels of previous foraging experience, trying to find the adaptative advantage associated with behavioral patterns found. Artificially reared female *D. longicaudata* of two strains were used in the experiments, and the results were compared between strains. All assays were conducted under laboratory conditions, using an experimental arenas and a Y-tube olfactometer. I found that *D. longicaudata* innately uses some visual cues of the host habitat, while other visual cues are used after the females acquire experience - apparently through associative learning. This mechanism is dynamic and gives the females an advantage over females without experience. Beside visual cues, the females use chemical cues during host searching. These cues come both from the host larvae and from the habitat where these larvae grow. After the females land on the infested fruits, the presence of larvae, or chemical compounds associated to them, produces an increase in the probing activity. A preference pattern among four fruit species was found for the females, the relationship of which with the fitness of the females was only partially proven. Also, this preference pattern is not fixed, and depends both on the infestation level and the previous experience of females. The differences in rearing between the two strains used in this study did not affect the foraging behavior of the female parasitoid.

Keywords: *Diachasmimorpha longicaudata*, fruit flies, foraging behavior, biological control, associative learning.

1. Introducción General

1.1. Sistemas hospedador-parasitoide

Reuter, en 1913, fue el primero en utilizar el término parasitoide para describir un tipo de historia de vida intermedia entre aquellas de los predadores y los verdaderos parásitos (Waage y Greathead 1986), pero el término sólo fue aceptado universalmente en los últimos 40 años. Aunque hay varias definiciones de lo que es un parasitoide, la más aceptada es que los parasitoides son insectos cuyas larvas se desarrollan alimentándose del cuerpo de otros artrópodos, que actúan como hospedadores en esta interacción. Si bien los hospedadores son usualmente otros insectos, se han encontrado algunos casos en que arañas y hasta miriápodos son utilizados como hospedadores (Godfray 1994). El resultado final de esta interacción es la muerte del hospedador y la completa formación de uno o varios parasitoides adultos a partir de los tejidos del hospedador. Los parasitoides consumen todo o casi todo el cuerpo del hospedador y luego empupan, ya sea dentro o fuera del cuerpo del hospedador (Koul y Dhaliwal 2003).

Aparentemente, la forma ancestral del parasitismo fue externa, y aún hoy numerosas especies de parasitoides conservarían este hábito de dejar sus huevos cerca de los hospedadores en lugar de depositarlos justo sobre, o incluso dentro, de estos (Whitfield 1998). Los parasitoides se diferencian también de acuerdo a si su desarrollo transcurre en el interior del hospedador (endoparasitoides) o si se alimentan de él desde el exterior (ectoparasitoides), así como en el estado de desarrollo en el que atacan a sus hospedadores. Así, existen parasitoides que atacan huevos, larvas, pupas, e incluso adultos de sus hospedadores. En algunos casos, las hembras del parasitoide depositan un huevo en un determinado estado de desarrollo del hospedador, que continúa su propio desarrollo, y la emergencia del parasitoide adulto ocurre en un estado más avanzado, y por esto reciben nombres como huevo-larval, o larvo-pupal. En general, este tipo de parasitoides son llamados koinobiontes ya que atacan hospedadores en estados móviles y les permiten seguir desarrollándose, mientras ellos se desarrollan endoparasíticamente durante un largo período de la vida del hospedador (Hochberg e Ives 2000). Por el

contrario, las hembras de parasitoides idiobiontes usualmente paralizan o matan estados inmóviles (huevos o pupas) y los recursos disponibles para sus larvas serán aquellos que estaban disponibles al momento de la oviposición (Askew y Shaw 1986).

1.2. Comportamiento de búsqueda de hospedadores

Los hospedadores son normalmente localizados por la hembras del parasitoide, quien es la responsable de depositar los huevos ya sea directamente sobre o dentro el hospedador, o en su vecindad (Godfray 1994). En la naturaleza, los parasitoides hembra buscan a sus hospedadores en una gran diversidad de sustratos, moviéndose sobre y entre estos sustratos, de una manera compleja y no aleatoria (van Alphen y Vet 1986). Esto hace que las hembras deban enfrentar una amplia gama de señales químicas y físicas, y discernir cuales de ellas son indicadoras fiables de la presencia de hospedadores.

Debido a la relación directa entre una búsqueda exitosa y la producción de descendientes, se podría esperar que el comportamiento de búsqueda de las hembras esté bajo una fuerte influencia de la selección natural (van Alphen y Jervis 1996). Del mismo modo, los hospedadores sienten una fuerte presión selectiva para escapar al parasitismo, porque este representa su muerte. Esto conduce a un tipo especial de fenómeno conocido como carrera armamentista en que el hospedador estaría evitando ser detectado y así produciría menos y menos pistas de su ubicación, mientras que el parasitoide iría afinando su percepción, respondiendo a claves cada vez menos conspicuas. Esto ha llevado, según Godfray (1994), a la aparición de una gran variedad de sutiles claves usadas por los parasitoides hembras durante el forrajeo.

Esta tendencia de los hospedadores a evitar ser encontrados, ha llevado a algunos investigadores a plantear que los parasitoides enfrentan un conflicto entre la detectabilidad de un estímulo y su confiabilidad como indicador de la presencia de hospedadores (Vet y Dicke 1992, Vet et al. 1995). Este conflicto hace referencia a que estímulos con alta detectabilidad están asociados normalmente a una baja confiabilidad como indicador de hospedadores, y viceversa. No obstante, habría al menos tres mecanismos que les permitirían a los parasitoides resolver este conflicto. El primero

estaría dado por la capacidad que tienen algunos parasitoides de aprender claves nuevas que son fácilmente detectables y que están asociadas frecuentemente a la presencia de hospedadores. Así, esta nueva clave tendrá, además de alta detectabilidad, alta confiabilidad. El segundo mecanismo, es el conocido como *desvío infoquímico* (Vet et al. 1995), por el cual el parasitoide responde a las feromonas de comunicación producidas por los hospedadores adultos. De esta manera, como la clave que señala la presencia del hospedador está siendo seleccionada positivamente por selección natural o selección sexual, su detectabilidad será elevada (Vinson 1998). Este es el caso de parasitoides de polillas que utilizan la feromona sexual producida por las hembras de su hospedador (Lewis et al. 1982). Un caso similar, esta dado por aquellos parasitoides que, en lugar de utilizar feromonas de sus hospedadores, utilizan señales auditivas de comunicación entre adultos; existen algunos ejemplos de parasitoides de grillos que utilizan su canto para detectarlos (Rotenberry et al. 1996). Finalmente, la tercera solución encontrada al conflicto esta dada por la utilización de claves altamente detectables producidas por el sustrato donde se encuentran los hospedadores en respuesta a la actividad de estos (Vinson 1998), como por ejemplo algunas plantas que, ante el ataque de un herbívoro, liberan compuestos volátiles que atraen parasitoides cuyos hospedadores son los herbívoros que indujeron la liberación de volátiles (Turling et al. 1993, Mattiacci et al. 1994).

El proceso de búsqueda de hospedadores puede ser visto como un proceso secuencial que ocurre en cuatro etapas jerárquicas (Godfray 1994). En la primera, el parasitoide hembra debe localizar el hábitat del hospedador. Una vez localizado el hábitat, debe encontrar al hospedador dentro del mismo. La tercera etapa está relacionada al reconocimiento del hospedador y la determinación de la calidad del mismo. Finalmente, si el hospedador potencial es adecuado, comienza la cuarta etapa en que el parasitoide evalúa con su ovipositor si el hospedador es aceptable para el desarrollo de sus huevos. En cada etapa de este proceso, el tipo de claves será de distinta naturaleza. Así, durante la búsqueda del hábitat del hospedador las claves visuales, auditivas, y químicas del hábitat o del hospedador mismo pueden ser utilizadas para localizar parches con alta probabilidad de estar ocupados por hospedadores. De todos estos, la olfacción parece ser el modo sensorial más frecuente a largas distancias (van Alphen y Vet 1986). Una vez dentro del hábitat del hospedador, claves más

íntimamente asociadas al mismo hospedador pueden volverse más importantes. Dentro de estas se encuentran claves mecánicas, como las vibraciones emitidas por larvas de hospedadores que permanecen ocultas (dentro de un sustrato vegetal o animal), el contacto visual con el hospedador (para hospedadores expuestos) o rastros, tanto visuales como olfativos, dejados por ellos (para hospedadores ocultos que dejan señales externas) o compuestos químicos (volátiles o de contacto) emitidos por el hospedador. Localizado el hospedador, el parasitoide se valdrá de otras claves que le indican la calidad del mismo. Estas pueden ser táctiles (e indicar, por ejemplo, el tamaño o el estadio de desarrollo del hospedador), o químicas (e indicar si el hospedador ha sido ya parasitado por otra hembra).

Si bien ha habido una aceptación general de que la división del proceso es arbitraria y debe su origen a que nos ayuda a analizar este proceso (que es esencialmente continuo), este modelo conceptual ha tendido a enfatizar una visión jerárquica y estática del comportamiento de los parasitoides (Godfray 1994). Lewis et al. (1990) y Vet et al. (1990) proponen modelos más dinámicos, que incorporan la capacidad del parasitoide de responder con mayor intensidad a aquellos estímulos más íntimamente asociados con sus hospedadores, independientemente de los estímulos que pueda estar recibiendo del hábitat donde estos se encuentran. Además, considera la posibilidad de que los estímulos utilizados por el parasitoide vayan cambiando a medida que estos adquieren experiencia de forrajeo, y así propone que el estado interno de las hembras debería ser considerado al analizar la forma en la que estas responden a los estímulos durante el proceso de búsqueda de hospedadores.

1.3. Variación en la respuesta ante estímulos durante el forrajeo

La respuesta de las hembras ante distintos estímulos no siempre será la misma y dependerá de un número de factores (Vinson 1998). Estos pueden ser factores intrínsecos (internos) a la biología de la hembra o extrínsecos, representados por factores biológicos externos y por condiciones físicas del ambiente. La figura 1.1 (adaptada de Vinson 1998) muestra la diversidad de estímulos que pueden estar afectando la respuesta de las hembras. La influencia que los factores extrínsecos poseen sobre las decisiones de las hembras viene dada por la existencia de refugios, fuentes de

alimento, y la presencia de competidores, predadores, y enfermedades (Vinson 1998). Las condiciones ambientales incluyen luz, temperatura, humedad, etc. (Vinson 1985, 1991, Roitberg et al. 1992, 1993).

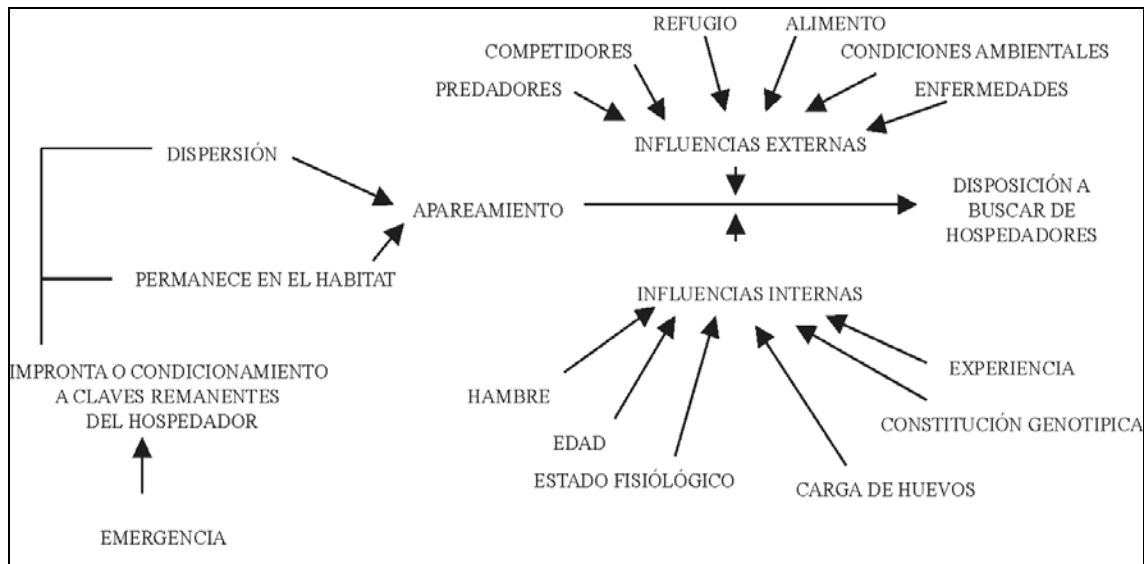


Figura 1.1. Factores que influyen en la elección de hábitat en un parasitoide hembra (adaptado de Vinson 1998).

Dentro de los factores biológicos internos que afectan las decisiones de una hembra, el primero corresponde a su constitución genética. Esta determinará las primeras claves a las que las hembras van a responder (es decir, su preferencia innata), el tipo de clave al que responden, el comportamiento inducido por estas claves, el abanico de especies atacadas, y la intensidad del ataque (Vinson 1998). Numerosos estudios han mostrado que variaciones en el comportamiento de forrajeo son el resultado de diferencias en el genotipo de las hembras (Wajnberg y Colazza 1998, Gu y Dorn 2000, Olson y Andow 2002, Stirling et al. 2002).

En segundo lugar, se encuentra la impronta que pueda generar durante el desarrollo larvario el hábitat del cual la hembra emergió. Algunas características de este hábitat podrían ser fijadas por la hembra y así condicionar su preferencia durante el forrajeo, haciendo que esta prefiera buscar hábitats u hospedadores semejantes a los que

su madre utilizó (Lecomte y Thibout 1993, Cortesero y Mong 1994). Si bien la influencia de la experiencia durante los estados inmaduros ha sido documentada en numerosos animales (Davis y Stamps 2004), en parasitoides la experiencia adquirida en el estado adulto tendría un mayor impacto sobre la preferencia de las hembras (Turlings et al. 1993).

Luego de la emergencia, existen otros factores capaces de modificar la respuesta de las hembras. Por ejemplo, al aumentar la edad y la carga de huevos que tiene una hembra su selectividad por hábitats u hospedadores puede verse disminuida (Sirot et al. 1997). Asimismo, la experiencia que va adquiriendo el insecto durante su vida adulta suele tener un rol fundamental en la preferencia de las hembras (Turlings et al. 1993, Godfray 1994, Vet et al. 1998, Vinson 1998), pues les permite responder a cambios en la abundancia y distribución de sus hospedadores. Los patrones prefijados (preferencia innata), y los adquiridos durante los estados inmaduros, pueden ser entonces alterados por la experiencia en el estado adulto. El comportamiento de las hembras puede verse modificado de dos maneras. En primer lugar, la experiencia con un estímulo innato puede provocar un incremento general de la respuesta ante otros estímulos (un fenómeno llamado sensibilización o *priming*). En segundo lugar, algunas hembras son capaces de asociar un nuevo estímulo (alguna señal asociada al hospedador) con la presencia del hospedador (aprendizaje asociativo), algunas veces respondiendo a estos nuevos estímulos aún en ausencia del hospedador (Turlings et al. 1993).

1.4. Importancia relativa de estímulos innatos y aprendidos en la selección del hábitat del hospedador

La importancia relativa de la preferencia heredada (innata) y la preferencia inducida por aprendizaje durante la selección de hábitats es desconocida (Rolstad et al. 2000), pero ha sido relacionada con la baja predictibilidad de la calidad de los hábitats. Cuando los diferentes hábitats son constantes en su riqueza, la preferencia por el mejor hábitat debería ser seleccionada y heredada a los descendientes, y por lo tanto la necesidad de aprender nuevas claves se vería minimizada. En el mismo sentido, cuando la riqueza de los diferentes hábitats cambia muy rápido y es completamente impredecible, aprender claves asociadas a un determinado hábitat que es rentable en el presente, no será útil en el futuro. Stephens (1993) propuso que la influencia del aprendizaje en la selección del

hábitat debería ser mayor cuando la rentabilidad de los hábitats disponibles no cambia demasiado rápido durante la vida de un individuo (baja variabilidad intra-generacional), pero tiende a cambiar marcadamente de una generación a la siguiente.

Se ha propuesto que el aprendizaje debería desempeñar un rol fundamental en especies de parasitoides generalistas (Geervliet et al. 1998, Stireman 2002). Este mecanismo le permitiría a un parasitoide manejar la variabilidad tanto de claves directas del hospedador como de claves indirectas producidas por la planta sobre la que este se alimenta (Wäckers y Lewis 1994, Steidle 1998), y ajustar su respuesta a cambios en la abundancia y calidad de los potenciales hospedadores (Vet y Dicke 1992, Stireman 2002). Dado que las claves de los hospedadores tienen usualmente una baja detectabilidad (como el resultado de la fuerte presión selectiva sobre el hospedador para evitar el parasitismo) los parasitoides pueden usar claves más conspicuas, como las provenientes de los microhábitats del hospedador. El aprendizaje asociativo permitiría responder solo a aquellas claves del microhábitat que fue encontrado en asociación con hospedadores en eventos de forrajeo previos. El aprendizaje en parasitoides generalistas debería verse intensificado si el grado de variabilidad inter-generacional en la calidad de los distintos hábitats es mayor que el intra-generacional, de acuerdo a la hipótesis planteada por Stephens (1993).

1.5. El parasitoide de moscas de los frutos *Diachasmimorpha longicaudata*

Diachasmimorpha longicaudata Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) es un endoparasitoide solitario que ataca larvas de los últimos estadios de desarrollo de varias especies de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae), incluyendo alguna de las especies plagas de lo frutales más importantes del mundo. Este parasitoide ataca a las larvas cuando estas se encuentran aún dentro del fruto. *D. longicaudata* es un parasitoide koinobionte, así es que las larvas parasitadas continúan su desarrollo, abandonan el fruto y empupan en el suelo, donde ya no son parasitadas por esta especie (Lawrence 1981). En el estado pupal el parasitoide mata al hospedador y de la pupa de la mosca emerge un adulto del parasitoide.

D. longicaudata es una especie introducida en algunas regiones del continente Americano por su utilidad como agente de control biológico de moscas de la fruta. Este parasitoide tiene una amplia distribución natural, y fue encontrado desde el sur y el sudoeste Asiático hasta Australia (Wharton y Gilstrap 1983). Es un parasitoide generalista cuyos hospedadores nativos son moscas del género *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae). Inicialmente, Wharton y Gilstrap (1983) reportaron 14 especies del género *Bactrocera* como hospedadores de este parasitoide. Esta lista fue luego ampliada por Vijaysegaran (1984) y, más recientemente, por Chinajariyawong et al. (2000) para alcanzar un total de 34 especies hospedadoras del género *Bactrocera*. No obstante, debido al desconocimiento de la ecología de este parasitoide en su lugar de origen y a la facilidad para ser criado artificialmente sobre varias especies de moscas tefritidas de otros géneros (*Anastrepha* y *Ceratitis*) el número de hospedadores nativos podría ser aún mayor (el género *Bactrocera* cuenta con 74 especies, White y Elson-Harris 1992).

1.6. Comportamiento de forrajeo del parasitoide *D. longicaudata*

Debido a su importancia como agente de control biológico para combatir a las moscas de la fruta, numerosos estudios han sido realizados acerca de la biología y la ecología de este parasitoide. Principalmente, estos estudios se centran en dos temáticas: la recuperación del parasitoide en el campo luego de liberaciones masivas (en el marco de programas de control biológico), y en el comportamiento de forrajeo de las hembras en condiciones de laboratorio y, en menor grado, semi-naturales. Así, varios estudios analizaron las posibles claves visuales y químicas involucradas en la primera fase del proceso de búsqueda de forrajeo, la búsqueda del hábitat. Greany et al. (1977) reportaron que las hembras son atraídas por sustancias volátiles que emanan las frutas maduras, independientemente de la presencia o ausencia de larvas hospedadoras. No obstante, otros autores encontraron que la presencia de los hospedadores sería determinante en este proceso (Carrasco et al. 2005). De acuerdo a Mainland (1950), el color y el tamaño de la fruta influyen el nivel de parasitismo. Si bien Sivinski (1991) encontró una clara preferencia en las hembras de este parasitoide por frutos de mayor tamaño, los resultados respecto a la preferencia por color han sido contradictorios (Leyva et al. 1991, Vargas et al. 1991, Messing y Jang 1992).

Otros estudios relacionados al comportamiento de forrajeo analizaron las claves involucradas en la segunda fase de este proceso. Así, se ha propuesto que claves de tipo vibratorio y químico producidas por las larvas hospedadoras podrían orientar a los parasitoides hembra que ya se encuentran sobre frutos infestados con estas larvas (Lawrence 1981, Duan y Messing 2000). En las últimas fases, al entrar en contacto con el hospedador, quimio y mecanoreceptores situados en el ovipositor del parasitoide permitirían discriminar entre hospedadores infestados y no infestados (Greany et al. 1977).

Una limitante de estos estudios para comprender la forma en que este parasitoide encuentra a sus hospedadores en la naturaleza, es el hecho de haber ignorado el efecto que el estado interno de las hembras puede tener sobre las decisiones tomadas durante la búsqueda de hospedadores. *D. longicaudata* es un parasitoide generalista, cuyos hospedadores son, a su vez, altamente polífagos. Esto hace que haya una gran variabilidad en los hábitats donde este parasitoide puede encontrar a sus hospedadores. Además, estos hábitats tienden a cambiar conforme las distintas especies frutales que poseen frutos susceptibles de ser atacados por moscas de la fruta se van sucediendo en el tiempo. Estos aspectos de la ecología de *D. longicaudata* tenderían a favorecer la existencia de mecanismos que le permitan al parasitoide aprender claves de aquellos ambientes en que sus hospedadores fueron encontrados en eventos previos de búsqueda por sobre patrones de preferencia innatos, porque la distribución y abundancia de sus hospedadores no son constantes. Aún cuando la experiencia adquirida en el estado adulto debería jugar un rol importante en el proceso de búsqueda de hospedadores en *D. longicaudata*, esta nunca ha sido analizada.

1.7. *Diachasmimorpha longicaudata* como biocontrolador de *Ceratitis capitata*

D. longicaudata ha sido utilizado en numerosas introducciones para el control de varias especies de tefrítidos plaga (Cancino Díaz y Yoc 1993). El hecho de ser de fácil cría en laboratorio y que posean un amplio rango de hospedadores favoreció su utilización en diversos programas de control de moscas tefrítidas.

En Argentina existen dos especies de moscas de la familia Tephritidae de carácter cuarentenario: *Ceratitis capitata* (Wiedemann) y *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann). *C. capitata*, o mosca del Mediterráneo, es una de las plagas más importantes del mundo debido a su gran capacidad destructiva y su amplio rango de hospederos frutales (Christenson y Foote 1959). Esta plaga causa enormes pérdidas por daño directo sobre el fruto, pero es aún mayor el daño económico indirecto por pérdida de mercados debido a restricciones ante las exportaciones (Malavasi et al. 1994).

Entre los métodos de control no contaminantes utilizados contra los tefrítidos pueden citarse: la técnica del insecto estéril y la utilización de parasitoides (Wong et al. 1991). La Técnica del Insecto Estéril (TIE)(Knippling 1955) se basa en la capacidad de criar, esterilizar y liberar insectos plaga, sexualmente competitivos con los individuos silvestres, de manera tal que aquellas hembras que se apareen solamente con un macho estéril no producirán descendencia disminuyendo el tamaño poblacional con sucesivas repeticiones del proceso (Metcalf y Luckman 1994). La eficiencia del método aumenta cuando la liberación involucra machos únicamente (McInnis et al. 1994). Este hecho ha llevado al desarrollo de líneas de sexado genético para *C. capitata* que permiten descartar a las hembras y de este modo hacer más eficiente y menos costosa la TIE. En este sentido, en el Instituto de Genética del INTA Castelar se ha desarrollado una línea de sexado genético de *C. capitata* que afecta el tiempo de desarrollo de estados inmaduros (denominada línea Cast191). En esta línea las hembras poseen una tasa de desarrollo retardada respecto del macho (Cladera 1995). Esta diferenciación temprana permite separar las hembras de los machos y disminuir costos, ya que sólo las larvas macho son criadas e irradiadas en el estado de pupa (Manso y Lifschitz 1992, Pizarro et al. 1997).

La TIE no es cien por ciento efectiva y puede ser complementada con otras medidas de control. Aquellas hembras que escapan a los machos estériles y son fecundadas por machos salvajes, dejan huevos viables que se desarrollan dentro de los frutos. Además otras especies de mosca de la fruta presentes (como *A. fraterculus*) no son controladas por este método especie-específico, e incluso pueden aumentar su densidad como consecuencia de la disminución poblacional de *C. capitata*. En este marco, se plantea el uso de otras estrategias de control complementarias a la TIE, como

ser el uso de parasitoides. Los mismos han sido utilizados con éxito en estrategias de control biológico clásico, así como en estrategias inundativas para el control de *C. capitata* y otras especies de moscas de la fruta, en otros lugares del mundo (Wong et al. 1991, Sivinski y Smittle 1996). El control biológico mediante parasitoides ha sido criticado debido a los costos de producción. En este sentido, se propone que la línea Cast191 brinda una excelente ventaja pues permite usar las hembras, remanentes de la cría de machos estériles, para la cría del parasitoide y de esta forma disminuir los costos. No obstante, el manejo diferencial de esta línea de sexado genético podría tener efectos negativos sobre la eficiencia de las hembras del parasitoide en la búsqueda de las larvas hospedadoras. Por lo tanto, para poder utilizar esta línea de sexado como hospedador en la cría del parasitoide se debería realizar un exhaustivo análisis para detectar posibles diferencias en el comportamiento de las hembras, utilizando una cepa de parasitoides criada sobre una línea salvaje de *C. capitata* como patrón de referencia que permita realizar comparaciones.

2. Objetivos e Hipótesis

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo General

Estudiar los estímulos visuales y olfativos utilizados por las hembras del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) durante la búsqueda de larvas hospedadoras de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), determinando la influencia de la experiencia previa sobre el comportamiento de forrajeo, y comparando la respuesta entre parasitoides provenientes de dos cepas diferentes.

2.1.2. Objetivos Específicos

- 1) Estudiar la importancia de los estímulos visuales del hábitat del hospedador en el proceso de búsqueda de hospedadores por las hembras del parasitoide *D. longicaudata*.
- 2) Estudiar la importancia de la experiencia previa durante la vida de las hembras en su patrón de preferencia por distintas claves visuales y químicas.
- 3) Analizar si existen señales químicas derivadas o asociadas a la actividad de *C. capitata* que son usadas por *D. longicaudata* para encontrar al hábitat del hospedador, y al mismo hospedador, una vez sobre los frutos infestados.
- 4) Analizar la preferencia del parasitoide *D. longicaudata* por distintos hábitats de su hospedador (especies frutales), y la importancia del nivel de infestación y la experiencia previa de las hembras, sobre su elección.
- 5) Comparar el éxito reproductivo de parasitoides hembra que forrajean sobre hospedadores en distintas especies frutales.
- 6) Comparar los patrones comportamentales exhibidos por hembras de dos cepas (Cast191 y cepa MI94).

2.2. Hipótesis

2.2.1. Sobre la orientación hacia el hábitat del hospedador

Hipótesis 1: El color, la forma, el tamaño y la luminosidad de los frutos determinan el grado de atracción que ellos ejercen sobre hembras de *D. longicaudata*.

Hipótesis 2: Las hembras de *D. longicaudata* son capaces de detectar estímulos químicos asociados o derivados de la actividad de las larvas de *C. capitata* dentro del fruto y utilizar estas claves para encontrar el hábitat del hospedador.

Hipótesis 3: La experiencia que adquieren las hembras durante eventos de forrajeo exitosos condiciona su preferencia en eventos de forrajeo futuros.

2.2.2. Sobre la orientación hacia el hospedador una vez detectado el hábitat

Hipótesis 4: Una vez localizado el hábitat del hospedador (fruto infestado) las hembras de *D. longicaudata* son capaces de detectar estímulos vibratorios y químicos asociados o derivados de la actividad de las larvas de *C. capitata* dentro del fruto y utilizan estas claves para localizar al hospedador.

2.2.3. Sobre el éxito asociado a la elección de las hembras

Hipótesis 5: La elección de las hembras por distintos hábitats del hospedador se corresponde con el éxito reproductivo asociado a cada uno de ellos pues: a) es más fácil localizar o parasitar larvas en frutos de la especie frutal preferida, b) las larvas criadas en frutos de la especie frutal preferida son de mejor calidad como hospedador para este parasitoide.

2.2.4. Sobre diferencias entre cepas

Hipótesis 6: Los patrones comportamentales mostrados por las hembras de *D. longicaudata* no difieren entre hembras criadas sobre la línea de sexado genético (cepa Cast191) y hembras criadas sobre una línea de *C. capitata* salvaje (cepa MI94).

3. Claves visuales utilizadas por *Diachasmimorpha longicaudata* durante la búsqueda de hospedadores

3.1. Introducción

La importancia de las claves visuales durante el proceso de búsqueda del hospedador en parasitoides himenópteros ha recibido tradicionalmente menos atención que las claves químicas (Wäckers y Lewis 1994). Este hecho es particularmente llamativo si se considera que la importancia de las claves visuales durante la búsqueda de alimento ha sido bien detallada en himenópteros no parasitoides, tanto sociales como no sociales (Giurfa et al. 1996, Horridge 1999, Nilggebrügge y Hempel de Ibarra 2003, Stach et al. 2004). A esto se suma el hecho de que varias especies dentro de este orden poseen un sistema visual tricromático y exhiben verdadera visión de colores (Brown et al. 1998, y referencias allí incluidas). El color, la forma, el patrón, y el tamaño podrían ser claves usadas por los parasitoides para localizar a los hospedadores o a los hábitats donde estos se encuentran (Moreno et al. 1984, Michaud y Mackauer 1994, Hoffmeister et al. 1999, Fischer et al. 2003, Lobdell et al. 2005). El color parece ser el estímulo más importante a largas distancias, dada la baja resolución que los ojos de los insectos poseen (Brown et al. 1998). La información de patrones y formas sería accesible a distancias más cortas (Wäckers y Lewis 1999).

Los parasitoides que atacan a hospedadores ocultos dentro de estructuras vegetales, o enterrados en el suelo, deben enfrentar el problema de que sus hospedadores están “escondidos” y emiten la mínima cantidad de señales posibles. En estos casos, las señales que provienen del hábitat del hospedador se vuelven más importantes para encontrar al hospedador (van Alphen y Vet 1986, van Alphen et al. 1991, Henneman 1998). Las claves químicas del hábitat del hospedador pueden atraer a los parasitoides aún en ausencia del mismo hospedador, pero las claves visuales también son importantes, sobre todo en las fases finales del proceso de búsqueda (Godfray 1994).

Diachasmimorpha longicaudata es un parasitoide que utiliza como hospedadores larvas de estadios avanzados de varias especies de moscas de la fruta de la familia Tephritidae (Cancino Díaz y Yoc 1993). Dado que este parasitoide ataca a las larvas sólo cuando estas se encuentran dentro del fruto (Lawrence 1981) las hembras deben primero localizar la fruta infestada para poder alcanzar una exitosa oviposición. Estímulos químicos y visuales ayudarían a las hembras para encontrar hábitats que alberguen potenciales larvas hospedadoras (Greany et al. 1977, Leyva et al. 1991, Vargas et al. 1991, Messing y Jang 1992, Eben et al. 2000). Una vez que las hembras aterrizan sobre la fruta, utilizarían señales de tipo químico y mecánico, ya que las hembras son capaces de detectar vibraciones y productos químicos asociados a las larvas (Lawrence 1981, Duan y Messing 2000).

El rol que las claves visuales juegan durante la búsqueda de hospedadores en *D. longicaudata* ha sido estudiado en diferentes contextos y diseños experimentales (Leyva et al. 1991, Sivinski 1991, Vargas et al. 1991, Cornelius et al. 1999). Como los hospedadores permanecen ocultos, las claves visuales disponibles para este parasitoide sólo pueden provenir del fruto. Varios estudios han encontrado una marcada preferencia en las hembras por modelos artificiales o trampas grandes frente a modelos pequeños (Sivinski 1991, Leyva et al. 1991), pero respecto a la preferencia de las hembras por el color del hábitat del hospedador los resultados obtenidos son contradictorios (Leyva et al. 1991, Vargas et al. 1991, Messing y Jang 1992, Cornelius et al. 1999). Una fuerte limitante de estos estudios para analizar el rol de las claves visuales en la búsqueda del hábitat del hospedador recae en el uso de modelos pegajosos (esferas o trampas cubiertas con pegamento incoloro e inodoro), ya que no se conoce el estímulo que lleva a las hembras a visitar los modelos (búsqueda de alimento, pareja, refugio, u hospedadores).

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Estudiar la importancia de los estímulos visuales del hábitat del hospedador en el proceso de búsqueda de hospedadores en el parasitoide *D. longicaudata*.

3.2.2. Objetivos específicos

- 1) Estudiar la respuesta de parasitoides hembra sin experiencia previa de forrajeo (*naïve*) ante distintos estímulos visuales del hábitat del hospedador (color, forma, tamaño, y luminosidad)
- 2) Comparar la respuesta de las hembras entre parasitoides criados sobre una línea sexante (Cast191) y una línea salvaje (cepa MI94) de *Ceratitidis capitata*.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Insectos

Se utilizaron hembras de *D. longicaudata* de 5-7 días de edad, sin experiencia previa (*naïve*), provenientes de las crías que se mantienen en el IGEAF (INTA Castelar). Los parasitoides fueron criados utilizando como hospedadores dos líneas de *C. capitata* (línea sexante Cast191 y línea salvaje MI94). La cría y multiplicación de los parasitoides y moscas fue realizada de acuerdo a protocolos estándares (Viscarret et al. 2006). Las hembras fueron mantenidas desde su nacimiento en frascos de 3lts con machos, miel y agua, bajo condiciones controladas (T: 25°; Hr: 60%-70%; fotoperíodo: 14-10).

3.3.2. Condiciones experimentales

Todos los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Comportamiento del Instituto de Genética, una sala aislada de 14 mts², con paredes y cielorraso blanco, que cuenta con un acondicionador de aire, un humidificador y un sistema de iluminación por 12 tubos luz día de 40W que provee una iluminación pareja. Las condiciones de trabajo fueron: 1200±100 luxes, 25±1°C, 65±5%.

Todas las observaciones fueron realizadas en jaulas de elección (30x30x30cm) con marco de hierro y paredes recubiertas de tul blanco (Figura 3.1). Dentro de esta arena experimental se examinó el comportamiento de hembras *naïve* de *D. longicaudata* enfrentadas a modelos de distintos color, forma, ó tamaño.

3.3.3. Procedimiento general

Durante el ensayo, cada hembra fue expuesta ante cuatro opciones ubicadas dentro de la jaula, cada una dispuesta a 10cm de una de las esquinas, a 10cm del techo de la jaula, y

a 10cm de los otros modelos ubicados en esquinas contiguas (Figura 3.1). Las claves fueron presentadas de a pares (combinaciones), de manera que dos de los cuatro modelos pertenecían a una clave (es decir, tenían el mismo color, el mismo tamaño, ó la misma forma) y los otros dos modelos a otra (por ejemplo, 2 esferas eran rojas y las otras dos eran amarillas cuando la clave analizada era color). Los modelos de la misma clave fueron colocados en esquinas opuestas.

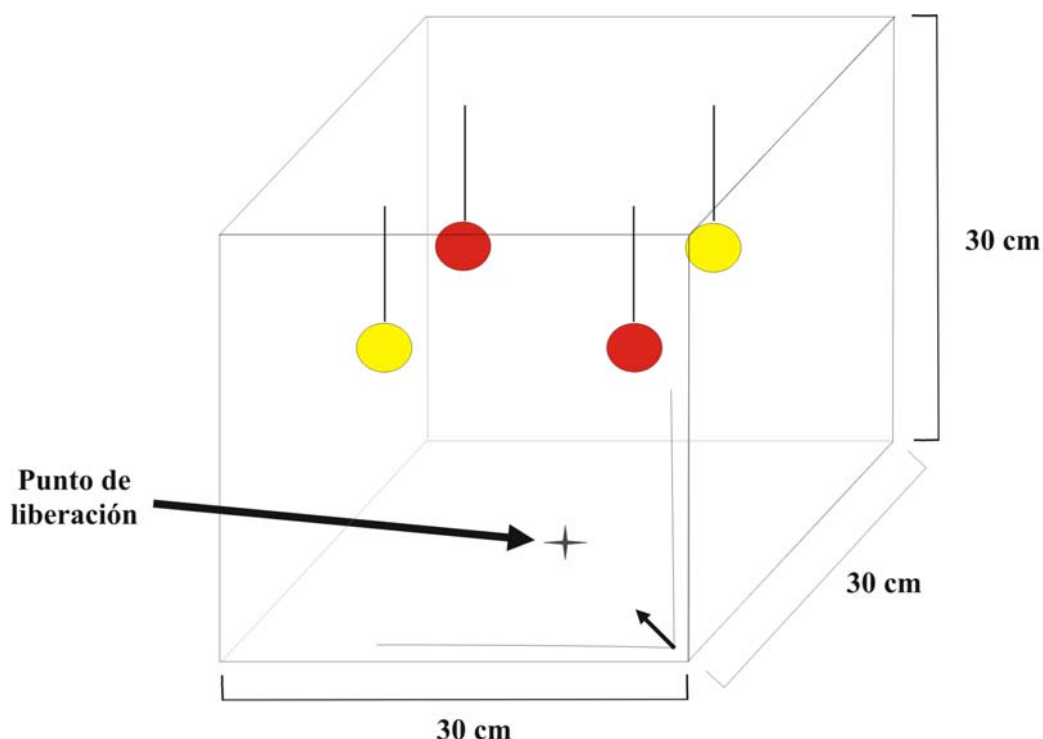


Figura 3.1. Jaulas cúbicas de 30 cm de lado utilizadas para evaluar la respuesta de las hembras ante diversos modelos.

En forma individual, las hembras fueron suavemente transferidas al centro de la jaula con la ayuda de una aspirador entomológico, y liberadas sobre el piso (Figura 3.1). Se consideró que una hembra realizó una elección cuando esta aterrizó sobre un modelo dentro de los 15 minutos desde su liberación, y si exhibió comportamientos de búsqueda de hospedadores (antenación y/o sondeo con el ovipositor, Lawrence 1981) al menos durante 30 segundos después del aterrizaje. Para cada hembra (réplica), se registraron tres variables: 1) latencia (tiempo transcurrido desde que fue liberada hasta que aterrizó

sobre un modelo); 2) modelo elegido, y 3) permanencia (tiempo que la hembra pasa sobre la opción elegida).

Al abandonar el modelo visitado, la hembra era removida de la jaula y una nueva hembra era liberada. Antes de colocar una nueva hembra, se rotaba la jaula 90° en sentido horario para evitar un posible efecto de la posición de los modelos dentro de la sala sobre la preferencia de las hembras.

Luego de que cinco hembras visitaran algún modelo, estos eran reemplazados por un nuevo par de claves (es decir, una nueva combinación), las cuales fueron elegidas al azar para evitar un potencial efecto del día. Se analizó un total de 20 hembras de cada cepa por cada par de combinaciones.

3.3.4. Experimentos realizados

3.3.4.1. Experimento 1. Importancia del color como clave visual. Para analizar la preferencia por color, se utilizaron esferas de poliestireno expandido (telgopor) de 4,5 cm de diámetro, pintadas de 6 colores distintos (Tabla 3.1): amarillo, blanco, naranja, negro, rojo, y verde (pintura acrílica Renoir, Emilio López S.A., Argentina). Los tratamientos fueron elegidos de manera de representar los colores más frecuentemente encontrados en frutos en la naturaleza, más los dos extremos de luminosidad (blanco y negro). Dado que fueron presentados de a pares, para esta clave visual se analizaron 15 combinaciones.

3.3.4.2. Experimento 2. Importancia de la forma como clave visual. Para analizar la preferencia por formas, se probaron formas simétricas que van cambiando en la proporción entre sus dimensiones. Las formas fueron elegidas de manera de imitar distintos formatos de fruto, desde aquellos relativamente esféricos, a aquellos con formas más aguzadas. Se utilizaron cartones amarillos de tres formas distintas: un círculo de 6 cm de diámetro (CÍRCULO); un óvalo de 9 cm longitud mayor y 4 cm de longitud menor (ÓVALO 1); y un óvalo de 9 cm longitud mayor y 3 cm de longitud menor (ÓVALO 2). Los tres modelos fueron construidos de manera tal que tuvieran la

misma superficie. Se analizaron las tres combinaciones posibles entre estos tres modelos.

Color de la esfera	L	a	b
Negro	14.40	-0.14	0.40
Verde	31.21	-34.10	31.24
Naranja	42.33	40.90	50.01
Rojo	25.52	37.92	20.87
Amarillo	73.64	14.06	51.25
Blanco	86,28	0,14	5,44
Gris oscuro	19,82	-0,50	-2,17
Gris claro	49,25	-1,00	-4,34

Tabla 3.1. Características espectrales utilizadas para cuantificar el color de las pinturas acrílicas utilizadas. El valor L es un índice de la luminosidad total, el valor “a” es una medida del tono en una escala que va desde el color rojo al verde, y el valor “b” es una medida del tono en una escala que va desde el color azul al amarillo (Messing y Jang 1992). Estos parámetros fueron determinados usando un Colorímetro BYK Gardner Color View modelo 9000.

3.3.4.3. Experimento 3. Importancia del tamaño como clave visual. Para analizar la preferencia por tamaño, se utilizaron esferas de poliestireno expandido de color amarillo de tres tamaños distintos: 3 cm, 6 cm y 9 cm de diámetro. Estos diámetros fueron elegidos considerando que cubren aproximadamente el intervalo de diámetros que se pueden encontrar en las especies frutales hospederas de *C. capitata*, desde frutos pequeños como *berries*, pasando por frutos de tamaño medio como ciruelas, caqui, o higos, a frutos grandes como duraznos, o naranjas. Se analizaron las tres combinaciones posibles entre estos tres modelos.

3.3.4.4. Experimento 4. Preferencia Grises. Este ensayo tuvo por objetivo analizar la existencia de preferencia de las hembras por distintas intensidades lumínicas. Para esto se les ofreció a las hembras dos opciones: una esfera coloreada de gris claro y una esfera coloreada de gris oscuro (Tabla 3.1). Los modelos consistieron en esferas de poliestireno expandido de 4,5 cm de diámetro coloreadas con pinturas acrílicas. Las dos tonalidades de grises fueron elegidas de manera que tomen valores de intensidad lumínica lo más alejados posible.

3.3.5. Análisis de datos

3.3.5.1. Control de posición. Para analizar si la posición del modelo dentro de la sala de experimentación influyó sobre la preferencia de las hembras, se analizó si alguna posición dentro de la jaula recibió un número de visitas mayor al esperado por azar (que fue calculado suponiendo que el número de visitas debía ser homogéneo entre posiciones). Para esto se realizó una prueba de bondad de ajuste de G corregida por Yates, agrupando los datos obtenidos en las diferentes combinaciones dentro de cada experimento. Asimismo, se analizó si la posición de los modelos pudo afectar los tiempos de latencia y de permanencia de las hembras. Para esto se realizó, para cada experimento, un ANOVA de un factor (posición), o una prueba de Kruskal Wallis si no se cumplía homocedacia y el desvío de la homocedasticidad era pequeño, o transformación de los datos si el desvío de la homocedasticidad era grande.

3.3.5.2. Patrón de preferencia. El número de visitas recibida por cada modelo se analizó para cada combinación estudiada mediante una prueba G de bondad de ajuste corregida por Yates contra la hipótesis de igual número de visitas. Las diferencias entre las dos cepas de parasitoides en el número de visitas a cada modelo fueron analizadas mediante una prueba de heterogeneidad de G corregida por Yates (asegurando que el promedio de las frecuencias esperadas sea mayor a 6, supuesto de esta prueba estadística según Zar 1996).

La latencia y la permanencia fueron analizadas por medio de un ANOVA de dos factores, donde uno de los factores fue el modelo visitado y el otro la cepa de origen de los parasitoides (Cast191 o MI94). En el caso que no se cumplieran los supuestos del ANOVA, los datos eran transformados y el análisis realizado nuevamente. Esta prueba estadística fue realizada para cada combinación de claves visuales, utilizando el programa Statistica for Windows (Statsoft Inc., 2000).

3.4. Resultados

3.4.1. Experimento 1. Importancia del color como clave visual

3.4.1.1. Control de posición. Ninguna posición de las esferas dentro de la jaula recibió más visitas que lo esperado bajo la hipótesis de igual proporción ($G = 2,83$, $0,25 < p < 0,50$). Al analizar los tiempos de latencia registrados en cada una de las cuatro

posiciones no se detectaron diferencias significativas entre estas para ninguna de las dos cepas (ANOVA: $F = 0,829$, $p = 0,478$). Los mismos resultados se verificaron al analizar los tiempos de permanencia (ANOVA: $F = 0,869$, $p = 0,457$).

3.4.1.2. Visitas. El número de visitas recibido por cada modelo en cada combinación de esferas coloreadas y para cada cepa del parasitoide se muestra en la Tabla 3.2. Los análisis de heterogeneidad de G no mostraron diferencias entre la cepa MI94 y la cepa Cast191 para ninguna de las combinaciones de color. Sobre la base de estos resultados, los datos de las dos líneas se agruparon, y sobre este conjunto de datos se realizaron las pruebas de bondad de ajuste de G. Todos los colores mostraron diferencias en el número de visitas con el color blanco, el cual siempre registró menos visitas que el resto (Tabla 3.2).

3.4.1.3 Latencia. Al comparar los valores de latencia entre colores y entre cepas (Cast191 y MI94) no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las combinaciones de color analizadas entre estos factores (Tabla 3.3).

3.4.1.4. Permanencia. En la mayor parte de las combinaciones de colores no se encontraron diferencias significativas entre colores ni entre cepas (Cast191 y MI94) en el tiempo de permanencia sobre las esferas (Tabla 3.4). Para los ensayos realizados con esferas blancas y verdes, y blancas y rojas se encontraron diferencias significativas, presentando las esferas de color blanco tiempos de permanencia superiores en ambos casos.

