

Tesis Doctoral

Caracterización morfológica de las larvas y de los receptores olfativos del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y determinación del origen de las claves químicas en el hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae)

Groba, Hernán F.

2014-03-14

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

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

Cita tipo APA:

Groba, Hernán F.. (2014-03-14). Caracterización morfológica de las larvas y de los receptores olfativos del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y determinación del origen de las claves químicas en el hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Groba, Hernán F.. "Caracterización morfológica de las larvas y de los receptores olfativos del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y determinación del origen de las claves químicas en el hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-14.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Caracterización morfológica de las larvas y de los receptores olfativos del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y determinación del origen de las claves químicas en el hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae)

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

Hernán F. Groba

Director de Tesis: Dra. Marcela K. Castelo
Consejeros de estudios: Dra. Lilia S. Lauria de Cidre y Dr. Pablo E. Schilman
Lugar de trabajo: Grupo de Investigación en Ecofisiología de Parasitoides

Buenos Aires, Marzo 2014

RESUMEN

Caracterización morfológica de las larvas y de los receptores olfativos del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y determinación del origen de las claves químicas en el hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae)

Autor: Lic. Hernán F. Groba

Director: Dra. Marcela K. Castelo

En un ambiente complejo y heterogéneo, el éxito de los individuos y de su descendencia depende de la capacidad de localizar los recursos y las condiciones necesarias para su supervivencia. El encuentro de los recursos y la evaluación de las condiciones se logran a través de la percepción de estímulos o claves, y particularmente en los insectos, los estímulos químicos juegan un rol central en estos procesos. En los parasitoides, la búsqueda y localización de los hospedadores, los cuales constituyen el recurso fundamental en su vida, puede involucrar diferentes tipos de estímulos, pero en particular son las claves químicas volátiles las que están mayormente implicadas en este comportamiento. El moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* es un parasitoide solitario de larvas de coleópteros de la familia Scarabaeidae (gusanos blancos del suelo) y una plaga de la apicultura de la Región Pampeana Argentina. En estado adulto es depredador de insectos, en particular de abejas melíferas, y en estado larval parasita preferentemente a larvas de tercer estadio de *Cyclocephala signaticollis*. La localización del hospedador por *M. ruficauda* está compartida entre la hembra y la larva. En primer lugar, la hembra localiza el hábitat del hospedador y ovipone en sustratos altos maximizando la dispersión de su progenie por el viento. En una segunda fase, las larvas que llegan al suelo se entierran, mudan y buscan activamente a su hospedador por medio de claves químicas que se originan en el tubo digestivo del gusano blanco. Hasta el momento, existen algunos aspectos de este mecanismo de localización que se desconocen. Por tanto, en la presente Tesis se estudiaron aspectos asociados al comportamiento de localización del hospedador por parte de *M. ruficauda*, tales como las características morfológicas de las estructuras sensoriales de los adultos y las larvas, los aspectos fisiológicos y morfológicos de las larvas asociados al período de búsqueda, y el rol ecológico y origen de las claves químicas

producidas por los hospedadores. Se encontró que las antenas de los adultos de *M. ruficauda* están especializadas en la captura e intercepción de estímulos químicos volátiles, posiblemente involucrados en los comportamientos de apareamiento y oviposición. Las larvas de primer y segundo estadio del parasitoide poseen una clara diferencia morfológica en sus estructuras cefálicas, lo que podría estar vinculado al comportamiento diferencial observado entre estos estadios durante el proceso de búsqueda del hospedador. Además el estudio del tamaño corporal de las larvas de primer estadio que nacen a lo largo de la temporada reproductiva sugiere que habría una asignación diferencial de recursos energéticos por parte de las hembras, pero no se ha encontrado un patrón claro al respecto. Por último, se determinó que tanto las larvas de estadio II de *M. ruficauda* como las de estadio III de *C. signaticollis* se orientan positivamente hacia extractos de la cámara de fermentación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis*. Estos resultados sugieren que las larvas de *M. ruficauda* podrían estar explotando el sistema de comunicación química de su hospedador durante la búsqueda y localización. Se determinó indirectamente el origen de estas claves, observándose la presencia de microorganismos asociados al hospedador en esta región del tubo digestivo. Mediante experimentos comportamentales se demostró que los productos metabólicos de estos microorganismos serían las claves que orientan a las larvas del parasitoide durante la localización del hospedador. Sin embargo, no se determinó la función de estas sustancias químicas en las interacciones intraespecíficas de *C. signaticollis*. En conclusión, *M. ruficauda* presenta estructuras sensoriales especializadas vinculadas a la percepción de estímulos químicos volátiles, aspectos fisiológicos que permiten la sobrevivencia de las larvas hasta el encuentro con el hospedador, y el uso de claves altamente confiables y específicas durante la búsqueda, las cuales contribuyen a la eficiencia en la localización de recursos por larvas y hembras de *M. ruficauda*. Esta Tesis es una contribución al conocimiento de la historia de vida de *M. ruficauda* y un aporte al entendimiento de otras especies de parasitoides con características y estrategias de vida similares.

PALABRAS CLAVE: *Mallophora ruficauda*, Scarabaeidae, búsqueda del hospedador, sensilias, claves químicas.

ABSTRACT

Morphological characterization of larvae and olfactive receptors in the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) and determination of chemical cues origin in the host *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae)

Author: Lic. Hernán F. Groba

Supervisor: Dra. Marcela K. Castelo

Individuals and their offspring success depend on their ability to locate the resources and optimal conditions required for survival in a complex and heterogeneous environment. The finding of resources and evaluation of these conditions is given through stimuli or cues. In most animals, especially insects, chemical cues play a central role in the location of resources. Parasitoid's hosts are a fundamental resource on parasitoid life history, as without those parasitoids are not able to develop its life cycle. Host-seeking behaviour may include different types of cues or stimuli but particularly volatile chemicals are mainly involved. The robber fly *Mallophora ruficauda* is a solitary ectoparasitoid of scarab beetle larvae (white grubs) and a major pest of beekeeping in the Pampas Region of Argentina. Adults are predators of flying insects, especially honeybees, and larvae parasitized mainly third instar larvae of *Cyclocephala signaticollis*. *Mallophora ruficauda* have a split host location strategy between female and larva. First, female locates the host habitat and lay eggs in clusters on elevated available sites increasing larval dispersal and hence encounter success with larval hosts. Second, once in the ground, larva starts to dig and actively seeks for its host detecting chemical cues arisen from white grub's digestive tube. So far, some characteristics of host finding mechanism are still unknown. Therefore, in this Thesis some features associated to *M. ruficauda* host searching behaviour, such as morphological characteristics of sensory structures of adults and larvae, larvae morphological and physiological aspects associated to searching process, and ecological role and origin of chemical cues produced by hosts were studied. Antennae of *M. ruficauda* adults are specialized for interception and capture of volatile chemical stimuli, possibly involved in mating and oviposition behaviour. First and second parasitoid larval instars showed morphological differences in cephalic structures which could be associated with the differential behaviour observed between them during host searching process. Furthermore, study of body

size of first instar larvae that born along reproductive season suggests a differential energetic resources allocation, but a clear pattern have not found. Finally, it was established that both second instar larva of *M. ruficauda* and third instar larva of *C. signaticollis* are attracted to fermentation chamber's extracts of third instar larva of *C. signaticollis*. These results suggest that *M. ruficauda* larvae could be exploiting the conspecific chemical communication system of their host during seeking behaviour. Study of cues origin indirectly revealed the presence of microorganisms associated to host in this region of the digestive tube. Experimental studies have shown that metabolic products of these microorganisms would be involved in the location of the host by parasitoid larvae. However, there were no conclusive results related to the role of the chemical cues involved in host conspecific interactions. In conclusion, *M. ruficauda* parasitoid presents different adaptations related to host location behaviour, such as specialized sensory structures involved in the volatile chemical stimuli perception, physiological aspects that ensure larval survival until the successful encounter occurs and the use of highly reliable and specific host cues during searching behaviour, which contribute to enhance *M. ruficauda* resources location. Therefore, this Thesis is a contribution to the knowledge of *M. ruficauda* life history, as well as to the understanding of the biology of other parasitoid species with similar characteristics and life strategies as those observed in this species.

KEY WORDS: *Mallophora ruficauda*, Scarabaeidae, host seeking, sensilla, chemical cues.

AGRADECIMIENTOS

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

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

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT) por el subsidio PICT 2006 N°01200 a Juan Corley, en el cual Marcela Castelo fue integrante, que facilitó el financiamiento parcial para llevar a cabo la Tesis.

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

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

Al Servicio de Paz y Justicia (SERPAJ) - "Aldea de los Niños por la Paz". Sedes Aldea Pilar y Aldea Rodríguez, por facilitarnos lugares de muestreo tan gentilmente.

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

A la Dra. Lilia Lauria de Cidre, por participar como codirectora de mi beca CONICET de tipo I y por el asesoramiento brindado para realizar los protocolos del capítulo 3 de la Tesis,

A los doctores Lilia Lauria de Cidre y Pablo Schilman por ser mis consejeros de estudios.

A los jurados de esta Tesis, los doctores Pablo Guerenstein, Luis Quesada Allué y Mariano Michat, por aceptar evaluar el trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE.....	VI
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
LA PERCEPCIÓN DE ESTÍMULOS EN LOS ANIMALES Y SU FUNCIÓN	2
LA PERCEPCIÓN DE ESTÍMULOS EN LOS INSECTOS	2
INTERACCIÓN INSECTO–INSECTO MEDIADA POR SUSTANCIAS QUÍMICAS.....	5
LOS PARASITOIDES	7
BIOLOGÍA DEL SISTEMA DE ESTUDIO	10
Biología del parasitoide <i>Mallophora ruficauda</i>	11
Biología de los hospedadores.....	18
Parasitismo de los hospedadores.....	21
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
PREGUNTAS Y PREDICCIONES	24
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	26
Recolección y mantenimiento de los insectos	27
Experimentos de olfatometría	28
Dispositivos experimentales y procedimientos.....	28
Condiciones experimentales	29
Obtención de estímulos del hospedador	30
Descripciones morfológicas e histológicas.....	31
Análisis estadísticos.....	31
CAPÍTULO 3. DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS ANTENALES DEL ADULTO DE <i>M. ruficauda</i>	33
Introducción	34
Materiales y Métodos	37
Insectos.....	37
Morfología de la antena	37
Descripción de las estructuras cuticulares	38
Comparaciones de la morfología de las antenas	40

Resultados	41
Morfología de la antena	41
Descripción de estructuras cuticulares	42
Discusión	49
CAPÍTULO 4. DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEFÁLICAS Y DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS LARVAS DE <i>M. ruficauda</i> EN LA TEMPORADA REPRODUCTIVA	57
Introducción	58
Materiales y Métodos	62
Insectos.....	62
Descripción de las sensilias olfativas en los estadios larvales de <i>M. ruficauda</i>	63
Estimación del tamaño corporal de las larvas de <i>M. ruficauda</i> a lo largo de la temporada reproductiva	64
Análisis estadístico	65
Resultados	66
Descripción de las sensilias olfativas en los estadios larvales de <i>M. ruficauda</i>	66
Estimación del tamaño corporal de las larvas de <i>M. ruficauda</i> a lo largo de la temporada reproductiva	70
Discusión	72
CAPÍTULO 5. ORIGEN Y ALMACENAMIENTO EN <i>C. signaticollis</i> DE LAS CLAVES QUÍMICAS ATRACTIVAS PARA EL PARASITOIDE	77
Introducción	78
Materiales y Métodos	80
Condiciones experimentales	80
Insectos.....	81
Obtención de los estímulos de <i>C. signaticollis</i>	81
Respuesta de los individuos a los estímulos del hospedador/coespecífico	82
Análisis estadístico	84
Resultados	84
Respuesta de <i>M. ruficauda</i> a estímulos del hospedador	84
Respuesta de <i>C. signaticollis</i> a estímulos de coespecíficos.....	87
Discusión	88
CAPÍTULO 6. DETERMINACIÓN DEL AGENTE PRODUCTOR DE LAS CLAVES QUÍMICAS ATRACTIVAS PARA EL PARASITOIDE EN EL INTESTINO DE <i>C. signaticollis</i>	93
Introducción	94
Materiales y Métodos	99
Insectos.....	99

Determinación de presencia de estructuras glandulares en la cámara de fermentación de <i>C. signaticollis</i>	100
Determinación de presencia de microorganismos asociados a la cámara de fermentación de <i>C. signaticollis</i>	101
Respuesta de las larvas de <i>M. ruficauda</i> y <i>C. signaticollis</i> a los extractos de la cámara de fermentación de <i>C. signaticollis</i>	108
Análisis estadístico	109
Resultados	109
Determinación de presencia de estructuras glandulares en la cámara de fermentación de <i>C. signaticollis</i>	109
Microorganismos asociados a la cámara de fermentación de <i>C. signaticollis</i> : determinación de su presencia y obtención de cultivos y productos metabólicos	111
Respuesta de las larvas de <i>M. ruficauda</i> y <i>C. signaticollis</i> a los extractos de la cámara de fermentación de <i>C. signaticollis</i>	112
Discusión	118
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL.....	126
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	134

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

LA PERCEPCIÓN DE ESTÍMULOS EN LOS ANIMALES Y SU FUNCIÓN

Los organismos se encuentran inmersos en un ambiente complejo y heterogéneo, el cual está en constante cambio temporal y espacial. La supervivencia de los individuos y la de su descendencia dependerá de la capacidad de responder o adaptarse a los cambios ocurridos en el ambiente en que viven (Turner 2005; Danks 2006; Chown y Terblanche 2007; Matthews y Matthews 2010; Plotnick et al. 2010; Hansson y Stensmyr 2011; Riffell 2012). La percepción de la variabilidad de este ambiente contribuye al éxito de los animales, permitiendo a los individuos encontrar las condiciones óptimas para su vida (Hardie et al. 2001; Chown y Terblanche 2007; Plotnick et al. 2010; Hansson y Stensmyr 2011). Por tanto, la evaluación de estas condiciones óptimas dependerá de la información que obtengan los individuos del ambiente. Esta información referente al cambio o variabilidad del ambiente es transportada por agentes a los que denominamos estímulos o señales ambientales.

Existen diferentes tipos de señales o estímulos que utilizan los organismos, siendo estos químicos, mecánicos, electromagnéticos, entre otros. En particular, los estímulos químicos se encuentran entre las señales más relevantes y juegan un rol central en la localización de recursos en la mayoría de los animales (Klaschka 2008; Su et al. 2009; Plotnick et al. 2010; Riffell 2012).

LA PERCEPCIÓN DE ESTÍMULOS EN LOS INSECTOS

En los insectos, los estímulos químicos son las señales más relevantes asociadas a la búsqueda de alimento, pareja y sitios de oviposición, entre otras actividades. La localización de recursos por parte de los insectos está relacionada a claves o estímulos del ambiente que son detectados por los organismos a través de lo que se denomina el sistema sensorial. Este sistema está compuesto por diferentes órganos entre los que podemos destacar a los ocelos, los ojos compuestos, las antenas, las piezas bucales y los cercos, entre otros (Schneider 1964;

Eaton 1985; Snodgrass 1997; Gillot 2005; Sato y Touhara 2009; Chapman 2013). En algunos casos estos órganos son multimodales, es decir, tienen la capacidad de detectar diferentes tipos de estímulos, y esta capacidad está definida por los diferentes tipos de sensilias que presentan estos órganos.

La sensilia es la unidad estructural y funcional básica de recepción sensorial en los insectos (Slifer 1970; Kaissling 1986; Chapman 2013). Pueden encontrarse en cualquier parte del insecto, pero se concentran especialmente en los apéndices. Generalmente, la morfología de las sensilias se encuentra relacionada con los diferentes tipos de estímulos que detectan, los cuales pueden ser de tipo mecánico, químico, térmico e hídrico (Figura 1.1) (Eaton 1985; Snodgrass 1997; Hallberg y Hansson 1999; Derby y Steullet 2001; Ryan 2002; Gillot 2005; Chapman 2013). Particularmente, son los estímulos químicos los que cumplen un rol fundamental en la vida de los insectos, hecho que se ve reflejado en la amplia cantidad de estudios de las quimio-sensilias o sensilias que detectan claves químicas que se encuentra en la literatura.

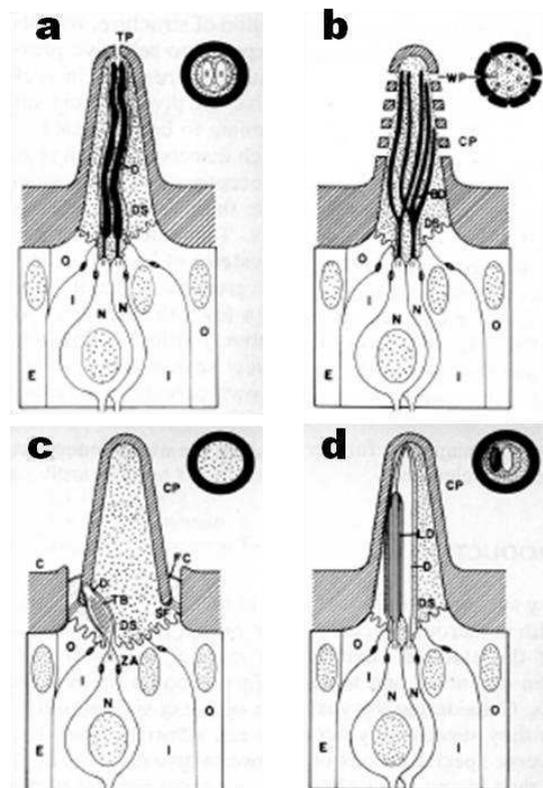


Figura 1.1. Esquemas de cuatro tipos básicos de sensilias: a) quimiosensilia de contacto; b) sensilia olfativa; c) sensilia mecanosensorial; d) sensilia termohigroreceptiva. Ilustraciones: J. Eaton (1985)

Existen dos tipos de quimiosensilias según la modalidad del estímulo que detectan. Las quimiosensilias de contacto se caracterizan por ser filiformes con un único poro apical (Figura 1.1a). Estas sensilias están asociadas al sentido del gusto debido a que detectan señales químicas en solución o en las superficies en las que se apoyan. En contraste, las sensilias olfativas, se caracterizan por poseer numerosos poros a lo largo de su pared cuticular, y permiten a los insectos detectar claves químicas volátiles (Figura 1.1b) (Slifer 1970; Zacharuk 1980; Eaton 1985; Snodgrass 1997; Hallberg y Hansson 1999; Ryan 2002; Gillot 2005; Chapman 2013). Las claves químicas volátiles, en contraposición a otras señales de comunicación, presentan mayor duración en el ambiente y tienen un amplio alcance espacial, lo que confiere una mayor eficiencia en la comunicación entre individuos. Además, existe un número ilimitado y muy variable de señales conformadas por los diferentes compuestos presentes en la naturaleza (Klaschka 2008; Ma y Krings 2009; Plotnick et al. 2010). En consecuencia, la especialización y los cambios estructurales que se producen en los receptores de estos estímulos, ya sean las sensilias o los órganos que las portan, son relevantes al momento de entender como perciben los insectos el complejo ambiente de las claves químicas volátiles. Así, entre las diferentes adaptaciones observadas en los individuos se puede destacar el aumento en el número de sensilias, las diferentes morfologías y tipos de sensilias que detectan diferentes estímulos, y los distintos tipos de arreglos tridimensionales de las estructuras receptoras de olores, lo que favorece la captura e intercepción de este tipo de sustancias (Hood Henderson y Wellington 1982; Cheer y Koehl 1987a, b; Ross y Anderson 1987; Loudon 1995; Koehl 1996; Scheinder et al. 1998; Derby y Steullet 2001; Loudon, 2003; Loudon y Davis 2005; Hansson y Stensmyr 2011). Por tanto, es de suma relevancia el estudio de las adaptaciones de los sistemas sensoriales periféricos y la morfo-funcionalidad de los mismos para conocer en profundidad las interacciones insecto–insecto que involucran claves químicas.