3.4.2. Experimento 2. Importancia de la forma como clave visual

3.4.2.1. Control de posición. No se encontró ninguna posición de los modelos dentro de la jaula en la cual las visitas fueran más frecuentes ($G = 4,35$, $0,10 < p < 0,25$). Al analizar los tiempos de latencia registrados en cada una de las cuatro posiciones no se detectaron diferencias significativas para ninguna de las cuatro posiciones (ANOVA: $F = 0,208$, $p = 0,891$). Los mismos resultados se verificaron al analizar los tiempos de permanencia (ANOVA: $F = 0,136$, $p = 0,939$).

Combinación de colores	MI94 # visitas	Cast191 # visitas	Prueba G de heterogeneidad	# visitas totales	Prueba G de bondad de ajuste
Rojo vs. Verde	R: 10 V: 10	R: 9 V: 11	Gy = 0,025 0,75 < p < 0,90	R: 19 V: 21	Gy = 0,025 0,75 < p < 0,90
Rojo vs. Amarillo	R:10 A: 10	R: 14 A: 6	Gy = 0,942 0,25 < p < 0,50	R: 24 A: 16	Gy = 1,231 0,25 < p < 0,50
Rojo vs. Naranja	R: 11 Nj: 9	R: 13 Nj: 7	Gy = 0,410 0,50 < p < 0,75	R: 24 Nj: 16	Gy = 1,231 0,25 < p < 0,50
Rojo vs. Negro	R: 10 Ng: 10	R: 13 Ng: 7	Gy = 0,637 0,25 < p < 0,50	R: 23 Ng: 17	Gy = 0,627 0,25 < p < 0,50
Rojo vs. Blanco	R: 13 B: 7	R: 18 B: 2	Gy = 3,454 0,05 < p < 0,10	R: 31 B: 9	Gy = 11,597 p < 0,001
Verde vs. Amarillo	V: 8 A: 12	V: 8 A: 12	Gy = 0,000 p = 1,00	V: 16 A: 24	Gy = 1,231 0,25 < p < 0,50
Verde vs. Naranja	V: 9 Nj: 11	V: 8 Nj: 12	Gy = 0,101 0,75 < p < 0,90	V: 17 Nj: 23	Gy = 0,627 0,25 < p < 0,50
Verde vs. Negro	V: 12 Ng: 8	V: 13 Ng: 7	Gy = 0,457 0,25 < p < 0,50	V: 25 Ng: 15	Gy = 2,042 0,10 < p < 0,25
Verde vs. Blanco	V: 16 B: 4	V: 20 B: 0	Gy = 4,139 0,025 < p < 0,05	V: 36 B: 4	Gy = 27,315 p < 0,001
Amarillo vs. Naranja	A: 7 Nj: 13	A: 9 Nj: 11	Gy = 0,410 0,50 < p < 0,75	A: 16 Nj: 24	Gy = 1,231 0,25 < p < 0,50
Amarillo vs. Negro	A: 11 Ng: 9	A: 14 Ng: 6	Gy = 0,427 0,50 < p < 0,75	A: 25 Ng: 15	Gy = 2,042 0,10 < p < 0,25
Amarillo vs. Blanco	A: 19 B:1	A: 19 B: 1	Gy = 0,000 p = 1,00	A: 38 B: 2	Gy = 36,748 p < 0,001
Naranja vs. Negro	Nj: 11 Ng: 9	Nj: 13 Ng: 7	Gy = 0,410 0,50 < p < 0,75	Nj: 24 Ng: 16	Gy = 1,231 0,25 < p < 0,50
Naranja vs. Blanco	Nj: 18 B: 2	Nj: 17 B: 3	Gy = 0,197 0,50 < p < 0,75	Nj: 35 B: 5	Gy = 23,420 p < 0,001
Negro vs. Blanco	Ng: 19 B: 1	Ng: 16 B: 4	Gy = 1,835 0,10 < p < 0,25	Ng: 35 B: 5	Gy = 23,420 p < 0,001

Tabla 3.2. Análisis de las visitas en el experimento 1. Número de visitas registradas sobre esferas coloreadas para cada combinación de colores y para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes. A: amarillo, B: blanco, Ng: negro, Nj: naranja, R: rojo, V: verde.

3.4.2.2. *Visitas.* El número de visitas recibido por cada modelo en cada combinación de formas y para cada cepa se muestra en la Tabla 3.5. Los análisis de heterogeneidad de G no detectaron diferencias entre la cepa MI94 y la cepa Cast191 en ningún caso, por lo que los datos de las dos líneas fueron agrupados. Las pruebas de bondad de ajuste de G muestran que las hembras visitaron todos los modelos en la misma frecuencia.

Combinación de colores	Latencia (ES) MI94	Latencia (ES) Cast191	ANOVA
Rojo vs. Verde	R: 419 (94) V: 347 (59)	R: 279 (76) V: 544 (177)	Color: F = 0,877; p = 0,355 Cepa: F = 0,079; p = 0,780 Int.: F = 2,676; p = 0,111
Rojo vs. Amarillo	R: 384 (104) A: 402 (94)	R: 283 (95) A: 322 (86)	Color: F = 0,077; p = 0,783 Cepa: F = 0,801; p = 0,377 Int.: F = 0,012; p = 0,918
Rojo vs. Naranja	R: 483 (96) Nj: 510 (121)	R: 398 (94) Nj: 341 (144)	Color: F = 0,017; p = 0,896 Cepa: F = 1,238; p = 0,273 Int.: F = 0,134; p = 0,716
Rojo vs. Negro	R: 474 (107) Ng: 697 (101)	R: 547 (98) Ng: 539 (108)	Color: F = 1,017; p = 0,320 Cepa: F = 0,155; p = 0,696 Int.: F = 1,163; p = 0,288
Rojo vs. Blanco	R: 609 (93) B: 496 (128)	R: 556 (79) B: 206 (20)	Color: F = 2,531; p = 0,120 Cepa: F = 1,381; p = 0,248 Int.: F = 0,667; p = 0,419
Verde vs. Amarillo	V: 556 (158) A: 438 (88)	V: 575 (126) A: 189 (50)	Color: F = 0,833; p = 0,367 Cepa: F = 0,005; p = 0,940 Int.: F = 1,823; p = 0,185
Verde vs. Naranja	V: 569 (111) Nj: 437 (82)	V: 230 (80) Nj: 201 (92)	Color: F = 0,041; p = 0,841 Cepa: F = 3,945; p = 0,055 Int.: F = 2,577; p = 0,117
Verde vs. Negro	V: 479 (90) Ng: 631 (123)	V: 710 (75) Ng: 377 (158)	Color: F = 0,671; p = 0,418 Cepa: F = 0,011; p = 0,916 Int.: F = 2,881; p = 0,101
Verde vs. Blanco	V: 469 (78) B: 744 (116)	V: 494 (74) B: -	Color: F = 2,530; p = 0,120
Amarillo vs. Naranja	A: 359 (116) Nj: 403 (71)	A: 359 (87) Nj: 449 (99)	Color: F = 0,087; p = 0,770 Cepa: F = 0,021; p = 0,887 Int.: F = 0,021; p = 0,886
Amarillo vs. Negro	A: 390 (94) Ng: 659 (95)	A: 499 (100) Ng: 602 (120)	Color: F = 2,259; p = 0,141 Cepa: F = 0,130; p = 0,720 Int.: F = 0,354; p = 0,555
Amarillo vs. Blanco	A: 388 (81) B: 260 (0)	A: 438 (81) B: 294 (0)	Color: F = 0,278; p = 0,601 Cepa: F = 0,265; p = 0,872 Int.: F = 0,001; p = 0,976
Naranja vs. Negro	Nj: 694 (96) Ng: 533 (112)	Nj: 525 (91) Ng: 566 (159)	Color: F = 0,270; p = 0,606 Cepa: F = 1,711; p = 0,199 Int.: F = 0,306; p = 0,584
Naranja vs. Blanco	Nj: 400 (75) B: 332 (10)	Nj: 474 (83) B: 357 (131)	Color: F = 0,351; p = 0,557 Cepa: F = 0,101; p = 0,752 Int.: F = 0,025; p = 0,875
Negro vs. Blanco	Ng: 353 (67) B: 253 (0)	Ng: 354 (75) B: 777 (185)	Color: F = 0,559; p = 0,460 Cepa: F = 2,769; p = 0,105 Int.: F = 1,723; p = 0,198

Tabla 3.3. Análisis de la latencia en el experimento 1. Tiempo de latencia promedio registrado para esferas coloreadas en cada combinación de colores para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes. A: amarillo, B: blanco, Ng: negro, Nj: naranja, R: rojo, V: verde.

Combinación de colores	Permanencia (ES) MI94	Permanencia (ES) Cast191	ANOVA
Rojo vs. Verde	R: 113 (37) V: 110 (36)	R: 96 (22) V: 320 (31)	Color: F = 0,212; p = 0,643 Cepa: F = 0,817; p = 0,392 Int.: F = 0,711; p = 0,448
Rojo vs. Amarillo	R: 120 (37) A: 140 (52)	R: 118 (51) A: 123 (50)	Color: F = 0,386; p = 0,539 Cepa: F = 0,044; p = 0,835 Int.: F = 0,059; p = 0,810
Rojo vs. Naranja	R: 184 (53) Nj: 246 (132)	R: 142 (35) Nj: 78 (78)	Color: F = 0,072; p = 0,789 Cepa: F = 1,155; p = 0,289 Int.: F = 0,157; p = 0,694
Rojo vs. Negro	R: 118 (21) Ng: 143 (26)	R: 250 (81) Ng: 211 (94)	Color: F = 0,012; p = 0,913 Cepa: F = 2,297; p = 0,138 Int.: F = 0,227; p = 0,636
Rojo vs. Blanco	R: 206 (54) B: 508 (227)	R: 150 (52) B: 1038 (942)	Color: F = 5,819; p = 0,021 Cepa: F = 0,024; p = 0,879 Int.: F = 1,055; p = 0,311
Verde vs. Amarillo	V: 108 (24) A: 376 (38)	V: 277 (51) A: 225 (57)	Color: F = 2,431; p = 0,124 Cepa: F = 1,295; p = 0,263 Int.: F = 1,760; p = 0,193
Verde vs. Naranja	V: 182 (75) Nj: 311 (107)	V: 78 (15) Nj: 158 (56)	Color: F = 1,838; p = 0,184 Cepa: F = 2,810; p = 0,102 Int.: F = 0,098; p = 0,756
Verde vs. Negro	V: 174 (62) Ng: 317 (112)	V: 289 (90) Ng: 351 (124)	Color: F = 0,996; p = 0,325 Cepa: F = 0,526; p = 0,473 Int.: F = 0,159; p = 0,691
Verde vs. Blanco	V: 109(32) B: 440 (63)	V: 156 (40) B: -	Color: F = 13,616; p = 0,001
Amarillo vs. Naranja	A: 240 (113) Nj: 233 (68)	A: 210 (75) Nj: 125 (30)	Color: F = 0,413; p = 0,525 Cepa: F = 0,941; p = 0,338 Int.: F = 0,301; p = 0,587
Amarillo vs. Negro	A: 176 (46) Ng: 182 (87)	A: 233 (68) Ng: 291 (186)	Color: F = 0,091; p = 0,764 Cepa: F = 0,751; p = 0,391 Int.: F = 0,054; p = 0,817
Amarillo vs. Blanco	A: 189 (64) B: 296 (0)	A: 251 (91) B: 588 (0)	Color: F = 0,796; p = 0,378 Cepa: F = 0,505; p = 0,482 Int.: F = 0,214; p = 0,647
Naranja vs. Negro	Nj: 242 (82) Ng: 339 (127)	Nj: 173 (54) Ng: 170 (26)	Color: F = 0,067; p = 0,798 Cepa: F = 0,710; p = 0,405 Int.: F = 1,260; p = 0,269
Naranja vs. Blanco	Nj: 158 (37) B: 102 (58)	Nj: 174 (36) B: 124 (36)	Color: F = 0,549; p = 0,463 Cepa: F = 0,071; p = 0,791 Int.: F = 0,002; p = 0,968
Negro vs. Blanco	Ng: 132 (31) B: 210 (0)	Ng: 210 (29) B: 222 (45)	Color: F = 0,393; p = 0,535 Cepa: F = 0,593; p = 0,446 Int.: F = 0,207; p = 0,652

Tabla 3.4. Análisis de la permanencia para el experimento 1. Tiempo de permanencia registrado sobre esferas coloreadas en cada combinación de colores y para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes. A: amarillo, B: blanco, Ng: negro, Nj: naranja, R: rojo, V: verde.

3.4.2.3. *Latencia.* Las comparaciones de los valores de latencia entre formas y entre cepas (Cast191 y MI94) no detectaron diferencias significativas en ninguna de las combinaciones de forma analizadas (Tabla 3.6).

3.4.2.4. *Permanencia.* En ninguna de las tres combinaciones de formas se encontraron diferencias significativas entre los modelos o entre cepas (Cast191 y MI94) en el tiempo de permanencia (Tabla 3.7).

Combinación de formas	MI94 # visitas	Cast191 # visitas	Prueba G de heterogeneidad	# visitas totales	Prueba G de bondad de ajuste
Círculo vs. Óvalo 1	C: 13 O1: 7	C: 11 O1: 9	Gy = 0,410 0,50 < p < 0,75	C: 24 O1: 16	Gy = 1,231 0,25 < p < 0,50
Círculos vs. Óvalo 2	C: 12 O2: 8	C: 11 O2: 9	Gy = 0,101 0,75 < p < 0,90	C: 23 O2: 17	Gy = 0,627 0,25 < p < 0,50
Óvalo 1 vs. Óvalo 2	O1: 9 O2: 11	O1: 8 O2: 12	Gy = 0,101 0,75 < p < 0,90	O1: 17 O2: 23	Gy = 0,627 0,25 < p < 0,50

Tabla 3.5. Análisis de las visitas en el experimento 2. Número de visitas registradas sobre modelos de distinta forma para cada combinación de formas y para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes. C: círculo, O1: óvalo 1, O2: óvalo 2.

Combinación de formas	Latencia (ES) MI94	Latencia (ES) Cast191	ANOVA
Círculo vs. Óvalo 1	C: 213 (44) O1: 139 (62)	C: 364 (88) O1: 178 (67)	Forma: F = 3,526; p = 0,068 Cepa: F = 1,866; p = 0,180 Int.: F = 0,658; p = 0,422
Círculos vs. Óvalo 2	C: 252 (85) O2: 285 (93)	C: 279 (78) O2: 261 (89)	Forma: F = 0,008; p = 0,930 Cepa: F = 0,001; p = 0,988 Int.: F = 0,086; p = 0,770
Óvalo 1 vs. Óvalo 2	O1: 206 (58) O2: 122 (32)	O1: 115 (40) O2: 218 (58)	Forma F = 0,009; p = 0,924 Cepa: F = 0,021; p = 0,885 Int.: F = 3,877; p = 0,057

Tabla 3.6. Análisis de la latencia en el experimento 2. Tiempo de latencia promedio registrado para modelos de distinta forma en cada combinación de modelos para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes. C: círculo, O1: óvalo 1, O2: óvalo 2.

Combinación de formas	Permanencia (ES) MI94	Permanencia (ES) Cast191	ANOVA
Círculo vs. Óvalo 1	C: 314 (68) O1: 109 (23)	C: 379 (98) O1: 291 (114)	Forma: F = 2,682; p = 0,110 Cepa: F = 1,921; p = 0,174 Int.: F = 0,422; p = 0,520
Círculos vs. Óvalo 2	C: 241 (82) O2: 180 (41)	C: 209 (53) O2: 188 (79)	Forma: F = 0,341; p = 0,563 Cepa: F = 0,032; p = 0,860 Int.: F = 0,080; p = 0,778
Óvalo 1 vs. Óvalo 2	O1: 109 (27) O2: 119 (39)	O1: 93 (20) O2: 148 (49)	Forma: F = 0,677; p = 0,416 Cepa: F = 0,029; p = 0,866 Int.: F = 0,304; p = 0,585

Tabla 3.7. Análisis de la permanencia para el experimento 2. Tiempo de permanencia registrado sobre modelos de distinta forma, en cada combinación de formas y para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes. C: círculo, O1: óvalo 1, O2: óvalo 2.

3.4.3. Experimento 3. Importancia del tamaño como clave visual

3.4.3.1. *Control de posición.* No se encontró ninguna posición dentro de la jaulas en que las esferas de distinto tamaño recibieran un número de visitas mayor que el esperado por azar ($G = 1,22$, $0,50 < p < 0,75$). Al analizar los tiempos de latencia registrados en cada una de las cuatro posiciones no se detectaron diferencias significativas (ANOVA: F = 0,251, $p = 0,860$). Los mismos resultados se verificaron al analizar los tiempos de permanencia (ANOVA: F = 1,819, $p = 0,148$).

3.4.3.2. *Visitas.* La cantidad de visitas recibidas por cada esfera en cada combinación de tamaño y para cada cepa se muestra en la Tabla 3.8. Los análisis de heterogeneidad de G no detectaron diferencias entre la cepa MI94 y la cepa Cast191 en ningún caso, por lo que los datos de las dos líneas fueron agrupados. Las pruebas de bondad de ajuste de G muestran que las hembras enfrentadas ante esferas de 3 cm y 9 cm de diámetro visitaron estas últimas en mayor frecuencia que lo esperado por azar. Las otras dos combinaciones de tamaños mostraron diferencias no significativas en el número de visitas recibidas.

3.4.3.3. *Latencia.* Los valores de latencia registrados sobre las esferas no mostraron diferencias entre las dos cepas (Cast191 y MI94) ni entre los tamaños comparados, para las combinaciones de 3 cm y 6 cm de diámetro, y de 6 cm y 9 cm de diámetro (Tabla 3.9). Para la combinación de 3 cm y 9 cm de diámetro el ANOVA de dos vías detecto

una interacción significativa: la latencia mostrada por hembras que visitaron esferas de 3 cm fue mayor en Cast191 y menor en MI94, que la latencia de las hembras que visitaron las esferas de 9 cm (Tabla 3.9).

Combinación de tamaños	MI94 # visitas	Cast191 # visitas	Prueba G de heterogeneidad	# visitas totales	Prueba G de bondad de ajuste
3cm vs. 6cm	3cm: 9 6cm: 11	3cm: 6 6cm: 14	Gy = 0,942 0,25 < p < 0,50	3cm: 25 6cm: 15	Gy = 2,042 0,10 < p < 0,25
3cm vs. 9cm	3cm: 4 9cm: 16	3cm: 3 9cm: 17	Gy = 0,157 0,10 < p < 0,25	3cm: 7 9cm: 33	Gy = 16,846 p < 0,001
6cm vs. 9cm	6cm: 8 9cm: 12	6cm: 8 9cm: 12	Gy = 0,000 p = 1,00	6cm: 16 9cm: 24	Gy = 1,231 0,25 < p < 0,50

Tabla 3.8. Análisis de las visitas en el experimento 3. Número de visitas registradas sobre modelos de distinto tamaño, para cada combinación de los mismos y para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes.

Combinación de formas	Latencia (ES) MI94	Latencia (ES) Cast191	ANOVA
3cm vs. 6cm	3cm: 198 (77) 6cm: 122 (47)	3cm: 55 (11) 6cm: 181 (71)	Tamaño: F = 0,613; p = 0,438 Cepa: F = 1,077; p = 0,306 Int.: F = 1,498; p = 0,228
3cm vs. 9cm	3cm: 126 (73) 9cm: 214 (67)	3cm: 557 (71) 9cm: 108 (36)	Tamaño: F = 4,075; p = 0,051 Cepa: F = 3,348; p = 0,076 Int.: F = 8,360; p = 0,007
6cm vs. 9cm	6cm: 214 (99) 9cm: 213 (54)	6cm: 174 (72) 9cm: 365 (101)	Tamaño: F = 1,213; p = 0,280 Cepa: F = 0,416; p = 0,523 Int.: F = 1,241; p = 0,273

Tabla 3.9. Análisis de la latencia en el experimento 3. Tiempo de latencia promedio registrado para modelos de distinto tamaño en cada combinación de modelos y para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes.

3.4.3.4. *Permanencia.* En ninguna de las tres combinaciones de tamaño se encontraron diferencias significativas entre los modelos o entre cepas (Cast191 y MI94) en el tiempo de permanencia (Tabla 3.10).

3.4.4. Experimento 4. Preferencia Grises

3.4.4.1. *Control de posición.* No se encontró ninguna posición dentro de la jaula en que las esferas grises recibieran un número de visitas mayor al esperado por azar ($G = 1,32$, $0,50 < p < 0,75$). Al analizar los tiempos de latencia registrados en cada una de las cuatro posiciones no se detectaron diferencias significativas entre estas (ANOVA: F =

1,253, $p = 0,307$). Los mismos resultados se verificaron al analizar los tiempos de permanencia (ANOVA: $F = 0,059$, $p = 0,626$).

3.4.4.2. *Visitas*. La cantidad de visitas recibidas por cada esfera gris se muestra en la Figura 3.2. Los análisis de heterogeneidad de G no detectaron diferencias entre la cepa MI94 y la cepa Cast191 (Prueba G de heterogeneidad: $G = 0,401$; $0,50 < p < 0,75$), por lo que los datos de las dos cepas fueron agrupados. El número total de visitas recibidas por cada tonalidad de gris no difirió del esperado bajo una hipótesis de igual proporción de visitas (Prueba de bondad de ajuste de G: $G_y = 1,231$; $0,25 < p < 0,50$, Figura 3.2).

Combinación de formas	Permanencia (ES) MI94	Permanencia (ES) Cast191	ANOVA
3cm vs. 6cm	3cm: 158 (34) 6cm: 236 (32)	3cm: 148 (57) 6cm: 249 (54)	Tamaño: $F = 0,132$; $p = 0,718$ Cepa: $F = 0,372$; $p = 0,546$ Int.: $F = 2,117$; $p = 0,154$
3cm vs. 9cm	3cm: 111 (16) 9cm: 199 (38)	3cm: 285 (16) 6cm: 211 (38)	Tamaño: $F = 0,008$; $p = 0,831$ Cepa: $F = 1,507$; $p = 0,228$ Int.: $F = 1,128$; $p = 0,295$
6cm vs. 9cm	6cm: 153 (36) 9cm: 171 (43)	6cm: 319 (117) 9cm: 139 (25)	Tamaño: $F = 1,936$; $p = 0,172$ Cepa: $F = 1,324$; $p = 0,257$ Int.: $F = 2,908$; $p = 0,097$

Tabla 3.10. Análisis de la permanencia para el experimento 3. Tiempo de permanencia registrado sobre modelos de distinto tamaño, en cada combinación de modelos y para las dos cepas utilizadas, y resultado de las pruebas estadísticas realizadas con el valor del estadístico y el valor P correspondientes.

3.4.4.3. *Latencia*. Las comparaciones de los valores de latencia entre las dos tonalidades de gris y entre cepas (Cast191 y MI94) no detectaron diferencias significativas en estos tiempos (ANOVA: cepa: $F = 2,762$, $p = 0,105$; gris: $F = 0,348$, $p = 0,559$; interacción: $F = 1,189$, $p = 0,283$, Figura 3.2).

3.4.4.4. *Permanencia*. Los tiempos de permanencia registrados sobre esferas de las dos tonalidades de gris no fueron estadísticamente significativos, tanto para la cepa MI94, como para la cepa Cast191 (ANOVA: cepa: $F = 0,041$, $p = 0,840$; gris: $F = 0,221$, $p = 0,641$; interacción: $F = 0,041$, $p = 0,840$, Figura 3.2).

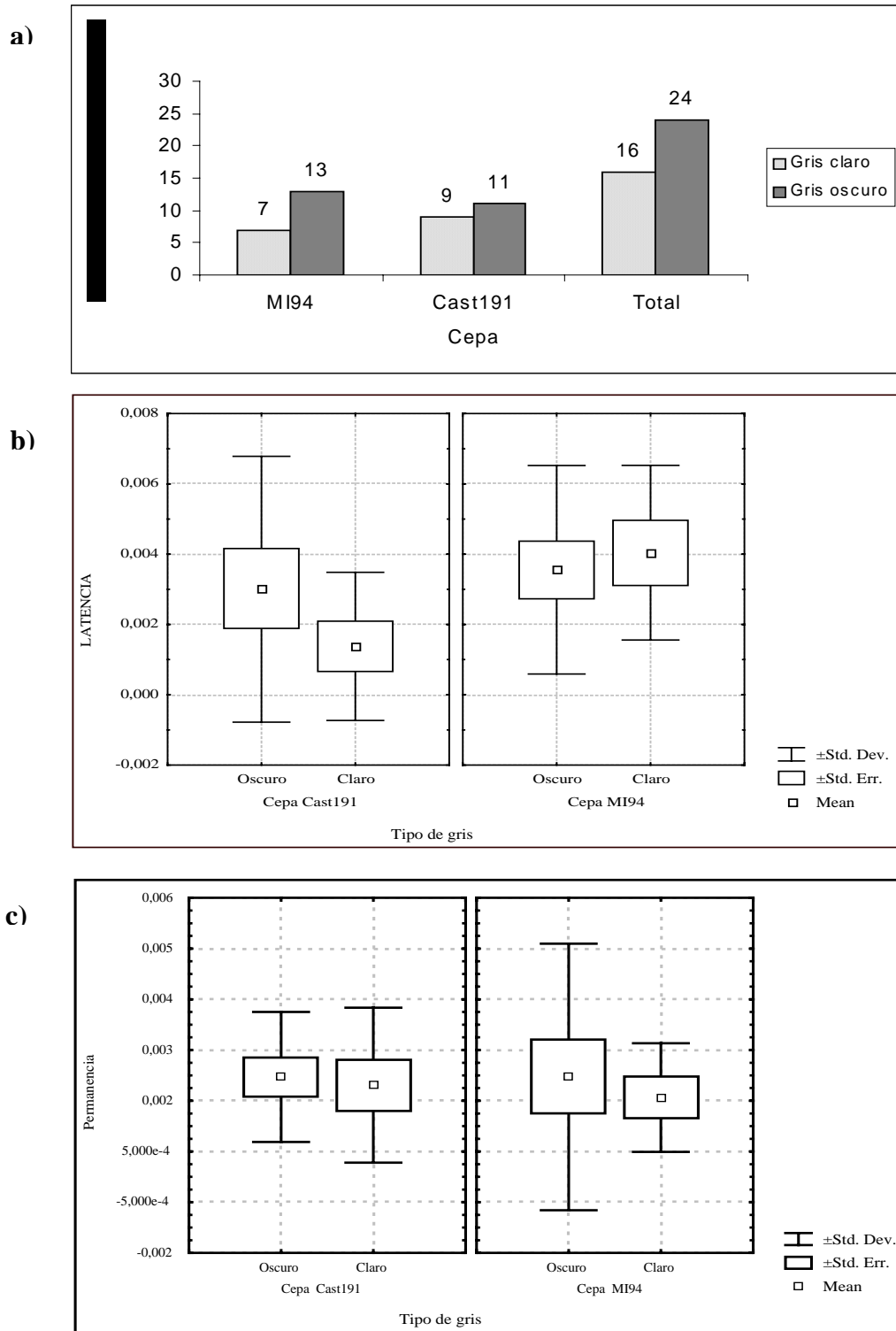


Figura 3.2. Vistas, latencia y permanencia en el experimento 4. a) número de visitas recibidas por las esferas grises por hembras de las dos cepas, b) latencia en cada tipo de esfera y para cada cepa, y c) permanencia en cada tipo de esfera y para cada cepa.

3.5. Discusión

Los resultados de los ensayos realizados sugieren que *D. longicaudata* no posee un patrón de preferencia innato por modelos de distinto color (a excepción del blanco), de distinta forma, o con distinto grado de intensidad lumínica. En cambio, el tamaño sí parece ser importante para las hembras sin experiencia. Los ensayos realizados con esferas de dos tonalidades distintas de grises muestran que no existe preferencia en hembras *naïve* por modelos con mayor intensidad lumínica. Esto permite concluir que en los ensayos con esferas de color la decisión de la hembra no se vio afectada por la diferente luminosidad de cada opción. Al comparar los resultados obtenidos en ambas cepas no se encontraron diferencias significativas, es decir que las hembras respondieron de manera semejante ante los estímulos ofrecidos.

Existen tres receptores visuales comúnmente encontrados en los himenópteros. Uno es sensible a las longitudes de onda (λ) correspondientes a la luz UV, uno a las λ cercanas al azul y otro a las λ cercanas al verde-amarillo. No obstante, algunos himenópteros poseen un receptor adicional, sensible a λ cercanas al rojo (Peitsch 1992). Para que un individuo pueda discriminar entre dos colores cualquiera, debe haber por lo menos dos receptores sensibles en el rango en que se encuentran estos dos colores (Chittka, comunicación personal). Por lo tanto los individuos podrán discriminar más o menos colores dependiendo de si tienen 3 o 4 tipos de receptores. En cualquiera de los dos casos, se esperaba que las hembras de *D. longicaudata* fueran capaces de discernir entre colores y mostraran algún patrón de preferencia innato por ellos. No obstante, las hembras sólo mostraron diferencias en la tasa de visita cuando uno de los dos colores era el blanco. Teniendo en cuenta que el color de las paredes y el cielorraso de la sala de experimentación era blanco, no se puede asegurar que las hembras hayan evitado las esferas blancas, pues estas pudieron haberse confundido con el entorno, es decir que el resultado podría ser el producto de un problema de detectabilidad más que de preferencia. En un ensayo posterior (datos no mostrados) en que se comparó la visita hacia esferas verdes y blancas, cambiando el color de fondo a verde (forrando de papel verde las paredes de la sala) las diferencias entre blanco y verde fueron revertidas. Esto hace suponer, que las hembras no visitaron las esferas blancas por una falta de

preferencia, sino porque su baja detectabilidad hizo imposible que más hembras lo eligieran.

Analizando las combinaciones que no incluyeron al blanco, no se encontró un patrón claro de preferencia. Este ensayo no permite distinguir entre capacidad de discriminar colores y preferencia entre colores, pero la información disponible para otros himenópteros permite suponer que *D. longicaudata* tiene la capacidad óptica para discriminar entre las diferentes λ presentadas aquí. El resultado obtenido se explica mejor diciendo que las hembras no poseen un patrón prefijado de preferencia por distintos colores.

Este estudio estuvo centrado solo en aquellas hembras que fueron atraídas hacia los modelos ofrecidos y que mostraron sobre ellos un comportamiento de búsqueda de hospedadores, usando, como indicadores de este comportamiento, patrones típicos de búsqueda descritos previamente (Lawrence 1981, Bautista y Harris 1997, Montoya et al 2003). Bajo condiciones más naturales, Leyva et al. (1991) tampoco encontraron un patrón de preferencia por color en hembras *naïve* de esta especie. Por otro lado, Messing y Jang (1992) y Cornelius et al. (1999) encontraron que *D. longicaudata* prefirió modelos amarillos sobre modelos de otros colores (azul, negro, rojo, y verde). Sin embargo, estos estudios no estuvieron limitados a hembras que mostraran comportamientos de forrajeo, más aún, los mismos patrones se encontraron tanto para hembras como para machos. Probablemente, la preferencia por el color amarillo represente una respuesta general de *D. longicaudata* al color, pero los resultados del presente estudio sugieren fuertemente que las hembras de esta especie no poseen una preferencia innata por color cuando buscan hospedadores.

Al analizar la respuesta de las hembras sin experiencia por modelos de tres formas distintas se encontró que éstas no muestran preferencia por las formas presentadas. Estas formas fueron pensadas en función de las distintas formas de frutos que se suelen encontrar en la naturaleza: naranja, durazno, ciruela, etc. (formas circulares); pera, higo, mango, etc. (óvalo 1), y mamón, palta, banana, etc. (óvalo 2). Aparentemente, no habría preferencias en hembras sin experiencia por distintas frutas sobre la base de su forma.

Los resultados obtenidos en los ensayos de forma y color pueden ser explicados bajo la hipótesis de que especies generalistas deben tener mayor plasticidad que las especialistas en su respuesta ante diversos estímulos (Stireman 2002). *Diachasmimorpha longicaudata* es un parasitoide ampliamente generalista, cuyos hospedadores son, a su vez, también generalistas. Esto hace que la cantidad de frutos en los que este parasitoide puede encontrar a sus hospedadores sea muy variable en su aspecto físico. En este contexto, una buena estrategia sería la de no valerse únicamente de patrones de búsqueda prefijados, al menos en variables como color y forma, que pueden cambiar ampliamente. En estos casos, la mejor opción puede ser la de ir fijando valores para estas variables a medida que la hembra va encontrando larvas asociadas a un determinado valor (por ejemplo, color naranja). Es decir, que si la hembra encuentra repetidas veces larvas asociadas a un fruto de color naranja, entonces utilizar esa información durante el forrajeo (mediante algún mecanismo de asociación) le permitiría reducir el número de sitios donde buscar. En cambio, un parasitoide de hábito especialista, cuyos hospedadores estén habitualmente asociados sólo a un determinado fruto, debería tener una gran capacidad de discriminar entre colores para poder encontrar al hospedador de forma más eficiente. En estos casos una respuesta innata a la forma o al color del hábitat donde su hospedador se encuentra habitualmente le conferiría una ventaja inmediata. No obstante, para asegurar que la ausencia de un patrón de búsqueda respecto al color o la forma de los frutos es la razón por la cual se encontraron los resultados de este estudio, se debe probar que las hembras poseen la capacidad óptica y neuronal de discriminar entre los modelos ofrecidos, y que, a pesar de tener esta capacidad, las hembras deciden no visitar uno de los modelos en mayor frecuencia que los otros.

Coincidiendo con estudios previos (Leyva et al. 1991, Sivinski 1991), las hembras *naïve* de *D. longicaudata* mostraron una marcada preferencia por esferas de mayor tamaño. Este resultado podría ser considerado contradictorio si la fruta estuviera actuando como un refugio para las larvas hospedadoras (Hoffmeister et al. 1999, y referencias incluidas allí). Bajo este supuesto, un incremento en el tamaño de la fruta debería ser seguido de un decremento en el porcentaje de parasitismo (asociado a un incremento en el refugio de las larvas). De hecho, varios muestreos de fruta infestada

por larvas de moscas de la fruta informan que frutas más grandes poseen una tasa de parasitismo menor (Hernández-Ortíz et al. 1994, Aguiar-Menezes y Menezes 1997, Carrejo y González 1999, López et al. 1999, Sivinski et al. 2000, Ovruski et al. 2004, 2005). Por lo tanto, como la eficacia de las hembras es mayor en frutas pequeñas se debería esperar que las hembras tiendan a visitar las esferas más chicas (3 cm). No obstante, si se considera que una fruta grande tiene capacidad para más larvas hospedadoras, entonces el número total de huevos dejados por una hembra (el cual está directamente asociado a su éxito reproductivo) que visita frutos grandes sería mayor que el de aquella que visita un fruto pequeño, y esto podría explicar la preferencia de las hembras por las esferas más grandes. Obviamente, otros factores como la distancia entre frutos, la distribución espacial de las larvas, y la habilidad de vuelo de los parasitoides hembra pueden afectar el rédito asociado a forrajear sobre frutos grandes o pequeños.

La preferencia por parte de este parasitoide por esferas de mayor tamaño puede corresponderse también con el hecho de que, a diferencia de otros parasitoides de moscas de la fruta, *D. longicaudata* posee un largo ovipositor. Esto le permitiría parasitar larvas exitosamente en una mayor cantidad de especies frutales (López et al. 1999, Sivinski et al. 2000, Ovruski datos no publicados). Aparentemente, esto le confiere una ventaja sobre otras especies de parasitoides nativos de moscas de la fruta, cuando las larvas se encuentran en frutos grandes y exóticos (Eben et al. 2000, Sivinski et al. 2001). Los resultados presentados en este estudio tienen una importante implicancia para utilizar *D. longicaudata* en el control de moscas de la fruta en Argentina. De acuerdo a Ovruski et al. (2003, 2004) en el Noroeste de Argentina, las poblaciones de *C. capitata* se encuentran asociadas principalmente a varias especies exóticas de frutos grandes (por ejemplo, especies del género *Citrus*) que limitan el ataque de los parasitoides nativos a las larvas alojadas dentro de sus frutos. Además, Putruele (1996) y Segura et al. (2006) mostraron que, en Argentina, *C. capitata* predomina en especies introducidas de frutos medianos y grandes. Por lo tanto, liberaciones aumentativas de *D. longicaudata* podrían ser utilizadas para suprimir a la mosca del Mediterráneo en áreas naturales en que esta plaga está establecida principalmente usando como hospedadores especies frutales de los géneros *Prunus* spp. y *Citrus* spp.

La preferencia inferida a partir de los tiempos de latencia y permanencia no muestra, en términos generales, colores, formas o tamaños en los cuales la visita se produzca más rápidamente que otros o en los cuales las hembras hayan decidido pasar mayor cantidad de tiempo. Se esperaba que estas dos variables pudieran reflejar la preferencia de las hembras, junto con el patrón de visitas. Es decir, se esperaba que aquellos modelos visitados más frecuentemente sean también aquellos que las hembras visiten más rápido y que en ellos las hembras pasen más tiempo buscando. No obstante, estas diferencias no se detectaron en el experimento 3, en el cual sí se detectó una mayor visita a modelos de 9cm de diámetro. Esto podría reflejar el hecho de que estas dos variables no se vean afectadas por las preferencias de las hembras.

Los resultados obtenidos al comparar las hembras de las dos cepas (MI94 y Cast191) mostraron que las diferencias en el sustrato de cría que existe entre cepas no producen diferencias en la respuesta de las hembras, al menos en los patrones de comportamiento evaluados en los cuatro experimentos y a través de las tres variables estudiadas. Esto tiene importantes implicancias dentro del marco de la utilización conjunta de dos métodos de control no contaminantes: la TIE y el CB. De estos resultados, se desprende que la cría del parasitoide sobre larvas hembras de *C. capitata* de la línea de sexado genético Cast191 no afectó el comportamiento de las hembras del parasitoide frente a diversos estímulos visuales, con respecto a los parámetros encontrados en los parasitoides criados sobre una línea salvaje de *C. capitata*.

En el presente estudio se describió la respuesta del parasitoide *D. longicaudata* ante estímulos visuales que imitan aquellos producidos por el hábitat de su hospedador. Se encontró que algunos estímulos desencadenan una respuesta innata en las hembras (como el tamaño), mientras que para otros la respuesta de la hembra no permitió detectar patrones de preferencia (como el color o la forma). Estos estudios fueron realizados en condiciones de laboratorio, utilizando un diseño experimental que tendió a minimizar posibles efectos posicionales en la respuesta de las hembras. La ausencia de este efecto fue corroborada mediante un exhaustivo análisis en el que no se detectaron diferencias entre las cuatro posiciones dentro de la jaula en la visita, ni en los tiempos de latencia ni permanencia, mostrando así que la posición no tuvo un efecto sobre la actividad de las hembras.

Teniendo en cuenta el hábito generalista de este parasitoide sería interesante estudiar la respuesta de las hembras ante los mismos estímulos, pero luego de someterla a eventos de forrajeo exitosos en los que alguna de las opciones ofrecidas fuera presentada junto con las larvas hospedadoras. Asimismo, sería importante repetir estos ensayos bajo condiciones de luz natural, para determinar la importancia de este factor en la preferencia de las hembras.

4. Importancia de la experiencia previa en la utilización de claves visuales por *Diachasmimorpha longicaudata*

4.1. Introducción

La respuesta innata de los parasitoides a determinados estímulos puede verse modificada por el estado interno de las hembras (edad, carga de huevos, y estado nutricional), por variación genética intrínseca, y por la experiencia previa que haya adquirido la hembra (Vet y Dicke 1992). El aprendizaje, definido como un cambio en el comportamiento individual de un parasitoide provocado por la experiencia (*sensu* Wardle 1990), ha sido documentado para varias especies de parasitoides (Vet y Groenewold 1990, Turlings et al. 1993, Vet et al. 1995, Lewis et al. 1998), y parece ser una característica ampliamente distribuida entre las especies del orden Hymenoptera (Chittka y Menzel 1992). Algunos parasitoides muestran un incremento general de su respuesta ante diversos estímulos luego de adquirir cierta experiencia (un fenómeno llamado sensibilización o *priming*), mientras otros son capaces de asociar un nuevo estímulo (alguna señal asociada al hospedador) con la presencia del hospedador (un fenómeno llamado aprendizaje asociativo) (Turlings et al. 1993).

El aprendizaje de señales asociadas a la presencia del hospedador sería de particular importancia para especies de parasitoides generalistas. Este mecanismo les permitiría a las hembras manejar la gran variabilidad de señales directas producidas por sus hospedadores o indirectas provenientes de las plantas de las que se alimentan los hospedadores (Wäckers y Lewis 1994, Steidle 1998), y responder a fluctuaciones en la abundancia de sus recursos potenciales (Stireman 2002). Evidencia empírica muestra que el aprendizaje permite a los parasitoides incrementar su éxito reproductivo (Steidle 1998, Dukas y Duan 2000).

Los estudios relacionados al aprendizaje de señales en parasitoides han estado orientados principalmente al aprendizaje de señales de tipo químico (Vinson et al. 1977, Wardle y Borden 1989, Turlings et al. 1989, 1990, Takasu y Lewis 1996, Iizuka y

Takasu 1998, McGregor y Henderson 1998, Olson et al. 2003). Aún cuando las claves visuales del hospedador suelen ser limitadas, el aprendizaje asociativo de señales visuales del hábitat del hospedador puede permitirles a los parasitoides explotar información visual durante su búsqueda (Turlings et al. 1993). A pesar de esto, la información acerca de la importancia del aprendizaje de claves visuales en parasitoides himenópteros es limitada (Wäckers y Lewis 1994), y centrada principalmente en el aprendizaje de colores (Wardle 1990, Wäckers y Lewis 1994, Brown et al. 1998, Wäckers y Lewis 1999, Oliai y King 2000). Wardle (1990) y Shafir (1996) hicieron una importante diferenciación, y consiguieron probar que el aprendizaje de colores está basado en la capacidad de aprender la tonalidad de los colores y no su luminosidad. El aprendizaje de formas y patrones asociados a los hospedadores ha sido estudiado en menor medida (Wardle y Borden 1990, Wäckers y Lewis 1999).

Para el parasitoide *D. longicaudata*, los patrones de preferencia por señales visuales sólo fueron analizados en hembras sin experiencia, de manera que sólo se conoce su respuesta innata (Leyva et al. 1991, Sivinski 1991, Messing y Jang 1992), y con resultados contradictorios respecto a la preferencia por color. En el Capítulo 3 se ha mostrado que no existe un patrón de preferencia, al menos para los colores y condiciones experimentales utilizadas. Lo mismo fue encontrado para la forma de los modelos. Sólo se encontró, coincidiendo con trabajos previos (Sivinski 1991, Vargas et al. 1991), una preferencia innata por los modelos de mayor tamaño. Dado el gran número de hospedadores que posee este parasitoide (y que muchos de sus hospedadores son, a su vez, frugívoros polífagos), el aprendizaje asociativo aparece como una estrategia altamente ventajosa, pero ningún estudio ha considerado su importancia hasta el presente.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo general

Estudiar la importancia de la experiencia previa durante la vida de las hembras en su patrón de preferencia por distintas claves visuales.

4.2.2. Objetivos particulares

- 1) Analizar el efecto que la experiencia previa tiene sobre los patrones de preferencia por color y forma encontrados en hembras *naïve* (Capítulo 3)
- 2) Analizar la influencia de la intensidad de la experiencia previa, y del tiempo transcurrido desde el último evento de oviposición sobre los patrones de preferencia hacia estas señales.
- 3) Estudiar cómo interactúan las señales visuales que son utilizadas por las hembras durante el proceso de búsqueda de hospedadores.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1 Insectos

Se sometieron hembras de *D. longicaudata* de 5-7 días de edad de las crías que se mantienen en el IGEAF (INTA Castelar), a distintos tratamientos previos (de acuerdo al experimento), y luego se las analizó en una arena experimental. Desde su emergencia, durante el tratamiento previo, y hasta su utilización en los ensayos, las hembras se mantuvieron en frascos de 3lts con machos, miel y agua, bajo condiciones controladas (T: 25°; Hr: 60%-70%; fotoperíodo: 14-10). Las cepas utilizadas para la cría del parasitoide y los métodos de cría empleados fueron los descritos en el Capítulo 3. Dado que las dos cepas (Cast191 y MI94) no mostraron diferencias en su respuesta ante estímulos visuales luego del exhaustivo análisis realizado en el Capítulo 3, se decidió trabajar indistintamente con hembras de las dos cepas, tratando de analizar en cada ensayo una cantidad de hembras similar de cada cepa. No obstante, debido a la disponibilidad fluctuante de insectos de cada cepa en el laboratorio, no se pudo asegurar un 50% exacto de cada cepa en todos los ensayos.

4.3.2. Condiciones experimentales

Los experimentos fueron conducidos en la sala descrita en el Capítulo 3 (14 mts², paredes y cielorraso blanco, 12 tubos luz día de 40W). La temperatura se mantuvo constante a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) y la humedad relativa a 65% ($\pm 5\%$). Todas las observaciones se realizaron en las jaulas de elección descritas en el Capítulo 3 (Figura 4.1).

4.3.3. Procedimiento general en los ensayos de elección

Durante el ensayo, cada hembra se expuso ante dos opciones ubicadas dentro de la jaula. Cada opción fue colocada a 10cm de una de las esquinas, quedando ambas

opciones enfrentadas con la abertura por donde se introducen las hembras (Figura 4.1). Cada modelo presentó una opción de la clave estudiada.