INTERACCIÓN INSECTO–INSECTO MEDIADA POR SUSTANCIAS QUÍMICAS

Los compuestos químicos cumplen un rol fundamental en la historia de vida de los insectos. Estos están involucrados en el comportamiento y la fisiología vinculada a la localización de recursos ya sean alimento, pareja o lugares de oviposición (Dicke y Sabelis 1988; Vet y Dicke 1992; Vet 1999; Dicke y Grostal 2001). Los estímulos químicos que median la interacción entre dos organismos y provocan en el receptor del estímulo una respuesta fisiológica o conductual con carácter adaptativo para uno o ambos organismos se denominan infoquímicos (Dicke y Sabelis 1988). Los infoquímicos son un grupo particular de compuestos químicos que transmiten información entre individuos de la misma especie (feromonas) o de diferentes especies (aleloquímicos) (Dicke y Sabelis 1988). Los aleloquímicos se clasifican a su vez dependiendo de quién se beneficia en la interacción, siendo las alomonas compuestos que benefician sólo al emisor, las kairomonas aquellos que benefician sólo al receptor y las sinomonas los compuestos químicos que benefician tanto al emisor como al receptor (Dicke y Sabelis 1988). Además, los infoquímicos están involucrados en un amplio rango de comportamientos individuales que pueden determinar la dinámica poblacional y las interacciones de parasitismo y depredación en las redes tróficas de los ecosistemas. Por consiguiente, el estudio de las interacciones entre individuos mediadas por infoquímicos es importante en la interpretación de los procesos ecológicos y evolutivos que actúan sobre las especies (Dicke 2006).

Las feromonas son de suma relevancia en las interacciones entre individuos dentro de una población. Están involucradas en los comportamientos de agregación, defensa y en la localización de recursos como son las parejas y las plantas hospedadoras. Intervienen en comportamientos simples como el forrajeo, y en complejos como las interacciones de los insectos eusociales (Dicke y Sabelis 1988; Aldrich 1995; Stowe et al. 1995; Ryan 2002; Wyatt 2003; Wertheim 2005; Wertheim et al. 2005). Las feromonas pueden ser un único compuesto o mezcla de sustancias, las cuales son derivados de otras actividades o sintetizadas *de novo* por

el individuo (Greenfield 2002; Wyatt 2003; Morgan 2004; Mori 2010). En cuanto a su síntesis, las feromonas pueden producirse en un epitelio glandular específico y/o pueden ser el resultado de la relación simbiótica entre el insecto y ciertos microorganismos que aloja (Hoyt et al. 1971; Byers 1989; Dicke 1988; Dicke y Sabelis 1988; Tillman et al. 1999; Ryan 2002; Ma y Ramaswamy 2003; Six 2003; Romero López et al. 2005; Davis et al. 2013). No obstante su origen, las feromonas son de gran importancia en las interacciones coespecíficas de los individuos, influyendo sobre la dinámica de las poblaciones a lo largo del ciclo de vida de los insectos.

Por su parte, los aleloquímicos son de vital importancia en las interacciones tróficas. Generalmente, los predadores y parasitoides (enemigos naturales) utilizan diferentes tipos de aleloquímicos como claves en la localización de sus presas (Vet y Dicke 1992; Godfray 1994; Stowe et al. 1995; Bottrell et al. 1998). Se han realizado diferentes estudios sobre las fuentes de producción de aleloquímicos. De acuerdo a estos estudios, los aleloquímicos son producidos directamente por la presa y/o son productos derivados de la actividad de las presas en el ambiente, o son producidos indirectamente por las plantas hospedadoras de las presas fitófagas (Lewis y Martin 1990; Vet y Dicke 1992; Godfray 1994; Stowe et al. 1995; Vet et al. 1995; Bottrell et al. 1998; De Moraes et al. 2000; Steidle y van Loon 2003). Las plantas hospedadoras son importantes productoras de sinomonas que atraen a los enemigos naturales, en defensa contra la herbivoría (Turlings et al. 1995; Guerrieri et al. 1999; Fritzsche Hoballah et al. 2002; Guerrieri et al. 2002; Sabelis et al. 2002; Steidle y Van Loon 2003; Turlings y Wäckers 2004; Marín-Loaiza y Céspedes 2007; Orre et al. 2010; Ichiki et al. 2012). Aunque estas claves sean altamente detectables debido a su gran volumen en el ambiente, pueden presentar una baja precisión al momento de informar la presencia e idoneidad de la presa en el ambiente. Por el contrario, los productos derivados de la actividad de las presas en el ambiente son de baja intensidad por ser emisores de pequeño tamaño, sin embargo son más confiables en el momento de informarle al enemigo natural sobre la presencia, identidad, densidad, disponibilidad e idoneidad de la presa (Vet et al. 1991; Vet y Dicke 1992; Stowe et al. 1995). Se han identificado varios tipos de posibles fuentes de aleloquímicos producidos

directamente por las presas: heces, cutícula, exuvias, hemolinfa o secreciones corporales (Vet et al. 1991; Vet y Dicke 1992; Stowe et al. 1995). Es claro que aunque la evolución favorece que los individuos sean inconspicuos frente a sus enemigos naturales, es imposible que las especies eviten emitir señales químicas y más aun cuando este tipo de señales tiene una relevancia en el ciclo de vida de las presas como son las feromonas (Stowe et al 1995). Por lo tanto, las feromonas son buenos indicadores de la presencia de los individuos de una especie, y al actuar como kairomonas son importantes fuentes de información para los predadores y parasitoides que pueden beneficiarse al explotar estos sistemas de comunicación (Aldrich 1995; Stowe et al. 1995; Wertheim 2005; Wertheim et al. 2005). De ahí su relevancia en el estudio de la localización de los hospedadores por parte de los parasitoides, fundamental etapa en la historia de vida de estos insectos particulares.

LOS PARASITOIDES

Los insectos parasitoides y sus hospedadores fitófagos componen una proporción importante de la biodiversidad global (Hawkins 1994). Un parasitoide es un insecto cuya larva se alimenta exclusivamente sobre el cuerpo de otro artrópodo, su hospedador, dando como resultado la muerte del mismo y el desarrollo completo del parasitoide (Reuter 1913; Godfray 1994). Los parasitoides establecen una relación estrecha con sus hospedadores lo que evolutivamente condujo a una especiación y radiación explosiva en la forma en que localizan, parasitan y se desarrollan sobre otros artrópodos. Poseen gran diversidad de formas de vida y comportamientos adaptativos lo cual hace de los parasitoides modelos interesantes para realizar estudios biológicos básicos (Vet et al. 2002). A su vez, en los sistemas agrícolas, juegan un papel fundamental en el control biológico de insectos herbívoros plaga, mientras que en los ecosistemas naturales tienen un rol central como reguladores de las poblaciones de insectos fitófagos (Hassel 2000; Vet et al. 2002).

La localización de hospedadores por parte de los parasitoides puede estar asociada a kairomonas producidas directa o indirectamente por el hospedador: las plantas que habitan los hospedadores fitófagos, productos de la actividad en el ambiente del hospedador, o el hospedador en sí mismo (Lewis y Martin 1990; Vet y Dicke 1992; Godfray 1994; Turlings et al. 1995; Vet et al. 1995; Guerrieri et al. 1999; De Moraes et al. 2000; Fritzsche Hoballah et al. 2002; Guerrieri et al. 2002; Ichiki et al. 2012). Las claves provenientes del hospedador son débiles en comparación a las otras fuentes de kairomonas, pero en contraposición presentan una alta confiabilidad al momento de informar sobre los hospedadores siendo explotadas en muchos casos por los parasitoides (Dicke y Sabelis 1988; Vet et al. 1991; Vet y Dicke 1992; Godfray 1994; Aldrich 1995; Stowe et al. 1995).

La mayoría de los parasitoides se encuentran en los órdenes Hymenoptera (78%) y Diptera (20%). A lo largo de la evolución la aparición del parasitoidismo ocurrió una sola vez entre los himenópteros, pero entre los dípteros ha aparecido en reiteradas ocasiones dando lugar a la enorme diversidad en sus hábitos alimenticios, formas de encontrar y parasitar al hospedador y hábitats que ocupan (Eggleton y Belshaw 1992, 1993; Feener Jr. y Brown 1997).

En las interacciones entre parasitoides y hospedadores la presencia de claves químicas es crucial en el éxito de cada una de las especies del sistema, y se ha observado que los parasitoides himenópteros y dípteros presentan diferencias notables en las estrategias que utilizan en la localización y “parasitación” de los hospedadores (Godfray 1994). En los himenópteros se ha observado que el modo más frecuente de localizar a los hospedadores es mediante el seguimiento de claves derivadas de la alimentación (secreciones salivales, heces) o de la fuente de alimento (planta hospedadora) de los hospedadores. En cambio, en los dípteros se ha registrado, con mayor frecuencia, que explotan el sistema de comunicación intraespecífica de su hospedador durante el comportamiento de búsqueda y localización, mediante la detección de feromonas sexuales o de agregación de los hospedadores adultos (Brown y Feener Jr. 1991; Vet y Dicke 1992; Wiskerke et al. 1993 a, b; Aldrich 1995; Stowe et al. 1995; Feener Jr. et al. 1996, Feener Jr. y Brown 1997; Stireman III et al. 2006). Esta

diferencia en la explotación de las claves tal vez se deba al tipo de estrategia de búsqueda que tienen estos parasitoides, dado que las hembras de los himenópteros oviponen dentro o sobre el hospedador, mientras que las larvas y no las hembras de muchos dípteros realizan la búsqueda activa del hospedador (Vinson 1984; Eggleton y Belshaw 1992, 1993; Godfray 1994; Feener Jr. y Brown 1997; Brodeur y Boivin 2004). Existen pocos estudios donde se haya investigado específicamente el origen de las claves involucradas en el comportamiento activo de localización del hospedador en los parasitoides inmaduros (Godfray 1994; Feener Jr. y Brown 1997; Brodeur y Boivin 2004). Dada la limitación que presentan estos parasitoides en su movilidad y en el tiempo de vida del cual disponen (parasitoides con “tiempo limitado”), es de esperarse que utilicen claves altamente confiables en el comportamiento de localización como las feromonas del hospedador, aumentando su eficiencia de búsqueda y consecuentemente su *fitness* o aptitud biológica (Vet et al. 1991; Brodeur y Boivin 2004; Wajnberg et al. 2006). Sin embargo, en general se desconoce cuál es la ubicación anatómica de producción de este tipo de claves en los pocos casos estudiados hasta el momento. Además, existen pocos trabajos morfológico-funcionales asociados a la descripción de los órganos que detectan este tipo de claves. Aunque existen estudios comparativos de las antenas de las fases larvales en dípteros que revelan la presencia de sensilias que varían según los taxa (Nicastro et al. 1998), no se han realizado trabajos que describan y caractericen las estructuras sensoriales vinculadas al comportamiento de búsqueda en parasitoides inmaduros. Por tanto la descripción de los órganos sensoriales, la identificación del origen y la caracterización del tipo de claves utilizadas durante el comportamiento de localización del hospedador es fundamental en el estudio de la evolución, comportamiento e historia de vida de los parasitoides inmaduros.

BIOLOGÍA DEL SISTEMA DE ESTUDIO

Los parasitoides de la familia Asilidae

Los individuos de la familia Asilidae son dípteros llamados comúnmente moscas ladronas (*robber flies*) y poseen distribución mundial (Ruiz 1925; Artigas 1970; De Santis 1989; Artigas et al. 1991). Los adultos tienen hábito cazador y se alimentan de insectos voladores que capturan activamente en el aire. En algunas especies existe una predilección por algún grupo particular de insectos, las cuales atacan exclusivamente a especies del orden Hymenoptera (Copello 1922; Linsley 1960; Werthein 1981; Wood 1981; Rabinovich y Quiroga 1995; Rabinovich y Corley 1997). En cuanto a las larvas de la mayoría de las especies de asíldos, se ha observado que viven en distintos sustratos y tienen hábito depredador, alimentándose de huevos, larvas y pupas de insectos que viven en el suelo o madera en descomposición, con una marcada preferencia hacia larvas de la familia Scarabaeidae (Coleoptera) (Clausen 1940; Hull 1962). Curiosamente, esta familia cuenta con unas pocas especies que son ectoparasitoides koinobiontes de larvas de escarabeidos, es decir, parasitoides externamente aferrados y que permiten que sus hospedadores continúen creciendo después de haber sido parasitados, como las del género *Mallophora* Macquart (Copello 1922, Clements y Bennett 1969, Musso 1978, 1983, Castelo y Capurro 2000, Castelo y Lazzari 2004, Castelo y Corley 2004a).

El género *Mallophora* tiene distribución exclusivamente en el continente americano, abarcando las regiones Neotropical y Neártica (Clements y Bennett 1969; Artigas y Angulo 1980). Las especies de *Mallophora* viven preferentemente en lugares bajos, a menudo con abundante vegetación (Artigas y Angulo 1980). Musso (1983) estudió los requerimientos ecológicos y nutritivos de las larvas y adultos de algunas especies de asíldos, y fue el primero en proponer que las especies del género *Mallophora* son verdaderos parasitoides.

Biología del parasitoide *Mallophora ruficauda*

Mallophora ruficauda Wiedemann 1828 (Diptera: Asilidae), conocido vulgarmente como moscardón cazador de abejas, es una especie endémica de Sudamérica que habita los pastizales cercanos a colmenares de la Región Pampeana de Argentina hasta los 38° LS (Figura 1.2a) (Rabinovich y Corley 1997). Hacia el norte su distribución se extiende abarcando Paraguay, Uruguay, el sur de Brasil y algunos países de Centro América (Artigas y Angulo 1980). Esta especie en estado adulto se alimenta de diferentes tipos de insectos voladores, con una alta preferencia hacia las abejas melíferas, considerando a la especie una plaga de la apicultura (Figura 1.2b) (Copello 1922; Werthein 1981; Rabinovich y Quiroga 1995; Rabinovich y Corley 1997). El incremento poblacional de este díptero en los últimos años ha aumentado el daño en los colmenares, afectando seriamente a la explotación apícola y la producción de miel. En Argentina, las provincias que sufren un impacto verdaderamente importante sobre la apicultura son Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y La Pampa (Rabinovich y Corley 1997). Estas provincias concentran el 90% del total de colmenas del país y es la zona que más sufre el ataque de *M. ruficauda* (SAGPyA 2007). Buenos Aires genera el 52% del volumen de miel nacional y se estima que las pérdidas ocasionadas solamente por el problema del moscardón rondan los 2 a 3 millones de dólares (Rabinovich y Corley 1997). *Mallophora ruficauda* además de afectar directamente la producción de miel, afecta indirectamente la producción de semillas oleaginosas como el girasol, ya que los adultos cazan a las abejas e interfieren en el proceso de polinización. Se estima que la utilización de abejas para la polinización de cultivos deja un beneficio de 1.000 millones de dólares por año (Mayoral 1999). De esta manera, la reducción de este insecto es de gran importancia para el área apícola y una de las aproximaciones para realizar un programa de control es enfocar los estudios en el período de localización de los hospedadores por parte de las larvas y de los adultos.

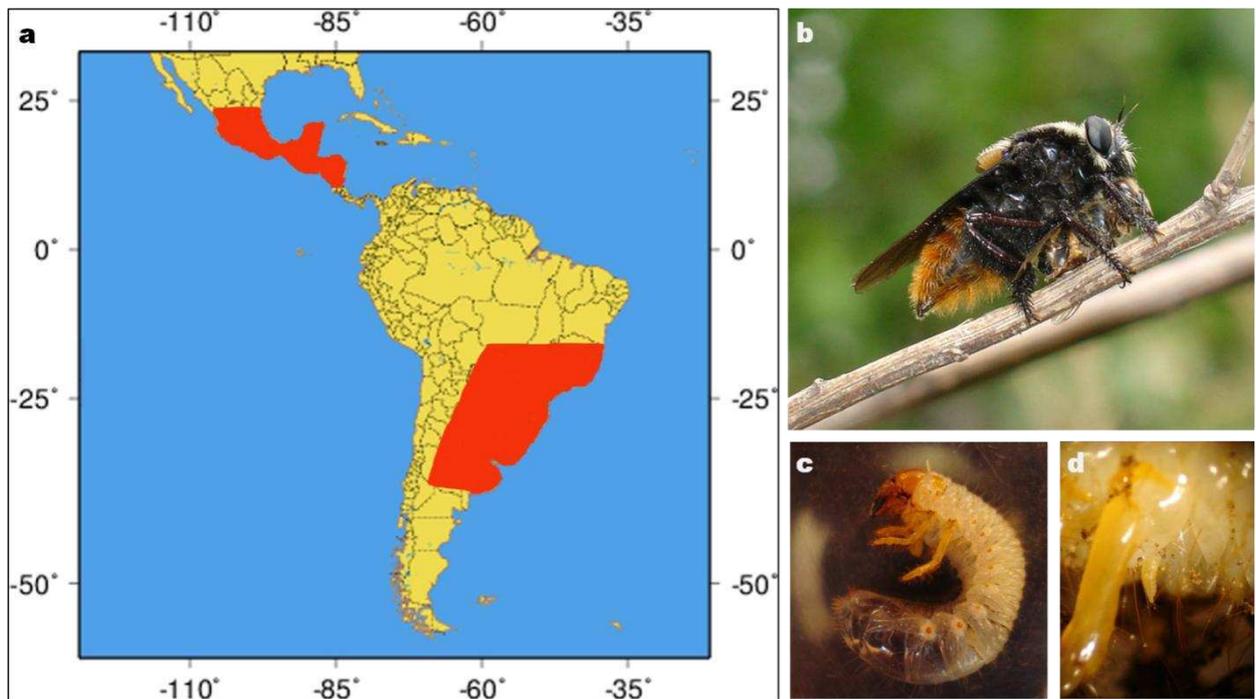


Figura 1.2. *Mallophora ruficauda*: a) Distribución mundial (en rojo; Artigas y Angulo 1980); b) Hembra alimentándose de una abeja melífera; c) Hospedador parasitado por larva de segundo estadio; d) Detalle de la ubicación de la larva de segundo estadio sobre el hospedador. Fotografías: María Eugenia Barrantes.