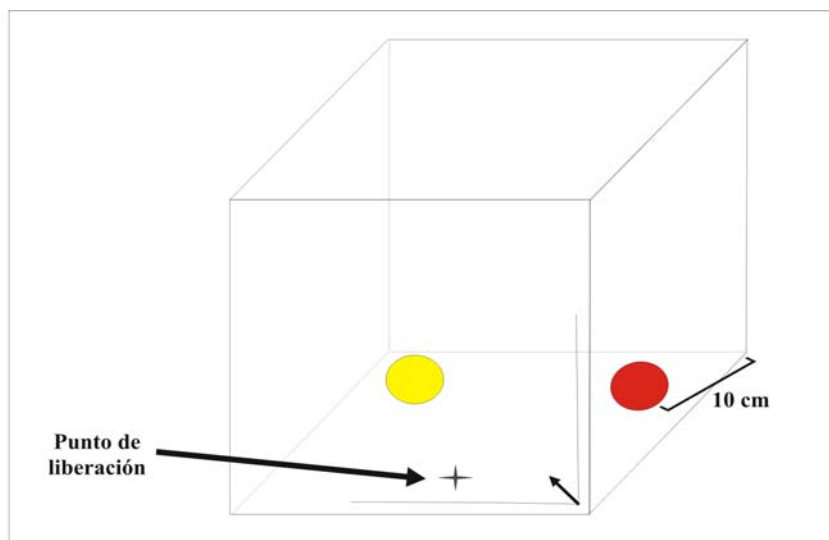


Figura 4.1. Disposición de las unidades de oviposición dentro de la jaula de elección.

En forma individual, las hembras fueron suavemente transferidas dentro de la jaula y liberadas sobre el piso, a 5cm de la pared donde se halla la abertura y en la línea media de la jaula, de manera que se encontraba a igual distancia de los dos modelos. Para su liberación se empleó un aspirador entomológico. Se consideró que una hembra realizó una elección si esta visitó el modelo dentro de los 10 minutos desde su liberación, y si exhibió comportamientos de búsqueda de hospedadores (antenación y/o sondeo con el ovipositor, Lawrence 1981) al menos durante 30 segundos después de posarse sobre el modelo. Para cada hembra (réplica), se registraron dos variables: 1) Latencia (cantidad de tiempo desde que fue liberada hasta que aterrizó sobre un modelo) y, 2) el modelo elegido. Los tiempos de permanencia no fueron estudiados en estos ensayos debido a que excedían el tiempo de observación asignado a cada hembra (> 10 minutos).

Al completarse la observación la hembra era removida de la jaula y se liberaba una nueva hembra. Con cada nueva hembra, los modelos fueron cambiados de lado

(izquierda por derecha, y viceversa) para evitar un posible efecto de la posición de los modelos sobre la preferencia de las hembras. Luego de que 5 hembras visitaran algún modelo, estos eran reemplazados por un nuevo par de modelos.

4.3.4. Experimentos realizados

4.3.4.1. Experimento 1. Influencia de la experiencia de ovipostura sobre la preferencia por color

a) Priming

Con el objetivo de analizar si un contacto previo con larvas hospedadoras tiene algún efecto sobre la preferencia por color, hembras de *D. longicaudata* fueron colocadas en presencia de larvas de *C. capitata* del tercer estadio. Las larvas fueron presentadas en una unidad de oviposición (UO, cajas de Petri pequeñas de 5 cm de diámetro) forrada con tela blanca durante 6 horas. Al día siguiente, se realizó el ensayo de elección, el cual consistió en ofrecerles simultáneamente dos UOs de distinto color dentro de la arena experimental. Las UOs contaban con dieta fresca (sin larvas) y estaban forradas en tela de color. Los colores usados fueron: amarillo, naranja, negro, rojo y verde (Tabla 4.1). La tela utilizada fue acrocel. Para cada tratamiento se analizaron 40 hembras.

Color de la tela	L	a	b
Negro	14.31	0.16	-3.10
Verde	42.03	-35.25	26.56
Naranja	51.79	40.12	37.60
Rojo	36.79	50.86	22.39
Amarillo	73.63	6.33	49.52
Gris oscuro	25.29	1.32	-3.55
Gris claro	67.22	2.10	3.06

Tabla 4.1. Características espectrales utilizadas para cuantificar el color de las UOs. Los parámetros L, a, y b fueron determinados usando un Colorímetro BYK Gardner Color View modelo 9000.

b) Experiencia sostenida sobre una determinada clave

Con el objetivo de analizar el efecto que tiene encontrar larvas asociadas a un color determinado en eventos de forrajeo previos, parasitoides hembra de 5-7 días desde la emergencia fueron expuestas durante 3 días consecutivos ante UOs envueltas en tela de

un determinado color. Cada día, una nueva UO fue colocada en el frasco que contenía las hembras y fue dejada allí por 6 horas. Al cuarto día, estas hembras fueron enfrentadas, dentro de la arena experimental, con dos UOs: una del mismo color sobre el cual fueron “entrenadas” y una de un color alternativo. Las UOs del día del ensayo contaban con dieta fresca sin larvas del hospedador. En total se usaron 5 colores: amarillo, naranja, negro, rojo, y verde (Tabla 4.1).

Se probaron todas las combinaciones de colores posibles, y se entrenaron sobre los dos colores de cada combinación. Por lo tanto, el número total de tratamientos analizados fue 20. Para cada hembra se registró la latencia y la elección realizada. En total se analizaron 80 hembras por tratamiento.

4.3.4.2. Experimento 2. Influencia de la experiencia previa en la preferencia por forma

a) Priming

Para analizar el efecto que un contacto previo con larvas hospedadoras tiene sobre la preferencia de las hembras por modelos de distinta forma, parasitoides hembra de 5 a 7 días postemergencia fueron expuestos a larvas de *C. capitata* del tercer estadio previamente colocadas en UOs. Las UOs consistieron en cajas rectangulares de plástico (8x4 cm, 1.1cm de profundidad) envueltas en tela amarilla. La exposición duró 6 horas. Al día siguiente se analizó la respuesta de estas hembras ante dos modelos ofrecidos simultáneamente dentro de la jaula. Los modelos ofrecidos fueron construidos, respetando la forma de los modelos utilizados en el Capítulo 3 (Círculo, Óvalo 1, y Óvalo 2). Un total de 40 hembras fueron analizadas en cada una de las tres combinaciones de formas.

b) Experiencia sostenida sobre una determinada clave

Para estudiar el efecto de la experiencia previa en una determinada forma sobre la preferencia de las hembras por modelos de distintas formas, parasitoides hembra de 5-7 días postemergencia fueron expuestos durante tres días consecutivos (6 horas cada día) ante UOs de una forma fija y forradas en tela amarilla. Las UOs usadas fueron construidas de manera que tengan la misma forma que los modelos usados en el Capítulo 3 (círculo, óvalo 1, y óvalo 2). Luego de los tres días de exposición, las hembras fueron liberadas en forma individual en la arena experimental, en la cual

debieron optar por una de dos opciones: una UO con la forma en la cual habían sido entrenadas y una UO de una forma alternativa. Se probaron las tres combinaciones posibles entre las 3 formas, realizando la exposición previa sobre cada una de las dos opciones de cada combinación. Al igual que los casos anteriores, las UOs de distinta forma no contenían larvas. En total se analizaron 80 hembras por tratamiento.

4.3.4.3. Experimento 3. Controles

a) Aprendizaje de luminosidades

Para descartar que las hembras estén modificando su respuesta hacia los colores con respecto a la respuesta de las hembras *naïve* sobre la base de la luminosidad de estos y no sobre la base de la tonalidad, se repitió el experimento 1.b. utilizando telas grises de dos luminosidades distintas (gris claro y gris oscuro, Tabla 4.1) para envolver las UOs usadas tanto para exponer las larvas durante el periodo de entrenamiento como durante el ensayo de preferencia. Estas telas fueron seleccionadas de manera tal que sus luminosidades contengan a las luminosidades de las telas de color usadas en el experimento 1. La metodología empleada en las exposiciones previas y en el ensayo de preferencia fue idéntica a la descrita en el experimento 1.b. En cada prueba se analizaron 80 hembras.

b) Control de aprendizaje

Con el objeto de descartar que la respuesta de las hembras en el experimento 1.b. esté influenciada por el hecho de que estas estuvieron en presencia de un determinado color durante tres días, y no porque hayan respondido al color debido a la presencia de las larvas, se realizó un segundo experimento a modo de control. Para cada combinación de color, se eligió al azar uno de los dos colores y se siguió el procedimiento descrito para el experimento 1.b, pero usando UOs vacías. Las hembras expuestas a estas UOs fueron luego utilizadas en ensayos de preferencia de la misma manera que en el experimento 1.b. En total se hicieron diez ensayos, y en cada uno se analizaron 40 hembras.

4.3.4.4. Experimento 4. Duración del aprendizaje

Para analizar si los cambios en el comportamiento de las hembras debidos a la experiencia previa se mantienen a medida que transcurren los días desde el último evento de forrajeo sobre UOs coloreadas, se repitió el experimento 1.b. a tiempos

crecientes desde la última exposición. Tomando como modelo de trabajo al par amarillo-rojo, se expusieron durante 6 horas en tres días consecutivos larvas de *C. capitata* en una UO amarilla a parasitoides hembras. Se dejaron pasar 3, 5 o 7 días (siendo estos los tratamientos) y se analizó la preferencia de las hembras en una arena experimental ante una UO amarilla y una roja, siguiendo el procedimiento detallado en el experimento 1.b. El dato de “1 día” fue tomado del experimento 1.b. Para cada tratamiento se estudiaron 80 hembras.

4.3.4.5. Experimento 5. Influencia del número de eventos de entrenamiento

Se realizó un ensayo con el objetivo de analizar si la respuesta de las hembras luego de la exposición a UOs de un color determinado es afectada por la cantidad de eventos en los cuales las hembras son expuestas ante estas UOs. Para esto se tomó como modelo experimental al par amarillo-rojo y se entrenaron hembras durante 1, 5 y 7 días consecutivos sobre el color amarillo (el dato de “3 días” fue tomado del experimento 1.b.). Al día siguiente se les ofrecieron dos UOs dentro de la jaula de elección: una amarilla y la otra roja. Para cada tratamiento se estudiaron 80 hembras.

4.3.4.6. Experimento 6. Ventajas asociadas al aprendizaje

Para analizar cómo el aprendizaje asociativo puede conferir una ventaja adaptativa durante la búsqueda de hospedadores, se realizó un experimento en el que se estudió el beneficio potencial de este comportamiento. Para esto, se entrenaron dos grupos de hembras: uno sobre una UO amarilla y otro sobre una UO roja, siguiendo el protocolo descrito en el experimento 1.b. Al cuarto día, se condujo una prueba de elección ofreciéndole a cada hembra dos UOs dentro de una jaula de elección. Una de estas UO era amarilla y contaba con dieta artificial (fresca) de *C. capitata* y 50 larvas de *C. capitata* del tercer estadio. La otra UO era roja y solo contaba con dieta artificial fresca. Las larvas utilizadas fueron lavadas (se colocaron en un colador y se les hizo pasar 2 litros de agua en un lapso de 30 segundos). Estas UOs fueron ofrecidas durante 20 minutos a cada una de las hembras de *D. longicaudata* previamente entrenadas. En total se analizaron 60 hembras de cada tratamiento (es decir, 60 entrenadas en rojo y 60 en amarillo).

En 20 de estas 60 hembras, se hicieron observaciones de la actividad de la hembra durante los 20 minutos. Se registró: 1) el tiempo pasado en cada UO, 2) el número de intentos de oviposición (IOs) en cada UO, y 3) la duración de cada IO.

Para todas las hembras (120) se recogieron las larvas de la unidad amarilla, y se colocaron en un recipiente con dieta fresca. Este recipiente fue colocado, a su vez, dentro de otro recipiente que contenía vermiculita en su base, y que sirvió de sustrato de pupación para las larvas. Una semana después del ensayo se recuperaron todos los puparios, y se transfirieron a un frasco de vidrio de 300ml. Estos frascos fueron mantenidos dentro de una cámara de cría en condiciones controladas de humedad y temperatura (Hr: $65\pm 5\%$, T: $25\pm 1^\circ\text{C}$). Se esperó hasta la emergencia de los parasitoides y se contabilizó el número de descendientes producidos por cada hembra.

4.3.4.7. Experimento 7. Interacción entre claves visuales: color y tamaño

Se analizó la interacción de dos claves visuales: el color y el tamaño. Se estudió cómo responden las hembras ante estímulos cruzados: amarillo y rojo dentro de los colores y dos tamaños de UOs (una caja de Petri chica de 5,5 cm de diámetro y una caja de Petri grande de 10 cm de diámetro). Las hembras fueron colocadas en presencia de una UO amarilla durante tres días consecutivos, 6 horas cada día. Al cuarto día se estudió la preferencia de estas hembras, en una arena experimental, ante dos opciones que resultaron de combinar UOs grandes y chicas, amarillas y rojas. En total se analizaron 4 combinaciones: a) Amarillo grande-Rojo grande, b) Amarillo chico-Rojo chico, c) Amarillo chico-Rojo grande, y d) Amarillo grande-Rojo chico. Si bien los experimentos realizados en el Capítulo 3 con esferas de distinto tamaño permiten suponer que las UOs grandes serán preferidas por las hembras, se realizó un experimento control adicional para estudiar la respuesta de las hembras enfrentadas ante UOs grandes y pequeñas. Para cada tratamiento se analizaron 80 hembras.

4.3.5. Análisis de datos

4.3.5.1. Control de posición. Para analizar si la posición del modelo (izquierda o derecha) dentro de la jaula influyó sobre la preferencia de las hembras, se analizó si existió una mayor tendencia a visitar las UOs ubicadas a derecha o izquierda. Para esto

se realizó una prueba de bondad de ajuste de G corregida por Yates comparando, para cada experimento, el número de visitas recibidas por UOs colocadas hacia ambos lados.

4.3.5.2. Comportamiento de búsqueda. El número de visitas recibida por cada modelo se analizó para cada combinación estudiada mediante una prueba G de bondad de ajuste corregida por Yates contra la hipótesis de igual número de visitas.

La latencia fue analizada por medio de un ANOVA de un factor, donde el factor analizado fue el modelo visitado. Este análisis fue realizado para cada combinación de claves visuales. En aquellos casos en que el supuesto de homocedasticidad del ANOVA no se cumplió, se realizó una prueba de Kruskal Wallis si el desvío de la homocedasticidad era pequeño, o se transformaron los datos si el desvío de la homocedasticidad era grande.

En los experimentos 4 y 5 se estudió si el porcentaje de hembras que modifican su comportamiento en respuesta al tratamiento previo al que fueron sometidas siguió una tendencia lineal de aumento o disminución. Para estimar el número de hembras que respondieron al tratamiento se supuso que las hembras que visitaron el color al que no fueron previamente expuestas (en este caso el rojo) eligieron esta opción por azar, y por tanto debería haber una cantidad semejante de hembras que visitaron el otro color por la misma razón (i.e., por azar mitad se fue al rojo y mitad se fue al amarillo). Se consideró que el resto de las hembras visitaron el color de preferencia, y se estudió si el porcentaje de hembras que prefirieron un color dado respecto del total de hembras siguió una tendencia lineal de disminución (en el caso del ensayo 4) o de aumento (en el caso del ensayo 5). Esta tendencia se analizó por medio de un análisis de tendencia entre proporciones (Zar 1996).

Para analizar diferencias en el comportamiento de oviposición entre hembras entrenadas en amarillo y hembras entrenadas en rojo, se compararon el número de IO realizado en la UO con larvas (i.e. la UO amarilla), el tiempo pasado en esta UO, y el tiempo total dedicado a IO sobre esta UO, para las 20 hembras observadas de cada uno de los tratamientos (entrenamiento sobre amarillo y sobre rojo). Además, utilizando los datos de las 60 hembras analizadas, se comparó el número de descendientes producidos

por las hembras entrenadas en amarillo y las entrenadas en rojo. En todos los casos el análisis estadístico realizado fue un ANOVA de un factor (color de entrenamiento), constatando previamente que se cumplan los supuestos de este análisis. En los casos en que estos no se cumplieron se realizó una prueba de Kruskal Wallis si el desvío de la homocedasticidad era pequeño, o se transformaron los datos si el desvío de la homocedasticidad era grande.

Los análisis de varianza fueron realizados utilizando el programa Statistica for Windows (Statsoft Inc., 2000).

4.4. Resultados

4.4.1. Control de posición.

La comparación entre el número de visitas recibidas por las UOs ubicadas a la izquierda y a la derecha mostró que las hembras visitaron los dos lados de la jaula en igual proporción, en todos los experimentos realizados (Gy fue siempre menor a 3,84, y por lo tanto el valor p fue siempre mayor a 0,05).

4.4.2. Experimento 1. Influencia de la experiencia previa en la preferencia por color

a) Priming

Las hembras expuestas durante un período de 6 horas a larvas de *C. capitata* de estadio adecuado no mostraron una mayor tasa de visita hacia ninguno de los colores comparados (Tabla 4.2), ni una latencia significativamente menor por ninguna de las opciones.

b) Experiencia sostenida sobre una determinada clave.

En casi todos los pares de colores, las hembras mostraron una mayor tendencia a visitar el color al que habían sido expuestas durante tres días consecutivos (Tabla 4.3). Solo hubo dos combinaciones de colores (rojo-negro y amarillo-naranja) para los cuales no se obtuvieron diferencias, independientemente del color al que fueron expuestas las hembras (Tabla 4.3). En ningún caso la latencia difirió entre los modelos presentados a las hembras (Tabla 4.3).

Tipo de clave visual	Combinación	# visitas	Gy	Valor P	Latencia (ES)	F	p-value	
Color	Rojo vs. Verde	R: 18 V: 22	0,23	0,50 < p < 0,75	R: 1,77 (0,30) V: 1,17 (0,26)	2,31	0,14	
	Rojo vs. Amarillo	R: 19 A: 21	0,03	p > 0,95	R: 1,41 (0,29) A: 1,25 (0,28)	0,16	0,70	
	Rojo vs. Naranja	R: 18 Nj: 22	0,23	0,50 < p < 0,75	R: 1,54 (0,21) Nj: 1,30 (0,16)	0,87	0,35	
	Rojo vs. Negro	R: 19 Ng: 21	0,03	p > 0,95	R: 1,84 (0,28) Ng: 1,98 (0,29)	0,11	0,74	
	Verde vs. Amarillo	V: 18 A: 22	0,23	0,50 < p < 0,75	V: 2,03 (0,38) A: 1,41 (0,33)	2,03	0,16	
	Verde vs. Naranja	V: 20 Nj: 20	0,00	1,00	V: 1,69 (0,33) Nj: 2,10 (0,31)	0,83	0,37	
	Verde vs. Negro	V: 20 Ng: 20	0,00	1,00	V: 1,81 (0,33) Ng: 1,61 (0,31)	0,21	0,65	
	Amarillo vs. Naranja	A: 20 Nj: 20	0,00	1,00	A: 1,20 (0,24) Nj: 1,44 (0,23)	0,54	0,47	
	Amarillo vs. Negro	A: 21 Ng: 19	0,03	0,50 < p < 0,75	A: 1,44 (0,27) Ng: 1,05 (0,20)	1,32	0,26	
	Naranja vs. Negro	Nj: 22 Ng: 18	0,23	0,50 < p < 0,75	Nj: 1,12 (0,16) Ng: 1,27 (0,22)	0,40	0,53	
	Forma	Círculo vs. Óvalo 1	C: 22 O1: 18	0,23	0,50 < p < 0,75	C: 1,99 (0,25) O1: 2,15 (0,29)	0,16	0,69
		Círculo vs. Óvalo 2	C: 15 O2: 25	2,04	0,10 < p < 0,25	C: 2,51 (0,32) O2: 2,13 (0,26)	0,86	0,36
Óvalo 1 vs. Óvalo 2		O1: 21 O2: 19	0,03	p > 0,95	O1: 2,00 (0,22) O2: 1,94 (0,18)	0,04	0,84	

Tabla 4.2. Respuesta de las hembras luego de un evento de forrajeo (priming). Número de visitas a cada modelo en cada combinación de color y forma analizada (Experimentos 1a y 2a), y latencia promedio (en minutos). Cada variable es seguida por el valor del estadístico y el valor P asociados a la prueba realizada (Gy: prueba de bondad de ajuste de G, F: ANOVA). A: amarillo, Ng: negro, Nj: naranja, R: rojo, V: verde, C: círculo, O1: óvalo 1, O2: óvalo 2.

4.4.3. Experimento 2. Influencia de la experiencia previa en la preferencia por forma.

a) Priming

La Tabla 4.2 muestra el número de visitas recibidas por cada modelo en cada combinación de formas. En ningún caso se registró un número de visitas significativamente mayor al esperado bajo la hipótesis de igual proporción de visitas. Los tiempos de latencia tampoco mostraron diferencias entre las opciones ofrecidas.

Importancia de la experiencia previa en la utilización de claves visuales

Color expuesto	Combinación	# visitas	Gy	Valor P	Latencia media (ES)	F/H	Valor p
Rojo	Rojo vs. Verde	R: 51 V: 29	5,78	0,010 < p < 0,025	R: 1,33 (0,14) V: 1,22 (0,15)	F = 0,29	0,59
	Rojo vs. Amarillo	R: 57 A: 23	14,03	p < 0,001	R: 1,36 (0,14) A: 0,91 (0,09)	H = 2,93	0,09
	Rojo vs. Naranja	R: 55 Nj: 25	10,76	0,001 < p < 0,005	R: 1,19 (0,11) Nj: 1,21 (0,18)	F = 0,02	0,89
	Rojo vs. Negro	R: 45 Ng: 35	1,02	0,25 < p < 0,50	R: 0,90 (0,08) Ng: 1,01 (0,17)	H = 0,20	0,66
Verde	Verde vs. Rojo	V: 61 R: 19	22,05	p < 0,001	V: 1,67 (0,15) R: 2,07 (0,37)	F = 1,34	0,25
	Verde vs. Amarillo	V: 51 A: 29	5,78	0,010 < p < 0,025	V: 1,13 (0,11) A: 1,43 (0,21)	F = 1,94	0,17
	Verde vs. Naranja	V: 54 Nj: 26	9,29	0,001 < p < 0,005	V: 1,48 (0,13) Nj: 1,47 (0,21)	F = 3x10 ⁻³	0,96
	Verde vs. Negro	V: 62 Ng: 18	24,38	p < 0,001	V: 1,02 (0,11) Ng: 1,39 (0,28)	F = 2,07	0,15
Amarillo	Amarillo vs. Rojo	A: 53 R: 27	7,95	0,001 < p < 0,005	A: 1,40 (0,16) R: 1,21 (0,21)	F = 0,48	0,49
	Amarillo vs. Verde	A: 54 V: 26	9,29	0,001 < p < 0,005	A: 1,24 (0,14) V: 1,00 (0,19)	F = 0,98	0,33
	Amarillo vs. Naranja	A: 41 Nj: 39	0,01	p > 0,95	A: 1,73 (0,24) Nj: 1,90 (0,24)	F = 0,26	0,61
	Amarillo vs. Negro	A: 56 Ng: 24	12,33	p < 0,001	A: 1,68 (0,20) Ng: 2,32 (0,33)	F = 2,82	0,10
Naranja	Naranja vs. Rojo	Nj: 52 R: 28	6,71	0,010 < p < 0,025	Nj: 0,94 (0,11) R: 0,66 (0,07)	H = 2,79	0,10
	Naranja vs. Verde	Nj: 52 V: 28	6,71	0,010 < p < 0,025	Nj: 1,08 (0,13) V: 1,34 (0,27)	H = 1x10 ⁻³	0,99
	Naranja vs. Amarillo	Nj: 34 A: 46	1,52	0,10 < p < 0,25	Nj: 1,41 (0,22) A: 1,14 (0,15)	F = 1,12	0,29
	Naranja vs. Negro	Nj: 55 Ng: 25	10,76	0,001 < p < 0,005	Nj: 1,72 (0,18) Ng: 1,62 (0,20)	F = 0,11	0,74
Negro	Negro vs. Rojo	Ng: 43 R: 37	0,13	0,75 < p < 0,90	Ng: 1,09 (0,14) R: 1,32 (0,20)	F = 0,92	0,34
	Negro vs. Verde	Ng: 56 V: 24	12,33	p < 0,001	Ng: 1,36 (0,13) V: 1,80 (0,27)	F = 2,81	0,10
	Negro vs. Amarillo	Ng: 54 A: 26	9,29	0,001 < p < 0,005	Ng: 1,21 (0,14) A: 1,01 (0,18)	F = 0,70	0,40
	Negro vs. Naranja	Ng: 59 Nj: 21	17,78	p < 0,001	Ng: 1,49 (0,16) Nj: 1,39 (0,23)	F = 0,12	0,73

Tabla 4.3. Preferencia de las hembras ante UOs coloreadas luego de un periodo de entrenamiento. Número de visitas y latencia promedio (en minutos) para cada tipo de modelo ofrecido, para hembras expuestas durante tres días a UOs de un color determinado (experimento 1b). Cada variable es seguida por el valor del estadístico y el valor P asociados a la prueba realizada (Gy: prueba de bondad de ajuste de G, F: ANOVA, H: prueba de Kruskal Wallis). A: amarillo, Ng: negro, Nj: naranja, R: rojo, V: verde.

b) Experiencia sostenida sobre una determinada clave

El número de visitas recibido por cada modelo y la latencia promedio en cada combinación de formas y para cada tipo de forma usada durante la fase de experiencia previa se muestra en la Tabla 4.4. Los análisis de bondad de ajuste de G no detectaron diferencias en el número de visitas recibidas por cada modelo en ninguna combinación. Las comparaciones de los valores de latencia entre formas no detectaron diferencias significativas en ninguna de las combinaciones de forma analizadas (Tabla 4.4).

4.4.4. Experimento 3. Controles

a) Aprendizaje de luminosidad.

Las hembras que fueron expuestas durante tres días a una UO gris clara o gris oscura no mostraron una preferencia por el tipo de gris al que fueron expuestas, y visitaron ambas UOs en una frecuencia similar (Tabla 4.5). En este experimento sólo se registró el modelo visitado por las hembras porque la latencia no mostró diferencias significativas en los experimentos para los que este ensayo sirve como control.

Forma expuesta	Combinación	# visitas	Gy	Valor p	Latencia (ES)	F	Valor p
Círculo	Círculo vs. Óvalo 1	C: 34 O1: 46	1,52	0,10 < p < 0,25	C: 1,86 (0,19) O1: 1,75 (0,16)	0,18	0,67
	Círculo vs. Óvalo 2	C: 44 O2: 36	0,61	0,25 < p < 0,50	C: 2,00 (0,18) O2: 1,98 (0,21)	4x10 ⁻³	0,95
Óvalo 1	Óvalo 1 vs. Círculo	O1: 43 C: 37	0,32	0,50 < p < 0,75	O1: 2,20 (0,17) C: 1,93 (0,19)	1,12	0,29
	Óvalo 1 vs. Óvalo 2	O1: 37 O2: 43	0,32	0,50 < p < 0,75	O1: 1,56 (0,16) O2: 1,87 (0,19)	1,55	0,22
Óvalo 2	Óvalo 2 vs. Círculo	O2: 44 C: 36	0,61	0,25 < p < 0,50	O2: 1,78 (0,19) C: 1,97 (0,15)	0,65	0,42
	Óvalo 2 vs. Óvalo 1	O2: 36 O1: 44	0,61	0,25 < p < 0,50	O2: 1,78 (0,14) O1: 1,66 (0,16)	0,32	0,57

Tabla 4.4. Preferencia por formas en hembras entrenadas. Número de visitas y latencia promedio (en minutos) para cada tipo de forma, en hembras expuestas a UOs de una forma fija durante un periodo de 3 días consecutivos (experimento 2b). Cada variable es seguida por el valor del estadístico y el valor P asociados a la prueba realizada (Gy: prueba de bondad de ajuste de G, F: ANOVA). C: círculo, O1: óvalo 1, O2: óvalo 2.

b) Control de aprendizaje

La Tabla 4.5 muestra el número de visitas registradas en UOs de distinto color luego de exponer las hembras a UOs vacías de uno de los dos colores de cada combinación

durante tres días. Las hembras no mostraron preferencia por visitar algún color en particular, en ninguna de las combinaciones analizadas. En este experimento sólo se registró el modelo visitado por las hembras porque la latencia no mostró diferencias significativas en los experimentos para los que este ensayo sirve como control.

CONTROL	Tratamiento previo	Prueba de preferencia	# visitas	Gy	Valor p
Luminosidad	Expuestas a gris oscuro	Gris oscuro vs. Gris claro	GO: 38 GC: 42	0,11	0,75 < p < 0,90
	Expuestas a gris claro	Gris oscuro vs. Gris claro	GC: 34 GO: 46	1,52	0,10 < p < 0,25
Aprendizaje	Expuestas a UOs verde	Verde vs. Rojo	V: 21 R: 19	0,03	p > 0,95
	Expuestas a UOs verde	Verde vs. Amarillo	V: 22 A: 18	0,23	0,50 < p < 0,75
	Expuestas a UOs verde	Verde vs. Naranja	V: 22 Nj: 18	0,23	0,50 < p < 0,75
	Expuestas a UOs verde	Verde vs. Negro	V: 19 Ng: 21	0,03	p > 0,95
	Expuestas a UOs amarilla	Amarillo vs. Rojo	A: 21 R: 19	0,03	p > 0,95
	Expuestas a UOs naranja	Naranja vs. Rojo	Nj: 22 R: 18	0,23	0,50 < p < 0,75
	Expuestas a UOs negro	Negro vs. Amarillo	Ng: 18 A: 22	0,23	0,50 < p < 0,75
	Expuestas a UOs negro	Negro vs. Naranja	Ng: 18 Nj: 22	0,23	0,50 < p < 0,75

Tabla 4.5. Visitas registradas en los controles. Número de visitas recibidas por UOs de distinta tonalidad de gris (Control de luminosidad), o por UOs de distinto color (Control de aprendizaje), seguida por el valor del estadístico Gy y el valor P asociados. GC: gris claro, GO: gris oscuro, A: amarillo, Ng: negro, Nj: naranja, R: rojo, V: verde.

4.4.5. Experimento 4. Duración del aprendizaje

El número de visitas recibidas por cada color a medida que transcurren los días desde el periodo de exposición a UOs coloreadas se muestra en la Figura 4.2 a. La proporción de hembras que responden al entrenamiento mostró una tendencia lineal de disminución a medida que aumentan los días desde el entrenamiento (Prueba de tendencia lineal en proporciones: $X^2 = 14,072$, $p < 0,001$, Figura 4.2 b).

4.4.6. Experimento 5. Influencia del número de eventos de entrenamiento

El número de visitas recibidas por cada color a medida que aumenta el número de días de entrenamiento previo se muestra en la Figura 4.3 a. Los resultados muestran que las proporciones tienen una tendencia lineal de aumento (Prueba de tendencia lineal en proporciones: $X^2 = 44,749$, $p < 0,001$, $p < 0,001$), es decir, a medida que aumentan los días de entrenamiento, aumenta la cantidad de hembras que responden al mismo (Figura 4.3 b).

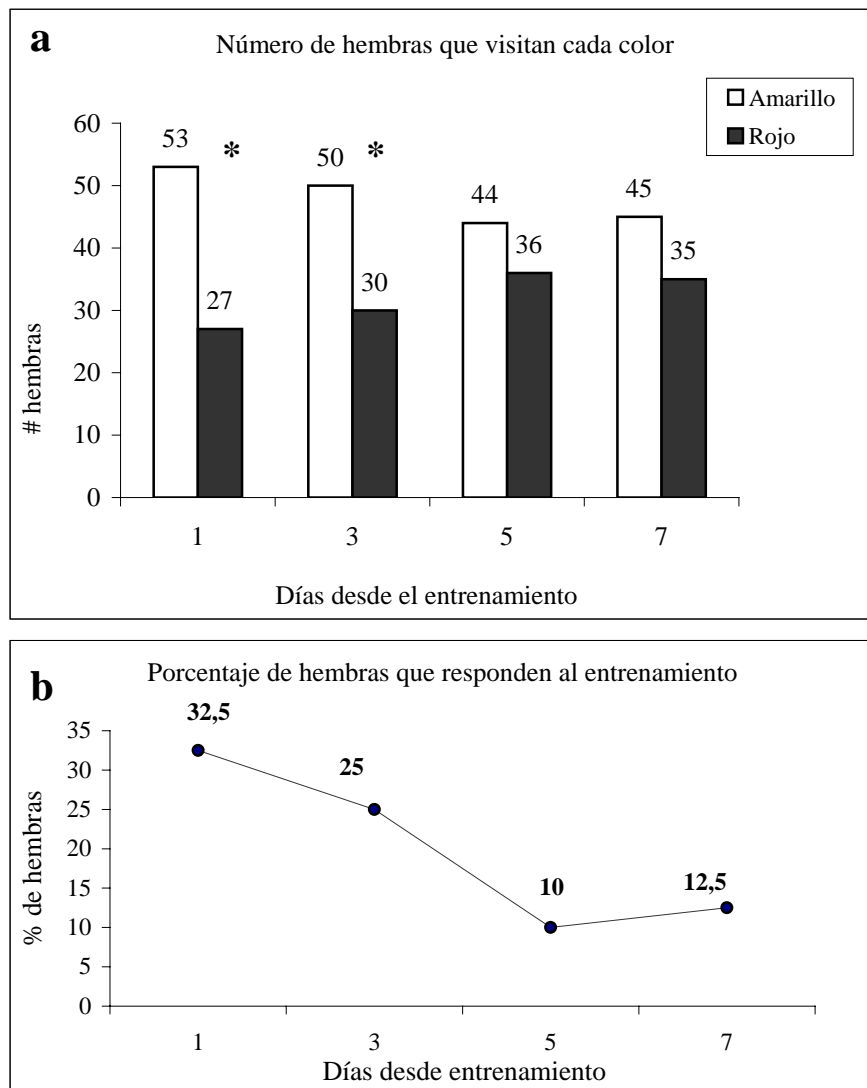


Figura 4.2. Patrón de preferencia a intervalos de tiempo creciente desde el último entrenamiento en amarillo. a) Número de hembras que visitaron cada tipo de UO en cada uno de los 4 tratamientos. b) Proporción de hembras que responden al entrenamiento en cada tratamiento. *: muestra los tratamientos para los cuales se encontraron diferencias significativas en la proporción de visitas (prueba G).

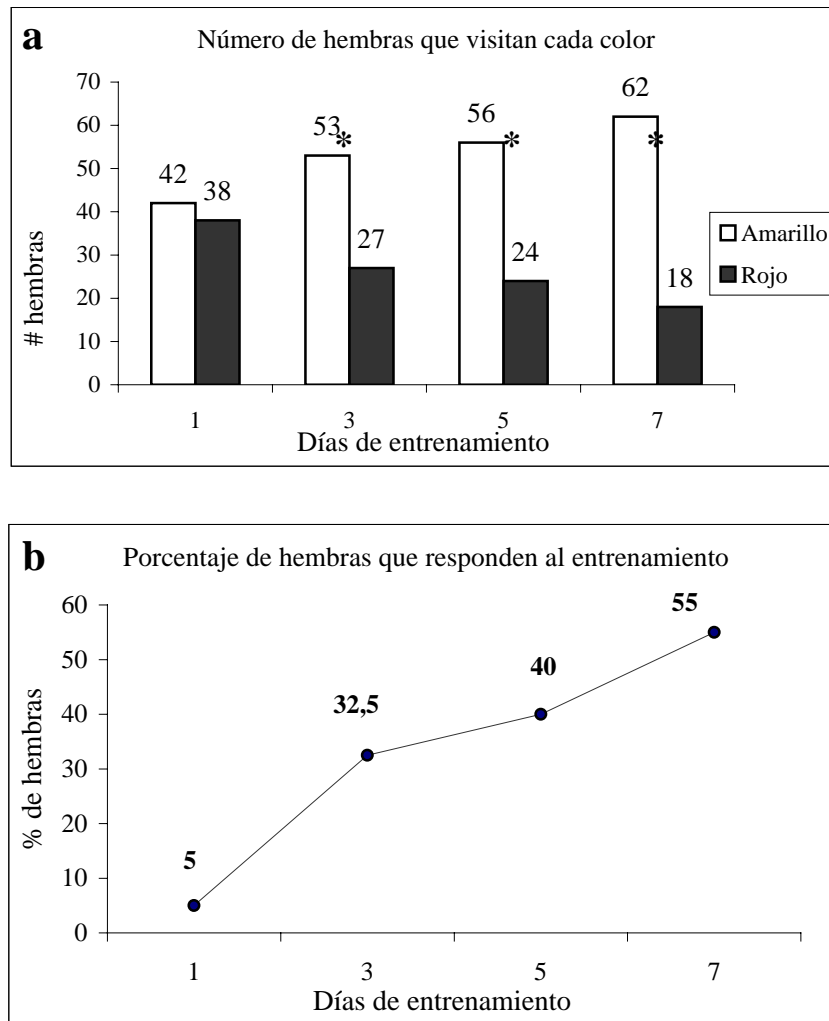


Figura 4.3. Patrón de preferencia con periodos de entrenamiento de duración creciente en amarillo. a) Número de hembras que visitaron cada tipo de UO en cada uno de los 4 tratamientos. b) Proporción de hembras que responden al entrenamiento en cada tratamiento. *: muestra los tratamientos para los cuales se encontraron diferencias significativas en la proporción de visitas (prueba G).

4.4.7. Experimento 6. Ventajas del aprendizaje

El experimento 6 mostró que las hembras que fueron entrenadas en amarillo pasan mayor cantidad de tiempo en las unidades amarillas con larvas (Tabla 4.6). También se encontró que estas hembras realizan mayor número de IO y durante más tiempo en las unidades con larvas (Tabla 4.6). Finalmente, el análisis del número de descendientes dejados por hembra mostró que las hembras que fueron entrenadas en amarillo dejan en promedio un mayor número de descendientes (Tabla 4.6).

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Tiempo pasado en la UO con larvas	Ent. Amarillo: 1091,30 (43,00) Ent. Rojo: 202,85 (77,24)	H = 27,27	p < 0,001
Número de IO en la UO con larvas	Ent. Amarillo: 10,85 (0,59) Ent. Rojo: 1,70 (0,69)	F = 105,78	p < 0,001
Duración total IO en la UO con larvas	Ent. Amarillo: 507,25 (35,82) Ent. Rojo: 82,20 (35,25)	F = 71,53	p < 0,001
Número de descendientes	Ent. Amarillo: 4,15 (0,36) Ent. Rojo: 0,98 (0,22)	F = 89,54	p < 0,001

Tabla 4.6. Comportamiento de oviposición de las hembras en el experimento 6. Se muestran los valores promedio para cada una de las 4 variables estudiadas. Cada variable es seguida por el valor del estadístico y el valor P asociados a la prueba realizada (F: ANOVA; H: prueba de Kruskal Wallis). Ent. Amarillo: hembras entrenadas en UO amarillas, Ent. Rojo: hembras entrenadas en UO rojas.

4.4.8. Experimento 7. Interacción entre claves visuales: color y tamaño

Al ofrecerles a las hembras dos UOs que diferían sólo en el color, estas visitaron más frecuentemente aquellas UOs del color al que habían sido expuestas durante tres días, independientemente del tamaño (amarillo grande-rojo grande: $G_y = 13,16$, $p < 0,001$; amarillo chico-rojo chico: $G_y = 8,61$, $p < 0,001$, Figura 4.4 a, b). Cuando la UO grande fue envuelta en tela de color rojo y la UO pequeña en tela de color amarillo, las hembras visitaron ambas UOs en frecuencia similar y no se detectaron diferencias entre ambas (amarillo chico-rojo grande: $G_y = 0,20$, $p > 0,50$, Figura 4.4 c). Finalmente, cuando la UO grande fue envuelta en tela amarilla y la UO pequeña en tela roja, las hembras prefirieron la primera (amarillo grande-rojo chico: $G_y = 18,80$, $p < 0,001$, Figura 4.4 d).

Las hembras que fueron colocadas en una arena experimental con una UO grande amarilla y una UO pequeña del mismo color mostraron una clara preferencia por la primera (OU grande amarilla: 64 visitas vs. UO pequeña amarilla: 16 visitas; $G_y = 29,47$; $p < 0,001$), manteniendo la preferencia por tamaños grandes encontrada en el Capítulo 3.

4.5. Discusión

Los resultados muestran que la experiencia previa es importante durante la búsqueda de hospedadores en *D. longicaudata*. Si bien el *priming* parece no tener efecto sobre los patrones de preferencia, las hembras fueron capaces de asociar el color del sustrato con la presencia de larvas hospedadoras luego de adquirir cierto grado de experiencia. Este

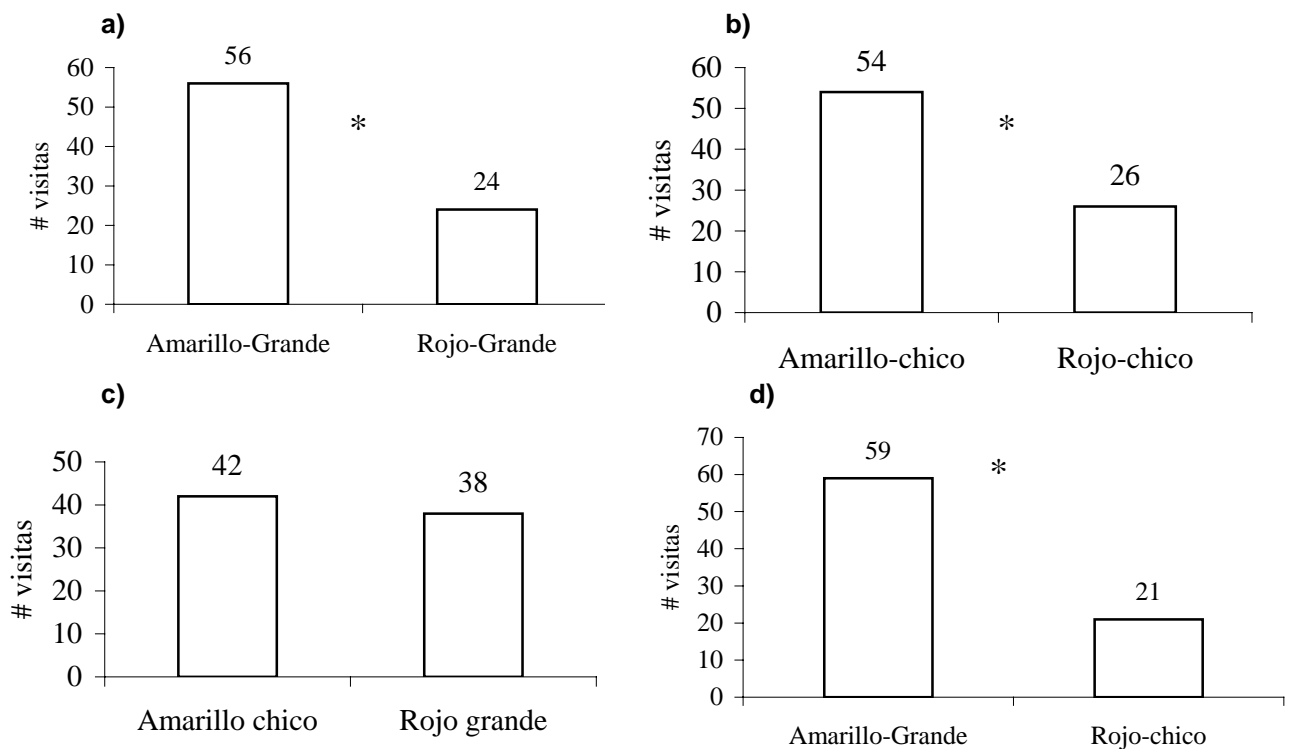


Figura 4.4. Interacción entre tamaño y color. Número de hembras que visitaron cada uno de los tipos de UOs ofrecidos. Todas las hembras fueron expuestas ante una UO pequeña amarilla durante tres días, luego de los cuales se realizó la prueba de preferencia. *: muestra los tratamientos para los cuales se encontraron diferencias significativas en la proporción de visitas (prueba G).

resultado tiene al menos tres implicancia. Primero, el hecho de que las hembras “entrenadas” fueran capaces de discriminar entre colores muestra que las hembras sin experiencia y las sometidas a un encuentro previo con larvas, también tienen la capacidad óptica/neuronal de discriminar entre colores. Por lo tanto, la ausencia de preferencia registrada para esas hembras (Capítulo 3 y experimento 1 del presente Capítulo) fue una consecuencia de falta de preferencia y no de falta de percepción. Segundo, las hembras fueron capaces de establecer una asociación entre color y presencia de hospedadores que fue usada posteriormente aún en ausencia del hospedador (no se colocaron larvas en las UOs durante los ensayos de preferencia), mecanismo conocido como aprendizaje asociativo (Turlings et al. 1993). Finalmente, la fuerte respuesta de las hembras hacia los colores solo después de la sesión de entrenamiento, apoya la hipótesis de que el aprendizaje debería verse exacerbado en especies de parasitoides generalistas, como es el caso de *D. longicaudata*. Para especies de este hábito, los potenciales hábitats del hospedador son variables, pero si las hembras

encuentran a sus hospedadores asociados a un hábitat en eventos de búsqueda sucesivos, entonces estas pueden usar información acerca de ese hábitat en particular durante futuras búsquedas.

En el experimento 6, la hipótesis puesta a prueba fue que asociar un color con la presencia de larvas tiene un beneficio, debido a que se encontrarán más rápido los parches con larvas y eso permitirá en un mayor número de oviposiciones exitosas. Otra ventaja viene dada al considerar la existencia de competencia intraespecífica, puesto que bajo estas condiciones encontrar un parche antes que otra hembra tendría el beneficio de encontrar mayor cantidad de larvas no parasitadas. La predicción para el experimento realizado es que aquellas hembras que fueron entrenadas en amarillo pasarán una mayor cantidad de tiempo en el parche que tiene larvas, realizarán mayor número de IO, pasarán más tiempo oviponiendo en estos parches y, como consecuencia, tendrán un mayor número de descendientes. Estos patrones fueron, en su conjunto, los resultados encontrados al realizar el experimento 6. Es decir, se encontró que el aprendizaje asociativo brinda una importante recompensa en términos de éxito reproductivo. La preferencia resultante de este proceso le permite a las hembras ahorrar tiempo en la búsqueda del hospedador y obviamente les otorga una ventaja sobre hembras que aprendieron sobre un color que dejó de ser recompensado. Una observación interesante fue que en muchos casos las hembras que fueron entrenadas en rojo y que visitaron inicialmente este color, decidieron visitar amarillo después de no encontrar larvas en rojo. Esto puede reflejar la flexibilidad de estos parasitoides durante la búsqueda.