En estado larval *M. ruficauda* ectoparasita a las larvas de algunas especies de coleópteros rizófagos de la familia Scarabaeidae, conocidos vulgarmente como gusanos blancos del suelo (Figura 1.2c y d) (Copello 1922; Castelo y Capurro 2000; Castelo y Corley 2004b, 2010). Se han realizado estudios para evaluar la capacidad reguladora de *M. ruficauda* sobre los gusanos blancos del suelo, en los que se determinó que su capacidad es limitada (Castelo y Corley 2004b). A campo y en laboratorio se ha observado que *M. ruficauda* parasita principalmente a tres especies del género *Cyclocephala* Dejean (*C. signaticollis* Burmeister, *C. putrida* Burmeister y *C. modesta* Burmeister), con una marcada preferencia por larvas de tercer estadio de *C. signaticollis* (Castelo 2003; Castelo y Corley 2010; Castelo y Crespo 2012). En laboratorio, Barrantes y Castelo (2014) realizaron estudios de orientación hacia diferentes especies de potenciales hospedadores – especies con bajo porcentaje de parasitismo – y encontraron indicios de que larvas en diferente estado fisiológico se orientaban a especies poco seleccionadas a campo. Es decir, que esta especie de parasitoide podría estar utilizando diferentes claves de su propio estado fisiológico al momento de decidir orientarse hacia algún hospedador.

El ciclo de vida de *M. ruficauda* es anual y los adultos se encuentran presentes sólo durante los meses de verano, desde fines de diciembre a principios de marzo (Copello 1922) (Figura 1.3). Estos son de hábito diurno y desarrollan todas sus actividades entre las 9 y 19 hs. El comportamiento de alimentación se produce a lo largo de todo el día con un máximo de actividad entre las 15 y las 18 hs, observándose una disminución entre las 11 y las 14 hs, que se corresponde con un aumento de los comportamientos relacionados con la reproducción. La actividad de cortejo es máxima entre las 10 y las 12 hs y las cópulas se producen mayoritariamente entre las 11 y las 13 hs (Nussenbaum 2007). Tricca y Trujillo-Genóz (1980) realizaron observaciones y experimentos de campo para estudiar el comportamiento sexual en esta especie, encontrando que la cópula se produce sobre un sustrato a los 30-40 minutos luego de iniciado el cortejo. Además, Tricca y Trujillo-Genóz (1980) sugirieron que el patrón de color de las hembras, su tamaño y su posición sobre el soporte serían los responsables de dar inicio a las fases del cortejo en los machos. Estos resultados sugieren que los estímulos visuales jugarían un papel fundamental en el comportamiento sexual de *M. ruficauda*. El comportamiento de oviposición se produce entre las 10 y las 17 hs, con un pico entre las 11 y las 13 hs, el cual presenta una relación lineal con la radiación solar (Nussenbaum 2007).

Las hembras de *M. ruficauda* depositan sus huevos fuera del hospedador sobre plantas herbáceas altas y sustratos artificiales, tales como alambrados, cables telefónicos o varas de vegetación secas. Los huevos los depositan en desoves de unos 328 huevos en promedio (fecundidad 96,2%), los cuales son cubiertos por albumina batida (Figura 1.3) (Copello 1922; Castelo y Corley 2004a). Se han realizado estudios sobre la preferencia de las hembras de *M. ruficauda* por los sitios de oviposición y se logró determinar que la elección de sustratos elevados contribuye significativamente a maximizar la dispersión de las larvas y el éxito de parasitismo (Castelo et al. 2006). Particularmente, se determinó que el éxito de parasitismo de este parasitoide es máximo cuando los desoves son depositados a alturas comprendidas entre 1,25 y 1,50 mts (Castelo et al. 2006). Además, se ha sugerido que claves químicas provenientes de los lugares donde están presentes las larvas de *C. signaticollis* podrían inducir el comportamiento oviposición (Castelo y Capurro 2000; Castelo 2003; Nussenbaum 2007;

Castelo y Corley 2010). Sin embargo, se desconoce cuáles son las claves involucradas y si las hembras cuentan con los órganos sensoriales adecuados en la detección de compuestos químicos volátiles.

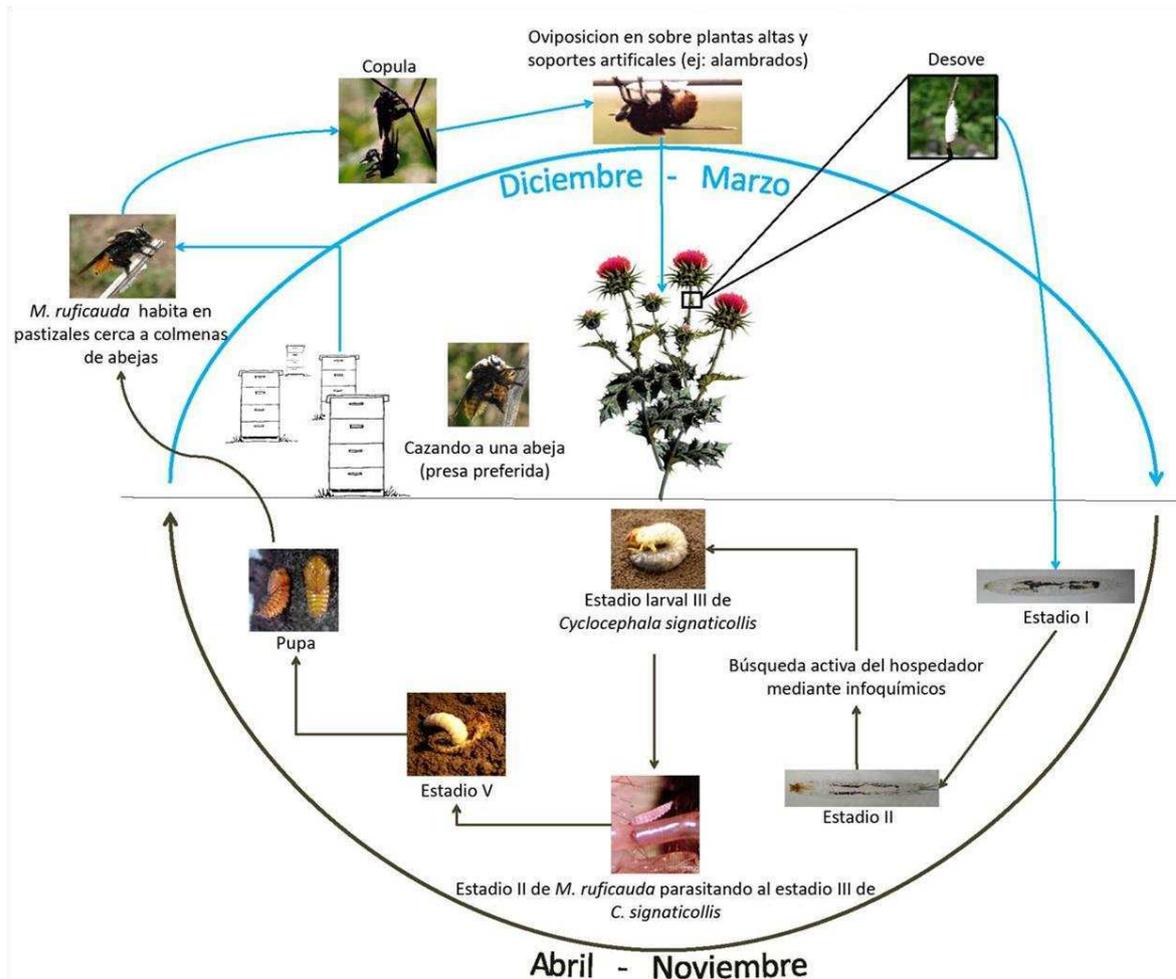


Figura 1.3. Ciclo de vida de *Mallophora ruficauda*.

Una vez elegido el sitio de oviposición, las hembras de *M. ruficauda* depositan sus desoves, y los huevos eclosionan luego de siete días de incubación en promedio (Castelo y Corley 2004a; Crespo y Castelo 2010). *Mallophora ruficauda* posee una estrategia de producción de huevos sinovigénica extrema, es decir, las hembras emergen con todos los oocitos inmaduros, y la maduración se produce durante su vida reproductiva. El índice de ovigenia fue calculado para las hembras capturadas a campo de edad desconocida y es, en promedio, de 0,084, mientras que es de 0 para las hembras recién emergidas. El número promedio de oocitos maduros es de 330,5 y el número promedio de ovariolas por hembra es de 514,9. Además, el número de

oocitos totales y el número de ovariolas de la hembra están correlacionados positivamente con el tamaño corporal (Nussenbaum 2007).

Los huevos de *M. ruficauda* eclosionan luego de siete días de incubación en promedio (Castelo y Corley 2004a; Crespo y Castelo 2010). Las larvas nacen a mediados de diciembre, mientras que la aparición del hospedador más susceptible al parasitismo se produce a fines de febrero, existiendo un desfase temporal (asincronía) entre la aparición del hospedador y del parasitoide. En trabajos previos se ha demostrado que las larvas de *M. ruficauda* sobreviven utilizando sus propias reservas corporales hasta que el hospedador se encuentra disponible en el campo, observándose una mayor tasa de supervivencia en aquellas larvas nacidas tempranamente en la temporada de oviposición con respecto a los individuos tardíos (Crespo 2007). Debido a que estos individuos utilizan recursos propios en el sostenimiento corporal y la dispersión, las diferencias en longevidad serían resultado de la inversión diferencial de las hembras dependiendo el momento de la temporada en que oviponen. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios que determinen si existe inversión parental diferencial en esta especie.

Al nacer las larvas de estadio I caen al suelo dispersada por acción del viento, a cierta distancia del sitio de oviposición (Figura 1.3) (Castelo y Corley 2004a; Castelo et al. 2006). El proceso de diseminación por el viento es favorecido por el tamaño de estas larvas, las cuales miden aproximadamente 1 mm de longitud (Castelo 2003; Castelo et al. 2006). Una vez en el suelo, las larvas se entierran rápidamente evitando la desecación y comienzan con el proceso de localización del hospedador (Crespo y Castelo 2008). Existen, en la bibliografía, varios ejemplos de parasitoides donde el encuentro con el hospedador se da luego de una búsqueda activa del primer estadio larval (“parasitoides inmaduros”) (Godfray 1994; Yeates y Greathead 1997; Feener Jr. y Brown 1997; Brodeur y Boivin 2004; Stireman et al. 2006). Sin embargo, Crespo y Castelo (2008) encontraron que el primer estadio larval no posee la capacidad de orientarse hacia su hospedador ni de localizarlo, pero tendría la capacidad de detectarlo y localizar su microhábitat. De esta manera, la búsqueda activa del hospedador comienza luego que la larva de *M. ruficauda* muda al segundo estadio y desarrolla las estructuras sensoriales

que permiten la orientación, utilizando en el proceso sus propias reservas energéticas (Castelo y Lazzari 2004; Crespo y Castelo 2008; Crespo et al. 2011). A su vez, Crespo y Castelo (2012) han encontrado que las condiciones ambientales, particularmente la presión barométrica, influyen sobre la orientación activa hacia el hospedador de la larva de *M. ruficauda*, la cual deja de orientarse hacia los hospedadores cuando la presión barométrica desciende abruptamente durante el proceso de localización. Por otro lado, efectos similares han sido observados en adultos de otras especies de parasitoides, pero referentes al tiempo invertido en la búsqueda de hospedadores y a las decisiones de parasitismo (Roitberg et al. 1993). Se cree que este hecho podría estar asociado con el riesgo de muerte que sufren los insectos durante el advenimiento de una tormenta (Roitberg et al. 1993; Amat et al. 2006). En resumen, las características precedentes observadas en *M. ruficauda* son únicas hasta el momento entre los parasitoides inmaduros.

En la localización activa del hospedador, las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* se orientan hacia el tercer estadio larval de *C. signaticollis* utilizando claves provenientes de su cuerpo. Mediante experimentos de laboratorio, se determinó que las claves involucradas son de naturaleza química, en particular, provienen de la mitad posterior del intestino del gusano (Castelo y Lazzari 2004). Sin embargo, se desconoce cuál es la estructura o agente productor de los infoquímicos involucrados en este comportamiento y si los mismos tienen un rol ecológico en el ciclo de vida de *C. signaticollis*, como ser productos de la actividad en el ambiente de los hospedadores o intervenir en interacciones entre individuos de esta especie.

Una vez que las larvas de estadio II encuentran al hospedador, se posicionan sobre su tegumento y se aferran a él, utilizando sus piezas bucales (Musso 1981; Castelo 2003). La larva parasitoide se alimenta de la hemolinfa y tejidos de su hospedador durante el otoño y el invierno hasta el comienzo de la primavera, manteniendo invariable su tamaño (Copello 1922; Castelo 2003; Crespo y Castelo 2010). Al finalizar el invierno, el hospedador sale del estado de letargo en el que se encontraba y comienza la fase prepupa. En ese momento, la larva

parasitoide comienza a desarrollarse rápidamente, mata al hospedador y para inicios del verano los adultos comienzan a emerger en el campo (Copello 1922; Castelo 2003).

Mallophora ruficauda en su ciclo de vida presenta cinco estadios larvales, de los cuales se determinó su duración promedio: estadio I siete días; estadio II 32 días en ausencia del hospedador y 109 días parasitando al hospedador; estadio III y IV cuatro días; y estadio V cinco días (Castelo 2003; Crespo y Castelo 2010). Cuando la larva del parasitoide alcanza el estadio IV, el hospedador está muerto y fue casi totalmente consumido. La larva de estadio V sigue consumiendo los restos del hospedador, luego muda a pupa y transcurridos 24 días promedio se abre camino en la tierra y llega a la superficie del suelo donde emerge el adulto (Crespo y Castelo 2010). Por tanto, los primeros dos estadios larvales de *M. ruficauda* se especializan en la detección y orientación hacia su hospedador, mientras que los subsiguientes tres estadios son poco activos y sólo se alimentan (Crespo y Castelo 2008, 2010). Además, presenta un desarrollo ontogénico único entre los parasitoides debido a que sólo son parásitos obligados los estadios II al IV y de vida libre los estadios I y V, donde este último presenta hábito carroñero sobre el hospedador (Crespo y Castelo 2010). Asimismo, se ha determinado que las larvas de estadio II detectan a los hospedadores utilizando los palpos maxilares (Crespo et al. 2011). Sin embargo, no se han realizado estudios que determinen las características morfológicas y sensoriales ligadas a las diferencias en el comportamiento de los estadios larvales vinculados a la localización del hospedador.

Teniendo en cuenta que *M. ruficauda* es una especie de parasitoide que se caracteriza por poseer una estrategia de búsqueda compartida del hospedador entre el estado adulto y el larval, el éxito de esta especie dependerá de la eficiencia en el comportamiento de búsqueda y localización del hospedador de cada estado del parasitoide implicado en la búsqueda. En consecuencia, son necesarios estudios enfocados al papel que cumple cada estado del ciclo biológico de esta especie. En particular algunas preguntas que surgen en el estudio de *M. ruficauda* son: ¿Los adultos cuentan con estructuras que detecten las claves químicas del hospedador? ¿Los estadios larvales que realizan la detección y localización activa del

hospedador presentan características morfológicas y fisiológicas que contribuyan con el comportamiento de búsqueda? ¿Cuál es el origen de los infoquímicos atractivos que desencadenan la orientación positiva de las larvas parasitoides hacia el hospedador? Y por último, ¿Estos infoquímicos atractivos cumplen alguna función en la interacción intraespecífica de los hospedadores? Por lo tanto, todos estos interrogantes fueron abordados en la presente Tesis, donde se estudiaron aspectos morfológicos de los adultos y de las larvas, el origen de las claves químicas en el hospedador y el rol ecológico de las mismas en este sistema.

Biología de los hospedadores

Los gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae) son larvas de escarabajos de régimen fitófago que cumplen la mayor parte de su ciclo de vida en el suelo (Figura 1.4b). Estas larvas producen grandes daños en las raíces de las plantas por la acción de sus mandíbulas, motivo por el cual son consideradas una importante plaga de los cultivos comerciales y áreas verdes de recreación en diferentes partes del mundo (Remedi de Gavoto 1964; Alvarado 1983; Ali y Harivandi 1987; Crutchfield y Potter 1995; Smitley 1996; Salvadori 1997; Cherry y Schueneman 1998; Cranshaw y Zimmerman 1998; Potter 1998; Redmond y Potter 2010). Las mismas son consideradas plaga de la agricultura cuando su densidad alcanza el nivel de daño económico de 4/m² (Alvarado 1979). En la República Argentina, los cultivos más perjudicados son los cereales, plantas forrajeras (pasturas) y hortalizas (Remedi de Gavotto 1964; Alvarado et al. 1981; Alvarado 1983; Álvarez Castillo et al. 1993; Carmona et al. 1994).

La mayoría de las especies de larvas de Scarabaeidae se hallan en profundidades de entre 0 y 15 cm, y la minoría llega hasta los 30 cm (Carmona et al. 1994). Esta diferencia en la distribución de las larvas en el suelo es resultado de los movimientos que realizan durante la localización de su alimento, permaneciendo en la zona superior de las raíces donde la temperatura se mantiene constante la mayor parte del año (Villani y Wright 1990). Sin embargo, si la temperatura del suelo fluctúa por fuera del rango tolerable, las larvas de muchas

especies de escarabajos presentan patrones de movimientos verticales en la columna de suelo en busca de condiciones óptimas (Villani y Wright 1990).

Los gusanos blancos del suelo son hospedadores de las larvas de *M. ruficauda* (Crouzel 1965), en especial *C. signaticollis* presenta una tasa elevada de parasitismo con respecto a las otras especies (Remedi de Gavotto 1964; Dennis y Knutson 1988; Castelo y Capurro 2000; Castelo y Corley 2004b, 2010). Se han detectado nueve especies de gusanos blancos rizófagos en la provincia de Buenos Aires: *Anomala testaceipennis* Blanchard, *Archophileurus vervex* Burmeister, *Bothynus striatellus* Fairmaire, *C. signaticollis*, *C. modesta*, *C. putrida*, *Diloboderus abderus* Sturm, *Heterogeniates bonariensis* Ohaus, y *Philochloenia bonariensis* Bruch (Alvarado 1980).

Cyclocephala signaticollis es una especie nativa de la República Argentina. Se distribuye en la provincia de Buenos Aires, este de Córdoba, sur de Santa Fe, provincia de Entre Ríos y nordeste de La Pampa, y en el exterior se han registrado en los países de Uruguay y Australia (Figura 1.4a) (Remedi de Gavotto 1964). Al nacer se alimenta de materia orgánica y en los estadios posteriores se alimenta de raíces de una gran variedad plantas, en particular de hortalizas y gramíneas, siendo una de las especies más dañinas de gusanos blancos (Remedi de Gavotto 1964; Alvarado 1980; López et al. 1994). Posee un ciclo de vida de un año de duración. Los adultos aparecen durante los meses de noviembre y diciembre, y primeros días de enero (Remedi de Gavotto 1964; Alvarado 1980; López et al. 1994). Estos una vez emergidos, poseen un periodo de oviposición de 15,8 días y una fecundidad máxima de 7,1 huevos/hembra (López et al. 1994). Los huevos son depositados de forma aislada, dejando una cierta distancia entre cada huevo, y en pequeños terrones en suelos blandos y removidos a una profundidad entre 0 y 10 cm (Carmona et al. 1994; López et al. 1994). No obstante, el muestreo de los estadios larvales de *C. signaticollis* mostró una distribución agregada de los individuos (Castelo y Capurro 2000), sugiriendo la posible existencia de un comportamiento de agregación mediado por algún tipo de clave o derivado de la actividad de oviposición de la hembra. Mediante experimentos de elección dicotómica en laboratorio, se observó que las

larvas de estadio III de *C. signaticollis* se orientaron positivamente hacia claves químicas provenientes de coespecíficos. En particular, este trabajo demostró que los individuos se orientaban hacia extractos de la mitad posterior del tubo digestivo de larvas (Castelo 2003). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la estructura o agente productor de estas claves químicas.