En las combinaciones rojo-negro y amarillo-naranja, las hembras entrenadas no mostraron un patrón de preferencia, independientemente del color al que fueron expuestas durante el periodo de entrenamiento. Dada la fuerte respuesta al entrenamiento observada en otras combinaciones de color, es lógico pensar que las hembras fueron incapaces de discriminar entre los miembros de estas combinaciones. Probablemente, como ocurre con muchas otras especies de himenópteros (Peitsch et al. 1992), *D. longicaudata* carece de los receptores visuales correspondientes a las longitudes de onda del rojo. Si este fuera el caso, el color rojo se vería como el negro, y de aquí que las hembras no tuvieran capacidad de discriminar entre estos dos colores. La habilidad para discriminar colores (independientemente de la intensidad) dentro de

un intervalo dado de longitudes de onda depende de la presencia de al menos dos fotorreceptores sensibles (Chittka, comunicación personal). Esto significa que si el receptor rojo está ausente la habilidad para discriminar colores en forma confiable e independiente de la intensidad termina alrededor de los 550nm. Por lo tanto, la falta del receptor rojo podría también explicar la incapacidad de discriminar amarillo de naranja por parte del sistema visual de *D. longicaudata*.

El control de aprendizaje permitió asegurar que las hembras estaban asociando la presencia de hospedadores con el color del sustrato. Sin este control, hubiera sido imposible descartar que las hembras estaban respondiendo al entrenamiento por un proceso distinto al de aprendizaje asociativo. Las hembras podrían haber fijado el color al que fueron expuestas durante tres días como un sustrato conocido en el cual buscar, y luego haber usado esta información durante el ensayo de preferencia. Asimismo, las hembras podrían exhibir algún tipo de neofobia y evitar buscar sobre un sustrato que presenta un color con el que nunca estuvieron en contacto. En el control de aprendizaje, las hembras que fueron expuestas a una OU de color vacía, no mostraron preferencia entre el color al que habían sido expuestas y un color alternativo. Este resultado apoya fuertemente el mecanismo de aprendizaje asociativo propuesto anteriormente.

El control de luminosidad mostró que las hembras de *D. longicaudata* respondieron a la tonalidad del color y no a diferencias en la intensidad lumínica. Este resultado concuerda con otros estudios que realizaron controles similares (Wardle 1990, Shafir 1996). Aún cuando Oliyai y King 2000 se basan en inferencias a partir de los resultados obtenidos, y no en verdaderos controles (como en el presente estudio), estos autores también concluyen que el aprendizaje estuvo radicado en la tonalidad de los colores. Considerando que la luminosidad es más importante que la tonalidad durante la búsqueda de hospedadores en algunos insectos (Wardle 1990), este parámetro podría ser, no obstante, importante para *D. longicaudata*. Pero los resultados del presente estudio sugieren que la asociación entre color y hospedadores estuvo basada únicamente en la tonalidad.

En los ensayos de preferencia por distintas formas las hembras no mostraron un patrón de elección que favoreciera alguna de las opciones presentadas. Este hecho se

verificó tanto en hembras sometidas solo a una exposición previa como en hembras que fueron expuestas tres días a una UO de una forma determinada. Estudios previos encontraron que algunas especies de parasitoides pueden discriminar entre objetos de distinta forma (Wardle y Borden 1990, Wäckers y Lewis 1999). No obstante, en estos estudios se analizaron especies de parasitoides cuyos hospedadores se encuentran asociados a diversas estructuras vegetales (hojas, frutos, tallos) y por tanto existe una alta variabilidad en las formas de los posibles hábitats del hospedador. Dado que esta variabilidad en formas es mayor a la encontrada entre frutos, es esperable que la forma represente una clave importante para estos parasitoides, pero no para parasitoides con hospedadores que permanecen enterrados dentro de distintos frutos, como es el caso de *D. longicaudata*.

Una pregunta interesante teniendo en cuenta que los posibles hábitats del hospedador de este parasitoide pueden cambiar en el transcurso de la vida de una hembra (pues estas son relativamente longevas, Viscarret et al. 2006) es si el patrón de preferencia inducido por el aprendizaje se fija o si tiene una duración limitada y se va perdiendo en ausencia de nuevos eventos de forrajeo exitosos. Esto está relacionado con la posibilidad de cambiar preferencias ante una eventual desaparición de un determinado hospedador frutal de la mosca. Los resultados del experimento 4 parecen señalar que la experiencia no se “fija” y que se va perdiendo a medida que pasa el tiempo. Probablemente la preferencia inducida por el aprendizaje requiera un refuerzo para mantenerse. Esto tiene sentido, ya que le permitiría a un parasitoide hembra cambiar de clave si esta deja de encontrarse disponible.

En todos los ensayos en que se entrenaron hembras por 3 días, apareció un porcentaje más o menos conservado de hembras que eligen el color en el cual no fueron entrenadas. Una opción para explicar el comportamiento de las hembras es suponer que existe variación respecto a la capacidad de aprendizaje y que algunas hembras necesitan más días para asociar un color con la presencia de larvas. El experimento 5 sugiere que este podría ser el caso para *D. longicaudata*, dado que a medida que aumentaron los episodios de entrenamiento, aumentó también el número de hembras que respondieron al mismo. No obstante, cabe destacar que, a pesar de entrenar 7 días seguidos a las hembras, existió un número considerable que siguió prefiriendo las UOs rojas. Esto deja

interrogantes abiertos acerca de estas hembras: tendrán estas capacidad de asociar? Si es así, requieren estas hembras de más eventos de exposición previa? Otra posible explicación es que el método de cría empleado con estos insectos, donde las larvas son presentadas siempre en las mismas UO de color blanco, haya provocado una pérdida en la capacidad de asociar estímulos condicionales de tipo visual a un estímulo incondicional como es la presencia de la larva o, simplemente, que hembras con menor capacidad de discriminar colores tengan igual éxito que otras y así aumenten su frecuencia con respecto a la encontrada en la naturaleza.

La interacción entre aquellas claves para las cuales las hembras mostraron una respuesta positiva en los ensayos previos (tamaño, en el Capítulo 3, y color en el presente Capítulo) fue analizada con el objeto de entender cómo las hembras integran esta información. En el experimento 7, las hembras respondieron al entrenamiento sobre un color dado no sólo en la UO pequeña, sino también la grande, mostrando que la asociación entre color y larvas hospedadoras fue mantenida aún cuando se le ofrecieron UO grandes. Por otro lado, el hecho de que las hembras no mostraran ninguna preferencia cuando la UO grande fue envuelta en tela del color no preferido (en este caso el rojo), podría estar indicando que el tamaño y el color tienen un efecto similar en la respuesta de las hembras. Este resultado describe una relación no jerárquica entre estas claves, y no coincide con lo esperado bajo una hipótesis de efecto aditivo o multiplicativo, dado que el porcentaje de hembras que visitaron la UO amarilla grande fue similar al encontrado en los experimentos en que se enfrentaron UO que difirieron solo en el color, o solo en el tamaño. Parecería que la presencia de al menos una de estas dos claves es suficiente, y esto explica el hecho de que no se registrasen incrementos en la visita a pesar de agregar otra clave preferida. Tal vez, un incremento de este porcentaje se pueda alcanzar agregando otro tipo de clave sensorial, ya que estudios previos encontraron que las hembras usan frecuentemente claves visuales en forma conjunta con claves de otra naturaleza, como ser químicas (Wäckers y Lewis 1994, Jang et al. 2000, Fisher et al. 2001).

Debido a su importancia como agente de control biológico de moscas de la fruta de la familia Tephritidae (una de las más importantes plagas frutales del mundo, White y Elson-Harris 1992), el comportamiento de forrajeo del parasitoide *D. longicaudata* ha

estado bajo intenso estudio. El rol de las claves visuales fue estudiado principalmente al comienzo de 1990 (Leyva et al. 1991, Sivinski 1991, Vargas et al. 1991, Messing y Jang 1992), obteniendo resultados divergentes respecto a la preferencia por color y prestando poca atención al comportamiento exhibido por las hembras. Además, ningún estudio determinó la importancia de la experiencia previa, a pesar de que el aprendizaje de claves visuales en himenópteros y la naturaleza generalista de *D. longicaudata* se conocían bien en ese momento. El presente trabajo muestra que algunas claves visuales son importantes en forma innata (como el tamaño), y que otras puede ser importantes pero sólo después de cierta experiencia previa y a través de un mecanismo de aprendizaje asociativo (como el color), y, finalmente, que otras claves parecen tener escasa importancia aún después de que las hembras encontraran hospedadores asociadas a ellas en eventos de forrajeo previos (como la forma).

Uno de los requerimientos para determinar la efectividad de un enemigo natural es evaluar el desempeño y capacidad dispersiva de las hembras. En este sentido, el estudio de las claves visuales podría brindar información valiosa a la hora de diseñar trampas para estimar la densidad y la dispersión de estos insectos luego de la liberación a campo como parte de un esquema de control biológico. Al mismo tiempo, es también importante conocer la forma en que los parasitoides van a responder a trampas de distintos colores en programas de control que combinen trampeo masivo del insecto plaga con liberaciones de enemigos naturales. En estos programas sería importante evitar usar trampas que tiendan a atraer números altos de parasitoides (Cornelius et al. 1999). Sobre la base de este estudio, se puede concluir que no existe preferencia en hembras sin experiencia por los colores, así que el mejor color para atrapar moscas debería ser usado. No obstante, dado que las hembras pueden asociar el color del sustrato con la presencia de larvas, una recomendación que surge de este trabajo es la de evitar usar colores semejantes al de los frutos infestados existentes en el área en que se piense disponer las trampas.

5. Claves químicas utilizadas por *Diachasmimorpha longicaudata* durante la búsqueda de hospedadores

5.1. Introducción

Dentro de los distintos tipos de estímulos que brindan información a un insecto, los de tipo químicos son de fundamental importancia cuando el insecto es un parasitoide que está buscando hospedadores. Los compuestos químicos que transmiten información entre dos especies reciben el nombre de aleloquímicos (para distinguirlos de aquellos compuestos de comunicación entre individuos de la misma especie llamados feromonas). Numerosos estudios han mostrado la importancia de los aleloquímicos de tipo volátil durante el proceso de forrajeo en parasitoides (Vet y Dicke 1992, Godfray 1994). Entre los estímulos que pueden ser utilizados durante la búsqueda de hospedadores, las claves químicas son las de mayor importancia a grandes distancias, mientras que, a corta distancia, otros estímulos (como los visuales o acústicos) pueden actuar conjuntamente con los químicos (van Alphen y Jervis 1996).

Los compuestos volátiles utilizados por los parasitoides son sumamente diversos, tanto por su naturaleza química como por su fuente de procedencia. En muchos casos son compuestos emitidos por el propio hospedador (claves directas) o derivados de su actividad (claves indirectas), mientras que en otros, provienen del hábitat donde este hospedador se encuentra (incluso en ausencia del propio hospedador). También pueden provenir de la interacción entre el hospedador y su hábitat. Dentro de las claves directas del hospedador, se encuentran por ejemplo aquellos casos de parasitoides de áfidos que responden en forma innata a olores liberados por los hospedadores (Jacob y Evans 2000). Asimismo, el parasitoide especialista *Lemophagous pulcher* (Hymenoptera: Ichneumonidae) es capaz de detectar volátiles producidos por la larva de su hospedador, el escarabajo *Lilioceris lili* Scopoli (Coleoptera: Chrysomelidae) (Schaffner y Müller 2001). Conti et al. (2003) encontraron que el parasitoide de huevos *Trissolcus brochymenae* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) utiliza volátiles directos de los huevos de su hospedador, un heteróptero

pentatómido. Así, parasitoides de casi todos los estados de desarrollo, son capaces de utilizar claves químicas directas de sus hospedadores. Un excepción serían los parasitoides de pupas ya que la emisión de olores es mínima en este estado durante el cual los individuos se mantienen inmóviles y no se alimentan (Fischer et al. 2001).

Aún cuando la detección de hospedadores utilizando olores propios de estos se ha encontrado en varios sistemas hospedador-parasitoide, la selección natural actúa, normalmente, minimizando la liberación de claves por parte del hospedador (claves directas de su ubicación) que puedan ser detectadas por los parasitoides, porque esto reduce la aptitud del emisor. De aquí que algunos parasitoides hayan solucionado este obstáculo utilizando volátiles de comunicación entre hospedadores para localizarlos, y así un compuesto que actúa como feromona puede ser, al mismo tiempo, utilizado como aleloquímico por el parasitoide. De esta manera, parasitoides que atacan estadios adultos pueden utilizar las feromonas sexuales de sus hospedadores para localizarlos, como es el caso del parasitoide *Tomicobia tibialis* Ashmead (Hymenoptera: Pteromalidae) que es atraído por la feromona de su hospedador, escarabajos del género *Ips* (Rice 1968, 1969). También se han encontrado casos en que estas mismas feromonas son utilizadas por parasitoides de huevo (Colazza et al. 1999, Conti et al. 2004). Hoffmeister y Giennap (1999) encontraron que la feromona de marcado de hospedadores depositada por la hembra de la mosca de la fruta *Myoleja lucida* Fallén (Diptera: Tephritidae) para señalar a otras hembras que puso sus huevos en un determinado fruto (y evitar así la competencia larvaria), es utilizada por el parasitoide *Halticoptera laevigata* Thomson (Hymenoptera: Pteromalidae) cuyos hospedadores son las larvas recién eclosionadas de esta mosca. En otros casos los parasitoides pueden utilizar claves indirectas para encontrar a sus hospedadores, como volátiles presentes en sus heces (Oatman et al. 1969, Hendry et al. 1973).

El hábitat del hospedador ofrece en muchos casos señales químicas que son utilizadas por los parasitoides, aún en ausencia del hospedador. Este es el caso de los parasitoides *Alysia manducator* Panz (Hymenoptera: Braconidae) y *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae), que se ven atraídos por carne no infestada por su hospedador (moscas del género *Calliphora*), o del parasitoide *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) que responde a la avena aún cuando sus

hospedadores no estén presentes en ella (Godfray 1994). En la mayoría de los casos, no obstante, las señales provenientes del hábitat del hospedador aparecen sólo cuando este está presente, es decir que son producto de la interacción entre el hospedador y su hábitat. Estas señales son luego recibidas e interpretadas por los parasitoides asociados. La mayoría de los casos citados corresponden a sistemas en los que el hábitat del hospedador es una planta, y el hospedador es un herbívoro que se alimenta de ella. Así, el establecimiento de la relación planta-parasitoide favorece a los dos involucrados. Un creciente número de estudios, tanto de laboratorio como de campo, han mostrado la importancia de los compuestos volátiles liberados por las plantas en respuesta a la alimentación de los herbívoros (ver Olson et al. 2003). La liberación, por parte de pinos dañados, de un terpeno (α -pineno) que atrae al pteromárido *Heydenia unica* Cook et Davis (un parasitoide del escarabajo *Dendroctonus frontalis* Zimmermann (Coleoptera: Curculionidae), Camors y Payne 1972) es un buen ejemplo de este tipo de sistemas. También se han encontrado respuestas semejantes en parasitoides dípteros de la familia Tachinidae (Stireman 2002).

En algunos casos, la respuesta de la planta se produce únicamente cuando el daño sobre alguna de sus estructuras es ocasionado por el hospedador y no a consecuencia de un daño de otro origen. Por ejemplo, *Cotesia marginiventris* Cresson (Hymenoptera: Braconidae) responde más fuertemente a hojas dañadas por su hospedador, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), que a hojas dañadas artificialmente. Aparentemente la saliva del hospedador induce a la planta a liberar terpenoides e indoles que son atractivos para el parasitoide (Turlings et al. 1990, 1991a, 1991b). Mattiacci et al. (1995), trabajando con el parasitoide *Cotesia glomerata* L. (Hymenoptera: Braconidae) (y su hospedador *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae)), y Blassiolo Moraes et al. (2005), con el parasitoide *Telonomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) y su hospedador *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), encontraron una respuesta semejante. Por su parte, Tenteliet al. (2005) concluyen también que *Lysiphlebus testaceipes* Cresson (Hymenoptera: Braconidae) utiliza emisiones de compuestos específicos que son liberados por la planta de la que se alimenta su hospedador (*Aphis gossypii* Glover, Homoptera: Aphididae).

Las moscas de la fruta de la familia Tephritidae tienen numerosos parasitoides asociados. Las distintas especies de parasitoides atacan tanto al huevo, como a las larvas y a las pupas. La importancia de las claves químicas durante el proceso de búsqueda del hospedador ha sido estudiada principalmente en parasitoides de huevo y de larva. Dentro de los primeros, la especie más estudiada es *Fopius arisanus* Sonan (Hymenoptera: Braconidae), básicamente por su importancia como agente de control de estas moscas plaga. Las hembras de este parasitoide son capaces de detectar volátiles emitidos por las hojas y los frutos de la planta hospedadora, así como las heces de las moscas adultas, y compuestos depositados junto con los huevos por las moscas hembra, mostrando el importante rol que las claves químicas tienen durante el forrajeo en esta especie (Rousse y Quilici 2006).

Dentro de los parasitoides de moscas de la fruta que atacan larvas, las especies más estudiadas han sido tal vez *D. longicaudata* y *Diachasmimorpha juglandis* Muesebeck (Hymenoptera: Braconidae). Esta última ataca larvas de especies del género *Rhagoletis* refugiadas dentro de los frutos del nogal (Henneman 1998). El estudio de las claves químicas utilizadas durante la búsqueda de hospedadores mostró que estos parasitoides prefieren frutos infestados y no infestados pero dañados artificialmente, sobre frutos no infestados e intactos (Henneman et al. 2002). Aparentemente, el daño sobre la fruta (ocasionado por la puntura de la mosca o por cualquier otro motivo) es suficiente para que los parasitoides visiten esta fruta durante la búsqueda de hospedadores. No obstante, existen todavía claves químicas presentes en frutos infestados y no infestados que no han sido estudiadas.

En el caso de *D. longicaudata* los estudios relacionados a la importancia de las claves químicas utilizadas por las hembras han sido escasos y los avances son sólo parciales. Estos estudios concuerdan en que las hembras de este parasitoide son capaces de diferenciar los frutos infestados con larvas de los no infestados, analizando frutos de distintas especies frutales (pomelo, mango, y durazno) atacadas por especies de moscas del género *Anastrepha* (Greany et al. 1977, Eben et al. 2000, Carrasco et al. 2005). Greany et al. (1977) propusieron que esta respuesta es independiente de la presencia de larvas y que la atracción se debe a productos de fermentación fúngica más que a compuestos liberados por las larvas. Por su parte, Carrasco et al. (2005) concluyen que

la presencia de larvas sería de fundamental importancia pues encontraron que mangos infestados atraen significativamente más parasitoides que mangos intactos y mangos dañado artificialmente.

Las claves químicas parecen ser importantes también durante las fases finales del proceso de búsqueda de hospedadores por parte de *D. longicaudata*. Duan y Messing (2000) mostraron que las hembras del parasitoide utilizan compuestos químicos provenientes de la actividad de las larvas de *C. capitata*, puesto que la presencia de estos compuestos desencadena un aumento en la tasa de intentos de oviposición (sondeo que realiza la hembra insertando su ovipositor en el sustrato, el cual puede o no terminar en una oviposición exitosa). Las hembras integrarían esta información con la información proveniente de las vibraciones producidas por las larvas, que también son detectadas y utilizadas por los parasitoides hembra para localizar los hospedadores (Lawrence 1981).

Aún cuando la importancia de las claves químicas asociadas a la fruta infestada ha sido destacada en más de una oportunidad, en ningún caso se ha intentado disociar cada una de las potenciales fuentes de compuestos volátiles asociados a un fruto infestado por larvas de mosca de la fruta. Asimismo, los estudios realizados están concentrados en larvas de *Anastrepha*, sin considerar que en muchos casos las larvas de *C. capitata* son tanto o más abundantes que las de *Anastrepha*. Por otro lado, se estudió la importancia de las claves químicas sobre el comportamiento de oviposición con larvas de *C. capitata*, estos estudios no involucraron nunca sustratos de búsqueda naturales (i.e., frutos infestados), reflejando solo la respuesta de las hembras en medios artificiales de cría de larvas de mosca de la fruta.

5.2. Objetivos

5.2.1. Objetivo general

Encontrar señales químicas derivadas o asociadas a la actividad de *C. capitata* que sean usadas por *D. longicaudata* y analizar el comportamiento exhibido por las hembras sobre distintos tipos de frutos, comparando la capacidad de búsqueda entre dos cepas de *D. longicaudata* (MI94 y Cast191).

5.2.2. Objetivos específicos

- 1) Analizar el grado de atracción de hembras *naïve* de *D. longicaudata* hacia frutos sometidos a distintos tratamientos en una arena experimental, a fin de encontrar señales químicas derivadas o asociadas a la actividad del hospedador *C. capitata* que sean utilizadas por el parasitoide durante la búsqueda de hospedadores.
- 2) Analizar la influencia de la presencia de larvas y de compuestos asociados a la actividad de estas sobre el comportamiento de oviposición de *D. longicaudata*, utilizando el hábitat natural de la mosca (i.e. frutos).
- 3) Comparar la capacidad de búsqueda de dos cepas de *D. longicaudata*, que difieren en la línea de *C. capitata* usada como sustrato de cría.

5.3. Materiales y Métodos

5.3.1. Insectos

El material biológico utilizado en los ensayos provino de las crías que se mantienen en el IGEAF (INTA Castelar). Se utilizaron hembras de entre 5-7 días desde la emergencia y sin experiencia previa de oviposición. Los ensayos fueron realizados con parasitoides de las dos cepas mantenidas en el IGEAF (Cast191 y MI94). Hasta el momento del ensayo las hembras fueron mantenidas con machos en condiciones controladas (T: 25°; Hr: 60%-70%; fotoperíodo: 14-10) y provistas de agua y de miel.

5.3.2. Condiciones experimentales

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Comportamiento del IGEAF. En esta sala se colocó una jaula de elección de 100 cm de longitud, 40 cm de ancho y 40 cm de altura. La misma tiene una estructura de hierro sobre la cual se colocó una funda confeccionada en tul blanco (Figura 5.1). Las condiciones de trabajo fueron: 1200±100 luxes, 25±1°C, 65±5%.

5.3.3. Metodología general

En los experimentos 1 a 8 se utilizaron frutos naturales sujetos a distintos tratamientos. La especie frutal elegida fue naranja, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, variedad W. Navel, debido a que se encuentra disponible en el mercado durante un lapso de tiempo suficientemente extenso como para asegurar que todos los ensayos se realizaran con el

mismo hospedador de mosca de la fruta. Los frutos ofrecidos fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales de temperatura y humedad desde el momento de su compra hasta el momento del ensayo (T: $25\pm 1^\circ\text{C}$, Hr: $50\pm 5\%$) y solo difirieron en el tratamiento recibido. Los frutos utilizados no mostraban signos externos de infestación por moscas de las frutas ni signos de contaminación por hongos.

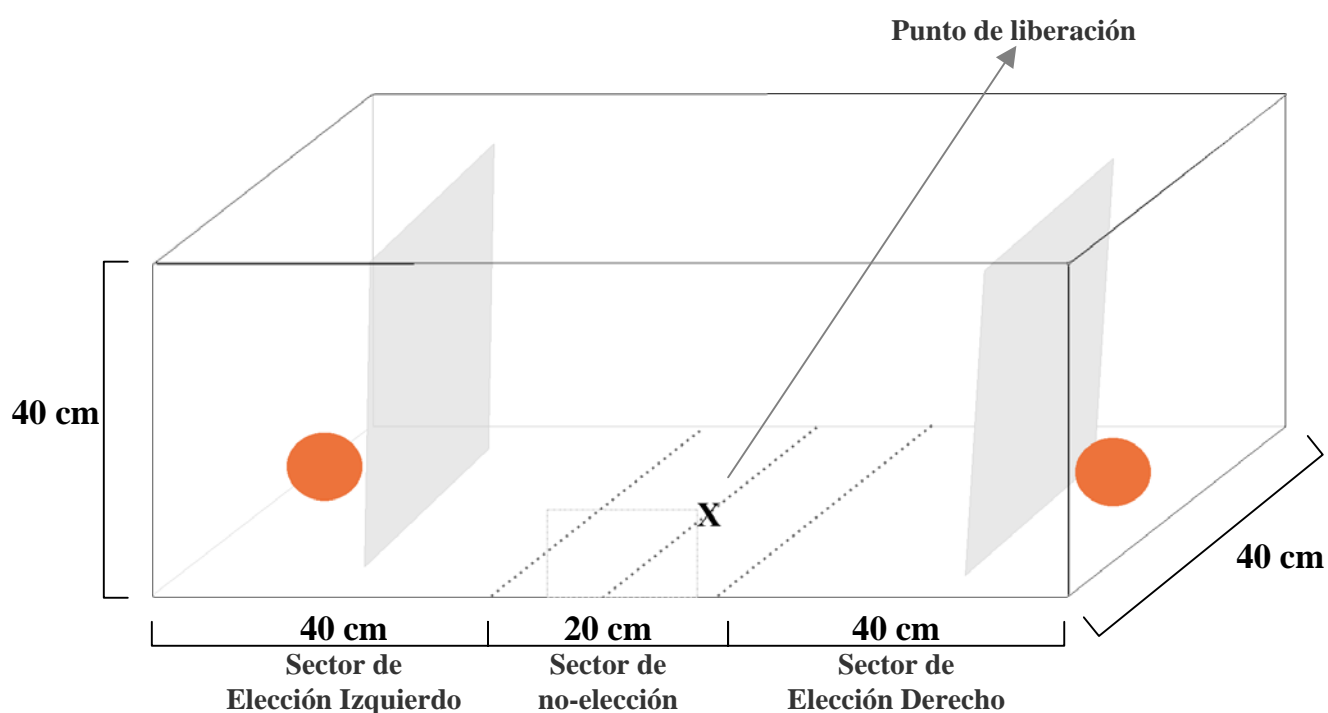


Figura 5.1. Jaula utilizada en los ensayos de elección.

En todos los ensayos, las opciones fueron presentadas de a pares ante los parasitoides, colocándolas hacia los extremos opuestos de la jaula. Dos hojas de papel blanco se colocaron en forma perpendicular al piso de la jaula de manera de impedir que las hembras vieran las opciones ofrecidas y que solo se guiaran por los olores (Figura 5.1). Las hembras fueron liberadas sobre el piso de la jaula, justo en el punto medio. En total, se analizaron 40 hembras por tratamiento y por cepa de parasitoides.

Para estudiar la preferencia de las hembras por las diferentes fuentes de olor presentadas, se dividió a la jaula en tres sectores de igual superficie: dos hacia los

extremos (que corresponden a las cercanías a cada uno de los estímulos olfativos) y una zona intermedia en la que se consideró que el individuo no realizó ninguna opción (ver Figura 5.1). Se consideró que una hembra ingresaba en un sector cuando esta pasaba más de 15 segundos en él. Las hembras que pasaban más de 5 minutos en el techo fueron descartadas como observación, pues la misma no exhibía comportamiento de búsqueda de hospedadores.

En un ensayo preliminar se analizó si las hembras eran capaces de encontrar las frutas dentro de la jaula. Para esto se colocó una naranja en uno de los extremos y se analizó si las hembras liberadas en forma individual encontraban la fruta dentro de los 10 minutos luego de su liberación. Se encontró que en el 75% de los casos las hembras visitaron la fruta dentro de este intervalo de tiempo. De los casos restantes, en el 50% las hembras pasaron más tiempo en el sector donde había sido colocado el fruto, mientras que el otro 50% las hembras no mostraron comportamientos de búsqueda, permaneciendo durante todo el ensayo en el techo de la jaula. Estos resultados permitieron determinar que el diseño utilizado (jaula, condiciones ambientales, tiempo de observación, etc.) era apropiado para analizar la preferencia de las hembras y su comportamiento de oviposición y que un tiempo de observación de 10 minutos permitía estudiar la respuesta de las hembras en el 80% de los casos aproximadamente.

Sobre la base de los ensayos preliminares, cada hembra fue observada durante 10 minutos o hasta que eligió una opción (lo que ocurrió primero). Una vez sobre la opción elegida, las hembras fueron observadas por 10 minutos o hasta que abandonaran la fuente visitada (lo que ocurrió primero). En este periodo de tiempo se registró: 1) el primer sector visitado; 2) el tiempo que pasó en cada sector de la jaula; 3) la opción visitada; 4) la latencia para la visita (tiempo que transcurre entre la liberación del individuo y la elección de una opción); 5) el tiempo de permanencia en la opción elegida; 6) el número de intentos de oviposición (IOs) exhibidos sobre la opción visitada; 7) la latencia para el primer IO (tiempo desde que se posa sobre la opción elegida hasta que intenta oviponer); y 8) duración (en segundos) de cada IO. Con estos datos se estimaron, además, las siguientes variables: 1) porcentaje del tiempo que pasa en las cercanías de cada fruto; 2) tasa de IOs (número de intentos de oviposición min^{-1});

3) el tiempo total dedicado a IO; 4) la duración promedio del IO; y 5) la proporción del tiempo dedicada a IOs (tiempo total dedicado a IOs / permanencia).

5.3.4. Experimentos realizados

5.3.4.1. Experimento 1. Efecto de la infestación de la fruta. Se les ofrecieron a las hembras dos opciones: un fruto infestado por larvas de *Ceratitis capitata* y un fruto intacto. Para conseguir la infestación, los frutos fueron expuestos ante 60 hembras apareadas de *C. capitata* durante 3 horas. La cantidad de hembras y el tiempo de exposición de los frutos fueron elegidos de manera de obtener frutos con densidades de larvas semejantes a las que se encuentran en la naturaleza (Segura et al. 2004). Previo a la exposición, la fruta fue lavada para eliminar posibles agentes químicos. Luego, las naranjas fueron retiradas y mantenidas en condiciones controladas hasta que desarrollaron larvas de *C. capitata* en estadio 2 tardío o 3 temprano. En ese momento se realizó el ensayo. Un grupo de naranjas de la misma partida fue mantenido en las mismas condiciones a excepción de la exposición a moscas, y fue utilizado como la opción alternativa en este ensayo.

5.3.4.2. Experimento 2. Importancia de la puntura en la fruta atacada. Las opciones ofrecidas dentro de la jaula fueron frutos pinchados artificialmente y frutos intactos. Las punturas se realizaron con la ayuda de un alfiler entomológico “00”. Los frutos pinchados se dejaron en cámara durante 13-14 días, tiempo estimado que tarda una larva en alcanzar el tercer estadio en estos frutos, y transcurrido este tiempo se condujo el ensayo. Para determinar el número de punturas a realizar en cada fruto, se colocaron frutos en las mismas condiciones que aquellos expuestos a *C. capitata* en el experimento 1, pero recubiertos previamente con una película de Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago EEUU). Luego de 3 horas se retiró la fruta y se contaron las perforaciones encontradas en la película de Parafilm. Se encontró que cada fruto recibió un promedio de 15,00 ($\pm 1,95$) punturas. Se tomó este número como la cantidad de punturas a realizar en cada fruto.

5.3.4.3. Experimento 3. Influencia de señales químicas provenientes de la comunicación o de la actividad de la mosca sobre el fruto. Se estudió el efecto que tienen las sustancias dejadas por los adultos de la mosca sobre el comportamiento de búsqueda y

oviposición del parasitoide. Para esto se analizó la respuesta de hembras a las que se les ofrecieron frutos infestados naturalmente, a los que se les retiró las señales provenientes de la actividad de los adultos (feromona de marcado de la hembra, feromonas sexuales de los machos, fecas), y frutos infestados en los que no se removieron estas señales. Para obtener naranjas de ambos tratamientos se expusieron dos naranjas en forma simultánea a una población de laboratorio de *C. capitata*, estando uno de estos frutos forrado en Parafilm. El Parafilm fue luego retirado, de manera que los dos frutos posean los huevos en su interior pero difieran en las posibles marcas que hayan dejado los adultos sobre su superficie. En un ensayo preliminar se constató que la presencia del Parafilm no limita el ataque de la mosca ni la normal infestación del fruto. Luego del ensayo, los frutos fueron mantenidos hasta obtener el recuento de pupas/fruto, para asegurar que los frutos ofrecidos cargaran con un número de larvas semejante.

5.3.4.4. Experimento 4. Importancia de compuestos depositados por las hembras junto con los huevos. Dentro de la jaula se les ofreció a las hembras una fruta que fue expuesta a *C. capitata* y una fruta pinchada artificialmente e inoculada con huevos de *C. capitata*. Los huevos fueron colectados en frutos artificiales, lavados cinco veces con agua bidestilada, y colocados en las punciones realizadas con un alfiler entomológico. Como resultado del estudio previo en el que se expusieron frutos envueltos en Parafilm, se concluyó que el número promedio de huevos por puntura fue aproximadamente seis huevos. Basados en estos resultados, se realizaron 15 punturas dentro de las cuales se colocaron seis huevos de *C. capitata*. De esta manera, ambos frutos poseen punturas y huevos, pero difieren en los productos que la hembra puede depositar al oviponer. Los frutos se dejaron 24-48 horas en cámara y luego se realizó el ensayo de elección y comportamiento de oviposición en la jaula. Después del ensayo, los frutos utilizados fueron mantenidos hasta obtener el recuento de pupas/fruto, para asegurar que estos contenían un número semejante de huevos al momento del ensayo. No obstante esto no pudo ser determinado ya que los frutos infestados artificialmente no produjeron pupas, presentando un alto nivel de proliferación de hongos, lo que pudo afectar el desarrollo de las larvas eclosionadas en estos frutos.

5.3.4.5. Experimento 5. Importancia de compuestos liberados por las larvas de C. capitata. En este experimento se colocaron en la arena experimental naranjas

mantenidas por 13 días después de su compra en condiciones controladas (y que no mostraban signos de pudrición ni contaminación con hongos) en ambos extremos, y se agregó sólo en uno de ellos, un recipiente con larvas de *C. capitata* del tercer estadio lavadas cinco veces con agua bidestilada. De esta manera hacia los dos lados de la jaula las opciones diferían solo en los posibles compuestos liberados por las larvas. Si las larvas produjesen por sí solas algún olor que es seguido por los parasitoides, cabría esperar mayor cantidad de visitas en el extremo con larvas.

5.3.4.6. Experimento 6. Influencia de compuestos provenientes de la actividad de las larvas. En este caso se analizó la respuesta de las hembras ante fruta expuesta a *C. capitata* de las que han escapado las larvas en comparación con frutos pinchados artificialmente. Para esto, de un grupo de naranjas de la misma partida se tomó la mitad y se expusieron a moscas, y el resto se pincharon con un alfiler entomológico “00”. Luego se dejaron en cámara a 26°C. Dos días después de la salida de las primeras larvas se realizó el ensayo en jaulas. Es importante señalar que los frutos infestados usados mantenían buenas condiciones generales (no mostraban estado de pudrición avanzado, ni existencia de hongos en su superficie). Cada fruto usado se mantuvo en observación luego del ensayo por un lapso de 7 a 10 días, para verificar que no salieran más larvas. Luego de este período, se disecaron todas las frutas para constatar que no hubieran larvas (ya sea vivas o muertas) dentro de estos. En caso de encontrar que en un fruto utilizado en este ensayo todavía quedaban larvas en su interior, las observaciones hechas sobre ese fruto fueron eliminadas del conjunto de datos.

5.3.4.7. Experimento 7. Importancia de compuestos asociados al desarrollo de hongos en los frutos. Se ofrecieron frutos perforados artificialmente que mostraban en su superficie signos de estar infectados con hongos, y frutos pinchados sin evidencias externas de hongos. Estos hongos crecen en forma espontánea sobre frutos pinchados, pero no lo hacen en todos los casos. Aprovechando esto, se perforaron frutos y se los dejó a temperatura ambiente (25°C aproximadamente) hasta que alguno de ellos mostraron la presencia del hongo (6 a 10 días). En ese momento se realizó el ensayo.

5.3.4.8. Experimento 8. Importancia de compuestos liberados por la fruta en estado de pudrición. En este experimento se ofreció a las hembras del parasitoide fruta en estado

de pudrición avanzado y fruta madura de la misma partida. En el experimento 1, los frutos infestados habían alcanzado un estado de pudrición bastante alto, incluso algunas de las frutas infestadas usadas habían comenzado a perder parte del jugo. En el presente experimento se trabajó con fruta no infestada que sólo difirió en su estado de maduración. Se consideró “estado de maduración avanzado” (o fruta podrida) a aquellos frutos que habían comenzado a perder jugo y a presentar sectores blandos y descoloridos en su epicarpio. Frutos de la misma partida que los anteriores pero sin mostrar estas características se consideraron como fruta aún madura.

5.3.4.9. Experimento 9. Importancia de compuestos provenientes de la actividad de la larva utilizando dieta artificial. Se repitió el experimento 6 pero utilizando medio artificial de cría de larvas de *C. capitata*. Para esto, de una porción de dieta artificial que contenía larvas del tercer estadio se removieron todas las larvas presentes, y se colocó el remanente dentro de una caja de Petri (10cm de diámetro, 1cm de profundidad). La misma cantidad de dieta artificial de la misma partida pero no usada para criar larvas fue colocada en otra caja de Petri, y presentada a las hembras del parasitoides en el otro extremo de la jaula. De esta manera, hacia ambos extremos de la jaula las opciones solo diferían en los compuestos producidos como resultado de la actividad de las larvas, como en el experimento 6, pero en un sustrato artificial.

5.3.5. Análisis de datos

5.3.5.1. Control de posición. Para analizar si la posición de las opciones dentro de la jaula influye sobre la respuesta de las hembras, se buscó si existe una tendencia a visitar con más frecuencia el sector ubicado a derecha o izquierda. Para esto se realizó una prueba de bondad de ajuste de G corregida por Yates comparando el número observado de visitas a ambos sectores con el número esperado bajo una hipótesis de igual proporción de visitas.

5.3.5.2. Comparación entre Cast191 y MI94. Se analizó si existe alguna diferencia entre las dos cepas de parasitoides, en los patrones comportamentales registrados. Las variables comparadas fueron: 1) proporción del tiempo dedicado a la búsqueda (tiempo total en sectores de elección / tiempo total de observación); 2) porcentaje de hembras que visitan algún fruto; 3) latencia en la visita de frutos infestados; 4) permanencia en

frutos infestados; 5) proporción de hembras que eligen fruto infestado; 6) porcentaje de hembras que intentan oviponer; 7) tasa de IOs (intentos de oviposición); 8) latencia para los IOs; y 9) proporción del tiempo dedicado a IOs. Las variables 2, 5, y 6 fueron analizadas mediante una prueba de heterogeneidad de G corregida por Yates (asegurando que el promedio de las frecuencias esperadas sea mayor a 6, supuesto de esta prueba estadística según Zar 1996). El resto de las variables fueron analizadas mediante un ANOVA de un factor, o una prueba de Kruskal Wallis si los datos no cumplían el supuesto de homocedacia y el desvío de la homocedasticidad era pequeño. Cuando el desvío de la homocedasticidad era grande, los datos fueron transformados y fueron analizados mediante un ANOVA de un factor (Zar 1996).

5.3.5.3. Comportamiento de búsqueda. El tiempo pasado en cada sector de la jaula fue analizado mediante una prueba de t pareada, o una prueba de Wilcoxon si no cumplía el supuesto de normalidad (Zar 1996). El primer sector visitado y el modelo visitado fueron analizados con una prueba de bondad de ajuste de G corregida por Yates (corrección sugerida cuando hay un solo grado de libertad) contra la hipótesis de igual número de visitas. La latencia para la visita y la permanencia sobre el fruto visitado fueron analizadas mediante un ANOVA de un factor, o una prueba de Kruskal Wallis si no se cumplía el supuesto de homocedacia y el desvío de la homocedasticidad era pequeño, o transformación de los datos si el desvío de la homocedasticidad era grande (Zar 1996).

5.3.5.4. Comportamiento de oviposición. La latencia para el primer IO, el número de IOs, la tasa de IOs, la duración total de los IOs, la duración promedio de los IOs, y la proporción del tiempo dedicado a IOs, fueron analizadas mediante un ANOVA de un factor, o una prueba de Kruskal Wallis si no se cumplía homocedacia y el desvío de la homocedasticidad era pequeño, o transformación de los datos si el desvío de la homocedasticidad era grande. Finalmente, los intentos de oviposición en los dos frutos ofrecidos se compararon mediante prueba de heterogeneidad de G corregida por Yates (previamente se verificó para cada caso que el promedio de las frecuencias esperadas sea superior a 6).

Los análisis de varianza fueron realizados utilizando el programa Statistica for Windows (Statsoft Inc., 2000).

5.4. Resultados

5.4.1. Control de posición

Al comparar el número de casos en que el primer sector visitado fue el izquierdo o el derecho se encontró que en 7 de los 9 experimentos no hubo diferencias entre los dos sectores (ambos sectores fueron visitados en concordancia con las frecuencias esperadas bajo la hipótesis de igual proporción). Si bien en los experimentos 3 y 4 las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$), en el experimento 3 el sector favorecido fue el izquierdo, mientras que en el experimento 4 el sector más visitado fue el derecho. En el caso del número de visitas a frutos ubicados a izquierda o derecha, solo en el experimento 3 se detectaron diferencias significativas (el sector izquierdo fue el que recibió más visitas). Teniendo en cuenta la baja cantidad de casos en que se encontraron diferencias entre sectores y que estas diferencias no señalan, en su conjunto, a un solo sector, se consideró que no hubo efecto del sector en la preferencia de las hembras.

5.4.2. Comparación de Cast191 y MI94

La Tabla 5.1 muestra los valores promedio y los porcentajes registrados para cada una de las variables analizadas en hembras de la cepa Cast191 y de la cepa MI94, para el experimento 1. A excepción de la latencia exhibida para visitar al fruto infestado (para la cual la cepa Cast191 mostró valores significativamente mayores) ninguna de las variables analizadas mostraron diferencias entre estas cepas. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió agrupar los datos para las dos cepas y luego analizar los patrones de preferencia y de oviposición. Lo mismo se hizo al analizar los datos registrados en los experimentos subsiguientes.

5.4.3. Experimento 1. Efecto de la infestación de la fruta

Comportamiento de búsqueda. Los resultados del experimento 1 se muestran en la Tabla 5.2. Todas las variables de preferencia en la visita, a excepción de la latencia, mostraron la existencia de diferencias significativas entre los dos tipos de fruta. Las hembras visitaron primero el sector donde se encontraban los frutos infestados, los visitaron preferentemente, pasaron más tiempo en el lado donde estos se encontraban y

permanecieron durante más tiempo en los frutos infestados (en los cuales las hembras pasaron casi la totalidad del tiempo de observación, 600 segundos).

Variable analizada	Valores registrados	Estadístico	Valor P
Proporción del tiempo dedicado a la búsqueda	Cast191: 0,641 (0,036) MI94: 0,568 (0,046)	F = 1,454	0,232
Porcentaje de hembras que eligen	Cast191: 62,50% MI94: 65,00%	Gy = 0,000	P > 0,999
Latencia para fruto infestado	Cast191: 346,091 (41,790) MI94: 229,652 (34,863)	F = 4,610	0,037
Permanencia en el fruto infestado	Cast191: 500,318 (41,778) MI94: 543,695 (31,527)	F = 0,695	0,409
Elección de la fruta infestada	Cast191: 88,00% MI94: 88,46%	Gy = 0,149	0,50 < P < 0,75
Porcentaje de IO	Cast191: 72,73% MI94: 86,96%	Gy = 1,443	0,10 < P < 0,25
Tasa de IO	Cast191: 0,329 (0,038) MI94: 0,367 (0,046)	F = 0,424	0,519
Latencia para IO	Cast191: 187,000 (36,974) MI94: 149,000 (33,508)	F = 0,578	0,452
Proporción el tiempo IO	Cast191: 0,411 (0,051) MI94: 0,358 (0,046)	F = 0,563	0,458

Tabla 5.1. Comparación entre Cast191 y MI94. Porcentaje de observaciones y valores promedio para cada cepa, seguidos del valor del estadístico empleado (F para ANOVA de dos vías, Gy para prueba de heterogeneidad) y valor P para cada prueba. El valor F presentado corresponde al factor Cepa (en ningún caso se encontró interacción significativa entre factores).

Comportamiento de oviposición. En la Tabla 5.2 se presentan los resultados de las variables analizadas a partir del momento en que las hembras tomaban contacto con el fruto. De las hembras que visitaron el fruto infestado, un 80% realizaron IO, mientras que ninguna de las hembras que visitaron frutos no infestados exhibió IO (estas diferencias en la tendencia a IO fueron estadísticamente significativas). El hecho de no registrar IO sobre frutos no infestados impidió continuar con el análisis estadístico del resto de las variables.

5.4.4. Experimento 2. Importancia de la puntura en la fruta atacada

Comportamiento de búsqueda. La Tabla 5.3 muestra los resultados del experimento en que se compararon frutos no infestados pinchados y no pinchados. En ningún caso se encontraron diferencias significativas en las variables analizadas, tanto en la visita como en los tiempo pasados en cada sector, la latencia, y la permanencia.

Comportamiento de oviposición. La Tabla 5.3 muestra que las hembras que visitaron los frutos pinchados tuvieron una mayor tendencia a realizar IO que las hembras que visitaron frutos no pinchados. No obstante, el resto de las variables asociadas al comportamiento de oviposición no mostraron diferencias entre los frutos ofrecidos.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Infestado: 60 No Infestado: 20	Gy = 19,85	P < 0,001
Opción elegida	Infestado: 45 No Infestado: 6	Gy = 31,79	P < 0,001
Tiempo en cada sector	Infestado: 200,25 (21,41) No Infestado: 75,33 (16,98)	F ^P = 3,90	0,0002
Latencia visita	Infestado: 286,58 (28,20) No Infestado: 282,83 (35,56)	F = 0,002	0,96
Permanencia	Infestado: 522,50 (25,92) No Infestado: 307,50 (82,37)	F = 7,81	0,007
Tendencia a IO	Infestado: 36/45 No Infestado: 0/6	Gy = 11,96	P < 0,001
Latencia para IO	Infestado: 165,89 (24,68) No Infestado: -	-	-
Número de IO	Infestado: 2,75 (0,32) No Infestado: -	-	-
Tasa de IO	Infestado: 0,35 (0,03) No Infestado: -	-	-
Duración total IO	Infestado: 224,91 (20,14) No Infestado: -	-	-
Duración promedio IO	Infestado: 74,91 (8,03) No Infestado: -	-	-
Proporción del tiempo IO	Infestado: 0,38 (0,03) No Infestado: -	-	-

Tabla 5.2. Resultados del Experimento 1. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico, y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; F^P: prueba de T pareado).