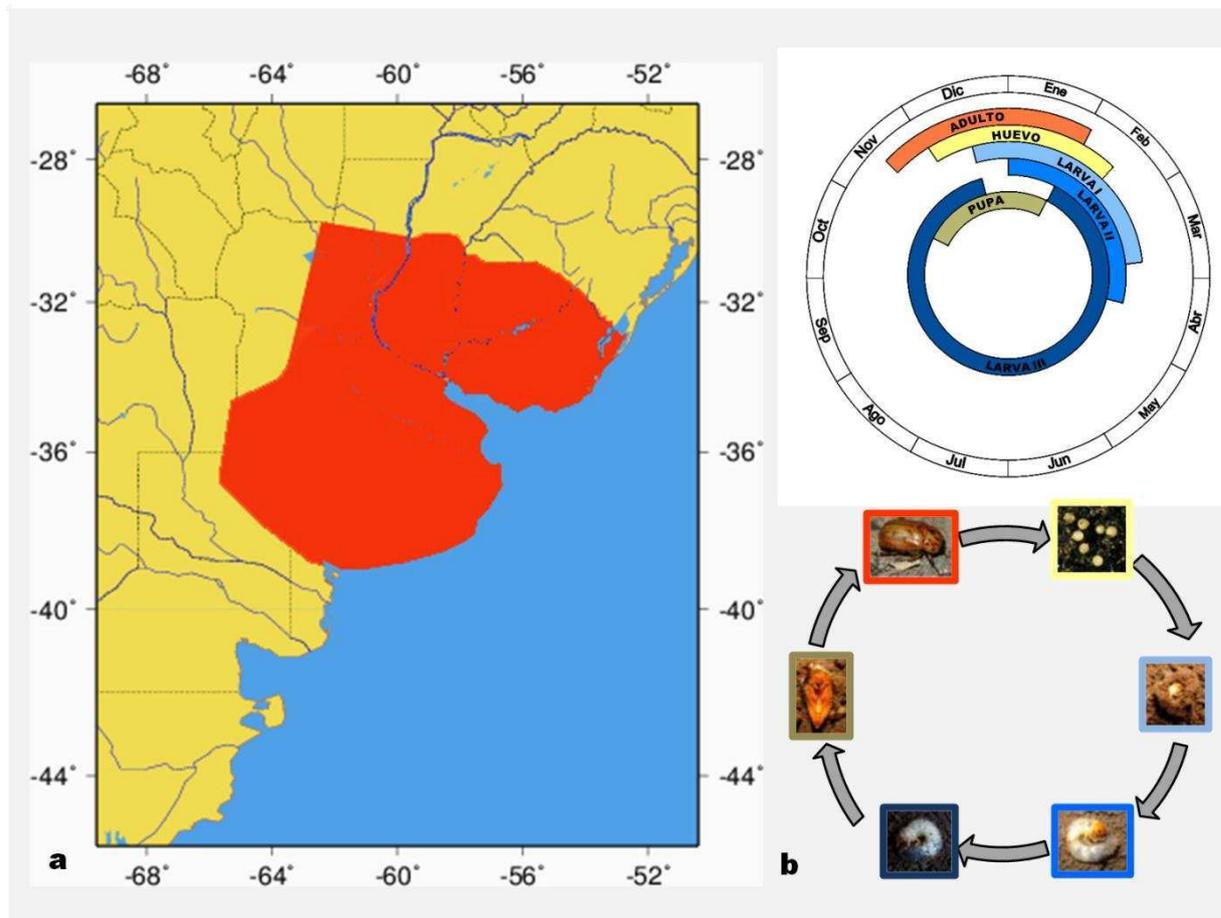


Figura 1.4. *Cyclocephala signaticollis*: a) Distribución en Sudamérica (en rojo; Remedi de Gavotto 1964); b) Ciclo de vida.

Luego de la puesta de los huevos, transcurre un periodo de 22,5 días en promedio de desarrollo embrionario hasta el nacimiento de las larvas de primer estadio. Esta especie cuenta con un desarrollo ontogénico de tres estadios larvales. El primer estadio larval presenta una duración promedio de 40 días, el segundo de 32 días promedio y el tercer estadio se desarrolla 217 días promedio. Una vez transcurrido la etapa larval, esta especie presenta un estadio de duración variable denominado prepupa. Durante este estadio la larva pierde su forma típica y no se alimenta. Posteriormente, alcanza el estadio de pupa el cual presenta una

duración promedio de 20 días. Finalizada la metamorfosis, los adultos emergen y viven 31 días promedio, siendo las hembras más longevas que los machos (Figura 1.4b) (López et al. 1994).

Las larvas del tercer estadio de *C. signaticollis* (larvas susceptibles al parasitismo por *M. ruficauda*) se hallan entre 5 y 15 cm de profundidad en el suelo y pasan el invierno en el interior de una celda en la tierra como larva invernante. Son del tipo escarabeiforme, en forma de “C”, con cabeza quitinizada y cuerpo blando de color blanco cremoso alcanzando un tamaño máximo de 25-30 mm de longitud (López et al. 1994). Son larvas polifitófagas que afectan varios cultivos comerciales debido a que se alimentan de raíces y semillas de trigo, maíz, cebada, lino, alfalfa, girasol y productos hortícolas tales como lechuga y zanahoria entre otros (Remedi de Gavotto 1964; Alvarado et al. 1981; Alvarado 1983). En particular, estas larvas son especialmente perjudiciales en los cultivares de papa (hasta un 60% de pérdida) en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Álvarez Castillo et al. 1993; Carmona et al. 1994; López et al. 1994) y en semillas de *Agropyron* sp. y *Melilotus* sp. (Alvarado 1983).

Parasitismo de los hospedadores

Hasta el momento el parasitismo de los gusanos blancos por *M. ruficauda* se ha evaluado a partir de aspectos ecológicos, comportamentales y fisiológicos. En sucesivos muestreos de campo en diferentes localidades de la región pampeana, Castelo y Corley (2010) determinaron el grado de especificidad de *M. ruficauda* sobre las 9 especies de gusanos blancos presentes en su área de distribución. Las frecuencias de parasitismo observadas indican que *M. ruficauda* prefiere a *C. signaticollis* como hospedador, ya que la frecuencia relativa de ataques sobre esta especie es la mayor encontrada en el campo (86,6%). En otras especies de gusano blanco pertenecientes al mismo género, las frecuencias relativas de parasitismo son menores, siendo de 6,7% para *C. modesta* y 1,4% para *C. putrida*. Luego, para *P. bonariensis* se encontró un porcentaje de parasitismo de 3,4%. En el caso de *D. abderus*, *Anomala testaceipennis*, *Archophileurus vervex*, *H. bonariensis* y *B. striatellus*, los valores son muy bajos, siendo de 1%, 0,5%, 0,5%, 0% y 0%, respectivamente. Al estudiar la especificidad de hospedadores a

microescala espacial, donde las larvas de *M. ruficauda* son las que eligen y aceptan a los hospedadores, se detectó que los individuos de *C. signaticollis* son preferentemente parasitados cuando se encuentran junto con individuos de otras especies de hospedadores en la misma porción de suelo. En cambio, para el resto de las especies de gusanos blancos se encontró que la probabilidad de ser parasitado es significativamente más baja cuando *C. signaticollis* está presente (Castelo 2003; Castelo y Corley 2010). Estos datos muestran que *M. ruficauda* tendría cierta flexibilidad al utilizar distintos hospedadores y no sería estrictamente especialista, pero prefiere a *C. signaticollis*. No obstante, dada la magnitud geográfica y temporal de este trabajo, los datos de campo obtenidos fueron evaluados en forma global y no teniendo en cuenta la situación particular de cada sitio muestreado a escala local, en referencia a la abundancia relativa de las distintas especies de larvas de Scarabaeidae, el comportamiento de respuesta frente al parasitismo que puede adoptar los hospedadores y al estado fisiológico de las larvas de *M. ruficauda* que se encontraron parasitando estos gusanos.

En cuanto a la detectabilidad de los hospedadores previa al parasitismo, se han realizado estudios donde se encontró una asociación positiva entre la presencia de *M. ruficauda* y la abundancia de hospedadores a escala de pastizal (Castelo 2003; Castelo y Corley 2010). Este hecho sugiere que la hembra de *M. ruficauda* podría detectar la presencia de los hospedadores a una escala espacial grande y, posteriormente, seleccionar dentro del pastizal el sitio de oviposición. Luego, a una escala espacial mucho más pequeña, la larva busca activamente al hospedador y lo parasita. Una vez parasitados los hospedadores, se observa a escala de pastizal un patrón de denso-independencia en el parasitismo, sugiriendo que las hembras no tendrían la capacidad de detectar exactamente donde están los hospedadores. En cambio, a escala de microhábitat en el suelo se produce un patrón de parasitismo denso-dependiente inverso, que indica que a medida que se incrementa el número de hospedadores la proporción de ellos que es parasitada es menor. Este patrón producido a menor escala sugiere que *M. ruficauda* posee un potencial limitado como regulador de las poblaciones de gusanos blancos, lo que hace posible la persistencia a largo plazo de este sistema hospedador-parasitoide (Castelo y Corley 2004b, 2010).