5.4.5. Experimento 3. Influencia de señales químicas provenientes de la comunicación o de la actividad de la mosca sobre el fruto

Comportamiento de búsqueda. Los resultados del experimento en que se comparó la respuesta de las hembras ante frutos expuestos a moscas con y sin Parafilm se muestran en la Tabla 5.4. Los parasitoides visitaron ambos sectores por igual, ambos frutos por igual, y pasaron una cantidad de tiempo semejante en cada sector. Asimismo, la latencia y la permanencia mostraron ser similares para los dos tipos de frutos (sin diferir

estadísticamente). Nuevamente la permanencia fue muy alta, mostrando que las hembras pasaron casi todo el tiempo de observación sobre el fruto visitado.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Pinchado: 45 No pinchado: 35	Gy = 1,02	0,25 < P < 0,50
Opción elegida	Pinchado: 31 No pinchado: 18	Gy = 2,97	0,05 < P < 0,1
Tiempo en cada sector	Pinchado: 134,64 (18,70) No pinchado: 118,38 (19,08)	F ^P = 0,50	0,617
Latencia visita	Pinchado: 240,19 (27,31) No pinchado: 298,56 (47,93)	F = 1,305	0,26
Permanencia	Pinchado: 493,10 (31,56) No pinchado: 443,33 (44,74)	F = 0,86	0,358
Tendencia a IO	Pinchado: 13/31 No pinchado: 2/18	Gy = 4,052	0,01 < P < 0,05
Latencia para IO	Pinchado: 271,15 (38,41) No pinchado: 344,50 (49,50)	F = 0,458	0,511
Número de IO	Pinchado: 1,23 (0,12) No pinchado: 1,00 (0,00)	F = 0,520	0,484
Tasa de IO	Pinchado: 0,12 (0,01) No pinchado: 0,10 (0,00)	F = 0,535	0,477
Duración total IO	Pinchado: 29,72 (5,93) No pinchado: 17,67 (6,24)	F = 3,091	0,102
Duración promedio IO	Pinchado: 24,02 (4,54) No pinchado: 17,65 (6,24)	F = 0,276	0,102
Proporción del tiempo IO	Pinchado: 0,05 (0,01) No pinchado: 0,03 (0,01)	F = 0,595	0,454

Tabla 5.3. Resultados del Experimento 2. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; F^P: prueba de T pareado).

Comportamiento de oviposición. El análisis del comportamiento de las hembras una vez sobre los frutos muestra que la tendencia a realizar IO fue alta (90-95%) para los dos tipos de frutos ofrecidos y que las hembras dedicaron una gran proporción del tiempo a este comportamiento (Tabla 5.4). En ningún caso se encontraron diferencias entre frutos en las variables analizadas.

5.4.6. Experimento 4. Importancia de compuestos depositados por las hembras junto con los huevos

Comportamiento de búsqueda. Al presentar a las hembras frutos inoculados artificialmente con huevos de *C. capitata* y frutos infestados naturalmente por las

moscas, estas no mostraron ningún patrón de preferencia por estos frutos (Tabla 5.5). El número de visitas a cada sector y cada fruto, el tiempo pasado en cada sector, la latencia y la permanencia no difirieron estadísticamente entre las opciones presentadas.

Comportamiento de oviposición. Los resultados (Tabla 5.5) muestran que no hubo una mayor tendencia a realizar IO en uno u otro fruto. En ambos casos la frecuencia fue baja (10-20%). El resto de las variables tampoco mostraron diferencias entre los dos tipos de fruta y, en general, revelan una baja actividad de oviposición sobre los frutos en este experimento.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Con Parafilm: 45 Sin Parafilm: 35	Gy = 1,02	0,25 < P < 0,50
Opción elegida	Con Parafilm: 39 Sin Parafilm: 28	Gy = 1,50	0,1 < P < 0,25
Tiempo en cada sector	Con Parafilm: 74,15 (11,69) Sin Parafilm: 79,51 (13,76)	F ^p = 0,283	0,778
Latencia visita	Con Parafilm: 212,21 (24,00) Sin Parafilm: 186,04 (23,91)	F = 0,564	0,46
Permanencia	Con Parafilm: 577,21 (14,78) Sin Parafilm: 600 (0,00)	F = 0,92	0,341
Tendencia a IO	Con Parafilm: 35/39 Sin Parafilm: 27/28	Gy = 0,320	0,50 < P < 0,75
Latencia para IO	Con Parafilm: 241,42 (25,85) Sin Parafilm: 184,00 (24,71)	F = 2,465	0,122
Número de IO	Con Parafilm: 2,17 (0,15) Sin Parafilm: 2,41 (0,25)	F = 0,712	0,402
Tasa de IO	Con Parafilm: 0,24 (0,03) Sin Parafilm: 0,22 (0,01)	F = 0,712	0,402
Duración total IO	Con Parafilm: 199,04 (18,53) Sin Parafilm: 227,65 (21,48)	F = 1,022	0,316
Duración promedio IO	Con Parafilm: 94,43 (7,39) Sin Parafilm: 119,08 (20,10)	F = 0,773	0,316
Proporción del tiempo IO	Con Parafilm: 0,33 (0,03) Sin Parafilm: 0,38 (0,04)	F = 0,023	0,880

Tabla 5.4. Resultados del Experimento 3. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; F^p: prueba de T pareado).

5.4.7. Experimento 5. Importancia de compuestos liberados por las larvas de *C. capitata*

Comportamiento de búsqueda. La respuesta de las hembras ante frutos acompañados o no de larvas del tercer estadio de *C. capitata* se muestra en la Tabla 5.6. Las visitas

registradas a sectores y frutos que diferían en el tratamiento no mostraron diferencias significativas. De la misma manera el tiempo pasado en cada sector, la latencia, y la permanencia no mostraron diferencias entre frutos.

Comportamiento de oviposición. En ninguno de los dos tipos de frutos se registraron IO. Por lo tanto fue imposible analizar las variables que describen este comportamiento en este experimento.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Inf. artificial: 33 Inf. natural: 47	Gy = 2,46	0,10 < P < 0,25
Opción elegida	Inf. artificial: 16 Inf. natural: 21	Gy = 0,43	0,50 < P < 0,75
Tiempo en cada sector	Inf. artificial: 154,74 (21,42) Inf. natural: 159,40 (21,42)	F ^p = 0,13	0,901
Latencia visita	Inf. artificial: 248,47 (35,48) Inf. natural: 320,07 (46,95)	F = 1,540	0,22
Permanencia	Inf. artificial: 527,44 (39,82) Inf. natural: 481,29 (43,05)	F = 0,58	0,450
Tendencia a IO	Inf. artificial: 2/16 Inf. natural: 4/21	Gy = 0,293	0,50 < P < 0,75
Latencia para IO	Inf. artificial: 229,50 (202,50) Inf. natural: 74,25 (26,27)	F = 0,312	0,606
Número de IO	Inf. artificial: 1,25 (0,25) Inf. natural: 1,50 (0,50)	F = 0,267	0,633
Tasa de IO	Inf. artificial: 0,15 (0,05) Inf. natural: 0,13 (0,03)	F = 0,267	0,633
Duración total IO	Inf. artificial: 79,80 (7,63) Inf. natural: 89,68 (23,03)	F = 0,080	0,791
Duración promedio IO	Inf. artificial: 57,94 (14,23) Inf. natural: 77,48 (24,79)	F = 0,262	0,791
Proporción del tiempo IO	Inf. artificial: 0,13 (0,01) Inf. natural: 0,15 (0,03)	F = 0,080	0,791

Tabla 5.5. Resultados del Experimento 4. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; F^p: prueba de T pareado).

5.4.8. Experimento 6. Influencia de compuestos provenientes de la actividad de las larvas

Comportamiento de búsqueda. Los resultados obtenidos para este experimento se muestran en la Tabla 5.7. Tanto el sector que contenía los frutos infestados (de los cuales habían escapado las larvas) como los mismos frutos recibieron un número de visitas significativamente mayor que el esperado bajo una hipótesis de igual número de

visitas. El tiempo pasado en este sector fue, asimismo, significativamente mayor. No obstante, la latencia y la permanencia registrada para los frutos infestados sin larvas no difirieron de aquellas registradas para frutos no infestados (Tabla 5.7).

Comportamiento de oviposición. La frecuencia con la cual las hembras realizaron IO sobre los frutos infestados (pero sin larvas) fue significativamente mayor a la registrada para frutos no infestados (Tabla 5.7). El hecho de encontrar sólo una hembra que intentara ovipositar sobre frutos no infestados impidió realizar el análisis estadístico del resto de las variables asociadas al comportamiento de oviposición. La Tabla 5.7 presenta solamente los valores promedio y su error estándar.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Con larvas: 37 Sin larvas: 43	Gy = 0,31	0,50 < P < 0,75
Opción elegida	Con larvas: 18 Sin larvas: 21	Gy = 0,10	0,75 < p < 0,90
Tiempo en cada sector	Con larvas: 142,58 (19,27) Sin larvas: 150,03 (18,91)	F ^P = 0,226	0,822
Latencia visita	Con larvas: 249,94 (24,12) Sin larvas: 299,14 (30,67)	F = 1,515	0,23
Permanencia	Con larvas: 372,50 (50,94) Sin larvas: 364,71 (44,84)	F = 0,01	0,909
Tendencia a IO	Con larvas: 0/18 Sin larvas: 0/21	-	-

Tabla 5.6. Resultados del Experimento 5. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; F^P: prueba de T pareado).

5.4.9. Experimento 7. Importancia de compuestos asociados al desarrollo de hongos en los frutos

Comportamiento de búsqueda. La Tabla 5.8 presenta los resultados obtenidos al ofrecerle a las hembras frutos con hongos y sin hongos (en ambos casos no infestados). Se encontró un mayor número de visitas al sector que contenía al fruto con hongos, así como a este fruto. Además, las hembras pasaron más tiempo en el sector que presentaba al fruto con hongos. Por otro lado, la permanencia y la latencia no mostraron diferencias entre tratamientos.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Inf. sin larvas: 58 No infestado: 22	Gy = 15,84	P < 0,001
Opción elegida	Inf. sin larvas: 48 No infestado: 16	Gy = 15,67	P < 0,001
Tiempo en cada sector	Inf. sin larvas: 144,45 (17,15) No infestado: 55,95 (13,69)	Z = 3,80	0,0001
Latencia visita	Inf. sin larvas: 267,60 (21,26) No infestado: 201,88 (31,50)	F = 2,555	0,12
Permanencia	Inf. sin larvas: 562,00 (15,17) No infestado: 568,75 (31,25)	F = 0,050	0,833
Tendencia a IO	Inf. sin larvas: 20/48 No infestado: 1/16	Gy = 6,203	0,010 < P < 0,025
Latencia para IO	Inf. sin larvas: 110,80 (11,62) No infestado: 289,00 (0,00)	-	-
Número de IO	Inf. sin larvas: 1,90 (0,20) No infestado: 2,00 (0,00)	-	-
Tasa de IO	Inf. sin larvas: 0,20 (0,02) No infestado: 0,20 (0,00)	-	-
Duración total IO	Inf. sin larvas: 68,08 (8,83) No infestado: 72,26 (0,00)	-	-
Duración promedio IO	Inf. sin larvas: 34,56 (3,23) No infestado: 36,13 (0,00)	-	-
Proporción del tiempo IO	Inf. sin larvas: 0,12 (0,02) No infestado: 0,12 (0,00)	-	-

Tabla 5.7. Resultados del Experimento 6. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; Z: prueba de Wilcoxon).

Comportamiento de oviposición. El análisis del comportamiento de oviposición mostró una baja tendencia a realizar IO en ambos frutos, que no difirió entre ellos (Tabla 5.8). Tampoco se encontraron diferencias en la latencia ni en la tasa de IO. Si bien el número promedio de IO no difirió estadísticamente entre los dos tipos de frutos ($p = 0,06$) se registró una leve tendencia a un mayor número en frutos sin hongos. El análisis de la duración mostró que la duración promedio fue mayor para los frutos con hongos, pero ninguna de las otras dos variables fueron afectadas por la presencia del hongo (Tabla 5.8).

5.4.10. Experimento 8. Importancia de compuestos liberados por la fruta en estado de pudrición

Comportamiento de búsqueda. La Tabla 5.9 muestra los resultados del experimento en que se estudió la respuesta de las hembras hacia frutos con distintos niveles de maduración. Se encontraron diferencias altamente significativas en el número de visitas

a cada sector y a cada tipo de fruto. El sector que contenía al fruto en estado avanzado de maduración (podrido), así como a este fruto recibieron una mayor cantidad de visitas. Además, las hembras pasaron más tiempo en el sector que tenía al fruto podrido. Por otro lado, la permanencia y la latencia no mostraron diferencias entre tratamientos.

Comportamiento de oviposición. La tendencia a realizar IO sobre las frutas presentadas fue en general baja, no mostrando diferencias entre los dos tipos de fruto (Tabla 5.9). El hecho de encontrar una sola hembra que intentara oviponer sobre frutos maduros impidió realizar el análisis estadístico del resto de las variables asociadas al comportamiento de oviposición. La Tabla 5.9 presenta solamente los valores promedio y su error estándar.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Con hongos: 53 Sin hongos: 27	Gy = 7,95	0,001 < P < 0,005
Opción elegida	Con hongos: 46 Sin hongos: 22	Gy = 7,94	0,001 < P < 0,005
Tiempo en cada sector	Con hongos: 105,03 (15,40) Sin hongos: 49,85 (10,82)	Z = 2,82	0,005
Latencia visita	Con hongos: 210,87 (21,53) Sin hongos: 187,00 (33,13)	F = 0,452	0,50
Permanencia	Con hongos: 373,46 (30,86) Sin hongos: 422,59 (44,38)	F = 0,820	0,368
Tendencia a IO	Con hongos: 6/46 Sin hongos: 4/22	Gy = 0,037	P > 0,95
Latencia para IO	Con hongos: 216,83 (49,54) Sin hongos: 152,50 (73,99)	F = 0,570	0,472
Número de IO	Con hongos: 1,00 (0,00) Sin hongos: 1,50 (0,29)	F = 4,800	0,060
Tasa de IO	Con hongos: 0,16 (0,04) Sin hongos: 0,21 (0,04)	F = 0,484	0,507
Duración total IO	Con hongos: 53,05 (8,87) Sin hongos: 36,97 (7,67)	F = 1,620	0,238
Duración promedio IO	Con hongos: 53,05 (8,87) Sin hongos: 24,65 (1,53)	F = 6,854	0,031
Proporción del tiempo IO	Con hongos: 0,13 (0,02) Sin hongos: 0,09 (0,02)	F = 1,772	0,220

Tabla 5.8. Resultados del Experimento 7. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; Z: prueba de Wilcoxon).

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Maduro: 23 Podrido: 57	Gy = 14,03	P < 0,001
Opción elegida	Maduro: 14 Podrido: 45	Gy = 15,99	P < 0,001
Tiempo en cada sector	Maduro: 58,26 (14,66) Podrido: 132,18 (17,16)	Z = 3,70	0,0002
Latencia visita	Maduro: 239,43 (18,22) Podrido: 216,89 (35,97)	F = 0,346	0,56
Permanencia	Maduro: 490,14 (47,95) Podrido: 471,11 (32,56)	F = 0,08	0,768
Tendencia a IO	Maduro: 1/14 Podrido: 3/45	Gy = 0,341	0,50 < P < 0,75
Latencia para IO	Maduro: 125,33 (28,79) Podrido: 66,00 (0,00)	-	-
Número de IO	Maduro: 1,00 (0,00) Podrido: 1,00 (0,00)	-	-
Tasa de IO	Maduro: 0,1 (0,00) Podrido: 0,1 (0,00)	-	-
Duración total IO	Maduro: 11,57 (0,00) Podrido: 38,73 (22,06)	-	-
Duración promedio IO	Maduro: 11,57 (0,00) Podrido: 38,73 (22,06)	-	-
Proporción del tiempo IO	Maduro: 0,02 (0,00) Podrido: 0,06 (0,04)	-	-

Tabla 5.9. Resultados del Experimento 8. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; F: ANOVA de un factor; Z: prueba de Wilcoxon).

5.4.11. Experimento 9. Importancia de compuestos provenientes de la actividad de la larva utilizando dieta artificial

Comportamiento de búsqueda. Los resultados del experimento realizado comparando la respuesta de las hembras ante dieta artificial usada por larvas de *C. capitata* y dieta no usada se muestran en la Tabla 5.10. El patrón de preferencia encontrado favorece claramente al sector de dieta usada, para el cual se registraron mayor número de visitas, y en el cual las hembras pasaron significativamente mayor parte del tiempo. De la misma manera el número de visitas realizadas a la caja de Petri con dieta usada también fue mayor al esperado bajo una hipótesis de igual número de visitas a ambas fuentes. La latencia, no obstante, fue mayor para la dieta usada. La permanencia mostró ser, en promedio, mayor para la dieta usada, aunque la falta de homocedacia en los datos y la imposibilidad de encontrar una transformación apropiada, impidió determinar si estas diferencias eran estadísticamente significativas.

Comportamiento de oviposición. La tendencia a realizar IO fue mayor en las cajas de Petri que contenían dieta usada (Tabla 5.10), para la cual el 50% de las hembras que visitaron esta opción intentaron oviponer, mientras que no se registraron IO en ninguna de las 12 hembras que visitaron la dieta no usada. Este hecho impidió continuar con el análisis estadístico del resto de las variables.

Variable	Valores observados	Estadísticos	Valor P
Primer sector visitado	Dieta usada: 67 Dieta fresca: 13	Gy = 38,28	P < 0,0001
Opción elegida	Dieta usada: 60 Dieta fresca: 12	Gy = 33,35	P < 0,001
Tiempo en cada sector	Dieta usada: 130,96 (14,34) Dieta fresca: 23,75 (6,97)	Z = 5,70	1,19x10 ⁻⁸
Latencia visita	Dieta usada: 248,98 (14,72) Dieta fresca: 187,25 (11,11)	H = 4,90	0,027
Permanencia	Dieta usada: 599,68 (0,32) Dieta fresca: 348,25 (77,40)	-	-
Tendencia a IO	Dieta usada: 30/60 Dieta fresca: 0/12	Gy = 10,486	0,001 < P < 0,005
Latencia para IO	Dieta usada: 76,76 (64,65) Dieta fresca: -	-	-
Número de IO	Dieta usada: 2,97 (0,18) Dieta fresca: -	-	-
Tasa de IO	Dieta usada: 0,30 (0,02) Dieta fresca: -	-	-
Duración total IO	Dieta usada: 262,70 (16,85) Dieta fresca: -	-	-
Duración promedio IO	Dieta usada: 92,01 (5,27) Dieta fresca: -	-	-
Proporción del tiempo IO	Dieta usada: 0,44 (0,03) Dieta fresca: -	-	-

Tabla 5.10. Resultados del Experimento 9. Para cada variable se muestra el número de casos observados ó los valores promedio con su error estándar entre paréntesis, el valor del estadístico y el valor P correspondiente a la prueba estadística realizada (Gy: prueba de heterogeneidad de G; H: prueba de Kruskal-Wallis; Z: prueba de Wilcoxon).

5.5. Discusión

En el presente trabajo se estudió el comportamiento de búsqueda de hospedadores del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* al enfrentar diversas opciones no visuales dentro de una arena experimental. Se encontró que las hembras de este parasitoide fueron capaces de discriminar entre frutos infestados por larvas hospedadoras de *C. capitata* y frutos no infestados, visitando los primeros en el 88% de los casos, y mostrando mayor actividad de búsqueda en el sector de la arena experimental donde

estos se encontraban. El análisis del comportamiento de elección mostrado por las hembras cuando los distintos componentes volátiles emitidos por un fruto infestado fueron analizados separadamente permitió determinar que existen compuestos derivados de la actividad de las larvas dentro de los frutos, productos de la presencia de hongos asociados al fruto, y compuestos provenientes del mismo proceso de pudrición de los frutos, que están involucrados en la atracción hacia frutos infestados en el experimento inicial.

La atracción de *D. longicaudata* hacia frutos infestados por larvas de mosca de la fruta fue también encontrada en otras especies frutales como durazno, mango, y pomelo (Greany et al. 1977, Eben et al. 2000, Carrasco et al. 2005). Aparentemente, la respuesta de este parasitoide es independiente de la especie frutal y cada vez que un fruto contiene larvas en su interior libera ciertos compuestos volátiles que atraen a las hembras del parasitoide. Incluso serían también independientes, hasta cierto punto, de la especie de mosca responsable de la infestación, ya que, en los estudios previos, la especie de mosca utilizada para infestar la fruta era del género *Anastrepha*, mientras que en el presente estudio se trabajó únicamente con *Ceratitis*.

Si bien la respuesta de este parasitoide ante la fruta infestada está relativamente bien descrita, pocos estudios profundizaron en los componentes responsables de esta respuesta. Los estudios de Greany et al. (1977) proponen que la presencia de hongos asociados a la infestación por larvas es el factor determinante de la atracción, y que la infestación en sí no es importante, mientras que Carrasco et al. (2005) encontraron que sin infestación no hay respuesta a frutos deteriorados, sin hacer mención a la presencia o no de hongos. Los resultados de los experimentos conducidos luego del ensayo con frutos infestados y no infestados (experimentos 2 a 9) permitieron entender los factores involucrados en la preferencia de las hembras. En primer lugar, se encontró que la atracción de las hembras es debida, al menos en parte, a algún producto de la actividad de las larvas dentro del fruto. El hecho de que la dieta usada por las larvas también sea atractiva para las hembras del parasitoide muestra que hay un remanente de la actividad de las larvas que es determinante. La presencia física de las larvas, en cambio, parece no importar en la respuesta de las hembras, puesto que las larvas desnudas y lavadas no mostraron ser atractivas. Queda por determinar si los compuestos involucrados en la

respuesta del parasitoide son producidos por las mismas larvas (producto de las glándulas salivares, o deposiciones dejadas en la dieta) o provienen de su degradación por microorganismos asociados a estos compuestos. Si bien Greany et al. (1977) descartaron la importancia de las larvas, los resultados del presente estudio sugieren que existe algún producto de su actividad que es clave en la respuesta de las hembras ante frutos infestados.

Por otro lado, se encontró que los frutos atacados por hongos desencadenan una respuesta positiva en las hembras del parasitoide. Esto coincide con lo reportado por Greany et al. (1977), trabajando con hongos aislados de durazno (de la especie *Monolinia fruticola* (Wint)) y de pomelo (de la especie *Penicillium digitatum* Sacc). En el presente estudio la especie fue también *P. digitatum*, pero se trabajó con el fruto atacado por el hongo y no con un aislamiento. El hecho de que los parasitoides visiten activamente estos frutos plantea una difícil pregunta si se considera el efecto de los hongos sobre el desarrollo de los hospedadores y el comportamiento de las hembras del parasitoide una vez que se encuentran sobre estos frutos. En primer lugar, en los frutos afectados por el hongo la supervivencia de las larvas de la mosca se ve seriamente afectada y en general unas pocas o ninguna larva alcanza el estado pupal, muriendo dentro del fruto (observación personal). En segundo lugar, cuando se estudió el comportamiento de los parasitoides sobre los frutos con hongos se registró frecuentemente que una vez que las hembras entraban en contacto con el sector del fruto con presencia del hongo, estas dejaban de antenar, se detenían y cambiaban de dirección. En algunos casos, las hembras ingresaban al sector con hongos y, tras caminar algunos centímetros, abandonaban directamente el fruto volando hacia el piso o las paredes de la jaula. Esto muestra que la presencia del hongo limita tanto las probabilidades de encontrar larvas vivas como la superficie de búsqueda disponible en un fruto. Consecuentemente se esperaría que las hembras eviten activamente los frutos con hongos. No obstante, no es este el patrón de respuesta encontrado. Greany et al. (1977) plantean que los hongos estarían produciendo algún compuesto que es activamente seguido por *D. longicaudata*. Teniendo en cuenta los dos puntos mencionados anteriormente no parece ser esta la explicación que mejor se ajuste a las observaciones. Probablemente, la aparente contradicción entre la preferencia de las hembras y la recompensa asociada (en términos de su éxito reproductivo) esté

relacionada con el hecho de que las plantas liberen (activamente o no) compuestos volátiles ante el ataque a sus frutos (independientemente del organismo que los esté afectando) y que estos sean los responsables de la atracción del parasitoide. También, podría ocurrir que tanto los frutos infestados como los atacados por hongos sean colonizados por parte de bacterias u otros microorganismos y que estos sean los responsables de la atracción de las hembras. Sea cual sea el proceso y el compuesto involucrado, la atracción de las hembras hacia frutos con hongos parece reflejar más una “contaminación” de las señales químicas utilizadas por los parasitoides que una clave que ayude a las hembras a encontrar las larvas hospedadoras en el campo.

La fruta con un alto grado de maduración desencadenó también una mayor frecuencia de visitas por parte de las hembras. Esto muestra como, aún en ausencia de larvas, los parasitoides encuentran atractivos los compuestos liberados por estos frutos. Este hecho, junto con lo discutido hasta aquí, estaría mostrando que *D. longicaudata* utiliza compuestos asociados directa e indirectamente con el ataque de las moscas sobre los frutos. Los frutos que han sido atacados por las moscas se pudren más fácilmente que los frutos no atacados, con lo cual los compuestos que provienen de frutos podridos van a conducir a frutos infestados con larvas con mayor confiabilidad que frutos simplemente maduros. Adicionalmente, los olores relacionados con la actividad de las larvas ayudarían a detectar eficazmente los frutos infestados. No obstante, debido a la fuerte presión que existe sobre las larvas para evitar ser descubiertas (ya que esto representa su muerte) los compuestos liberados por estas debieran ser más difíciles de detectar por los parasitoides. Tal vez a grandes distancias los compuestos liberados por frutos podridos guíen a los parasitoides hacia hábitats con alta probabilidad de encontrar larvas y, a más corta distancia, los compuestos provenientes de la actividad de las larvas puedan ser percibidos por los parasitoides. Debido al diseño experimental que se utilizó en este estudio, no se pudo determinar la función de estos estímulos a largo alcance.

¿Están las plantas comunicando activamente la presencia de larvas al parasitoide? Se han descrito varios ejemplos de plantas que liberan compuestos como resultados del ataque de un herbívoro, compuestos que no son liberados cuando las hojas de la planta son dañadas por otros agentes y que son percibidos por parasitoides que atacan al herbívoro (Mattiacci et al. 1994, de Moraes et al. 1998). El efecto negativo

que tiene el herbívoro sobre la planta sería suficiente para que la selección natural favorezca aquellas plantas capaces de atraer a los parasitoides. Por su parte aquellos parasitoides que puedan detectar diferencias entre el daño ocasionado a una planta por su hospedador y daños de cualquier otro origen tendrán automáticamente una ventaja sobre otros parasitoides. En el sistema tritrófico especie frutal-mosca de la fruta- *D. longicaudata* el efecto que tiene la infestación del fruto sobre la planta no ha sido estudiado con profundidad. Los frutos permiten a la planta dispersar sus semillas gracias a la ayuda de agentes dispersantes, animales que se alimentan de los frutos. ¿Son los frutos infestados menos palatables para estos agentes que los frutos no infestados? Esta pregunta aún no tiene respuesta. Si bien los frutos infestados tienden a pudrirse más rápidamente y por tanto podrían tener más posibilidades de ser rechazados por un agente dispersante, el hecho de comer frutos con larvas en su interior significaría adicionar proteínas a la dieta comiendo frutos, cuando normalmente un fruto carece de ellas. Por otro lado, el hecho de que tanto *D. longicaudata* como sus hospedadores sean tan polípagos hace difícil suponer que este parasitoide dependa fuertemente de un mecanismo de comunicación que no esté presente en todas las plantas hospedadoras en que este parasitoide puede encontrar a sus hospedadores. De hecho, los sistemas de comunicación planta-parasitoide están asociados normalmente a parasitoides monófagos u oligófagos. Finalmente, los resultados del presente estudio no parecen indicar que los frutos se vuelvan atractivos sólo después del ataque de la larva, puesto que los frutos podridos ya emiten compuestos que son atractivos para el parasitoide. Esto, sumado a la falta de una presión selectiva fuerte para la aparición de un mecanismo de comunicación, hace pensar que este mecanismo está ausente en el sistema tritrófico frutal-moscas de la fruta-*D. longicaudata*.

El presente estudio permitió descartar la participación de ciertos compuestos en la orientación de *D. longicaudata* hacia frutos infestados. La mera punción de los frutos y la oviposición, así como la deposición de heces y de feromonas de marcado de hospedadores por parte de los adultos no representaron estímulos atractivos para el parasitoide. Estos resultados concuerdan con la preferencia de esta especie por larvas de estadios de desarrollo avanzado (Cancino Diaz y Yoc 1993). Los estímulos recién mencionados están relacionados con el momento inicial de la infestación del fruto y los mismos sólo conducen al encuentro de adultos, huevos, y quizá larvas recién

eclosionadas, pero no conducen a larvas de los últimos estadios. De hecho, en parasitoides de tefritidos que atacan el estadio de huevo se ha encontrado que la feromona de marcado de hospedadores es determinante a la hora de encontrar frutos infestados (Prokopy y Webster 1978). Aún cuando la importancia de esta feromona puede extenderse a especies de parasitoides que atacan larvas en un estadio intermedio del desarrollo (Hoffmeister y Gienapp 1999), evidentemente no resultan importantes para parasitoides que atacan los últimos estadios larvarios, como *D. longicaudata*.

Una vez sobre los frutos, las hembras mostraron una mayor tendencia a realizar intentos de oviposición en frutos infestados, no infestados pinchados, infestados (sin larvas), y en la dieta usada (sin larvas). Esto concuerda con estudios previos en que se concluyó que las hembras responden a estímulos mecánicos (vibraciones producidas por las larvas, Lawrence 1981) pero también químicos (compuestos producidos por las larvas y dejados en la dieta artificial, Duan y Messing 2000). El hecho de que los estudios citados utilizaran larvas de *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) muestra que el tipo de claves utilizadas durante la búsqueda sobre el fruto sería relativamente independiente de la especie hospedadora. No obstante, la importancia relativa de las dos claves podría no ser igual entre especies hospedadoras ya que las larvas de *Anastrepha* spp. son más grande y móviles que las de *Ceratitis* spp., y por tanto las claves mecánicas podrían tener mayor peso a la hora de buscar larvas de *Anastrepha* spp.

A diferencia de los estudios previos, el presente trabajo fue realizado utilizando frutos en lugar de unidades de oviposición artificiales (a excepción del experimento 9), mostrando así que tanto la presencia de larvas como su actividad aumentan la actividad de búsqueda de las hembras cuando el sustrato de búsqueda es el fruto (probablemente involucrando claves vibretorias y químicas). Incluso comparando los valores registrados para las variables asociadas al comportamiento de oviposición entre los frutos infestados que poseían larvas (experimento 1) y los frutos infestados sin larvas (experimento 6) se puede ver como al retirar del fruto los estímulos mecánicos la actividad de oviposición disminuye, mostrando el efecto conjunto de ambos tipos de clave.

El hecho de utilizar frutos como sustrato de búsqueda permitió encontrar que la existencia de orificios en los frutos (experimento 3) aumenta la tendencia a realizar intentos de oviposición. Probablemente, las hembras sean capaces de detectar los orificios realizados sobre los frutos y los utilicen para buscar larvas con su ovipositor, aunque la naturaleza del estímulo (química, táctil, y/o visual) queda sin esclarecerse. Cabe destacar que, aún cuando en los frutos pinchados se registró una mayor tendencia a realizar intentos de oviposición (mostrando la misma tendencia que sobre frutos infestados con larvas) estos intentos tuvieron una corta duración (semejante incluso a la duración de los intentos sobre frutos no pinchados del mismo experimento). Esto está relacionado al hecho de que las hembras encuentran los orificios e introducen su ovipositor pero al no encontrar larvas no asignan una gran cantidad de tiempo a esta actividad ni siguen realizando muchos más intentos que en los no pinchados, con los cuales son iguales a excepción de los agujeros. Algo similar se registra en el experimento 6, donde los restos que las larvas dejan en el sustrato estimulan a que las hembras realicen más intentos de oviposición, y que lo hagan más rápido, pero al no encontrar larvas la duración sea similar a la encontrada en frutos no infestados del mismo experimento (aunque la ausencia de diferencias no pudo ser comprobada estadísticamente por el bajo número de observaciones para los frutos no infestados en el experimento 6).

Otros estímulos, como los provenientes de la infestación por hongos y la pudrición de la fruta, no parecen tener efecto en la tendencia a realizar intentos de oviposición. De la misma manera, la existencia de feromonas de marcado de hospedadores tampoco desencadenó una mayor propensión a intentar oviponer. Hoffmeister y Gienapp (1999) proponen que esta feromona podría ser utilizada a corto alcance aún por los parasitoides larvarios. No obstante, para el sistema estudiado en este trabajo (*C. capitata*- *D. longicaudata*) los resultados sugieren que esta feromona no estaría involucrada en la búsqueda de las larvas sobre el sustrato.

Comprender la biología, la ecología, y el comportamiento de un enemigo natural y la plaga blanco es esencial para asegurar la calidad de la producción masiva del enemigo natural, con el objeto de suprimir la plaga a campo (Glenister y Hoffmann, 1998). En 1991 un grupo de trabajo de la IOBC (International Organization for

Biological Control) fijó criterios preliminares para determinar la calidad de enemigos naturales criados en laboratorio con fines de control biológico (van Lenteren y Steinberg 1991). Estos criterios incluyeron el análisis de la tasa de emergencia, la proporción de sexos, el tamaño del adulto, su fecundidad y mortalidad, y la capacidad de vuelo. En el presente estudio, se utilizaron variables asociadas al comportamiento de forrajeo para analizar diferencias entre dos cepas del parasitoide, un aspecto relativamente descuidado en los controles de calidad sugeridos hasta el presente. Los análisis realizados comparando el desempeño de los parasitoides de las dos cepas criadas en el IGEAF muestran que, en general, no existieron diferencias entre las hembras de Cast191 y las hembras MI94, ya sea que se analicen variables relacionadas con la eficiencia de búsqueda y la preferencia de las hembras o variables relacionadas con el comportamiento de oviposición sobre los frutos. Solo en la velocidad de búsqueda, que es inversamente proporcional a la latencia, se encontraron diferencias entre cepas, señalando que la cepa MI94 tiene mejor desempeño que la cepa Cast191. Si bien esta variable ha sido propuesta como un estimador de la capacidad de búsqueda de las hembras (y por tanto, de su calidad como enemigo natural, van Hezewijk et al. 2000) el hecho de diferir sólo en esta variable señala que las diferencias en el método de cría de estos parasitoides no generan grandes diferencias en los comportamientos analizados. Se espera entonces, que los parasitoides de ambas cepas tengan un efecto semejante al ser utilizados como biocontroladores de la mosca. No obstante, otros estudios, como los concernientes a la respuesta funcional y numérica de parasitoide de ambas cepas, deberían realizarse para analizar más a fondo posibles diferencias entre estas.

Si bien los ensayos realizados hasta aquí han arrojado interesantes resultados, se desconoce la base química de la preferencia de las hembras. El análisis químico de los compuestos liberados permitiría determinar si los compuestos involucrados son los mismos o difieren entre los distintos tipos de frutos atractivos para el parasitoide. Descifrar los compuestos químicos involucrados en la respuesta de las hembras representaría un importante avance en el conocimiento de los mecanismos que utiliza el parasitoide para encontrar a sus hospedadores en la naturaleza, así como en la base de conocimiento necesaria para el diseño de un atrayente específico para este parasitoide. La utilidad de estos estudios está vinculada estrechamente al seguimiento de las poblaciones de este parasitoide luego de liberaciones masivas en el marco del control

biológico de moscas de la fruta. Un seguimiento poblacional permitiría conocer parámetros importantes para el diseño de un protocolo de liberaciones de este parasitoide, como ser su capacidad dispersiva y su permanencia en el campo. Estos parámetros son de vital importancia para determinar la periodicidad y distancia de las liberaciones.

6. Estudios de olfatometría

6.1. Introducción

Los estudios relacionados a las claves químicas utilizadas por los insectos durante la selección de hábitats, en el sentido más amplio del término (véase Rolstad et al. 2000), han sido llevado a cabo en diversos dispositivos. Estos van desde arenas experimentales en las cuales dos o más opciones son ofrecidas al insecto y en las cuales los compuestos volátiles llegan a estos por simple difusión, hasta equipos que permiten estudiar la activación de células nerviosas luego de la exposición del insecto ante un estímulo químico, como los equipos de electroantenograma. Un punto intermedio dentro del abanico de dispositivos para estudiar la respuesta de un insecto ante estímulos químicos, son los túneles de viento y los olfatómetros. En estos, los compuestos volátiles son arrastrados desde la fuente emisora por una corriente de aire. Esta característica, más la ventaja que confieren estos aparatos de poder controlar en forma precisa el flujo de aire que pasa por cada una de las fuentes, han hecho que estos dispositivos sean utilizados cada vez más en diversas especies y sistemas biológicos (sistemas planta-herbívoro, hospedador-parasitoide, predador-presa, etc).

El dispositivo elegido para estudiar la respuesta de un insecto ante un estímulo químico debe ajustarse al comportamiento y la ecología del organismo bajo estudio. Así, para los insectos que, en el contexto del comportamiento que se desea estudiar, muestran una tendencia a aproximarse volando a las fuentes de olor, será más adecuado un túnel de viento que permite gran movilidad, mientras que para los que se aproximan caminando será mejor un olfatómetro pequeño, pues dentro de un túnel de viento puede ocurrir que no se registren movimientos o que estos sean leves y no se pueda determinar si el insecto se ve atraído o repelido por la fuente, o incluso si está respondiendo. Además de las dimensiones y del tipo de aparato a utilizar, la velocidad de la corriente de aire (o el caudal) es otro de los factores determinantes al momento de diseñar el aparato que mejor se ajusta al insecto bajo estudio (Messing et al. 1997).

Dentro de los distintos diseños de olfatómetros, el más común consiste en un tubo en forma de Y. Aun cuando estos olfatómetros han sido criticados por la potencial

mezcla de olores que puede ocurrir en el punto en que los dos brazos de la ye se unen (debido a turbulencias provocadas por la confluencia de dos corrientes de aire) y por el hecho que una vez que el insecto ha pasado el punto de unión de los brazos no hay más posibilidad de elección, este dispositivo ha permitido obtener resultados impresionantes (van Alphen y Jervis 1996). Además, el hecho de representar un sistema aislado permite conducir experiencias en condiciones de luz natural (por ejemplo dentro de un invernáculo) sin que haya contaminación con volátiles provenientes de otras fuentes que las que se desean analizar (Rutledge y Wiedenmann 1999).

Estos dispositivos han sido utilizados para analizar la importancia de los compuestos químicos volátiles producidos por el sustrato de búsqueda en la orientación de insectos parasitoides hacia sus hospedadores, en una gran cantidad de estudios. La utilización de olfatómetros y túneles de viento ha permitido determinar que tanto los hospedadores (Rostás et al. 1998, Colazza et al. 1999, Royer y Boivin 1999, Sullivan et al. 2000, Schaffner y Müller 2001, Conti et al. 2004) como el hábitat del hospedador (Read et al. 1970, Wardle y Borden 1989, Takabayashi et al. 1998, Rutledge y Wiedenmann 1999, Souissi 1999, Blassioli Moraes et al. 2005) emiten volátiles que pueden ser percibidos y utilizados por los parasitoides durante el proceso de búsqueda de hospedadores. Asimismo, por medio de estudios de olfatometría se ha encontrado que en algunos sistemas las hembras del parasitoide son capaces de detectar la presencia de hembras conespecíficas sobre parches y así evitan dirigirse a parches que ya están siendo explotados (Janssen et al. 1995a y b).

En el caso de los parasitoides de moscas de la fruta los estudios concernientes a la importancia de las claves químicas han sido realizados principalmente en arenas experimentales, aunque Eben et al. (2000) emplearon un olfatómetro en Y para analizar la preferencia de las hembras del parasitoide *D. longicaudata* por frutos de distintas especies frutales y por frutos de la misma especie infestados y no infestados. Eben et al (2000), Jang et al. (2000), y Carrasco et al (2005) han estudiado la respuesta de este parasitoide utilizando túneles de viento en lugar de olfatómetros. Si bien los autores encuentran cierta preferencia por las distintas opciones ofrecidas, los porcentajes de elección son considerablemente bajos (ca. 20%) mostrando así que este dispositivo no es tal vez el más apropiado para este parasitoide. Las hembras de *D. longicaudata*

parasitan estadios larvarios tardíos, y para el momento en que las larvas hospedadoras alcanzan estos estadios normalmente los frutos se encuentran ya en el suelo. Esto hace pensar que estos parasitoides están más motivados a buscar a sus hospedadores caminando, o al menos realizando vuelos cortos, que volando hacia frutos que se hallan aún en los árboles. De hecho, en muestreos de fruta larvada se recupera un mayor número de ejemplares de *D. longicaudata* de fruta tomada del suelo que de fruta tomada de la copa del árbol frutal (Purcell et al. 1998). Sobre esta base, parecería que el dispositivo que mejor se ajusta al comportamiento de este parasitoide sería un olfatómetro. Estudios similares conducidos en túneles de viento con el parasitoide *Diachasmimorpha juglandis* (Henneman et al. 2002) muestran también una baja respuesta en la hembras (0%, 22%, y 46% en los tres experimentos realizados).

La correlación que existe entre la preferencia por distintas fuentes de olor y los patrones de forrajeo para varias especies de parasitoides sugiere que analizar las preferencias dentro de un olfatómetro puede proveer información acerca de los hábitats en los cuales los parasitoides irán a forrajear una vez en el campo (Rutledge y Wiedenmann 1999). En este sentido, la preferencia de *D. longicaudata* por distintas especies frutales fue estudiada al menos en tres oportunidades, utilizando distintos dispositivos (Leyva et al. 1991 y Messing y Jang 1992, usaron arenas experimentales, mientras que Eben et al. 2000 usaron un olfatómetro en Y y un túnel de viento). Aún cuando esta información puede reflejar la preferencia de *D. longicaudata* por distintos hábitats, todos estos estudios fueron realizados por grupos de trabajo localizados en América del Norte, y por lo tanto las especies frutales incluidas en los experimentos en general difieren de las existentes en Argentina. Este hecho hace difícil comprender cómo estos parasitoides se comportarán una vez liberados en nuestro país. Además, algunos factores importantes como la capacidad de aprendizaje y la influencia del nivel de infestación de la fruta han sido ignorados en estudios previos. Rutledge y Wiedenmann (1999) proponen que los estudios de preferencia deberían ser más informativos acerca de la selección de hábitats en especies poco longevas. En especies de parasitoides con adultos relativamente longevos, los individuos pueden aprender a medida que atraviesan eventos de forrajeo y, así, la selección de hábitats estará fuertemente afectada por la experiencia previa. Sumado a esto, el hecho de que tanto *D. longicaudata* como sus hospedadores exhiben una alta polifagia, refuerza la idea de que

la experiencia previa puede tener, en este parasitoide, un considerable impacto sobre la preferencia por diversas especies frutales. La importancia del nivel de infestación que posean los frutos de distintas especies también ha sido descuidada. Considerando que, con alta probabilidad, la distribución de larvas hospedadoras no es homogénea entre las diversas especies frutales, y que *D. longicaudata* utiliza claves asociadas a la actividad de sus hospedadores, el nivel de infestación podría estar jugando un rol importante en la selección de hábitats por parte de las hembras de este parasitoide.

6.2. Objetivos

6.2.1. Objetivo general

Utilizar un olfatómetro en Y para analizar la importancia de claves químicas asociadas a la infestación de la fruta y la preferencia del parasitoide *D. longicaudata* por distintos hábitats de su hospedador, y el efecto que puede tener sobre la experiencia previa y el nivel de infestación.

6.2.2. Objetivos específicos

- 1) Estudiar la repetitividad de los resultados encontrados trabajando en una arena experimental (Capítulo 5).
- 2) Analizar la repetitividad de esos resultados, en una especie frutal alternativa.
- 3) Analizar la preferencia de los parasitoides hembra entre cuatro hábitats (especies frutales) del hospedador
- 4) Analizar la importancia del grado de infestación y de la experiencia previa en la elección del hábitat.

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. Material Biológico

El material biológico utilizado en los ensayos provino de las crías que se mantienen en el IGEAF (INTA Castelar). Se utilizaron hembras de entre 5-7 días desde la emergencia y sin experiencia previa de oviposición (a excepción del experimento 5). Los ensayos fueron realizados con parasitoides de las dos cepas mantenidas en el IGEAF (Cast191 y MI94). Hasta el momento del ensayo las hembras fueron mantenidas con machos en

condiciones controladas (T: $25\pm 1^\circ$; Hr: $65\pm 5\%$; fotoperíodo: 14-10) y provistas de agua y miel.

En todos los ensayos se utilizaron frutos naturales como modelo experimental. Los frutos ofrecidos fueron mantenidos en las mismas condiciones de temperatura y humedad ($25\pm 1^\circ$, $50\pm 5\%$) y solo difirieron en el tratamiento experimental recibido o en la especie frutal.

6.3.2. Condiciones experimentales

Todos los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Comportamiento del IGCAF, dentro del cual se dispuso un olfatómetro en Y. Las condiciones de trabajo (medida dentro del olfatómetro) fueron: 1200 ± 100 luxes, $26\pm 1^\circ\text{C}$ y Hr: $70\pm 5\%$. El sistema de iluminación existente en esta sala proveyó una iluminación pareja sobre todo el aparato.

6.3.3. Descripción del olfatómetro en Y

El olfatómetro en Y se construyó utilizando materiales incoloros e inodoros. El mismo consta de las siguientes piezas, ordenadas desde el extremo distal (Figura 6.1):

1) Flotámetros. Cada brazo del olfatómetro está conectado a un flotámetro (modelo MB60V-B, Bruno Schilling SA). Estos dispositivos permiten controlar, por un lado, la cantidad total de aire que entra al sistema y, por el otro, que el aire esté pasando a la misma velocidad en cada brazo. Los dispositivos tienen un intervalo de registro y control de 200 a 1000 ml/min, y permiten controlar el flujo de la bomba de vacío, colocada hacia el otro extremo del aparato.

2) Filtros. Los filtros fueron armados utilizando tubos de vidrio (IVA), de 15cm de longitud y 4,5 cm de diámetro interno. En el centro de estos tubos se colocó carbón activado (100 gr.) y hacia cada extremos se puso un trozo de guata (Figura 6.1). El carbón y la guata fueron reemplazados semanalmente. Este filtro permite entonces purificar el aire que está entrando al sistema: todos los compuestos volátiles que hay en la sala quedan retenidos en la superficie adsorbente del carbón activado, mientras que las partículas mayores (polvo) son retenidas por la guata.

3) Botella de humidificación del aire. Constan de un erlenmeyer de 250ml y un cabezal de piseta (Figura 6.1). En este dispositivo el aire entra directamente en el agua contenida en el erlenmeyer y se humidifica antes de pasar por el orificio de salida (es decir que el aire que entra burbujea dentro del erlenmeyer). Esto permite que el aire entrante, que ha pedido agua al pasar por los filtros, llegue al insecto con una humedad semejante a la que han sido mantenidos hasta el momento del ensayo. La humedad que se registra a la salida de este dispositivo es de 73%. Dentro de las botellas se colocó agua destilada, que fue reemplazada diariamente.

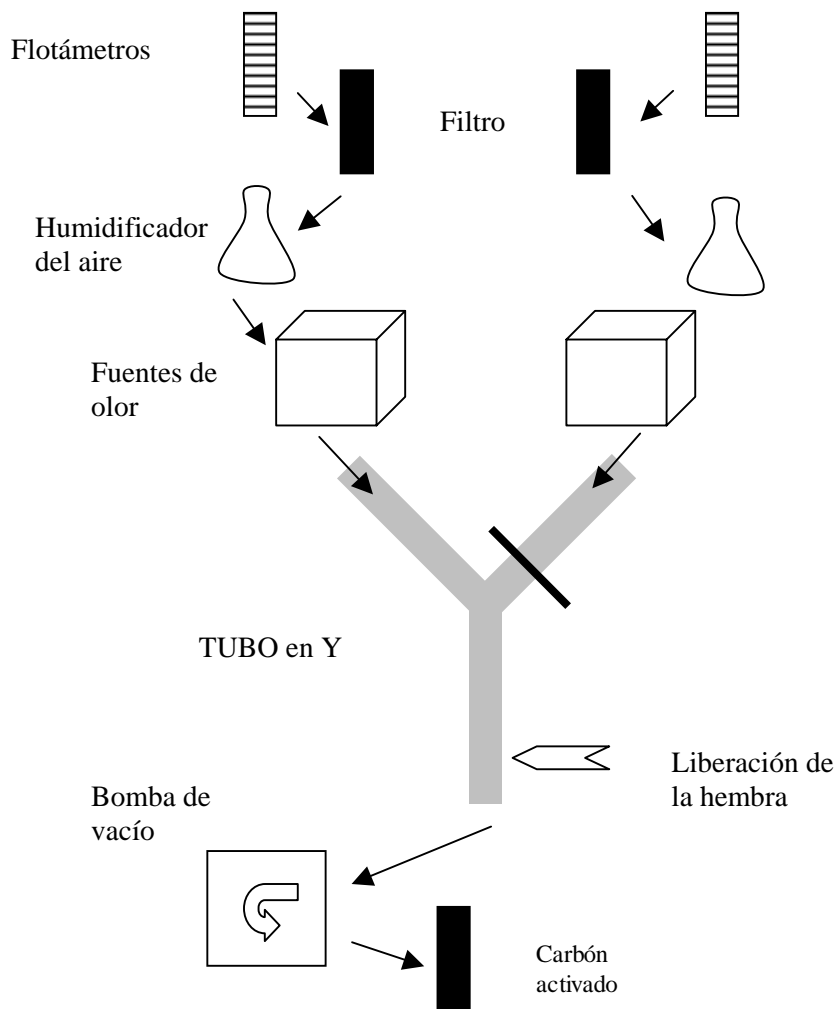


Figura 6.1. Olfatómetro en Y. Esquema del olfatómetro usado en los experimentos de elección de fuentes de olor.

4) Cajas con las fuentes de olor. Se construyeron de acrílico. Son cajas incoloras de forma cúbica, con 15 cm de lado y cierre hermético (capacidad: 3,375 litros). Estas cajas tienen dos agujeros en paredes opuestas que permiten su conexión con el resto del aparato (hacia un lado con el tubo en Y, y hacia el otro con las botellas de humidificación).

5) Tubo en Y. Construido en vidrio pirex (borosilicato, IVA-Industria Vidriera Argentina). El tubo tiene un brazo principal de 15 cm de longitud, dos brazos laterales de 15 cm, y un diámetro interno de 3 cm. Entre los dos brazos laterales hay un ángulo de 60. Los extremos de este tubo llevan un esmeril “macho” y se enganchan en dos conectores de vidrio de 15 cm que tienen un esmeril “hembra” de un lado y un extremo sin esmeril. El brazo principal cuenta en su extremo con un orificio lateral que es el sitio de entrada de las hembras al dispositivo. Este orificio se cubre con un trozo de Parafilm durante el ensayo de manera de mantener cerrado todo el sistema (excepto por la entrada de aire en los flotámetros y la salida de aire luego del Filtro de salida).

6) Bomba de vacío. Esta bomba (AIR CADET Vacuum/Pressure Pump, Barnat Company, EEUU) es la responsable de generar la corriente de aire por el interior del dispositivo. Es una bomba de succión que trabaja en forma continua y a muy bajos flujos, ideales para este tipo de ensayos pues los olores llegan al insecto en forma continua y no en pulsos discretos como los que generan las bombas usadas en peceras (alternativa encontrada frecuentemente en la bibliografía). La bomba se colocó en el suelo, separada del tubo en Y, de manera que las vibraciones generadas por la bomba no perturben al insecto que se halla dentro de este.

7) Filtro de salida. El aire que es extraído por la bomba está cargado de los olores que recoge en las cajas de cajas con las fuentes de olor. Por lo tanto, liberar este aire dentro de la sala haría que el aire entrante al sistema este cada vez más cargado de olores. Para evitar esto, a la salida de la bomba de vacío se colocó otro filtro como los descriptos previamente.

Todas las piezas están conectadas por un sistema de tapones perforados (de goma atóxica (DGH SRL, Córdoba), que están atravesados por un tubo de vidrio. Los

tubos de dos tapones contiguos están conectados por mangueras de silicona curada con platino (Dow Corning), que asegura que no emita ni absorba olores (ya que cumple reglamentaciones internacionales para empleo en medicina, biotecnología, y fabricación de productos farmacéuticos).

Sobre la base de los trabajos previos de preferencia de parasitoides dentro de olfatómetros en Y, se probaron caudales de aire de entre 300 ml/min y 800 ml/min. Sobre la base de la respuesta registrada en las hembras del parasitoide, se optó por un caudal de aire de 600 ml/min que, para el diámetro de este olfatómetro, representa una velocidad de 0,014 m/seg.

6.3.4. Metodología general

Las hembras fueron liberadas dentro del olfatómetro en forma individual. Cada hembra fue retirada suavemente del frasco en que se mantuvo hasta el día del ensayo con la ayuda de un aspirador entomológico. El extremo del aspirador fue colocado sobre el orificio de entrada al aparato, en el brazo principal. Una vez que la hembra ingresó en el olfatómetro, el orificio se cerró con un trozo de Parafilm. Luego de que la hembra mostrara señales de aclimatación (antenación, búsqueda, etc.) se encendió la bomba de vacío.

A partir del encendido de la bomba, se observó a cada hembra durante 10 minutos, o hasta que realizó una elección. Si en esos 10 minutos la hembra no eligió una opción (un brazo), se la descartó del conjunto de datos. Se consideró que una hembra elegía un brazo cuando, luego de ingresar en uno de ellos, se alejaba cuatro cm (o más) del punto en que se bifurcan los brazos y se mantenía allí durante más de 30 segundos. En estudios previos (Eben et al. 2000, Carrasco et al. 2005), los tiempos de observación varían entre 4 y 20 minutos, con un valor promedio de 7,5 minutos. Mirando durante 10 minutos, se respetaron los estándares para trabajos de olfatometría, y además se mantuvo el tiempo de observación que se usó para los ensayos realizados en la arena experimental (Capítulo 5).

Cada 5 hembras ensayadas, el tubo fue retirado y lavado con detergente, abundante agua, y luego etanol. Mientras este se secaba, se lo reemplazó por otro tubo

de las mismas características. Las fuentes de olor se invirtieron para evitar un posible efecto de la posición. Las cajas de acrílico en que se encontraban los frutos fueron lavadas con detergente y abundante agua y reemplazadas por otras limpias, y el par de frutas utilizadas fue reemplazado por un nuevo par.

En total se analizaron 40 hembras por tratamiento (20 de ellas de la cepa MI94 y 20 de la cepa Cast191). Para cada hembra se registró: a) opción elegida, y b) latencia: tiempo desde su liberación hasta realizar la elección.

6.3.5. Experimentos realizados

6.3.5.1. Claves químicas asociadas a la infestación de la fruta

Experimento 1. Repetición en olfatómetro de los resultados positivos del ensayo en jaula de elección. Se realizaron experiencias de elección en el olfatómetro repitiendo 4 de los ensayos realizados utilizando jaulas (Capítulo 5). Los experimentos repetidos fueron aquellos en que se registró una respuesta positiva en las hembras (patrón de preferencia), es decir: a) compuestos liberados por frutos infestado, b) compuestos derivados de la actividad de las larvas, c) compuestos producidos por hongos asociados a la infestación, y d) compuestos presentes en frutos con una grado avanzado de maduración. El tratamiento al que fueron sometidos los frutos utilizados en cada experimento fue el descrito en el Capítulo 5, para los experimentos 1, 3, 7, y 8 realizados en jaulas.

Experimento 2. Estabilidad de los patrones encontrados en el experimento 1, cambiando de fruta. Se analizó si los patrones encontrados en las jaulas de elección y en el olfatómetro utilizando naranja como modelo experimental, se mantienen usando una especie frutal diferente, y la especie frutal utilizada fue manzana, *Malus domestica* Borkh. Se repitieron todos los tratamientos analizados dentro del olfatómetro, a excepción del tratamiento en que se estudió el efecto de los hongos asociados a los frutos de naranja, puesto que los hongos que se desarrollaron en naranjas no se desarrollan en manzanas. El tratamiento al que fueron sometidos los frutos utilizados en cada experimento fue el descrito en el Capítulo 5, para los experimentos 1, 3, y 8 realizados en jaulas.

6.3.5.2. *Respuesta de D. longicaudata ante distintas especies frutales*

Experimento 3. Preferencia entre especies frutales. Se seleccionaron 4 especies frutales y se estudió el patrón de preferencia de hembras sin experiencia de oviposición. Las especies fueron presentadas de a pares dentro del olfatómetro. Las especies frutales seleccionadas fueron: durazno (*Prunus persica* L.), higo (*Ficus carica* L.), naranja, y manzana.

Los frutos fueron adquiridos en comercios y antes de ser utilizados en los ensayos fueron lavados con abundante agua de manera de remover cualquier remanente de agente químicos existentes sobre su superficie. De todas las tandas de fruta comprada se tomó una muestra de al menos 10 unidades y se las mantuvo bajo condiciones controladas para asegurar que no estuvieran infestados por moscas de la fruta. Los frutos utilizados no mostraron signos de infestación por hongos.

Para determinar qué cantidad de fruta de cada especie se debía a colocar dentro de cada caja del olfatómetro se realizaron mediciones del diámetro de cada una de las especies utilizadas. Considerando a las frutas como esferas, se estimó la superficie promedio de los frutos de cada especie. Sobre esta base, se decidió que en los ensayos realizados con naranja, manzana, y durazno se debía colocar una fruta en cada caja. Aún cuando hay ciertas diferencias en el tamaño y, consecuentemente, en la superficie de los frutos se consideró que la superficie de los frutos de estas tres especies son aproximadamente iguales. En cambio, cuando se realizaron los ensayos utilizando higo como una de la opciones dentro del olfatómetro, en cada caja se colocaron tres frutos de esta especie frente a un fruto de cualquiera de las otras tres. De esta manera se logró que la superficie total de cada especie frutal dentro del olfatómetro fuera aproximadamente semejante.

Experimento 4. Efecto del nivel de infestación sobre la preferencia de las hembras. Se estudió si las hembras del parasitoide pueden discriminar entre frutos que exhiben distintos niveles de infestación por parte de *C. capitata*, y si la preferencia por frutos de distintas especies (Experimento 3) se ve modificada por el nivel de infestación que cada especie frutal pueda presentar. Para esto, naranja y manzana fueron seleccionadas como especies frutales modelo en este experimento. Se realizaron 4 experimentos dentro del

olfatómetro en los que se comparó el grado de atracción de *D. longicaudata* entre: a) Naranjas con alto nivel de infestación vs. naranjas con bajo nivel de infestación; b) Manzanas con alto nivel de infestación vs. manzanas con bajo nivel de infestación; c) Naranjas con alto nivel de infestación vs. manzanas con bajo nivel de infestación, y d) Manzanas con alto nivel de infestación vs. naranjas con bajo nivel de infestación

Los frutos de alto nivel de infestación fueron considerados aquellos que mostraron 30 (± 5) larvas por fruta, mientras que los frutos con bajo nivel de infestación fueron considerados aquellos que mostraron entre 5 y 10 larvas. Estos valores fueron determinados de acuerdo a datos de muestreos de fruta larvada estas dos especies frutales realizados por el laboratorio de Insectos del IGEEAF, INTA Castelar.

Los frutos fueron adquiridos en comercios y fueron sometidos a los mismos tratamientos que los descritos en el experimento 3. Asimismo, una parte de los frutos fue mantenida bajo condiciones controladas para asegurar que no estuvieran infestados. Los frutos utilizados no mostraron signos de infestación por hongos.

Para lograr la infestación de los frutos, estos se colocaron dentro de jaulas estándar de cría de *C. capitata* durante 1 hora. Para asegurar que los frutos utilizados pertenecían al nivel de infestación requerido, sin dañar el fruto, se esperó hasta la salida de las primeras larvas y, sobre la base de los números de pupas registrados se asignaron las frutas a cada uno de los cuatro experimentos. Nunca se usaron frutos de los que las larvas habían empezado a escapar con anterioridad a las 48 hs al momento del ensayo.

Una vez finalizado el ensayo, los frutos fueron rotulados, y colocados bajo condiciones de temperatura controladas hasta que todas las larvas empuparon. El número total de pupas recuperado en cada fruto utilizado fue registrado, y la fruta fue disecada para determinar la existencia de larvas (vivas o muertas) en su interior. Todas las frutas fueron medidas y pesadas antes del ensayo.

Experimento 5. Importancia de la experiencia previa en la elección de la especie frutal. Para analizar la importancia de eventos previos de forrajeo sobre la preferencia por especies frutales, se analizó cómo se modifican los resultados encontrados en el

experimento 3 cuando las hembras fueron sometidas previamente a un periodo de entrenamiento a los olores de una de las especies frutales estudiadas. Como en el experimento 4, se usaron naranjas y manzanas como modelos experimentales. Durante el periodo de entrenamiento, un grupo de hembras del parasitoide, recién emergidas, fue colocado dentro de una frasco de vidrio de 3 litros de capacidad y provisto de machos, agua, y miel. A los 5-7 días se colocó dentro de cada frasco una unidad de oviposición (caja de Petri pequeña: 5 cm de diámetro, 1 cm de alto) en la cual se ofrecieron, durante 6 horas, 100 larvas del tercer estadio de *C. capitata*, inmersas en pulpa de naranja ó de manzana, y este procedimiento se repitió durante tres días. Al cuarto día, estas hembras fueron utilizadas en ensayos de olfatometría siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el experimento 3, siendo la única diferencia el estado de las hembras.

Las larvas colocadas en las unidades de oviposición que se usaron en el periodo de entrenamiento fueron trasferidas a medio de cultivo larvario estándar de *C. capitata*. Una vez que estas larvas empuparon, las pupas fueron transferidas a recipientes con vermiculita y mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$). Esto permitió constatar que las hembras utilizadas en los ensayos de olfatometría fueron capaces de parasitar exitosamente a las larvas cuando estas fueron presentadas en las UOs conteniendo pulpa de las dos especies frutales utilizadas en este experimento.

Los frutos fueron adquiridos en comercios y fueron sometidos a los mismos tratamientos que los descritos en el experimento 3. Asimismo, una parte de los frutos fue mantenida bajo condiciones controladas para asegurar que no estuvieran infestados. Los frutos utilizados en los ensayos no mostraron signos de infestación por hongos.

6.3.6. Análisis de datos

6.3.6.1 Control de posición. Para analizar la existencia de un efecto de la posición en la preferencia de las hembras, se analizó si existió una mayor tendencia a visitar las ramas derecha o izquierda del olfatómetro. Para esto se realizó una prueba de bondad de ajuste de G corregida por Yates comparando, para cada experimento, el número de visitas realizadas ambos brazos del olfatómetro con el número esperado bajo una hipótesis de igual número de visitas.

6.3.6.2. Comparación Cast191 y MI94. Se analizó la existencia de diferencias entre las dos cepas de parasitoides en los patrones comportamentales registrados. Este análisis incluyó el estudio de diferencias en el fruto elegido en los ensayos confrontando fruta infestada y no infestada de los experimentos 1 y 2. Asimismo, se compararon los patrones de elección por frutas de distinta especie del experimento 3. Para comparar la elección dentro del olfatómetro entre las hembras de cada cepa del parasitoide se realizó una prueba de heterogeneidad de G, corregida por Yates (previamente se verificó para cada prueba que el promedio de las frecuencias esperadas sea mayor a 6, supuesto del método según Zar 1996). Para analizar diferencias en la latencia se realizó un ANOVA de dos factores, donde uno de los factores fue el fruto elegido y el otro la cepa de origen de los parasitoides. En aquellos casos en que los supuestos del ANOVA no se cumplieron, los datos fueron transformados y el análisis estadístico fue realizado sobre este nuevo grupo de datos.

6.3.6.3. Análisis de preferencia. El análisis de datos se realizó por medio de una prueba de bondad de ajuste de G con la corrección de Yates por continuidad para la elección del fruto. En el caso de la latencia, el análisis empleado fue un ANOVA de un factor si cumplía homocedasticidad, ó una prueba de Kruskal Wallis cuando esta no se cumplía pero el desvío de la homocedasticidad era pequeño, ó transformación de los datos si el desvío de la homocedasticidad era grande.

Los análisis de varianza fueron realizados utilizando el programa Statistica for Windows (Statsoft Inc., 2000).

6.4. Resultados

6.4.1. Control posición

El número de visitas recibidas por el brazo izquierdo y el brazo derecho no difirieron del esperado bajo una hipótesis de igual proporción de visitas, para ninguno de los experimentos realizados (prueba de bondad de ajuste de G: $p > 0,05$ en todos los experimentos). Esto muestra que no existió un efecto de la posición de las fuentes de olor dentro del olfatómetro sobre la preferencia de las hembras.

6.4.2. Claves químicas asociadas a la infestación de la fruta

6.4.2.1 *Comparación entre MI94 y Cast191.* La Tabla 6.1 muestra el patrón de elección y la latencia discriminando entre las cepas utilizadas, así como los resultados de la comparación entre cepas para los experimentos 1 y 2. En ningún caso se encontraron diferencias entre cepas en el comportamiento exhibido por las hembras. Sobre la base de estos resultados, se decidió agrupar los datos para estos experimentos y analizar sobre estos datos los patrones de preferencia.

Experimento	Variable	Cast191	MI94	Estadístico	Valor P
Naranja infestada vs. no infestada	Fruto elegido	Inf: 15 No inf: 5	Inf: 16 No inf: 4	Gy = 0,000	P > 0,999
	Latencia	Inf: 443,796 (27,663) No inf: 415,364 (78,025)	Inf: 439,031 (23,562) No inf: 449,460 (56,184)	F = 0,118	0,733
Manzana infestada vs. no infestada	Fruto elegido	Inf: 15 No inf: 5	Inf: 17 No inf: 3	Gy = 0,157	P > 0,500
	Latencia	Inf: 435,126 (31,174) No inf: 417,507 (60,457)	Inf: 375,387 (30,730) No inf: 435,153 (79,872)	F = 0,169	0,683

Tabla 6.1. Comparación entre Cast191 y MI94. Para cada variable analizada se muestra el valor observado para cada cepa y el valor del estadístico correspondiente a la prueba utilizada (Gy: prueba de heterogeneidad; F: ANOVA de dos factores) y el valor p asociado. El valor del estadístico F corresponde al factor Cepa (en ningún caso la interacción entre factores resultó significativa). Inf: fruto infestado, No inf.: fruto no infestado.

6.4.2.2. *Experimento 1. Repetición en olfatómetro de los resultados positivos del ensayo en jaula de elección.* En los cuatro ensayos realizados se encontró que el número de visitas recibidas por cada tipo de fruto difirió estadísticamente del esperado bajo una hipótesis de igual proporción de visitas (Tabla 6.2). Los resultados obtenidos coincidieron con los hallados en las experiencias realizadas en jaulas (Capítulo 5).

El análisis de la latencia para visitar cada una de las opciones no mostró diferencias significativas en ningún caso (Tabla 6.3). En los cuatro experimentos la latencia promedio fue semejante (aproximadamente 400 segundos).

Experimento	Número de visitas	Valor Gy	Valor P
Infestación del fruto	Infestado: 31 No Infestado: 9	11,60	P < 0,001
Actividad de larvas	Inf. sin larvas: 30 No infestado: 10	9,40	0,001 < P < 0,005
Presencia de hongos	Con hongos: 30 Sin hongos: 10	9,40	0,001 < P < 0,005
Grado de maduración	Maduro: 6 Podrido: 34	23,01	P < 0,001

Tabla 6.2. Elección dentro del olfatómetro. Número de hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 1, seguido del valor del estadístico G corregido por Yates (Gy), y el valor P asociado a esta prueba.

Experimento	Latencia (ES)	F	Valor P
Infestación del fruto	Infestado: 441,34 (17,78) No Infestado: 430,52 (47,47)	0,067	0,796
Actividad de larvas	Inf. sin larvas: 437,64 (21,16) No infestado: 384,46 (30,01)	1,711	0,199
Presencia de hongos	Con hongos: 404,06 (50,83) Sin hongos: 330,61 (63,11)	0,590	0,447
Grado de maduración	Maduro: 355,64 (66,46) Podrido: 297,78 (30,36)	0,556	0,460

Tabla 6.3. Latencia dentro del olfatómetro. Latencia promedio en segundos registrada para las hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 1, seguida del estadístico F correspondiente al ANOVA de una factor realizado y del valor P asociado a la prueba.

6.4.2.3. *Experimento 2. Estabilidad de los patrones encontrados en el experimento 1, cambiando de fruta.* Al repetir los ensayos realizados en el experimento anterior, probando ahora la respuesta de las hembras en manzanas sometidas a los mismos tratamientos, se encontró para los tres ensayos realizados que el número de visitas recibidas por cada tipo de fruto difirió estadísticamente del esperado bajo una hipótesis de igual proporción de visitas (Tabla 6.4). En todos los casos los resultados favorecen a los mismos tratamientos que en el experimento 1 y en el Capítulo 5.

La Tabla 6.5 muestra los tiempos promedio de latencia para los tres experimentos realizados con manzana. En todos los casos se ven tiempos de latencia semejantes (aproximadamente 400 segundos), no encontrándose diferencias estadísticas en ninguno de los experimentos.

Experimento	Número de visitas	Valor Gy	Valor P
Infestación del fruto	Infestado: 32 No Infestado: 8	14,07	P < 0,001
Actividad de larvas	Inf. sin larvas: 29 No infestado: 11	7,46	0,001 < P < 0,005
Grado de maduración	Maduro: 10 Podrido: 30	9,40	0,001 < P < 0,005

Tabla 6.4. Elección usando manzana como sustrato. Número de hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 2, seguido del valor del estadístico G corregido por Yates (Gy), y el valor P asociado a esta prueba.

Experimento	Latencia	F	Valor P
Infestación del fruto	Infestado: 403,39 (22,21) No Infestado: 424,13 (44,71)	0,174	0,679
Actividad de larvas	Inf. sin larvas: 376,53 (29,60) No infestado: 404,38 (31,05)	0,396	0,553
Grado de maduración	Maduro: 334,93 (51,69) Podrido: 368,43 (26,79)	0,400	0,531

Tabla 6.5. Latencia usando manzana como sustrato. Latencia promedio en segundos registrada para las hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 2, seguida del estadístico F correspondiente al ANOVA de una factor realizado y del valor P asociado a la prueba.

6.4.3. Respuesta de *D. longicaudata* ante distintas especies frutales

6.4.3.1 Comparación entre MI94 y Cast191. La Tabla 6.6 muestra los valores de visita y latencia registrados para cada cepa en cada uno de los experimentos en que se compararon especies frutales. La distribución de visitas entre las opciones presentadas dentro del olfatómetro así como los tiempos de latencia no mostraron diferencias entre las cepas en su comportamiento de búsqueda y preferencia. Por esto se decidió agrupar los datos para este experimento, y analizar los patrones de preferencia sin tener en cuenta la cepa del parasitoide. Lo mismo se hizo al analizar los datos registrados en los experimentos subsiguientes.

6.4.3.2. Experimento 3. Preferencia entre especies frutales. El número de visitas recibidas por cada una de las especies analizadas en cada ensayo se muestra en la Tabla 6.7. En todos los casos en que uno de los frutos ofrecidos fue higo, las hembras visitaron este fruto más veces que lo esperado bajo una hipótesis de igual número de visitas. En las comparaciones entre durazno y manzana, y durazno y naranja, el durazno

fue el fruto más visitado, mostrando diferencias significativas con las otras dos especies. Finalmente, cuando la manzana y la naranja fueron enfrentadas en el olfatómetro, un mayor número de hembras que el esperado visitó el brazo que tenía una naranja (Tabla 6.7).

Experimento	Variable	Cast191	MI94	Estadístico	Valor P
Durazno vs. Higo	Fruto elegido	D: 4 H: 16	D: 8 H: 12	Gy = 1,080	P > 0,100
	Latencia	D: 456,282 (26,171) H: 370,076 (20,592)	D: 305,173 (47,769) H: 369,839 (40,934)	F = 3,449	0,072
Durazno vs. Manzana	Fruto elegido	D: 16 M: 4	D: 16 M: 4	Gy = 0,000	P > 0,999
	Latencia	D: 368,789 (30,107) M: 385,617 (52,783)	D: 436,281 (18,221) M: 457,092 (35,800)	F = 3,214	0,081
Durazno vs. Naranja	Fruto elegido	D: 13 N: 7	D: 15 N: 5	Gy = 0,119	P > 0,500
	Latencia	D: 388,715 (30,357) N: 411,871 (33,334)	D: 344,407 (42,437) N: 348,773 (75,545)	F = 1,250	0,271
Higo vs. Manzana	Fruto elegido	H: 17 M: 3	H: 18 M: 2	Gy = 0,000	P > 0,999
	Latencia	H: 337,958 (19,529) M: 315,946 (42,755)	H: 312,561 (22,100) M: 377,654 (143,984)	F = 0,164	0,688
Higo vs. Naranja	Fruto elegido	H: 17 N: 3	H: 13 N: 7	Gy = 1,214	P > 0,250
	Latencia	H: 323,980 (21,405) N: 375,173 (80,388)	H: 338,621 (26,945) N: 438,365 (36,217)	F = 1,084	0,305
Manzana vs. Naranja	Fruto elegido	M: 6 N: 14	M: 5 N: 15	Gy = 0,000	P > 0,999
	Latencia	M: 404,168 (31,333) N: 406,045 (19,703)	M: 341,619 (45,302) N: 371,628 (23,703)	F = 2,588	0,116

Tabla 6.6. Comparación entre Cast191 y MI94. Para cada variable analizada se muestra el valor observado para cada cepa y el valor del estadístico correspondiente a la prueba utilizada (Gy: prueba de heterogeneidad; F: ANOVA de dos factores) y el valor p asociado. El valor del estadístico F corresponde al factor Cepa (en ningún caso la interacción entre factores resultó significativa). D: durazno; H: higo; M: manzana; N: naranja.

A excepción del ensayo en que higo y naranja fueron presentados a las hembras, en ningún caso se registraron diferencias significativas entre especies frutales en la latencia (Tabla 6.8). La latencia fue, en términos generales, pareja entre tratamientos y especies frutales, mostrando valores cercanos a los 350 y 400 segundos.

Experimento	Número de visitas	Valor Gy	Valor P
Durazno vs. Higo	D: 13 H: 24	4,303	0,025 < P < 0,050
Durazno vs. Manzana	D: 32 M: 8	14,072	0,005 < P < 0,010
Durazno vs. Naranja	D: 28 N: 12	5,765	0,010 < P < 0,025
Higo vs. Manzana	H: 35 M: 5	23,420	P < 0,001
Higo vs. Naranja	H: 30 N: 10	9,399	0,001 < P < 0,005
Manzana vs. Naranja	M: 11 N: 29	7,460	0,005 < P < 0,010

Tabla 6.7. Elección entre especies frutales. Número de hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 3, seguido del valor del estadístico G corregido por Yates (Gy), y el valor P asociado a esta prueba. D: durazno; H: higo; M: manzana; N: naranja.

Experimento	Latencia	F	Valor P
Durazno vs. Higo	D: 369,975 (20,669) H: 355,543 (38,621)	0,128	0,723
Durazno vs. Manzana	D: 402,536 (18,340) M: 421,355 (32,467)	0,219	0,642
Durazno vs. Naranja	D: 364,979 (26,618) N: 385,581 (36,143)	0,191	0,664
Higo vs. Manzana	H: 324,897 (14,784) M: 340,630 (53,386)	0,130	0,720
Higo vs. Naranja	H: 333,325 (16,597) N: 419,408 (33,208)	6,677	0,014
Manzana vs. Naranja	M: 375,737 (27,164) N: 388,243 (15,585)	0,170	0,682

Tabla 6.8. Latencia comparada entre especies frutales. Latencia promedio en segundos registrada para las hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 3, seguida del estadístico F correspondiente al ANOVA de un factor realizado y del valor P asociado a la prueba. D: durazno; H: higo; M: manzana; N: naranja.

6.4.3.3. *Experimento 4. Efecto del nivel de infestación sobre la preferencia de las hembras.* Cuando se presentaron naranjas ó manzanas de distinto nivel de infestación dentro del olfatómetro, las hembras visitaron en mayor proporción las frutas que mostraban un nivel de infestación más alto (Tabla 6.9). El mismo patrón fue encontrado cuando la naranja presentaba un alto nivel de infestación en comparación con la manzana. No obstante, cuando la manzana presentaba un alto nivel de infestación (en

comparación con la naranja) las diferencias en el número de visitas dejaron de ser estadísticamente significativas (Tabla 6.9).

Experimento	Número de visitas	Valor Gy	Valor P
Manzana alta vs. Manzana baja	M alta: 32 M baja: 8	14,072	P < 0,001
Naranja alta vs. Naranja baja	N alta: 29 N baja: 11	7,460	0,005 < P < 0,010
Naranja alta vs. Manzana baja	N alta: 31 M baja: 9	11,597	P < 0,001
Manzana alta vs. Naranja baja	M alta: 17 N baja: 23	0,627	0,250 < P < 0,500

Tabla 6.9. Elección entre naranja y manzana con distintos niveles de infestación. Número de hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 4, seguido del valor del estadístico G corregido por Yates (Gy), y el valor P asociado a esta prueba. M: manzana; N: naranja.

La Tabla 6.10 muestra la latencia promedio registrada para cada opción dentro del olfatómetro. En ningún caso se detectaron diferencias significativas entre las frutas presentadas, registrándose una latencia promedio de entre 350 y 400 segundos aproximadamente.

Experimento	Latencia	F	Valor P
Manzana alta vs. Manzana baja	M alta: 374,853 (18,590) M baja: 431,555 (36,738)	0,020	0,889
Naranja alta vs. Naranja baja	N alta: 413,805 (18,583) N baja: 394,368 (36,975)	0,273	0,604
Naranja alta vs. Manzana baja	N alta: 307,144 (23,531) M baja: 366,524 (44,352)	1,423	0,240
Manzana alta vs. Naranja baja	M alta: 375,764 (25,562) N baja: 339,627 (23,697)	0,004	0,951

Tabla 6.10. Latencia comparada entre naranja y manzana con distintos niveles de infestación. Latencia promedio en segundos registrada para las hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 4, seguida del estadístico F correspondiente al ANOVA de una factor realizado y del valor P asociado a la prueba. M: manzana; N: naranja.

6.4.3.4. *Experimento 5. Importancia de la experiencia previa en la elección de la especie frutal.* El número de visitas registrado en cada brazo del olfatómetro cuando las opciones eran frutos de manzana y naranja y las hembras habían sido entrenadas en una

de estas dos especies se muestra en la Tabla 6.11. En ambos casos, las hembras visitaron en mayor proporción la especie en que habían sido entrenadas.

El análisis de la latencia para cada una de las opciones en cada experimento (Tabla 6.12) no mostró diferencias entre las dos frutas, registrándose una latencia semejante en todos los casos (aproximadamente 400 segundos).

Experimento	Número de visitas	Valor Gy	Valor P
Entrenamiento en Manzana	Manzana: 28 Naranja: 12	5,765	0,010 < P < 0,025
Entrenamiento en Naranja	Manzana: 7 Naranja: 33	16,846	P < 0,001

Tabla 6.11. Elección entre naranja y manzana con experiencia previa. Número de hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 5, seguido del valor del estadístico G corregido por Yates (Gy), y el valor P asociado a esta prueba. M: manzana; N: naranja.

Experimento	Latencia	F	Valor P
Entrenamiento en Manzana	Manzana: 383,974 (31,127) Naranja: 429,918 (29,886)	0,792	0,379
Entrenamiento en Naranja	Manzana: 369,054 (67,182) Naranja: 415,13 (11,8402)	0,003	0,957

Tabla 6.12. Latencia comparada entre naranja y manzana con experiencia previa. Latencia promedio en segundos registrada para las hembras que eligieron cada una de las opciones dentro del olfatómetro en Y en el experimento 1, seguida del estadístico F correspondiente al ANOVA de una factor realizado y del valor P asociado a la prueba. M: manzana; N: naranja.

6.5. Discusión

En el presente estudio se analizó la respuesta de las hembras del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* ante compuestos volátiles emitidos por frutos sometidos a los tratamientos que resultaron atractivos en el Capítulo 5, utilizando manzana, además de naranja, como modelo experimental. Asimismo, se analizó el grado de preferencia de las hembras *naïve* del parasitoide por frutos de distintas especies y se determinó el efecto del nivel de infestación por larvas de *C. capitata* y de la experiencia previa del parasitoide sobre los patrones de preferencia. Para esto se utilizó un olfatómetro en Y, y se analizó el número de visitas y la latencia exhibida por

las hembras dentro de este aparato. Esta última variable no mostró ser informativa acerca de la preferencia de las hembras y, por lo tanto, la discusión se centra sobre los resultados obtenidos en relación con el número de visitas de las hembras. Por otra parte, los experimentos en que se analizaron diferencias en la elección entre parasitoides de las cepas Cast191 y MI94, mostraron nuevamente que no existieron diferencias entre estas. Por este motivo, los resultados fueron agrupados y analizados en forma conjunta.

Al analizar la preferencia de las hembras por naranjas sometidas a distintos tratamientos, la respuesta fue, en los cuatro experimentos realizados, la misma que la registrada en los experimentos conducidos en arenas experimentales y descritos en el Capítulo 5. Los parasitoides prefirieron visitar naranjas infestadas por *C. capitata* sobre naranjas no infestadas, y respondieron positivamente a la actividad de las larvas dentro del fruto, a la presencia de hongos en la fruta, y al mismo proceso de pudrición del fruto. De esta manera, las conclusiones presentadas en el Capítulo 5 se ven reforzadas, y surgen nuevamente los mismos interrogantes: ¿existe una verdadera asociación entre el hongo y el parasitoide? ¿O es un producto del proceso que el hongo induce sobre la fruta? Los compuestos liberados por el fruto infestado: ¿difieren a los emitidos por un fruto podrido pero no infestado? ¿O cada compuesto tiene un nivel de alcance distinto (por ejemplo, compuestos producidos por las larvas siendo de corto alcance y compuestos emitidos por frutos en descomposición de largo alcance)? Estas preguntas solo podrán encontrar su respuesta analizando similitudes y diferencias en los volátiles emitidos por frutos de estos tres tratamientos y frutos maduros no infestados ni atacados por hongos.

Al repetir los ensayos en el olfatómetro, utilizando manzana como fruto modelo, se encontraron los mismos resultados que los descritos al utilizar naranja. Esto muestra que, hasta cierto punto, la respuesta de los parasitoides es independiente del hospedador de mosca de la fruta utilizado. En los experimentos que involucran frutos infestados (con o sin larvas en su interior), esta independencia podría estar explicada por la presencia de una clave química común a las dos especies y proveniente de la actividad de las larvas dentro de los frutos. En el caso de los experimentos con frutos en estado de descomposición, los resultados muestran que las hembras responden a estos estímulos aún cuando la especie frutal cambia y se espera, por ende, que los compuestos derivados

de la propia pudrición de la fruta cambien también. Si esto fuera así, los parasitoides deberían ser capaces de reconocer un amplio intervalo de claves químicas provenientes del hábitat del hospedador. Por otro lado, el desconocimiento de la diversidad de los microorganismos asociados a los procesos de pudrición de cada especie frutal deja abierta la pregunta de si frutos en descomposición de distintas especies frutales son atacados por organismos que liberan compuestos volátiles similares. Si este fuera el caso, los parasitoides podrían utilizar unos pocos compuestos químicos asociados al proceso de descomposición de las diversas especies frutales en que su hospedador puede alojarse. Nuevamente, el análisis de los compuestos volátiles emitidos por frutos de distintas especies y grados de descomposición podría echar luz sobre la base de la atracción de las hembras del parasitoide por estos frutos.

Las hembras *naïve* de *D. longicaudata* mostraron un patrón de preferencia lineal por las especies frutales ofrecidas dentro del olfatómetro. En primer lugar las hembras prefirieron al higo, seguido por el durazno, luego la naranja, y finalmente, la manzana. Algunos de estos resultados han sido ya reportados en estudios previos (Messing y Jang 1992). No obstante, Leyva et al. (1991) reportan que *D. longicaudata* muestra una marcada preferencia por naranja sobre durazno. Las diferencias con el patrón encontrado en el presente estudio podrían deberse a diferencias en el grado de madurez de la fruta utilizada en las pruebas de preferencia o bien a diferencias debidas a los dispositivos usados para realizar los experimentos.

Debido a la condición generalista, tanto del parasitoide como de sus hospedadores, la existencia de una patrón de preferencia tan marcado en hembras *naïve* resulta difícil de explicar. La mejor estrategia sería detectar primero fruta infestada sobre la base de claves directas del hospedador, como aquellas emitidas por los compuestos derivados de la actividad de las larvas, y asociar estas claves a otras más conspicuas como el olor o el color de la fruta en las que frecuentemente se encuentran larvas hospedadoras. Esto fue lo encontrado para el caso de las claves visuales (específicamente el color del sustrato, Capítulo 4) pero respecto a las claves químicas parecería haber un patrón prefijado de búsqueda. Esto puede responder a varios motivos. En primer lugar, el patrón de preferencias podría responder al patrón de distribución de larvas hospedadoras entre las distintas especies frutales. Este patrón

estará afectado principalmente por la preferencia de oviposición de las moscas y por la capacidad de carga de las especies frutales analizadas. Para un parasitoide en búsqueda de hospedadores las diferencias en densidad larval entre especies frutales se traducirán directamente en diferencias de la cantidad potencial de huevos depositados por unidad de tiempo, y, por tanto, afectaría radicalmente su éxito reproductivo. Esta fuerte presión de selección, que tiene como origen el hecho de que la distribución de larvas en la naturaleza no es homogénea entre especies frutales puede ser la razón de la preferencia del parasitoide por las especies frutales ofrecidas en el presente estudio.

Diachasmimorpha longicaudata tiene como hospedador natural a la larvas de moscas del género *Bactrocera* (Wharton y Gilstrap 1983). Sobre la base de la lista de especies frutales atacadas por 74 especies de este género (incluyendo a las especies más importantes como *B. tryoni*, *B. dorsalis*, y *B. cucurbitacea*, entre otras) publicada por White y Elson-Harris (1992), se encontró que estas moscas han sido recuperadas de una amplia variedad de especie frutales, de las cuales la más frecuentes son: mango (*Mangifera indica*), papaya (*Carica papaya*), guayaba (*Psidium guava*), varias especies de la familia Cucurbitae, y varias especies nativas de diversas familias. Respecto a las especies analizadas en el presente estudio, el durazno y la naranja aparecen como hospedadores de *Bactrocera* para 22% y 24% de las especies respectivamente. La manzana aparece como hospedador para el 10% de las especies. Esto permitiría apoyar la idea de que la baja atracción de los parasitoides hacia estos frutos está relacionada con la baja importancia de la manzana como hospedador para las moscas. Por otro lado, el higo sería un hospedador de baja importancia para estas moscas, ya que figura citado solo en un 4% de las especies. Resulta entonces llamativo que las hembras del parasitoide hayan mostrado tan alta preferencia por el higo cuando esta especie frutal no aparece como hospedador principal de *Bactrocera*. No obstante, es importante aclarar que si bien existen listas de hospedadores de estas moscas, estas listas se basan muchas veces en información poco precisa y no dan detalle de la preferencia de cada una de las especies, sólo de los hospedadores atacados. Para analizar la asociación entre preferencia de las moscas y preferencia del parasitoide por especies frutales, se necesitaría información detallada de los patrones de utilización (por parte de las moscas) de cada una de las especies frutales citadas, más que una simple lista de hospedadores.

Dos explicaciones alterativas, pero no excluyentes, tienen su base en el éxito reproductivo asociado a forrajear en cada una de las especies frutales, independientemente de la distribución de larvas entre estas. En primer lugar, la preferencia de las hembras del parasitoide podría reflejar cuán fácil sea detectar y/o parasitar larvas en frutos de cada una de las cuatro especies frutales. Así, las hembras podrían obtener un mayor rédito (en términos de número de larvas parasitadas por unidad de tiempo) en una especie frutal que en otra y esto sería independiente del nivel de infestación. El éxito diferencial asociado a cada especie frutal podría ser la causa de la preferencia de las hembras del parasitoide. Por otro lado, la preferencia de las hembras podría ser el producto de diferencias en la calidad de las larvas criadas sobre las distintas especies frutales como sustrato de oviposición. Así, las larvas del parasitoide que se alimenten de larvas de la mosca criadas en higo, en este caso, darían origen a adultos con una ventaja adaptativa sobre individuos criados sobre larvas de la mosca alimentados en las otras tres especies.

La preferencia de *D. longicaudata* por especies frutales podría tener una explicación más funcional que adaptativa. Probablemente, las distintas especies frutales emitan señales cuya detectabilidad por el parasitoide no es comparable, es decir que los parasitoides detectan más fácilmente frutos podridos de higo que del resto de las especies frutales, y es por esto que las hembras analizadas en el olfatómetro prefieren esta especie frutal. No obstante, si una mayor detectabilidad fuera la explicación de la preferencia no solo se esperarían diferencias en la visita sino también en la latencia, mostrando latencias más bajas en las hembras que visitan higo y más altas en aquellas hembras que visitan manzana. Al analizar los resultados se ve que solo en un caso la latencia fue significativamente distinta entre especie frutales (higo y naranja), por lo que la existencia de preferencia por especies frutales sobre la base de la detectabilidad no parece ser la explicación más adecuada.

Si bien el parasitoide *D. longicaudata* parece tener un patrón fijo de preferencia por especies frutales, en el presente estudio se encontró que esta preferencia es bastante plástica y es afectada al menos por dos factores: el nivel de infestación de la fruta y la experiencia previa de las hembras. En el primer caso, se encontró que las hembras detectan distintos niveles de infestación y visitan las fuentes con mayor densidad de

larvas, tanto para la naranja como para la manzana. Hasta el presente, varios estudios realizados con *D. longicaudata* evidenciaron la capacidad de distinguir entre frutos infestados y no infestados (Greany et al. 1977, Eben et al. 2000, Carrasco et al. 2005). Los experimentos realizados en el presente estudio permiten concluir que las hembras no solo tienen la capacidad de detectar frutos infestados, sino que además pueden percibir diferentes niveles de infestación, mostrando que la atracción de las hembras por frutos infestados tendría un carácter dosis-dependiente. Este hecho, además, parece integrarse con la preferencia por especies frutales. Cuando la especie frutal preferida (en este caso la naranja) muestra un menor nivel de infestación que un hábitat alternativo no preferido (la manzana), la preferencia de las hembras por el primero desaparece, mostrando que ambos factores están influyendo en forma similar en la respuesta de las hembras. De esta manera, los parasitoides podrían ajustar su preferencia en respuesta a la preferencia de las moscas y detectar así los parches en que la probabilidad de éxito sea mayor.

Por otro lado, la preferencia innata de los parasitoides hembra por estas dos especies frutales se vio fuertemente afectada por la experiencia previa. Cuando las hembras fueron sometidas a un periodo de entrenamiento en el que encontraron larvas hospedadoras asociadas a pulpa de manzana, la elección dentro del olfatómetro fue revertida respecto a lo encontrado para hembras *naïve*. Esto muestra nuevamente como las hembras del parasitoide pueden ajustar su patrón de búsqueda en función de la recompensa potencial asociada a cada elección, en este caso probablemente mediante un mecanismo de aprendizaje asociativo. Así, las hembras modificarían su preferencia, eligiendo la manzana pues es en ese hospedador frutal en el que con alta probabilidad van a encontrar larvas hospedadoras. Cuando las hembras fueron entrenadas en naranja, el porcentaje de hembras que eligió esta especie se incrementó (pasó de 72,50% en hembras *naïve* a 82,50% en hembras entrenadas), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando las proporciones fueron analizadas por medio de una prueba de heterogeneidad de G (datos no mostrados). Esto muestra que la elección innata de las hembras no se ve reforzada luego del entrenamiento en la especie frutal preferida.

El aprendizaje de claves químicas por insectos parasitoides ha sido reportado en varias especies y en diferentes contextos comportamentales (Turlings et al. 1993). Así algunos parasitoides son capaces de aprender olores asociados a fuentes alimenticias y utilizar estos olores en futuros eventos de búsqueda de alimento (Lewis y Takasu 1990, Takasu y Lewis 1993, 1996, Patt et al. 1999, Wäckers 1994, Sato y Takasu 2000). De la misma manera, se han descripto varios casos en los cuales los parasitoides tienen la habilidad de asociar olores del sistema planta-hospedador, tanto en parasitoides himenópteros (Wardle y Borden 1989, Wäckers y Lewis 1994, Iizuka y Takasu 1998, Kerguelen y Cardé 1998) como en parasitoides dípteros (Morehead y Feener 2000, Stireman 2002). Todos estos casos, se enmarcan dentro de la idea de que en especies con hábitos generalistas el aprendizaje debería jugar un rol más importantes que en aquellas especialistas. Los parasitoides generalistas enfrentan, frecuentemente, un ambiente variable en el cual deben responder a fluctuaciones en la abundancia de los potenciales recursos, por lo que la capacidad de aprender les permitirá explotar más eficientemente los recursos, al concentrarse sólo en los estímulos que conducen a hábitats ricos (Stireman 2002). Aún cuando *D. longicaudata* cae dentro de la categoría de parasitoides para los que se espera una alta influencia del aprendizaje, ningún estudio analizó el efecto de la experiencia previa en los patrones de preferencia de este parasitoide. En el presente estudio, se encontró evidencia de que el aprendizaje de claves químicas tiene un fuerte impacto sobre la preferencia de las hembras de *D. longicaudata*, revirtiendo incluso la preferencia innata del parasitoide.

Los estudios realizados constituyen una primera aproximación para entender cómo se distribuirá este parasitoide en el campo luego de una liberación en el marco del control biológico de moscas de la fruta. Los estudios de olfatometría permitieron confirmar la habilidad de este parasitoide para encontrar frutos infestados por larvas de moscas y la participación de claves químicas directas e indirectas en este proceso. Asimismo, se concluye que aparentemente esta habilidad es independiente de la especie frutal. En ambientes donde varios cultivos frutales son realizados simultáneamente, o bien donde un cultivo frutal se mezcla con frutales domiciliarios, estos parasitoides pueden exhibir una preferencia innata por las especies frutales. No obstante, el hecho de que tanto el nivel de infestación como la experiencia previa asociada a cada especie frutal le permiten al parasitoide ajustar su patrón de búsqueda y modificar así su

preferencia innata garantizaría que las hembras de *D. longicaudata* encontrarán larvas asociadas a sustratos no preferidos inicialmente y utilizarán esta información en sucesivos eventos de forrajeo, haciéndose más eficientes como controladores de esta plaga.

7. Éxito reproductivo asociado al forrajeo en distintos hábitats del hospedador

7.1. Introducción

Debido a que las decisiones que un parasitoide toma durante el forrajeo determinan el número de descendientes que produce, este comportamiento debe estar bajo una fuerte presión de selección (van Alphen y Jervis 1996). Se espera, por tanto, que estas decisiones estén modeladas en buena parte por la selección natural. Numerosas hipótesis y modelos matemáticos han sido desarrollados para predecir la respuesta de los individuos, suponiendo que estos son capaces de evaluar las circunstancias en las que se encuentran y tomar la mejor decisión posible. Esta será aquella que les permita maximizar el número de descendientes dejados. Los modelos más clásicos suponen que la decisión del individuo no está afectada por su estado fisiológico (modelos de optimalidad de tipo estático) mientras que otros modelos permiten que la decisión del individuo varíe de acuerdo a su estado interno (modelos estado dependientes) (Clark y Mangel 2000, Godfray 1994). Otros modelos permiten, además, contemplar cual es la mejor decisión en función de lo que están haciendo los posibles competidores (van Alphen y Jervis 1996).

Dentro de este marco, la teoría de forrajeo (Charnov y Stephens, 1988) predice que la preferencia de un individuo durante el proceso de búsqueda de presas u hospedadores debería reflejar diferencias en la calidad de los mismos (Rivero 2000). En el caso de los insectos parasitoides, una gran cantidad de estudios han registrado tanto la existencia de preferencia por determinados hospedadores, así como el efecto que tienen distintos hospedadores en el éxito reproductivo de las hembras, pero pocos han comparado cuantitativamente la preferencia con la calidad de los hospedadores (Godfray 1994). Los que lo han hecho, encontraron evidencias de un correlato positivo entre preferencia y calidad de los hospedadores en varias especies de parasitoides de *Drosophila* (van Alphen y Vet 1986, Driessen et al. 1991), en parasitoides de áfidos (Liu et al. 1984, Liu 1985), y en himenópteros tricogrammatidos (Juliano 1982). Más recientemente, Mohamed et al. (2003) y Luhring et al. (2004) encontraron también evidencias de esta asociación. No obstante, en algunos casos se observó una falta de correlación entre la preferencia de los parasitoides y el éxito asociado a

los distintos hospedadores disponibles (Driessen et al. 1991, Eben et al. 2000, Rivero et al. 2000).

En general, todos estos estudios se centran en medir el efecto que tiene la elección de hospedadores de un determinado tamaño, estadio de desarrollo, o especie, sobre el éxito reproductivo de las hembras del parasitoide. No obstante, cuando una hembra forrajea por hospedadores que se desarrollan en más de un hábitat, la primera decisión que debe tomar es cuál de los hábitats disponibles conviene visitar. Numerosos factores pueden afectar la decisión de la hembra, tales como la densidad de hospedadores en cada hábitat, la facilidad para encontrar y/o parasitar hospedadores en cada uno de los hábitats, y la calidad de los hospedadores asociados a los distintos hábitats. Teniendo en cuenta el vasto número de estudios en los cuales se analizó la importancia de las plantas (u otros tipos de hábitats del hospedador) en la orientación de los parasitoides hembra, resulta llamativo que la relación entre la preferencia por hábitats del hospedador y el éxito reproductivo haya sido relativamente ignorada.

En el caso de sistema tritrófico conformado por parasitoides de moscas de la fruta, sus hospedadores, y las especies frutales, la elección del hábitat del hospedador podría ser un punto clave en el éxito reproductivo que las hembras del parasitoide pueden obtener en su vida. Una vez que la hembra de la mosca deposita un huevo en un fruto, las larvas podrán alimentarse sólo de ese fruto y, por lo tanto, su desarrollo estará estrechamente ligado a la especie frutal. Esto hace que, para el parasitoide, el hábitat donde crece una larva sea un indicador bastante fiel de la calidad de los hospedadores que aloja. Por tanto, se espera que si frutos de distintas especies producen larvas de distinta calidad como hospedadores, los parasitoides puedan utilizar información proveniente del hábitat del hospedador y visitar primero aquellas plantas que produzcan mejores hospedadores. Alternativamente, los posibles hábitats del hospedador podrían no diferir en los beneficios que brindan a los descendientes en términos de éxito reproductivo sino en los costos (en términos energéticos o de tiempo empleado en la búsqueda) que la hembra del parasitoide debe pagar para dejar un huevo en una larva que se alimenta en distintos sustratos (Rivero 2000). El hecho de que los frutos de distintas especies difieran en sus características como sustrato de búsqueda (tamaño, estructura interna, grosor del epicarpio) puede hacer que, encontrar y/o parasitar larvas en un determinado hospedador frutal, sea más costoso (en los términos definidos antes) y que, por lo

tanto, el patrón de preferencia responda al beneficio por unidad de tiempo que se espera obtener en cada hábitat.

En el Capítulo 6 de esta tesis, se encontró que las hembras *naïve* del parasitoide *D. longicaudata* mostraron un claro patrón de preferencia por cuatro posibles hábitats del hospedador. Estudios previos han mostrado también que las hembras de este parasitoide muestran cierta preferencia por distintas especies frutales, intentando hallar una relación entre esta preferencia y el éxito reproductivo de las hembras. Leyva et al. (1991) compararon el patrón de preferencia de este parasitoide con el porcentaje de parasitismo asociado a distintas especies frutales (como una medida de la calidad del hábitat en términos de barrera física al parasitismo). Por su parte, Eben et al. (2000) analizaron si el patrón de preferencia por especies frutales encontrado mantenía una relación con la calidad de los hospedadores que se desarrollaban en cada especie frutal. En ese estudio, la calidad de los hospedadores se infirió a partir del éxito reproductivo de las hembras criadas sobre larvas hospedadoras provenientes de diversas especies frutales. No obstante, en ningún estudio se analizaron los beneficios asociados a forrajear en distintas especies frutales en términos del esfuerzo de búsqueda y calidad de los hospedadores en forma conjunta.

7.2. Objetivos

7.2.1. Objetivo general

Analizar la existencia de diferencias en el éxito reproductivo de hembras del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* que forrajeen por hospedadores en distintas especies frutales y estudiar su relación con los patrones de preferencia hallados en el Capítulo 6.

7.2.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar el porcentaje de parasitismo alcanzado por hembras *naïve* en frutos infestados por larvas de *Ceratitis capitata* de las cuatro especies frutales utilizadas en el Capítulo 6 (durazno, higo, manzana, y naranja).
- 2) Analizar diferencias en la calidad de las larvas de *C. capitata* criadas sobre cada una de las cuatro especies frutales ya citadas, utilizando la fecundidad y la supervivencia de los parasitoides emergidos de estas y al peso pupal como estimadores de calidad.

7.3. Materiales y Métodos

7.3.1. Insectos

El material biológico utilizado en los ensayos provino de las crías que se mantienen en el IGEAF (INTA Castelar). Parasitoides de las dos cepas mantenidas en el IGEAF (Cast191 y MI94) se utilizaron indistintamente en estos ensayos. Hasta el momento del ensayo las hembras fueron mantenidas con machos en condiciones controladas (T: 25°; Hr: 60%-70%; fotoperíodo: 14-10) y provistas de agua y miel.

7.3.2. Experimentos realizados

7.3.2.1. Experimento 1. Éxito durante el forrajeo sobre distintas especies frutales. Para analizar la calidad de cada una de las especies frutales como sustrato de búsqueda de hospedadores, se presentaron frutos infestados con larvas de *C. capitata* de las cuatro especies frutales utilizadas en el Capítulo 6 ante hembras grávidas sin experiencia de *D. longicaudata*. Las hembras tenían entre 5-7 días desde la emergencia.

Previo a la exposición, frutos de estas cuatro especies frutales fueron expuestos a hembras de *C. capitata*. Luego de esta exposición fueron mantenidos en condiciones controladas (T: 25±1°C, Hr: 50±5%) hasta que se registrara en ellos la presencia de larvas de estadio 2 tardío o 3 temprano. En este momento, los frutos infestados fueron expuestos a los parasitoides hembra.

La exposición fue realizada colocando un grupo de parasitoides hembra dentro de un frasco de vidrio de 3 litros de capacidad (junto a contenedores con agua y miel). Luego de seis horas los frutos fueron retirados y colocados en un recipiente plástico de 1 litro de capacidad que contenía vermiculita en su interior. Una vez que las larvas abandonaron el fruto, este mineral actuó como sustrato de pupación (Figura 7.1).

Una vez que las larvas abandonaron el fruto y empuparon, las pupas fueron separadas de la vermiculita, contadas y pesadas utilizando una balanza de precisión. Posteriormente, las pupas fueron colocadas en frascos de vidrio de 500 ml con una capa delgada de vermiculita y colocadas en una sala bajo condiciones controladas (T: 26±1°C, Hr: 70±10%). Estos frascos fueron dejados allí hasta que emergieran todos los individuos (moscas y parasitoides). Diariamente el material fue rociado con agua de manera de mantener buena humedad dentro

de la vermiculita y favorecer así la recuperación de adultos. Al terminar la emergencia, cada frasco fue examinado y se registró el número de moscas, de parasitoides, y de pupas no emergidas. Estas últimas se mantuvieron separadas y posteriormente se disecaron para determinar si su contenido se correspondía a una mosca o un parasitoide que había muerto en el estadio de pupa antes de emerger (en el caso de los parasitoides también se encontraron larvas diapausantes).

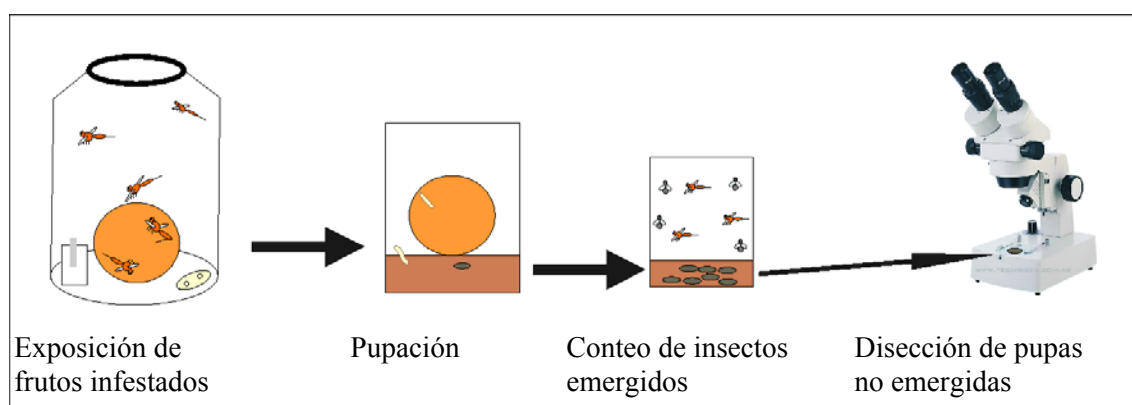


Figura 7.1. Esquema del experimento 1. Pasos seguidos desde la exposición de fruta infestada hasta la disección de las pupas no emergidas.

En total se expusieron 120 frutos de cada especie frutal. Todos los frutos fueron pesados y medidos. Debido a que el tamaño de los frutos de las distintas especies frutales mostraba una marcada variación en el tamaño y, consecuentemente, la superficie de búsqueda ofrecida a los parasitoides era distinta se trató de ponderar el número de hembras a colocar dentro de cada frasco por la superficie de la fruta. Para durazno, naranja, y manzana, que poseen una superficie semejante entre sí (durazno = $134,99 \text{ cm}^2 (\pm 2,46)$; naranja = $165,75 \text{ cm}^2 (\pm 7,54)$; manzana = $153,53 \text{ cm}^2 (\pm 4,34)$), se utilizaron 5 hembras del parasitoide por unidad experimental (un frasco con una fruta infestada en su interior) En cambio, para el higo ($77,30 \text{ cm}^2 (\pm 0,86)$) se utilizaron 3 hembras por unidad experimental. Esta relación fue obtenida haciendo una regla de tres tomando la relación hembras / superficie fijada para los otros tres frutos como referencia.

7.3.2.2. Experimento 2. Calidad de hospedadores criados sobre distintas especies frutales. En este experimento se analizó si las larvas provenientes de las distintas especies frutales poseen distinta calidad como sustrato de cría de para *D. longicaudata*. Para esto, un parasitoide

hembra y un parasitoide macho provenientes de larvas que fueron criadas en distintos frutos (como parte del experimento 1) fueron colocadas dentro de un frasco de vidrio de 500 ml y provistos de agua y miel (Figura 7.2). Estos frascos fueron mantenidos bajo condiciones controladas a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura y $60\pm 10\%$ de humedad. La miel y el agua fueron renovadas todas las semanas. Diariamente, se revisaron todas las parejas y se registró la existencia de individuos muertos. Cada vez que se detectó un macho muerto en un frasco que todavía tenía una hembra, se reemplazó el macho muerto por uno nuevo, para asegurar a la hembra un acceso ininterrumpido a machos. A los 7 días de emergida, y cada 48-72 horas, se les expuso a las hembras larvas de *C. capitata* de tercer estadio temprano en unidades de oviposición pequeñas (recipientes cilíndricos de 25mm de diámetro y 7 mm de profundidad, llenos de dieta larvaria de *C. capitata* y envueltos en voile). En total, para cada hembra se realizaron nueve exposiciones espaciadas en un periodo de 3 semanas. Así las hembras tuvieron acceso a hospedadores durante su periodo de mayor fecundidad (según Viscarret et al. 2006). Para cada especie frutal se analizó la supervivencia y fecundidad de 40 parejas (excepto para el higo que contó con 36 réplicas). Las unidades de oviposición (UOs) fueron colocadas dentro de los frascos que contenían a las parejas y dejadas allí por 6 horas (Figura 7.2). A continuación las UOs fueron retiradas y las larvas fueron transferidas a un recipiente rectangular (5cmx2,5cm, y 3,5 cm de profundidad) que contenía una capa de dieta fresca.

Estos recipientes fueron colocados dentro de un frasco de vidrio de 500ml con vermiculita en su interior. Los frascos fueron colocados dentro de una sala con condiciones controladas (T: $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, Hr: $70\pm 10\%$). Diariamente el material fue rociado con agua de manera de mantener buena humedad dentro de la vermiculita. Una vez que las larvas dejaban la dieta y empupaban, eran separadas de la vermiculita, contadas y transferidas a un nuevo frasco con base de vermiculita (Figura 7.2). Estos frascos fueron colocados nuevamente bajo condiciones controladas como las descritas anteriormente. Una vez que todos los parasitoides habían emergido se contabilizó, para cada frasco, el número de moscas, de parasitoides (machos y hembras) y de pupas no emergidas. Estas, fueron mantuvieron separadas y posteriormente se disecaron para determinar si su contenido se correspondía a una mosca o un parasitoide.

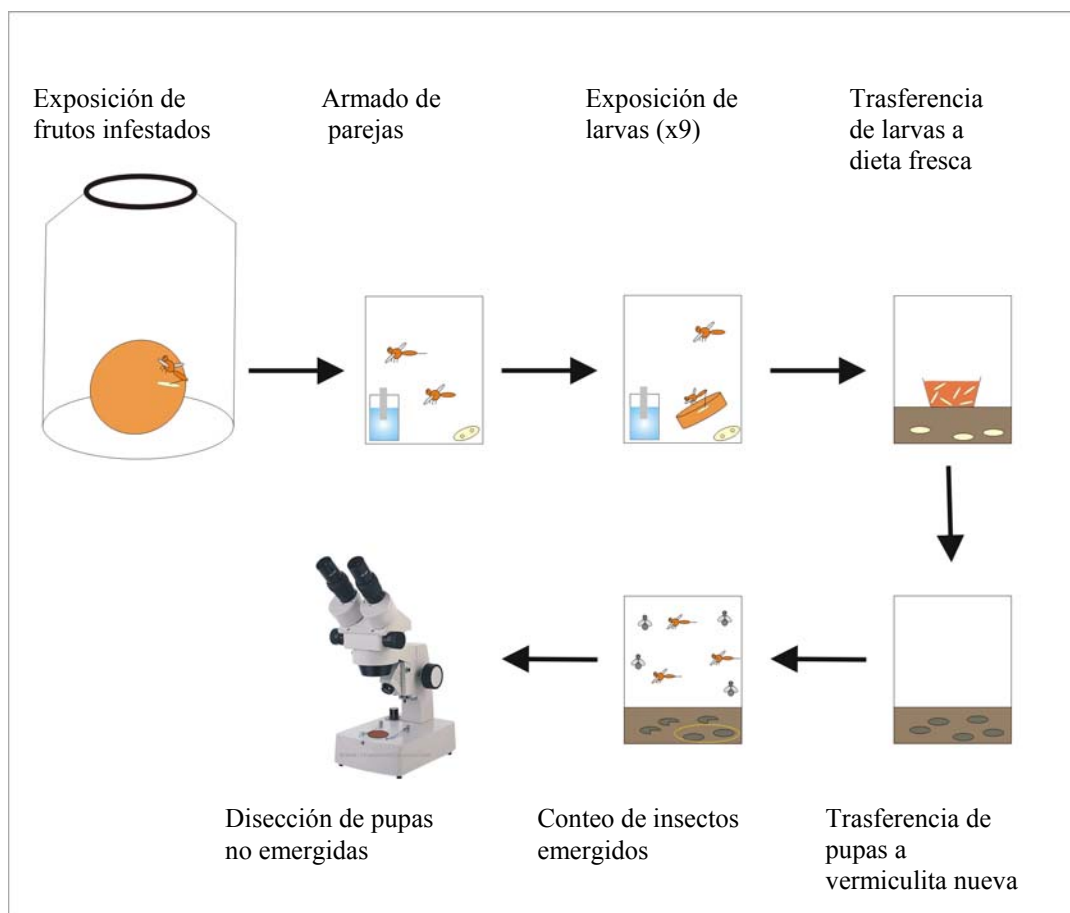


Figura 7.2. Esquema del experimento 2. Pasos seguidos desde el armado de las parejas hasta la disección de las pupas no emergidas.

7.3.3. Análisis de datos

7.3.3.1 *Experimento 1. Éxito durante el forrajeo sobre distintas especies frutales.* Para analizar si las hembras tuvieron más éxito durante el forrajeo en alguna de las especies frutales bajo estudio, se comparó el porcentaje de parasitismo ($\text{número de parasitoides recuperados} / (\text{número de moscas} + \text{número de parasitoides}) \times 100$) registrado en cada una de ellas. Los datos obtenidos del conteo de individuos emergidos fueron agrupados con aquellos provenientes de las disecciones de las pupas no emergidas. Los datos fueron analizados mediante una prueba de Kruskal Wallis comparando especies frutales, previa transformación de la proporción de pupas parasitadas al arcoseno de la raíz cuadrada. Los datos originales no cumplían el supuesto de homocedacia que hubiese permitido realizar un ANOVA de un factor. Ninguna transformación permitió eliminar la heterocedacia en los datos, pero la transformación al arcoseno de la raíz cuadrada mostró alejarse sólo levemente de la homocedasticidad. Teniendo en cuenta esto, y que la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis

es más robusta ante la falta de homocedacia que un ANOVA (Zar 1996), se utilizaron los datos transformados y se comparó entre especies mediante la prueba no paramétrica. A continuación se realizaron contrastes no paramétricos.

Para determinar si todas las especies frutales ofrecieron la misma probabilidad de encuentro de larvas, se analizó si el número de pupas recuperadas por unidad de superficie y por hembra difirió entre las especies frutales. Nuevamente, los datos no cumplieron el supuesto de homocedacia requerido para realizar un ANOVA por lo que se analizaron transformados al logaritmo natural, lo que permitió alcanzar la homocedasticidad. El ANOVA realizado fue de un factor donde el factor es la especie frutal. A continuación, se realizó una comparación múltiple utilizando la prueba de Tukey para muestras de distinto tamaño.

7.3.3.2. Experimento 2. Calidad de los hospedadores asociados a distintas especies frutales.

Para analizar posibles diferencias en la fecundidad de hembras criadas en larvas alimentadas en distintas especies frutales se comparó el porcentaje de parasitismo promedio registrado para cada hembra estudiada. Esta variable fue elegida en lugar del número de descendientes producidos por cada hembra porque no depende del número de larvas ofrecidas (como sí lo hace el número absoluto de descendientes) y debido al diseño utilizado fue imposible asegurar un número parejo de larvas en las distintas UOs. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas mediante un ANOVA de un factor, donde el factor fue la especie frutal. Este análisis fue seguido de contrastes de Tukey para muestras de distintos tamaño.

Se analizó también la existencia de diferencias en la tasa sexual de la progenie entre hembras criadas sobre los cuatro tipos de larva. La tasa sexual fue calculada como el número de descendientes hembra del total de descendientes producidos por hembra. Los valores para cada exposición fueron promediados por hembra (réplica) y las diferencias analizadas por medio de un ANOVA. Previamente los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la tasa sexual, puesto que no cumplían con el supuesto de homocedacia. Este análisis fue seguido de comparaciones múltiples mediante una prueba de Tukey para N desiguales.

Para analizar la existencia de diferencias en longevidad entre tratamientos, se realizó un análisis de supervivencia en el que se compararon las curvas del número de individuos

vivos desde la emergencia hasta que muriera el último insecto, entre las avispas emergidas de las distintas especies frutales (análisis de supervivencia para $k (>2)$ grupos). Esta prueba estadística es una extensión (o generalización) de la prueba de Wilcoxon generalizada de Gehan, la prueba de Peto y la prueba de Wilcoxon generalizada de Peto, y la prueba de *log-rank* (Statsoft Inc. 2000). Este método asigna un valor a cada tiempo de supervivencia (i.e., días vividos) usando el procedimiento de Mantel (Mantel, 1967), y luego calcula un valor de Chi cuadrado sobre la base de las sumas (para cada grupo) del valor asignado, que será el estadístico usado por esta prueba (Statsoft Inc. 2000). El análisis fue realizado para hembras y machos por separado debido a que en *D. longicaudata* existen diferencias en longevidad entre sexos (Viscarret et al. 2006).

Como una medida adicional de la calidad como sustrato de cría de las larvas obtenidas de distintas especies frutales, se analizó la existencia de diferencias en el peso pupal, entre pupas recuperadas de las cuatro especies frutales utilizadas en el presente estudio. Se intentó realizar un ANOVA, pero los datos no cumplieron con el supuesto de homocedasticidad. Se probaron varias transformaciones disponibles y en ningún caso se logro cumplir con este supuesto. Por lo tanto, se decidió calcular el promedio (y el error estándar) y los intervalos de confianza alrededor de este promedio, y analizar descriptivamente las diferencias observadas entre las especies frutales. Previamente, se comprobó para cada especie frutal que los datos se distribuyeran normalmente. Asimismo, se realizó un ANOVA de un factor eliminando a los datos provenientes del higo, pues eran estos datos los responsables de la falta de homocedacia.

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los programas Statistica for Windows (Statsoft Inc., 2000) y Statistix for Windows versión 7 (Analytical Software 2000).

7.4. Resultados

7.4.1. Experimento 1. Éxito durante el forrajeo sobre distintas especies frutales

Si bien el número de frutos expuestos a los parasitoides fue 120 para cada especie frutal, en ningún caso el número de réplicas finales fue este. En algunos casos (sobre todo en naranja) los frutos que parecían estar infestados (y por tanto fueron expuestos a los parasitoides) finalmente no lo estaban. También ocurrió que en varios frutos había larvas al momento de la exposición ante el parasitoide pero estas morían dentro del fruto antes de empupar (esto fue

común en manzana). En otros casos, una vez que los frutos fueron expuestos al parasitoide fueron atacados por hongos que afectaron la supervivencia de las larvas, y por esto fueron descartados del conjunto de replicas analizadas (como en el caso del higo).

Al analizar el porcentaje de parasitismo encontrado en cada especie frutal se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (prueba de Kruskal Wallis: $H = 58,28$; $p < 0,001$, Figura 7.3). Las comparaciones múltiples no paramétricas permitieron determinar que este resultado se debe a que el higo muestra un porcentaje de parasitismo significativamente superior al durazno y a la naranja (Higo: $25,92 \pm 4,65\%$; Durazno: $18,19 \pm 1,48$; Naranja: $11,28 \pm 1,69$). Higo y manzana no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de parasitismo (Manzana: $21,59 \pm 3,41$). Asimismo, manzana y durazno mostraron valores significativamente superiores a naranja, sin diferir entre ellos.

El análisis del número de larvas por unidad de superficie ofrecidas a cada hembra permitió detectar diferencias significativas entre las especies frutales (ANOVA: $F = 22,74$; $p < 0,001$, Figura 7.4). Al realizar las comparaciones múltiples se pudo ver que la manzana muestra valores significativamente menores al resto de los frutales (Número de pupas/superficie/hembra (ES): $0,014 \pm 0,002$), mientras que durazno, higo, y naranja no difieren entre sí (Número de pupas/superficie/hembra (ES): $0,075 \pm 0,008$; $0,059 \pm 0,012$; y $0,073 \pm 0,011$, respectivamente).

7.4.2. Experimento 2. Calidad de los hospedadores asociados a distintas especies frutales

El análisis del porcentaje de parasitismo asociado a cada tratamiento mostró que existen diferencias significativas entre las hembras criadas sobre larvas provenientes de distintas especies frutales (ANOVA: $F = 6,80$, $p < 0,001$). Los contrastes realizados a continuación de este análisis mostraron que estas diferencias se deben a un porcentaje de parasitismo mayor para la naranja, sin diferencias entre el resto de los frutos (Tabla 7.1).

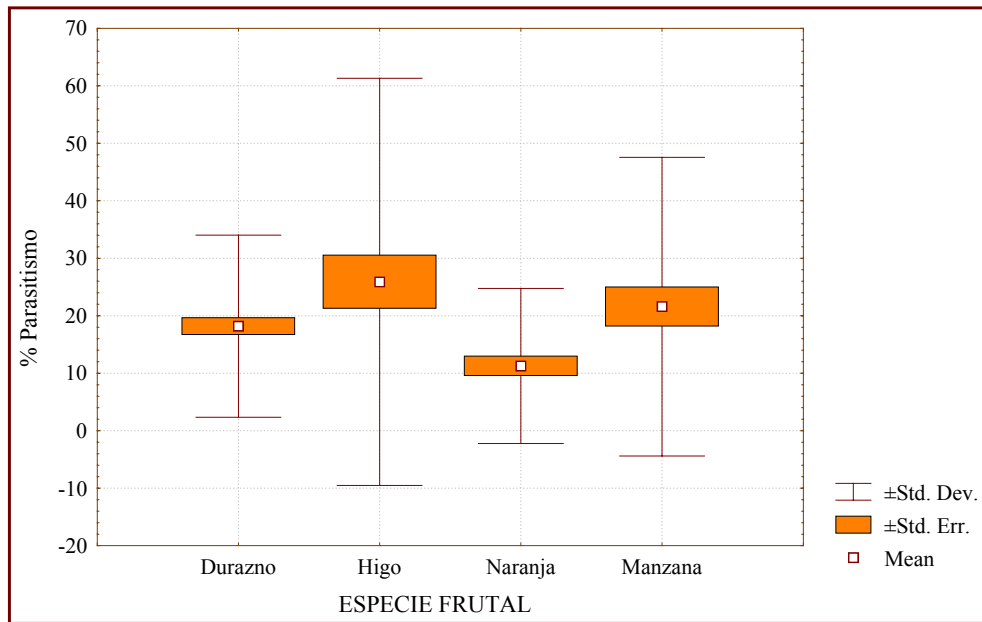


Figura 7.3. Porcentaje de parasitismo registrado en cada especie frutal. Los valores más altos se registraron en el higo y en la manzana, seguidos de durazno y luego naranja. Std. Dev.: desvío estándar, Std. Err.: error estándar, Mean: promedio.

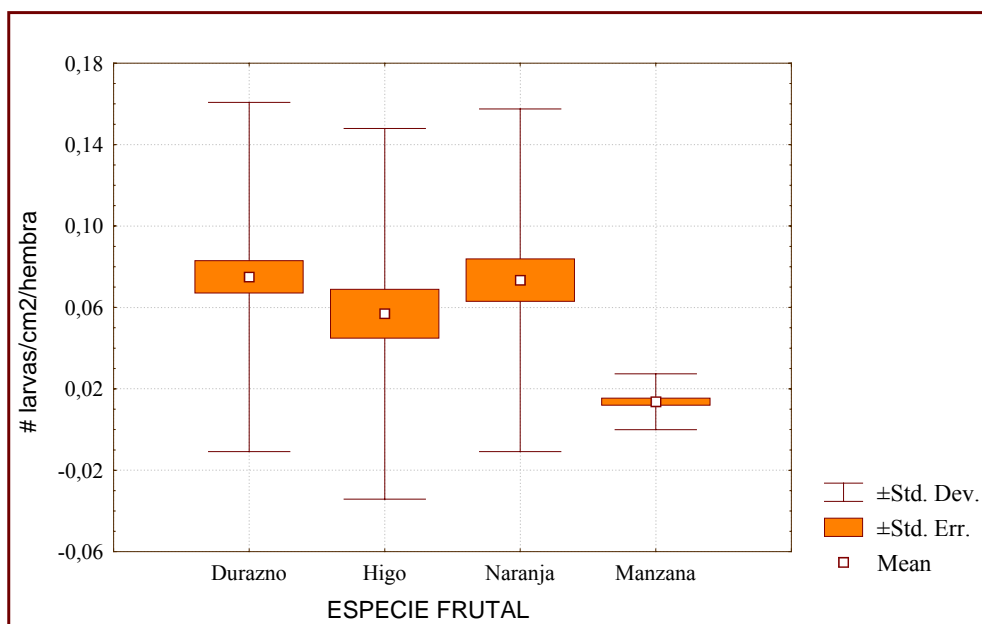


Figura 7.4. Número de larvas por cm² ofrecidas a cada hembra en cada tipo de fruto. Las disponibilidad de larvas fue semejante entre durazno, higo, y naranja, mostrando la manzana valores marcadamente menores. Std. Dev.: desvío estándar, Std. Err.: error estándar, Mean: promedio.

El análisis de la tasa sexual registrada para cada hembra mostró también diferencias significativas entre las especies frutales (ANOVA: $F = 9,51$, $p < 0,001$). Las comparaciones

múltiples realizadas a continuación mostraron que la tasa sexual de las hembras criadas sobre larvas provenientes de naranja fue significativamente más alta, sin mostrar diferencias entre los otros tres tipos de hospedadores (Tabla 7.1)

Especie frutal	Porcentaje de parasitismo (\pm ES)	Tasa sexual (\pm ES)
Durazno	14,18 \pm 0,90 %a	0,531 \pm 0,029a
Higo	15,89 \pm 1,23 %a	0,477 \pm 0,019a
Manzana	13,14 \pm 1,03 %a	0,500 \pm 0,026a
Naranja	19,41 \pm 1,11 %b	0,646 \pm 0,021b

Tabla 7.1. Análisis de la fecundidad asociada a distintas especies frutales. La tabla muestra el promedio del porcentaje de parasitismo y la tasa sexual y el resultado de los contrastes múltiples: dentro de cada columna los valores seguidos de la misma letra no difirieron estadísticamente ($\alpha = 0,05$). ES: error estándar.

El análisis de supervivencia mostró, tanto en el caso de las hembras como para los machos, que la cantidad de días vividos no difirió estadísticamente entre insectos de distintos tratamientos (Análisis de supervivencia para k (>2) grupos: $\chi^2 = 6,277$, g.l. = 3, $p = 0,422$). No obstante, en las curvas que muestran la proporción de individuos vivos desde la emergencia hasta la finalización del ensayo (Figura 7.5) se observa que en el caso de las hembras, aquellas que fueron criadas sobre larvas alimentadas en manzana tienen una supervivencia relativamente mayor al resto.

El peso pupal obtenido en cada especie frutal muestra que los valores promedio más altos se registraron en durazno y naranja, con un peso intermedio para las pupas obtenidas de higo, y valores más bajos para aquellas recuperadas de manzana (Tabla 7.2). Si bien las diferencias entre las cuatro especies frutales no pudieron ser analizadas estadísticamente, el ANOVA realizado excluyendo al higo mostró la existencia de diferencias significativas entre las otras tres especies (ANOVA: $F = 54,78$, $p < 0,001$). Al realizar los contrastes se encontró que este resultado se debía a diferencias entre la manzana, y el durazno y la naranja, sin detectar diferencias entre estos dos últimos hospedadores.

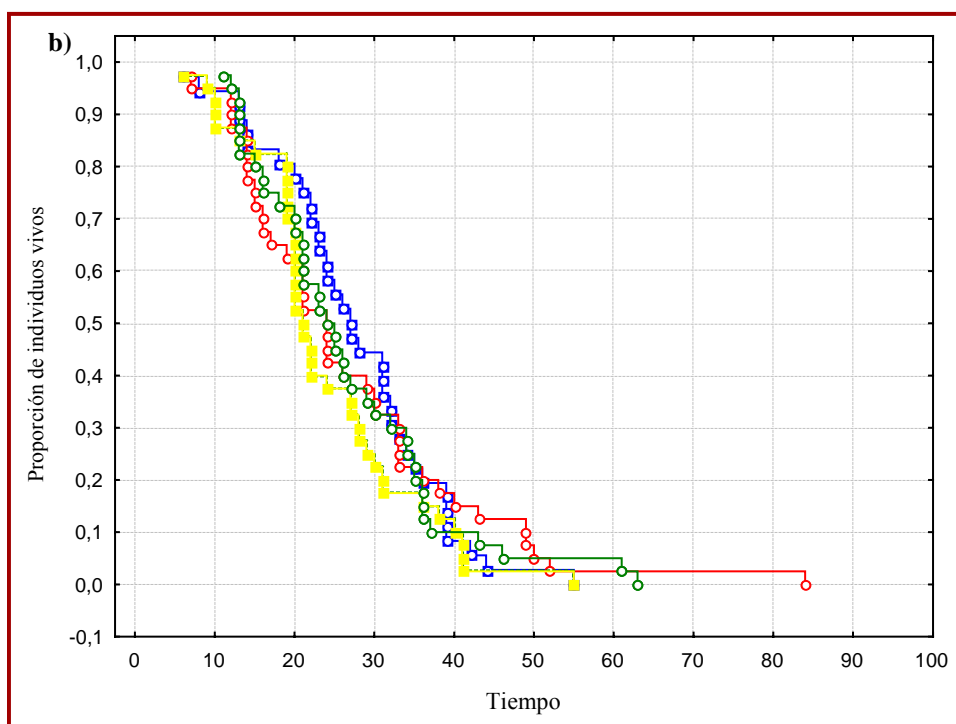
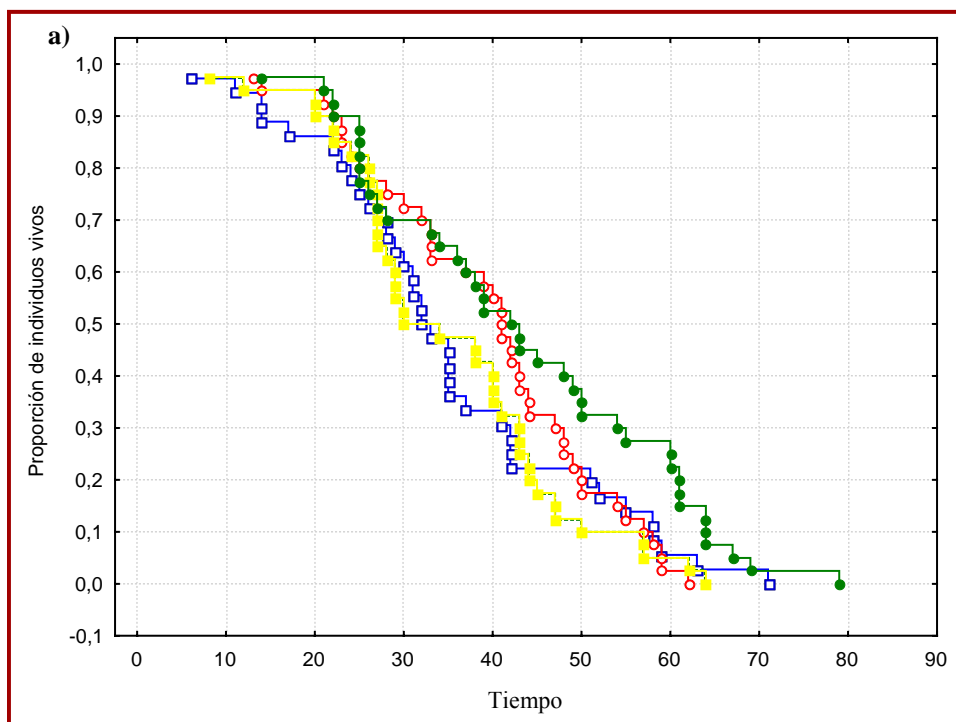


Figura 7.5. Curvas de supervivencia. La proporción de insectos vivos desde la emergencia hasta la finalización del ensayo se muestra para cada especie frutal. a) curvas de supervivencia para hembras, b) curva de supervivencia para machos. Referencias: ● manzana, ○ durazno, ■ naranja, □ higo.

Especie frutal	Peso pupal medio (ES)	IC
Durazno	9,34 ± 0,14	9,06-9,62
Higo	8,46 ± 0,36	7,74-9,19
Manzana	7,09 ± 0,17	6,74-7,43
Naranja	9,16 ± 0,15	8,86-9,45

Tabla 7.2. Peso de pupas obtenidas de distintos frutos. Para cada especie frutal se muestra el valor promedio del peso de las pupas (registrado en una balanza de alta precisión) así como los valores del intervalo de confianza al 95%. ES: error estándar, IC: intervalos de confianza.

7.5. Discusión

En el presente estudio se analizaron variables asociadas al éxito reproductivo de las hembras del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* al ofrecerles distintas especies frutales como sustrato de búsqueda de larvas hospedadoras. Se utilizaron las mismas cuatro especies frutales analizadas en el Capítulo 6, y se buscó establecer una relación entre el patrón de preferencia registrado en ese capítulo (higo > durazno > naranja > manzana) y el éxito reproductivo de las hembras al forrajear sobre cada una de estas especies frutales. En primer lugar, se estudió si el éxito en la búsqueda y parasitación de larvas mostraba diferencias cuando la especie frutal sobre la cual las hembras forrajearan cambiaba. El éxito en la búsqueda fue inferido a partir del porcentaje de parasitismo en cada especie frutal. Asimismo, se analizó si las larvas de *Ceratitis capitata* provenientes de distintas especies frutales representaban hospedadores de distinta calidad para el parasitoide. Para esto, se estimó la fecundidad y la tasa sexual en hembras emergidas de pupas que se alimentaron (en el estadio larval) de cada uno de los cuatro frutos bajo estudio. La supervivencia fue analizada tanto para machos como para hembras.

El patrón resultante conforma relativamente bien el patrón de preferencia registrado en el Capítulo 6, ya que el higo muestra ser el hospedador frutal con mayor tasa de encuentro / oviposición, el durazno muestra valores intermedios, y la naranja los valores más bajos (aunque entre estos dos últimos hospedadores frutales no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas). Aún cuando el porcentaje de parasitismo en manzana fue alto, al analizar el número de larvas por unidad de superficie ofrecido a cada hembra durante la exposición del fruto, se encontró que esta especie frutal ofrecía significativamente menos larvas a los parasitoides. Este hecho puede haber ocasionado un aumento en el porcentaje de

parasitismo que no estaría relacionado a que las larvas sean más fáciles de detectar y/o parasitar en la manzana, sino a que al haber menor cantidad se registre un incremento porcentual en el ataque. Tal vez, con tiempos de exposición más cortos que 6 horas el porcentaje de parasitismo en manzana hubiera sido más bajo en relación al encontrado en el resto de las especies frutales. Lo más razonable es, entonces, suponer que los valores observados en manzana son un artificio provocado por el diseño experimental.

Dentro de los estudios previos en que se analizó la preferencia del parasitoide *D. longicaudata* por diversas especies frutales, solo uno intentó asociar la preferencia encontrada con el rédito que tienen las hembras al forrajear sobre cada uno de los frutales ofrecidos en términos del porcentaje de parasitismo alcanzado (Leyva et al. 1991). Estos autores encontraron una marcada preferencia por frutos de pomelo y naranja sobre frutos de mango y durazno, pero esta preferencia no se vio respaldada por el porcentaje de parasitismo, ya que el pomelo fue el fruto con más bajo ataque de larvas, mientras que los otros tres frutales no difirieron entre sí. Los autores ven estos resultados como el subproducto del incremento en tamaño del fruto, puesto que los frutos de durazno, mango, y naranja tenían diámetros y porcentajes de parasitismo similares, mientras que el pomelo presentaba un diámetro significativamente mayor. En el presente estudio, el mayor porcentaje de parasitismo se registró en el fruto del menor diámetro pero a diferencia de Leyva et al. (1991) este fruto fue también el preferido por las hembras del parasitoide. Esto podría indicar que la preferencia por higo está relacionada a su tamaño, pero el hecho de que la estructura interna de los frutos (que condiciona fuertemente la posición de las larvas dentro del fruto) así como la estructura del epicarpio (que podría estar afectando la llegada de las vibraciones producidas por las larvas y utilizadas por las hembras del parasitoide, Lawrence 1981) sean distintas entre las cuatro especies frutales utilizadas hace difícil pensar que el tamaño sea el único factor que explica el porcentaje de parasitismo. Asimismo, estudios previos (Leyva et al. 1991, Sivinski 1991, Capítulo 3 de la presente tesis) señalan que las hembras de *D. longicaudata* sin experiencia previa prefieren frutos o modelos artificiales de mayor tamaño. Para entender cómo hacen las hembras del parasitoide para resolver esta aparente contradicción entre claves químicas y visuales, se deberían realizar experimentos que integren estos dos estímulos y analizar por ejemplo qué ocurre cuando un fruto que fue preferido dentro del olfatómetro se presenta junto a uno no preferido de mayor tamaño.

Al analizar la calidad de las larvas provenientes de distintas especies frutales como hospedadores para el parasitoide se observó que los parasitoides hembra criados sobre larvas alimentadas en naranja tuvieron una mayor fecundidad que el resto. Asimismo, estos parasitoides mostraron una tasa sexual significativamente mayor, mostrando un sesgo hacia la producción de descendientes hembra. Por su parte, la supervivencia de los parasitoides criados en las distintas especies frutales fue la misma, tanto para los machos como para las hembras. En un estudio similar, Eben et al. (2000) encontraron que las hembras de *D. longicaudata* criadas sobre larvas alimentadas de pomelo y naranja mostraron mayor fecundidad, mayor proporción de descendientes hembra, y mayor supervivencia, que hembras criadas en larvas alimentadas de mango, aún cuando las hembras *naïve* no mostraron preferencia entre pomelo y mango.

Aparentemente, los cítricos (al menos naranja y pomelo) serían hábitats que producen larvas de alta calidad en términos del éxito reproductivo de los descendientes, y esto sería relativamente independiente de la especie de moscas que se estudie, ya que Eben et al. (2000) utilizaron como hospedador larvas de *Anastrepha ludens*, mientras que en este estudio la especie fue *C. capitata*. No obstante, en ninguno de los estudios realizados se encuentra una marcada preferencia por estos frutos. Otros factores, como el porcentaje de parasitismo y la preferencia por especies frutales de las moscas adultas, quizás expliquen mejor la preferencia de los parasitoides por especies frutales. Además, de acuerdo con Rivero (2000) existen numerosas limitaciones asociadas a la medición certera del éxito reproductivo en laboratorio, y pequeñas diferencias en el éxito reproductivo pueden ser difíciles de detectar.

El tamaño del hospedador es uno de los estimadores de calidad del hospedador más ampliamente utilizado en la literatura (Rivero 2000). Para parasitoides que dejan sus huevos en hospedadores que continúan creciendo y desarrollándose luego de la parasitación, el tamaño del hospedero puede no ser una variable confiable de su calidad (Sequeira y Mackauer 1992), pero para parasitoides de estadios de desarrollo avanzado, como *D. longicaudata*, el tamaño del hospedador al momento del ataque es un buen indicador del recurso alimenticio que tendrá a disposición su progenie. Si se considerara al peso pupal como el indicador más preciso de la calidad de las larvas, se podría proponer que la baja atracción de *D. longicaudata* hacia frutos de manzana se debe a la baja calidad de las larvas allí desarrolladas, puesto que la manzana mostró los valores más bajos de peso pupal. No obstante, el peso pupal

por sí solo no alcanzaría para explicar los patrones de preferencia entre los otros tres hospedadores frutales incluidos en el presente estudio.

Varios estudios analizaron la relación entre la elección de los parasitoides hembras y la calidad de los hospedadores, mostrando en la mayoría que las hembras eligen los hospedadores en los cuales su éxito reproductivo potencial es mayor (Rolff y Kraaijeveld 2001, Mohamed et al. 2003, Luhring et al. 2004). No obstante, la atracción de los parasitoides hacia diversas plantas hospedadoras y su relación con la calidad de los hospedadores que en ellas se encuentran ha sido prácticamente ignorada, incluso cuando existen numerosos estudios que reconocen la participación del hábitat del hospedador (plantas, hongos, etc.) en el proceso de búsqueda de hospedadores. En el presente trabajo se estudió la relación el éxito reproductivo asociado a cuatro posibles hábitats de los hospedadores del parasitoide *D. longicaudata*. Se encontró que el patrón de preferencia del parasitoide por estas cuatro especies frutales puede ser explicado sólo parcialmente por el éxito en la búsqueda y/o parasitación que las hembras experimentan sobre estos frutales, pero no se encontró ninguna asociación entre preferencia y la calidad de los hospedadores cuando esta se evalúa a través del éxito reproductivo de los descendientes.

8. Conclusiones Generales

En el presente estudio, se analizó el comportamiento de las hembras del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* ante estímulos, de naturaleza tanto química como física, asociados al proceso de búsqueda de hospedadores. Estos estímulos corresponden a señales asociadas al hospedador de este parasitoide, larvas del tercer estadio de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), que participan principalmente en la orientación de las hembras hacia el hábitat del hospedador (un fruto infestado por larvas), y en menor grado, al encuentro del hospedador una vez localizado su hábitat. La respuesta del parasitoide fue estudiada en hembras sin experiencia previa (*naïve*), y los patrones encontrados fueron luego comparados con el comportamiento exhibido por hembras que tuvieron experiencia previa de forrajeo. Algunos de los patrones comportamentales encontrados se analizaron en relación con el éxito reproductivo asociado a la elección de las hembras. Los estudios fueron realizados utilizando hembras del parasitoide de la cepa Cast191, que son criadas sobre una cepa sexante de *C. capitata* en el Laboratorio de Insectos, del IGEEAF (INTA Castelar). Esta cepa está siendo evaluada para ser utilizada en programas de control de moscas de la fruta. Como parte de su evaluación como controlador biológico, se utilizaron los patrones comportamentales estudiados en el presente trabajo, comparándolos con los registrados para una segunda cepa (MI94), que difiere en la cepa de hospedadores utilizada en la cría y que fue utilizada como cepa de referencia.

Las principales conclusiones de la presente tesis son:

- I.** Las hembras de este parasitoide muestran un patrón innato de preferencia por modelos de mayor tamaño, pero su color y su forma no parecen ser importantes para hembras sin experiencia.

- II.** La experiencia previa de las hembras sobre sustratos de oviposición de un determinado color, induce en las hembras una marcada preferencia por ese color. Esto no ocurrió con sustratos de distintas formas.

- III.** La respuesta de las hembras luego de un periodo de experiencia previa parece deberse a un mecanismo de aprendizaje asociativo, en el cual las hembras asocian la tonalidad (y no la luminosidad) de los colores, con la presencia de larvas hospedadoras.

- IV.** El color y el tamaño de los modelos tienen un efecto equivalente sobre la preferencia de las hembras del parasitoide, sin mostrar entre sí una relación jerárquica en importancia.

- V.** El aprendizaje sería un proceso dinámico que depende del número de eventos y del tiempo desde el último evento de forrajeo exitoso sobre un sustrato de un determinado color. La ventaja que confiere el aprendizaje en términos del éxito reproductivo de las hembras fue claramente evidenciada.

- VI.** Los parasitoides hembra utilizan, durante la búsqueda del hábitat del hospedador, claves químicas que parecen provenir tanto de las larvas hospedadoras (al menos en forma indirecta) como del hábitat donde estas se encuentran. Esto parece ser independiente de la especie frutal utilizada como hospedadora por la mosca.

- VII.** La presencia de larvas, de compuestos químicos asociados a su actividad, y de perforaciones en los frutos generan un aumento en la actividad de sondeo con el ovipositor por parte de los parasitoides hembra, mostrando la importancia de estos componentes en la búsqueda del hospedador una vez localizado su hábitat.

- VIII.** Las hembras naïve de *D. longicaudata* mostraron un claro patrón de preferencia por estímulos químicos provenientes de distintos hábitats del hospedador. De las cuatro especies ofrecidas, los parasitoides prefirieron visitar en primer lugar al higo, en segundo al durazno, en tercero a la naranja, y nunca eligieron a la manzana por sobre las otras especies frutales.

- IX.** Las hembras del parasitoide pueden detectar olfativamente frutos con distintos niveles de infestación de larvas hospedadoras, y utilizar esta información para

orientarse hacia los frutos más infestados. Este factor interactúa con la preferencia de las hembras por especies frutales en el momento de decidir qué fruto visitar.

- X.** La preferencia registrada en hembras *naïve* pudo ser modificada luego de un periodo de experiencia previa en el que las hembras encontraron larvas del hospedador asociado a una de las especies frutales. Así como ocurre con el color del sustrato, probablemente las hembras establezcan una asociación entre el olor de una especie frutal y la presencia de las larvas, y utilicen esa información en sucesivos eventos de forrajeo.

- XI.** La preferencia de las hembras *naïve* por distintas especies frutales está relacionada solo parcialmente con el éxito reproductivo (en términos de la proporción de larvas atacadas) que las hembras obtienen al forrajear en cada especie frutal. La calidad de los hospedadores que se desarrollan sobre cada una de las especies frutales estudiadas tampoco mantiene relación con el patrón de preferencia encontrado en hembras sin experiencia.

- XII.** Las diferencias en el método y sustrato de cría que existen entre las cepas Cast191 y MI94 no producen diferencias importantes en el comportamiento de forrajeo de los parasitoides hembra, al menos en los patrones de comportamiento evaluados en el presente estudio.

9. Referencias Bibliográficas

Aguiar-Menezes, E. L. y Menezes, E. B. 1997. Natural occurrence of parasitoids of *Anastrepha* spp. Schiner (Diptera: Tephritidae) in different host plants, in Itaguai (RJ), Brasil. *Biological Control*, 8, 1-6.

van Alphen, J. J. M. y Vet, L. E. M. 1986. An evolutionary approach to host finding and selection. En: *Insect Parasitoids* (J. K. Waage y D. Greathead, eds.), pp. 23-61. London: Academic Press.

van Alphen, J. J. M., Nordlander, G. y Eijs, I. 1991. Host habitat finding and host selection of the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina australis* (Hymenoptera, Eucoilidae), with a comparison of the niches of European *Leptopilina* species. *Oecologia*, 87, 324-329.

van Alphen, J. J. M. y Jervis, M. A. 1996. Foraging behavior. En: *Insect Natural Enemies* (M. A. Jervis y N. A. C. Kidd, eds.), pp. 1-62. London: Chapman & Hall.

Aluja, M., Rull, J., Sivinski, J., Norrbom, A. L., Wharton, R. A., Macías-Ordóñez, R., Díaz-Fleischer, F. y López, M. 2003. Fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) and associated native parasitoids (Hymenoptera) in the tropical rainforest biosphere reserve of Montes Azules, Chiapas, México. *Environmental Entomology*, 32, 1377-1385.

Alvarado, L. J. y Ritacco, M. 1991. Programa Nacional de Manejo de moscas de los frutos (Diptera: Tephritidae). INTA- CNEA.

Analytical Software. 2000. STATISTIX for Windows (Computer program manual). Tallahassee, FL.

Askew, R. R. y Shaw, M. R. 1986. Parasitoid communities: their size, structure and development. En: *Insect Parasitoids* (J. Waage y D. Greathead, eds.), pp. 225-264. London: Academic Press.

Baker, M. B. 2005. Experience influences settling behaviour in desert isopods, *Hemilepistus reaumuri*. *Animal Behaviour*, 69, 1131-1138.

- Bautista, R. C. y Harris, E. J.** 1997. Effect of insectary rearing on host preference and oviposition behaviour of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83, 213-218.
- Blassiolo Moraes, M. C., Laumann, R., Sujii, E. R., Pires, C. y Borges, M.** 2005. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115, 227-237.
- Brown, P. E., Frank, C. P., Groves, H. L. y Anderson, M.** 1998. Spectral sensitivity and visual conditioning in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae* (Hymenoptera: Cynipidae). *Bulletin of Entomological Research*, 88, 239-245.
- Camors, F. B. y Payne, T. L.** 1972. Response of *Heydenia unica* to *Dendroctonus frontalis* pheromones and a host-tree terpene. *Annals of the Entomological Society of America*, 65, 31-33.
- Cancino Díaz, J. L. y Yoc, M. O.** 1993. Methods proposed to apply quality control in the mass rearing of *Diachasmimorpha longicaudata*. Proceedings of the 7th workshop of the global IOBC working group "Quality control of mass reared arthropods" Rimini (I), pp. 37-47.
- Carrasco, M., Montoya, P., Cruz-López, L. y Rojas, J. C.** 2005. Responses of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to mango fruit volatiles. *Environmental Entomology*, 34, 576-583.
- Carrejo, N. S. y González, R.** 1999. Parasitoids reared from species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in Valle de Cauca, Colombia. *Florida Entomologist*, 82, 113-118.
- Cladera, J. L.** 1995. Self sexing strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on a gene that affects the rate of development. *Annals of the Entomological Society of America*, 88, 353-356.
- Clark, C. W. y Mangel, M.** 2000. Dynamic state variable models in ecology: methods and applications. 304 pp. New York: Oxford University Press.
- Colazza, S., Salerno, G. y Wajnberg, E.** 1999. Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg

parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biological Control*, 16, 310-317.

Conti, E., Salerno, G., Bin, F. y Vinson, S. B. 2004. The role of host semiochemicals in parasitoid specificity: a case study with *Trissolcus brochymenae* and *Trissolcus simoni* on pentatomid bugs. *Biological Control*, 29, 435-444.

Conti, E., Salerno, G., Bin, F., Williams, H. J. y Vinson, S. B. 2003. Chemical cues from *Murgantia histrionica* eliciting host location and recognition in the egg parasitoid *Trissolcus brochymenae*. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 115-130.

Cornelius, M. L., Duan, J. J. y Messing, R. H. 1999. Visual stimuli and the response of female oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) to fruit-mimicking traps. *Journal of Economic Entomology*, 92, 121-129.

Cortesero, A. M. y Monge, J. P. 1994. Influence of pre-emergence experience on response to host and host plant odours in the larval parasitoid *Eupelmus vuilleti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 72, 281-288.

Cunningham, J. P., Moore, C. J., Zalucki, M. P. y West, S. A. 2004. Learning, odour preference and flower foraging in moths. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 87-94.

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

Chinajariyawong, A., Clarke, A. R., Jirasurat, M., Kritsaneepiboon, S., Lahey, H. A., Vijaysegaran, S. y Walter, G. H. 2000. Survey of opiine parasitoids of fruit flies in Thailand and Malaysia. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 48, 71-101.

Chittka, L., y Menzel, R. 1992. The evolutionary adaptation of flower colours and the insect pollinators' colour vision. *Journal of Comparative Physiology A*, 171, 171-181.

Christenson, L. D. y Foote, R. 1959. Biology of Fruit Flies. *Annual Reviews of Entomology*, 5, 171-192.

Dalesman, S., Rundle, S., Coleman, R. A. y Cotton, P. A. 2006. Cue association and antipredator behaviour in a pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Animal Behaviour*, 71, 789-797.

- Davis, J. M. y Stamps, J. A.** 2004. The effect of natal experience on habitat preferences. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 411-416.
- de Jong, R. y Kaiser, L.** 1991. Odor learning by *Leptopilina boulardi*, a specialist parasitoid (Hymenoptera: Eucoilidae). *Journal of Insect Behavior*, 4, 743-750.
- de Moraes, C. M., Lewis, W. J., Pare, P. W., Alborn, H. T. y Tumlinson, J. H.** 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393, 570-573.
- Driessen, G., Hemerik, L. y Boonstra, B.** 1991. Host selection behaviour of the parasitoid *Leptopilina clavipes*, in relation to survival in hosts. *Netherlands Journal of Zoology*, 41, 99-111.
- Duan, J. J. y Messing, R. H.** 2000. Effects of host substrate and vibration cues on ovipositor-probing behavior in two larval parasitoids of tephritid fruit flies. *Journal of Insect Behavior*, 13, 175-186.
- Dukas, R. y Duan, J. J.** 2000. Potential fitness consequences of associative learning in a parasitoid wasp. *Behavioral Ecology*, 11, 536-543.
- Eben, A., Benrey, B., Sivinski, J. y Aluja, M.** 2000. Host species and host plant effects on preference and performance of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*, 29, 87-94.
- Fernández-Arhex, V. C., Capurro, A. y Corley, J. C.** 2001. La respuesta funcional de parasitoides y su éxito en control biológico de plagas: ¿un cuento de hadas?. Libro de resúmenes de la I Reunión Binacional de Ecología 2001, pg. 103.
- Fischer, S., Samietz, J., Wäckers, F. L. y Dorn, S.** 2001. Interaction of vibrational and visual cues in parasitoid host location. *Journal of Comparative Physiology A*, 187, 785-791.
- Fischer, S., Samietz, J., Wäckers, F. L. y Dorn, S.** 2003. Perception of achromatic cues during host location of a pupal parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 106, 63-66.
- Geervliet, J. B. F., Vreugdenhil, A. I., Dicke, M. y Vet E. M.** 1998. Learning to discriminate between infochemicals from different plant-host complexes by the

parasitoids *Cotesia glomerata* and *C. rubecula*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86, 241-252.

Giurfa, M., Eichmann, B. y Menzel, R. 1996. Symmetry perception in an insect. *Nature*, 382, 458-461.

Glenister, C. S. y Hoffmann, M. P. 1998. Mass-reared natural enemies: scientific, technological, and informational needs and considerations. En: *Mass Reared Natural Enemies: Application, Regulation, and Need*. (R. L. Ridgway, M. P. Hoffmann, M. N. Inscoe y C. S. Glenister, eds.), pp. 242-267. Proceedings: Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America. Lanham, MD.

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

Greany, P. D., Ashley, T. S., Baranowski, R. M. y Chambers, D. L. 1976. Rearing and life history studies on *Biosteres (Opius) longicaudatus* (Hym.: Braconidae). *Entomophaga*, 21, 207-215.

Greany, P. D., Tumlinson, J. H., Chambers, D. L. y Boush, G. M. 1977. Chemically mediated host finding by *Biosteres (Opius) longicaudatus*, a parasitoid of tephritid fruit fly larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 3, 189-195.

Gu, H. y Dorn, S. 2000. Genetic variation in behavioral response to herbivore-infested plants in the parasitic wasp, *Cotesia glomerata* (L.) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behaviour*, 13, 141-156.

Hassell, M. P. 1978. The dynamics of arthropod predator-prey systems. Monographs in Population Biology, 13. 473 pp. Princeton: Princeton University press.

Hendry, L. B., Greany, P. D. y Gill, R. J. 1973. Kairomone mediated host finding behavior in the parasitic wasp *Orgilus lepidus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 16, 471-477.

Henneman, M. L. 1998. Maximization of host encounters by parasitoids foraging in the field: females can use a simple rule. *Oecologia*, 116, 467-474.

- Henneman, M. L., Dyreson, E. G., Takabayashi, J. y Raguso, R. A.** 2002. Response to walnut olfactory and visual cues by the parasitic wasp, *Diachasmimorpha juglandis*. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 2221-2244.
- Hernández-Ortiz, V., Perez-Alonso, R. y Wharton, R. A.** 1994. Native parasitoids associated with the genus *Anastrepha* (Dip.: Tephritidae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Entomophaga*, 39, 171-178.
- van Hezewijk, B. H., Bouchier, R. S. y Smith, S. M.** 2000. Searching speed of *Trichogramma minutum* and its potential as a measure of parasitoid quality. *Biological Control*, 17, 139-146.
- Hochberg, M. E., e Ives, A. R.** 2000. *Parasitoid Population Biology*. 1st edn. 366 pp. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Hoffmeister, T. S. y Gienapp, P.** 1999. Exploitation of the host's chemical communication in a parasitoid searching for concealing host larvae. *Ethology*, 105, 223-232.
- Hoffmeister, T. S., Lachlan, R. F. y Roitberg, B. D.** 1999. Do larger fruits provide a partial refuge for rose-hipec flies against parasitoids? *Journal of Insect Behaviour*, 12, 451-460.
- Horridge, G. A.** 1999. Pattern discrimination by the honeybee (*Apis mellifera*): training on two pairs of patterns alternately. *Journal of Insect Physiology*, 45, 349-355.
- Iizuka, T. y Takasu, K.** 1998. Olfactory associative learning of the pupal parasitoid *Pimpla luctuosa* Smith (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Behavior*, 11, 743-760.
- Jacob, H. S. y Evans, E. W.** 2000. Influence of experience on the response of *Bathyplectes curculionis* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a nonaphidophagous parasitoid, to aphid odor. *Biological Control*, 19, 237-244.
- Jang, E. B., Messing, R. H., Klungness, L. M. y Carvalho, L. A.** 2000. Flight tunnel response of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) to olfactory and visual stimuli. *Journal of Insect Behaviour*, 13, 525-538.

- Janssen, A., van Alphen, J. J. M., Sabelis, M. W. y Bakker, K.** 1995a. Odour-mediated avoidance of competition in *Drosophila* parasitoids: the ghost of competition. *Oikos*, 73, 356-366.
- Janssen, A., van Alphen, J. J. M., Sabelis, M. W. y Bakker, K.** 1995b. Specificity of odour-mediated avoidance of competition in *Drosophila* parasitoids. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 36, 229-235.
- Juliano, S. A.** 1982. Influence of host age on host acceptability and suitability for a species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) attacking aquatic Diptera. *Canadian Entomologist*, 114, 713-740.
- Kaiser, L., Pérez-Maluf, R., Sandoz, J. C. y Pham-Delégue, M. H.** 2003. Dynamics of odour learning in *Leptopilina boulardi*, a hymenopterous parasitoid. *Animal Behaviour*, 66, 1077-1084.
- Keasar, T., Ney-Nifle, M., Mantel, M. y Swezey, S.** 2001. Early oviposition experience affects patch residence time in a foraging parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98, 123-132.
- Kerguelen, V. y Cardé, R. T.** 1998. Flight toward a learned odor and factors inducing landing of female *Brachymeria intermedia* (Hymenoptera: Chalcididae), a parasitoid of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Insect Behavior*, 11, 221-234.
- Knipling, G. F.** 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48, 459-462.
- Koul, O. y Dhaliwal, G. S.** 2003. *Predators and Parasitoids*. 191pp. London y New York: Taylor and Francis Group.
- Law, E., Nuttley, W. M. y van der Kooy, D.** 2004. Contextual taste cues modulate olfactory learning in *C. elegans* by an occasion-setting mechanism. *Current Biology*, 14, 1303-1308.
- Lawrence, P. O.** 1981. Host vibration- a cue to host location by the parasite, *Biosteres longicaudatus*. *Oecologia* (Berl.), 48, 249-251.

- Lecomte, C. y Thibout, E.** 1993. Pre- and post-imaginal experience in a specialist parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hym.: Ichneumonidae). *BioControl*, 38, 175-184
- van Lenteren, J. C. y Steinberg, S. A.** 1991. A preliminary list of criteria for quality control of beneficial arthropods used commercially in greenhouse crops. Proceedings of the fifth workshop of the IOBC working group "Quality control of mass reared arthropods" pp. 195-199. Wageningen, Holanda.
- Lewis, W. J., Nordlund, D. Q., Gueldner, R. C., Teel, P. D. y Tumlinson, J. H.** 1982. Kairomones and their use for management of entomophagous insects: II. Mechanisms causing increase in rate of parasitization by *Trichogramma* spp. *Journal of Chemical Ecology*, 1, 349-360.
- Lewis, W. J. y Takasu, K.** 1990. Use of learned odours by a parasitic wasp in accordance with host and food needs. *Nature*, 348, 635-636.
- Lewis, W. J., Stapel, J. O., Cortesero, A. M. y Takasu, K.** 1998. Understanding how parasitoids balance food and host needs: Importance to biological control. *Biological Control*, 11, 175-183.
- Lewis, W. J., Vet, L. E. M., Tumlinson, J. H., van Lenteren, J. C. y Papaj, D. R.** 1990. Variation in parasitoid foraging behavior: Essential elements of a sound biological control theory. *Environmental Entomology*, 19, 1183-1193.
- Leyva, J. L., Browning, H. W. y Gilstrap, F. E.** 1991. Effect of host fruit species, size, and colour on parasitization of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*, 20, 1469-1474.
- Liu, S. S.** 1985. Development, adult size and fecundity of *Aphidus sonchi* reared in two instars of aphid host, *Hyperomyzus lactucae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 37, 41-48.
- Liu, S. S., Morton, R. y Hughes, R. D.** 1984. Oviposition preferences of a hymenopterous parasites for certain instars of its aphid host. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 35, 249-254.

- Lobdell, C. E., Tze-Hei, Y. y Hoffmann, M. P.** 2005. Host color preferences and short-range searching behaviour of the egg parasitoid *Trichogramma ostriniae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 116, 127-134.
- López, M., Aluja, M. y Sivinski, J.** 1999. Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biological Control*, 15, 119-129.
- Luck, R. F.** 1990. Evaluation of natural enemies for biological control: a behavioral approach. *Trends in Ecology and Evolution*, 5, 196-2.
- Luhring, K. A., Millar, J. G., Paine, T. D., Reed, D., Hanks L. M. y Christiansen, H.** 2004. Oviposition preferences and progeny development of the egg parasitoid *Avetianella longoi*: factors mediating replacement of one species by a congener in a shared habitat. *Biological Control*, 30, 382-391.
- Mahometa, M. J. y Domjan, M.** 2005. Classical conditioning increases reproductive success in Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Animal Behaviour*, 69, 983-989.
- Mainland, G. B., Hardy, D. E., Claney, D.W., Bess H. A. y Fullaway, D.T.** 1950. Notes on parasites of tephritid flies. *Proceedings of the Hawaii Society*, 14, 23-28.
- Malavasi, A., Rohwer, G. G. y Campbell, D. S.** 1994. Fruit Fly Free Areas: Strategies to develop them. En: *Fruit flies and the sterile insect technique* (C. O. Calkins, W. Klassen y P. Liedo, eds.), pp. 165-180. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Manso, F. C. y Lifschitz, E.** 1992. Nueva metodología genética para el mejoramiento de la eficiencia de la Técnica del Macho Estéril en el control de la mosca del Mediterráneo *Ceratitidis capitata*. *Ciencia e Investigación*, 44, 225-228.
- Mantel, N.** 1967. Ranking procedures for arbitrarily restricted observations. *Biometrics*, 23, 65-78.
- Mattiacci, L., Dicke, M. y Posthumus, M. A.** 1995. β -Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92, 2036-2040.
- Mattiacci, L., Dicke, M. y Posthumus, M. A.** 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in Brussels sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: Role of

mechanical damage and herbivore elicitor. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 2229-2247.

McGregor, R. y Henderson, D. 1998. The influence of oviposition experience on response to host pheromone in *Trichogramma sibericum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Insect Behavior*, 11, 621-632.

McInnis, D. O., Tam, S., Grace, C. y Myyashida, D. 1994. Population suppression and sterility rates induced by variable sex ratio, sterile insect releases of *Ceratitidis capitata* in Hawaii. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 231-240.

Menzel, R. 1993. Associative learning in honey bees. *Apidologie*, 24, 157-168.

Menzel, R. y Bitterman, M. E. 1983. Learning by honeybees in an unnatural situation. En: *Neuroethology and Behavioral Physiology* (F. Huber y H. Marka, eds.), pp. 206-215. New York: Springer Verlag.

Messing, R. H. y Jang, E. B. 1992. Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to host-fruit stimuli. *Environmental Entomology*, 21, 1189-1195.

Messing, R. H., Klungness, L. M. y Jang, E. B. 1997. Effects of wind on movement of *Diachasmimorpha longicaudata*, a parasitoid of tephritid fruit flies, in a laboratory wind tunnel. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82, 147-152.

Metcalf, R. L. y Luckmann, W. H. 1994. Introduction to Insect Pest Management. 3rd edn. 672pp. New York: Wiley.

Michaud, J. P. y Mackauer, M. 1994. The use of visual cues in host evaluation by aphidiid wasps I. Comparison between three *Aphidius* parasitoids of the pea aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 70, 273-283.

Mohamed, S. A., Overholt, W. A., Wharton, R. A., Lux, S. A. y Eltoum, E. M. 2003. Host specificity of *Psyttalia cosyrae* (Hymenoptera: Braconidae) and the effect of different host species on parasitoid fitness. *Biological Control*, 28, 155-163.

Montoya, P., Benrey, B., Barrera, J. F., Zenil, M., Ruiz, L. y Liedo, P. 2003. Oviposition behaviour and conspecific host discrimination in *Diachasmimorpha*

longicaudata (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid. *Biocontrol Science and Technology*, 13, 683-690.

Montoya, P., Liedo, P., Benrey, B., Barrera, J. F. y Zenil, M. 1999. Host discrimination by *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit fly. Libro de resúmenes del 3rd WGFFWH. Pg.:48.

Morehead, S. A. y Feener, D. H. 2000. Visual and chemical cues used in host location and acceptance by a dipteran parasitoid. *Journal of Insect Behavior*, 13, 613-625.

Moreno, D. S., Gregory, W. A. y Tanigoshi, L. K. 1984. Flight response of *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Scirtothrips citri* (Thysanoptera: Thripidae) to trap color, size, and shape. *Environmental Entomology*, 13, 935-940.

Morgante, J.S. 1991. Moscas-das-frutas (Tephritidae): características biológicas, detecção e controle. 19pp. (Boletim Técnico de Recomendações para os perímetros Irrigados do Vale do São Francisco, 2). Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, SENIR.

Mumm, R., Tiemann, T., Varama, M. y Hilker, M. 2005. Choosy egg parasitoids: Specificity of oviposition-induced pine volatiles exploited by an egg parasitoid of pine sawflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115, 217-225.

Niggerbrügge, C. y Hempel de Ibarra, N. 2003. Colour-dependent target detection by bees. *Journal of Comparative Physiology A*, 189, 915-918.

Nuttley, W. M., Atkinson-Leadbetter, K. P. y van der Kooy, D. 2002. Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 12449-12454.

Oatman, E. R., Platner, G. R. y Greany, P. D. 1969. The biology of *Orgilus lepidus* (Hymenoptera: Braconidae) a primary parasite of the potato tuberworm. *Annals of the Entomological Society of America*, 62, 1407-1414.

Oliai, S. E. y King, B. H. 2000. Associative learning in response to colour in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Insect Behavior*, 13, 55-69.

- Olson, D. M., Hodges, T. A. y Lewis, W. J.** 2003. Foraging efficacy of a larval parasitoid in a cotton patch: influence of chemical cues and learning. *Journal of Insect Behavior*, 16, 613-624.
- Olson, D. M., Lewis, W. J. y Takasu, K.** 2005. Interactive-web of factors governing effective natural enemy foraging behaviour: overview of food resources as a critical component. Proceedings of the 2nd International Symposium on Biological control of Arthropods, Vol. 2 (M. S. Hoddle, compilador), USDA Forest Service, publication FHTET-2005-08, pp. 389-397. Davos, Switzerland.
- Olson, D. M. y Andow, D. A.** 2002. Inheritance of an oviposition behavior by an egg parasitoid. *Heredity*, 88, 437-443.
- Ovruski, S. M., Colin, C., Soria, A., Oroño, L. y Schliserman, P.** 2003. Introducción y establecimiento en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae, Opiinae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae, Dacinae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62, 49-59.
- Ovruski, S. M., Schliserman, P. y Aluja, M.** 2004. Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in Northwestern Argentina. *Biological Control*, 29, 43-57.
- Ovruski, S. M., Wharton, R. A., Schliserman, P. y Aluja, M.** 2005. Abundance of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) and its associated native parasitoids (Hymenoptera) in “feral” guavas growing in the endangered northernmost Yungas forest of Argentina with an update on the taxonomic status of opiine parasitoids previously reported in this country. *Environmental Entomology*, 34, 807-818.
- Papaj, D. R.** 1986. Conditioning of leaf-shape discrimination by chemical cues in the butterfly, *Battus philenor*. *Animal Behaviour*, 34, 1281-1288.
- Papaj, D. R. y Prokopy, R. J.** 1989. Ecological and evolutionary aspects of learning in phytophagous insects. *Annual Reviews of Entomology*, 34, 315-350.

- Papaj, D. R., Roitberg, B. D. y Opp, S. B.** 1989. Serial effects of host infestation on egg allocation by the Mediterranean fruit fly: a rule of thumb and its functional significance. *Journal of Animal Ecology*, 58, 955-970.
- Parmesan, C., Singer, M. C. y Harris, I.** 1995. Absence of adaptive learning from the oviposition foraging behaviour of a checkerspot butterfly. *Animal Behaviour*, 50, 161-175.
- Patt, J. M., Hamilton, G. C. y Lashomb, J. H.** 1999. Response of two parasitoid wasps to nectar odors as a function of experience. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90, 1-8.
- Peitsch, D., Fietz, A., Hertel, H., de Souza, J., Ventura, D. F. y Menzel, R.** 1992. The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A*, 170, 23-40.
- Pizarro, J. M., Manso, F. C. y Cladera, J. L.** 1997. New allele at a locus affecting developmental time in Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) and its potential use in genetic sexing at the egg stage. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 220-222.
- Poolman Simons, M. T. T., Suverkropp, B. P., Vet, L. E. M. y de Moed, G.** 1992. Comparison of learning in related generalist and specialist eucoilid parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 64, 117-124.
- Prokopy, R. J. y Webster, R. P.** 1978. Oviposition-detering pheromone in *Rhagoletis pomonella*: a kairomone for its parasitoid *Opius lectus*. *Journal of Chemical Ecology*, 4, 481-494.
- Purcell, M. F., Herr, J. C., Messing, R. H. y Wong, T. T. Y.** 1998. Interactions between augmentatively released *Diachasmimorpha longicaudata* and a complex of opiine parasitoids in a commercial guava orchard. *Biocontrol Science and Technology*, 8, 139-151.
- Putruele, M. T. G.** 1996. Hosts for *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* in the Northeastern province of Entre Ríos, Argentina. En: *Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management* (B. A. McPherson y G. J. Steck, eds.), pp. 343-345. Delray Beach, Florida: St. Lucie Press.

- Read, D. P., Feeny, P. P. y Root, R. B.** 1970. Habitat selection by the aphid parasite *Diaeretiella rapae* and its hyperparasitoid, *Charips brassicae*. *Canadian Entomologist*, 102, 1567-1578.
- Rice, R. E.** 1968. Observations on host selection by *Tomicobia tibialis* Ashmead (Hymenoptera: Pteromalidae). *Contribution of the Boyce Thompson Institute*, 24, 53-56.
- Rice, R. E.** 1969. Response of some predators and parasites of *Ips confusus* (Lec.) (Coleoptera: Scolytidae) to olfactory attractants. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 24, 189-194.
- Rivero, A.** 2000. The relationship between host selection behaviour and offspring fitness in a koinobiont parasitoid. *Ecological Entomology*, 25, 467-472.
- Roitberg, B. D., Mangel, M., Lalonde, R. G., Roitberg, C. A., van Alphen, J. J. M. y Vet, L. E. M.** 1992. Seasonal dynamic shifts in patch exploitation by parasitic wasps. *Behavioural Ecology*, 3, 156-165.
- Roitberg, B., Sircom, J., Roitberg, C. A., van Alphen, J. J. M y Mangel, M.** 1993. Life expectancy and reproduction. *Nature*, 364, 108.
- Rolff, J. y Kraaijeveld, A. R.** 2001. Host preference and survival in selected lines of a *Drosophila* parasitoid, *Asobara tabida*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 742-745.
- Rolstad, J., Loken, B. y Rolstad, E.** 2000. Habitat selection as a hierarchical spatial process: the green woodpecker at the northern edge of its distribution range. *Oecologia (Berl.)*, 124, 116-129.
- Rosen, D. y Huffaker, C. B.** 1983. An overview of desired attributes of effective biological control agents, with particular emphasis on mites. En: *Biological Control of pests by mites* (M. A. Hoy, G. L. Cunningham y L. Knutson, eds.), pp. 2-11 Berkeley: Univ. Calif. Div. Agric., Special Publ. 3304.
- Rostád, M., Dippel, C. y Hilker, M.** 1998. Infochemical influencing the host foraging behaviour of *Dahlbominus fuscipennis*, a pupal parasitoid of the European spruce sawfly (*Gilpinia hercyniae*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86, 221-227.

- Rotenberry, J. T., Zak, M., Simmons, L. W. y Hayes, C.** 1996. Phonotactic parasitoids and cricket song structure: An evaluation of an alternate hypotheses. *Evolutionary Ecology*, 10, 233-243.
- Royer, L. y Boivin, G.** 1999. Infochemicals mediating the foraging behaviour of *Aleochara bilineata* Gyllenhal adults: sources of attractants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90, 199-205.
- Rousse, P. y Quilici, S.** 2006. Host selection by the egg-pupal parasitoid *Fopius arisanus*. Proceedings of the VII International Symposium of Fruit Flies of Economic Importance. Salvador de Bahia, Brasil.
- Rutledge, C. E. y Wiedenmann, R. N.** 1999. Habitat preferences of three congeneric braconid parasitoids: implications for host-range testing in biological control. *Biological Control*, 16, 144-154.
- Salles, L. A. B.** 1995. Bioecologia e controle da mosca das frutas sul-americana. EMBRAPA-CRACT, Pelotas, RS. 58pp.
- Sato, M. y Takasu, K.** 2000. Food odor learning by both sexes of the pupal parasitoid *Pimpla alboannulatus* Uchida (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Behavior*, 13, 263-272
- Schaffner, U. y Müller, C.** 2001. Exploitation of the fecal shield of the lily leaf beetle, *Lilioceris lili* (Coleoptera: Chrysomelidae), by the Specialist Parasitoid *Lemophagus pulcher* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Behavior*, 14, 739-757.
- Segura, D. F., Vera, M. T., Cagnotti, C., Vaccaro, N., de Coll, O., Ovruski, S. M. y Cladera, J. L.** 2006. Relative abundance of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in diverse host species and localities of Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 70-83.
- Segura, D. F., Vera, M. T., y Cladera, J. L.** 2004. Dinámica de la infestación por estadios inmaduros de la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), en San Pedro, pcia. de Buenos Aires. *Ecología Austral*, 14, 3-17.
- Sequeira, R. y Mackauer, M.** 1992. Nutritional ecology of an insect host-parasitoid association: the pea-aphid *Aphidus ervi* system. *Ecology*, 73, 183-189.

- Shafir, S.** 1996. Colour discrimination of the wasp, *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae). *Biotropica*, 28, 243-251.
- Sirot, E, Ploye, H. y Bernstein, C.** 1997. State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behavioural Ecology*, 8, 226-232.
- Sivinski, J.** 1991. The influence of host fruit morphology on parasitization rates in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Entomophaga*, 36, 447-454.
- Sivinski, J. y Smittle, B.** 1996. Effects of gamma radiation on the development of the Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa*) and the subsequent development of its parasite *Diachasmimorpha longicaudata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 55, 295-297.
- Sivinski, J., Aluja, M. y Lopez, M.** 1997. The spatial and temporal distributions of parasitoids of Mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 604-618.
- Sivinski, J., Piñero, J. y Aluja, M.** 2000. The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control*, 18, 258-269.
- Sivinski, J., Vulinec, K. y Aluja, M.** 2001. Ovipositor length in a guild of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) attacking *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) in southern Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*, 94, 886-895.
- Solomon, M. E.** 1949. The natural control of animal population. *Journal of Animal Ecology*, 18, 1-35.
- Souissi, R.** 1999. The influence of the host plant of the Cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* the plant and host preferences of its parasitoid *Apoanagyrus lopezi*. *Biological Control*, 15, 64-70.
- Stach, S., Benard, J. y Giurfa, M.** 2004. Local-feature assembling in visual pattern recognition and generalization in honeybees. *Nature*, 429, 758-761.
- StatSoft, Inc.** 2000. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa OK, USA.

- Steidle, J. M. L.** 1998. Learning pays off: influence of experience on host finding and parasitism in *Lariophagus distinguendus*. *Ecological Entomology*, 23, 451-456.
- Stephens, D. W.** 1993. Learning and behavioral ecology: incomplete information and environmental predictability. En: *Insect learning: Ecological and evolutionary perspectives* (D. R. Papaj y A. C. Lewis, eds.), pp. 195-218. New York: Chapman y Hall.
- Stireman, J. O. III.** 2002. Learning in the generalist tachinid parasitoid *Exorista Mella Walker* (Diptera: Tachinidae). *Journal of Insect Behavior*, 15, 689-706.
- Stirling, D. G., Reale, D. y Roff, D. A.** 2002. Selection, structure and the heritability of behaviour. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 277-289.
- Sullivan, B. T., Pettersson, E.M., Seltmann, K. C. y Berisford, C. W.** 2000. Attraction of the bark beetle parasitoid *Roptrocercus xylophagorum* (Hymenoptera: Pteromalidae) to host-associated olfactory cues. *Environmental Entomology*, 29, 1138-1151.
- Takabayashi, J., Sato, Y., Horikoshi, M., Yamaoka, R., Yano, S., Ohsaki, N. y Dicke, M.** 1998. Plant effects on parasitoid foraging: differences between two tritrophic systems. *Biological Control*, 11, 97-103.
- Takasu, K. y Lewis, W. J.** 1996. The role of learning in adult food location by the larval parasitoid, *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behavior*, 9, 265-281.
- Takasu, K. y Lewis, W. J.** 1993. Host- and food-foraging of the parasitoid *Icroplitis croceipes*: learning and physiological state effects. *Biological Control*, 3, 70-74.
- Tentelier, C., Wajnberg, E. y Fauvergue, X.** 2005. Parasitoids use herbivore-induced information to adapt patch exploitation behaviour. *Ecological Entomology*, 30, 739-744.
- Turlings, T. C. J., Scheepmaker, J. W. A., Vet., L. E. M., Tumlinson, J. H. y Lewis, W. J.** 1990. How contact foraging experiences affect the preferences for host-related odors in the larval parasitoid *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16, 1577-1589.

- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., Heath, R. R., Proveaux, A. T. y Doolittle, R. E.** 1991a. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 2235-2251.
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H. y Lewis, W. J.** 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host seeking parasitic wasps. *Science*, 250, 1251-1253.
- Turlings, T. C. J., Wäckers, F. L., Vet, L. E. M, Lewis, W. J. y Tumlinson, J. H.** 1993. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. En: *Insect Learning*. (D. R. Papaj y A.C. Lewis, eds.), pp. 51-78. New York: Chapman y Hall.
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., Eller, F. J. y Lewis, W.J.** 1991b. Larval-damaged plants: source of volatiles synomones that guide the parasitoid *Cotesia marginiventris* to the microhabitat of its hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 58, 75-82.
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., Lewis, W. J. y Vet, L. E. M.** 1989. Beneficial arthropod behavior mediated by airborne semiochemicals. VII. Learning of host-related odors induced by a brief contact experience with host by-products in *Cotesia marginiventris* (Cresson), a generalist larval parasitoid. *Journal of Insect Behavior*, 2, 217-225.
- Vargas, R. I., Stark, J. D., Prokopy, R. J. y Green, T. A.** 1991. Response of oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) and associated parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) to different-colour spheres. *Journal of Economic Entomology*, 84, 1503-1507.
- Vet, L. E. M, Lewis, W. J., Papaj, D. R. y van Lenteren, J. C.** 1990. A variable response model for parasitoid foraging behavior. *Journal of Insect Behavior*, 3, 471-491.
- Vet, L. E. M. y Dicke, M.** 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Reviews of Entomology*, 37, 141-172.
- Vet, L. E. M. y Groenewold, A. W.** 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 3119-3135.

- Vet, L. E. M., de Jong, A. G., Franchi, E. y Papaj, D. R.** 1998. The effect of complete versus incomplete information on odour discrimination in a parasitic wasp. *Animal Behaviour*, 55, 1271-1279.
- Vet, L. E. M., Lewis, W. J. y Cardé, R. T.** 1995. Parasitoid foraging and learning. En: *Chemical Ecology of Insects 2* (R. T. Cardé y W. J. Bell, eds.), pp 65-101. New York: Chapman & Hall.
- Vijaysegaran, S.** 1984. The Occurrence of Oriental Fruit Fly on Starfruit in Serdang and the Status of its Parasitoids. *Journal of Plant Protection in the Tropics*, 1, 93-98.
- Vinson, S. B.** 1984. How parasitoids locate their hosts: a case of insect espionage. En: *Insect communication* (T. Lewis, ed.), pp. 325-348. London: Academic Press.
- Vinson, S. B.** 1985. The behavior of parasitoids. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol. 9* (F. A. Kerkut y L. I. Gilbert, eds.), pp. 417-469. New York: Pergamon Press.
- Vinson, S. B.** 1991. Chemical signals used by insect parasitoids. *Redia, Giornale di Zoologia*, 124, 15-42.
- Vinson, S. B.** 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control*, 11, 79-96.
- Vinson, S. B., Barfield, C. S. y Henson, R. D.** 1977. Oviposition behavior of *Bracon mellitor*, a parasitoid of the boll weevil (*Anthonomus grandis*). II. Associative learning. *Physiological Entomology*, 2, 157-164.
- Viscarret, M. M., La Rossa, R., Segura, D. F., Ovruski, S. M. y Cladera, J. L.** 2006. Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 36, 147-153.
- Waage, J. y Greathead, D.** 1986. *Insect Parasitoids*. Academic Press, London. 389pp.
- Wäckers, F. L.** 1994. The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in *Cotesia rubecula*. *Journal of Insect Physiology*, 40, 641-649.

- Wäckers, F. L. y Lewis, W. J.** 1994. Olfactory and visual learning and their combined influence on host site location by the parasitoid *Microplitis croceipes* (Cresson). *Biological Control*, 4, 105-112.
- Wäckers, F. L. y Lewis, W. J.** 1999. A comparison of colour-, shape- and pattern-learning by the hymenopteran parasitoid *Microplitis croceipes*. *Journal of Comparative Physiology A*, 184, 387-393.
- Wajnberg, E. y Colazza, S.** 1998. Genetic variability in the area searched by a parasitic wasp. Analysis from automatic video tracking of the walking path. *Journal of Insect Physiology*, 44, 437-444.
- Wardle, A. R.** 1990. Learning of host microhabitat colour by *Exeristes roborator* (F.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Animal Behaviour*, 39, 914-923.
- Wardle, A. R. y Borden, J. H.** 1989. Learning of an olfactory stimulus associated with a host microhabitat by *Exeristes roborator*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 52, 271-279.
- Wardle, A. R. y Borden, J. H.** 1990. Learning of host microhabitat form by *Exeristes roborator* (F.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Behavior*, 3, 251-263.
- Weiss, M. R. y Papaj, D. R.** 2003. Colour learning in two behavioural contexts: how much can a butterfly keep in mind?. *Animal Behaviour*, 65, 425-434.
- Wharton R. A. y Gilstrap F. E.** 1983. Key to and status of Opiinae Braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* S. L. (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 76, 721-742.
- White, I. M. y Elson-Harris, M. M.** 1992. Fruit Flies of Economic Significance; Their Identification and Bionomics. Wallingford: CAB International. 601pp.
- Whitfield, J. B.** 1998. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annual Reviews of Entomology*, 43, 129-151.
- Wong, T. T. Y., Ramadan, M. M., McInnis, D. O., Nishimoto, J. I. y Herr, J. C.** 1991. Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. *Biological Control*, 1, 2-7.

Wund, M. A. 2005. Learning and the development of habitat-specific bat echolocation. *Animal Behaviour*, 70, 441-450.

Zanen, P. O. y Cardé, R. T. 1991. Learning and the role of host-specific volatiles during in-flight host-finding in the specialist parasitoid *Microplitis croceipes*. *Royal Entomological Society of London*, 16, 381-389.

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