La defensa de los hospedadores frente al parasitismo influye sobre la localización y aceptación del hospedador, siendo un factor que puede determinar el patrón de parasitismo. Mediante ensayos de laboratorio se evaluó el comportamiento de defensa de las larvas de escarabeidos frente ataques simulados de las larvas de *M. ruficauda* y la aceptación del hospedador por el parasitoide (Castelo y Crespo 2012). Los resultados obtenidos mostraron un patrón similar al hallado en el campo donde las larvas de *C. signaticollis* presentan la menor agresión y el mayor porcentaje de parasitismo seguidas de forma gradual por las larvas de *C. modesta*, *C. putrida*, *D. abderus*, *P. bonariensis* y *A. testaceipennis* (Castelo y Crespo 2012). Por otra parte se ha estudiado en laboratorio, utilizando experimentos de olfatometría y éxito de ataque, la influencia del estado fisiológico o interno de las larvas de *M. ruficauda* sobre el patrón parasitismo de las larvas de escarabeidos (Crespo 2011; Barrantes y Castelo 2014). Barrantes y Castelo (2014) evaluaron la orientación, aferramiento y éxito de ataque en función de la edad (estado fisiológico) de las larvas de *M. ruficauda* frente a *C. signaticollis* y otras potenciales especies de hospedadores: *C. modesta*, *C. putrida*, *H. bonariensis* y *P. bonariensis*. Los resultados de este trabajo demostraron que las larvas con menor expectativa de vida (longevas, 60-80 días) se orientan hacia especies de hospedadores menos atacadas en el campo, como son *C. modesta* y *C. putrida* (Barrantes y Castelo 2014). Esto demuestra como el grado de especificidad del parasitismo en *M. ruficauda* es influenciado por el estado fisiológico, en particular la expectativa de vida de los individuos. Además, se ha observado que la edad y la competencia intraespecífica, otro aspecto del estado fisiológico de los individuos, condiciona la toma de decisiones de las larvas de *M. ruficauda* sobre el parasitismo de sus hospedadores (Crespo y Castelo 2009; Crespo 2011). Se ha observado que dependiendo de su estado interno, las larvas se orientan y aceptan hospedadores ya parasitados, siendo estos de menor calidad debido a la condición de parasitoide solitario de *M. ruficauda* (Crespo y Castelo 2009; Crespo 2011). Estos resultados indican la relevancia del comportamiento de defensa del hospedador y el estado fisiológico del parasitoide en el patrón de parasitismo del sistema *M. ruficauda* – gusanos blancos.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Estudiar aspectos del sistema parasitoide – hospedador *Mallophora ruficauda* – *Cyclocephala signaticollis* que tienen relevancia en el contexto de localización y encuentro del hospedador, caracterizando morfológicamente a los adultos y a las larvas parasitoides y determinando el origen y función de las claves químicas en el hospedador.

PREGUNTAS Y PREDICCIONES

A) ¿Los adultos de *M. ruficauda* cuentan con antenas especializadas en la detección de estímulos olfativos?

Las hembras presentarán antenas con sensillas especializadas en la detección de compuestos químicos volátiles transportados por el aire.

B) ¿Las larvas de *M. ruficauda* presentan características morfológicas que les permiten percibir estímulos químicos relacionados al comportamiento de búsqueda de los hospedadores? ¿Las larvas de primer estadio presentan diferencias morfométricas o fisiológicas a lo largo de la temporada reproductiva relevantes en el contexto de localización del hospedador?

Las larvas de estadio II presentarán quimiosensillas en los palpos maxilares, los cuales están involucrados en la detección de claves olfativas provenientes del hospedador. Las larvas de estadio I presentarán diferencias morfométricas/fisiológicas dependiendo el momento de la temporada reproductiva donde nacen, relacionadas al momento de aparición del hospedador.

C) ¿En qué región de la mitad posterior del intestino de las larvas de tercer estadio de *C. signaticollis* se almacenan y/o producen las claves químicas que desencadenan la orientación positiva hacia el hospedador por parte de las larvas de *M. ruficauda*? ¿Cuál es el agente/estructura del abdomen que produce estas claves químicas?

Las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* se verán atraídas hacia una región particular de la mitad posterior del tubo digestivo de los hospedadores. Se espera que los infoquímicos que

desencadenan el comportamiento de orientación positiva hacia sustancias químicas de esta región del tubo digestivo sean producidas o almacenadas por un tejido glandular o por microorganismos asociados al intestino de las larvas de *C. signaticollis*.

D) ¿Son los infoquímicos producidos por el agente/estructura abdominal de relevancia en las interacciones intraespecíficas de las larvas de *C. signaticollis*?

Las sustancias químicas que desencadenan la orientación positiva de las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* mediarán algún comportamiento de interacción entre larvas de estadio III de *C. signaticollis*. En particular se espera que exista una atracción de los individuos entre sí sugiriendo que los infoquímicos estarían involucrados en la comunicación intraespecífica de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* y a su vez actuarían como kairomonas en la búsqueda y localización del hospedador por parte de las larvas de estadio II de *M. ruficauda*.

Un resumen de los interrogantes que se estudiarán en esta Tesis se expone en forma gráfica en la Figura 1.5.



Figura 1.5. Esquema de los interrogantes estudiados en esta Tesis vinculados a los atributos y comportamientos de la larva y del adulto de *M. ruficauda* durante la localización del hospedador.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Recolección y mantenimiento de los insectos

Los desoves de *M. ruficauda* se colectaron directamente de la vegetación herbácea en pastizales asociados a campos de la Provincia de Buenos Aires, donde se practica la apicultura, ubicados en las localidades de Moreno (34° 46 S, 58° 93 W) y Pilar (34° 28 S, 58° 55 W). La recolección de los huevos se realizó en los meses de verano (enero a marzo) desde el 2008 hasta el 2013. Para obtener los desoves, se cortó la rama seca o soporte y se los almacenó aisladamente en tubos tipo Falcon de 30 ml hasta el nacimiento de las larvas. Inmediatamente luego de la eclosión de los huevos, las larvas recién nacidas se separaron individualmente en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml con papel de filtro húmedo como sustrato, o grupalmente en frascos con tierra como sustrato. Los tubos con larvas individuales y los frascos con varias larvas fueron mantenidos en oscuridad y a una temperatura de 25-28 °C hasta que las larvas parasitoides alcanzaron la edad y estadio específicos para los experimentos. En los procedimientos se utilizaron larvas provenientes de cada tipo de mantenimiento según los protocolos experimentales de cada experimento.

Por otra parte, los hospedadores, los gusanos blancos de la especie *C. signaticollis*, fueron recolectados de muestras de suelo tomadas en diferentes pastizales de las localidades Moreno, Pilar, Mercedes (34° 65 S, 59° 43 W) de la provincia de Buenos Aires y Núñez (34°32'S, 56°26'W) de la ciudad de Buenos Aires, Argentina, desde marzo a julio de los años 2008 a 2012. El muestreo se realizó al azar mediante pozos en el suelo de hasta 30 cm de profundidad. Cada larva fue identificada a nivel de especie en el laboratorio con la ayuda de la clave taxonómica de Alvarado (1980) y fue registrada para determinar si estaba parasitada. En todos los experimentos sólo se utilizaron los individuos sanos (ver capítulos 5 y 6). Los gusanos blancos se mantuvieron a temperatura ambiente del laboratorio en tubos negros (3 cm de radio, 5 cm de altura) llenos con tierra, y fueron alimentados semanalmente con pedazos de zanahoria fresca.

Experimentos de olfatometría

Dispositivos experimentales y procedimientos

Para realizar los experimentos de olfatometría en esta Tesis, se utilizaron dos olfatómetros desarrollados por Castelo (2003). Los olfatómetros utilizados se denominan de ambiente estacionario ya que no existe una corriente de aire en su interior que transporte los estímulos. Se ha visto que las larvas de *M. ruficauda* son muy sensibles a la desecación, dado que a partir de valores muy bajos de humedad relativa ambiente la mortalidad es elevada (M.K. Castelo, comunicación personal). Por otro lado, las larvas de este parasitoide viven durante todo su desarrollo dentro del suelo, donde no existen corrientes de aire. Es por estas razones que en esta Tesis se utilizaron olfatómetros donde los estímulos son transportados pasivamente por el gradiente que se forma en el aire durante el período de experimentación.

El primero de los olfatómetros, denominado “Extractos-Larvas”, utiliza extractos como estímulos y larvas parasitoides vivas como individuos experimentales. Consiste en una arena experimental de 9 x 5 x 1,5 cm en la cual se definen tres zonas equivalentes, dos laterales y una central. No lleva ninguna clase de división que delimite las zonas laterales, ya que se utilizan extractos o soluciones del hospedador. Durante los ensayos, en las zonas laterales se coloca un papel de filtro de 2 x 1 cm impregnado con 10 µl de la solución estímulo a probar (estímulo) y el solvente hexano (control) (Figura 2.1a). Se utiliza hexano como solución control ya que es el solvente utilizado para la obtención de los infoquímicos o estímulos haciendo homogenatos de los insectos (Castelo y Lazzari 2004).

El segundo olfatómetro, denominado “Extractos-Gusanos”, utiliza extractos como estímulos y gusanos vivos como individuos experimentales. Es similar al anterior pero con dimensiones acordes al sujeto experimental, la larva de estadio III de *C. signaticollis*. La arena experimental es de 13 x 8 x 2 cm. Durante los ensayos se coloca un papel de filtro de 3 x 2 cm en cada extremo de la arena, embebido con 40 µl de la solución estímulo o control (Figura 2.1b).

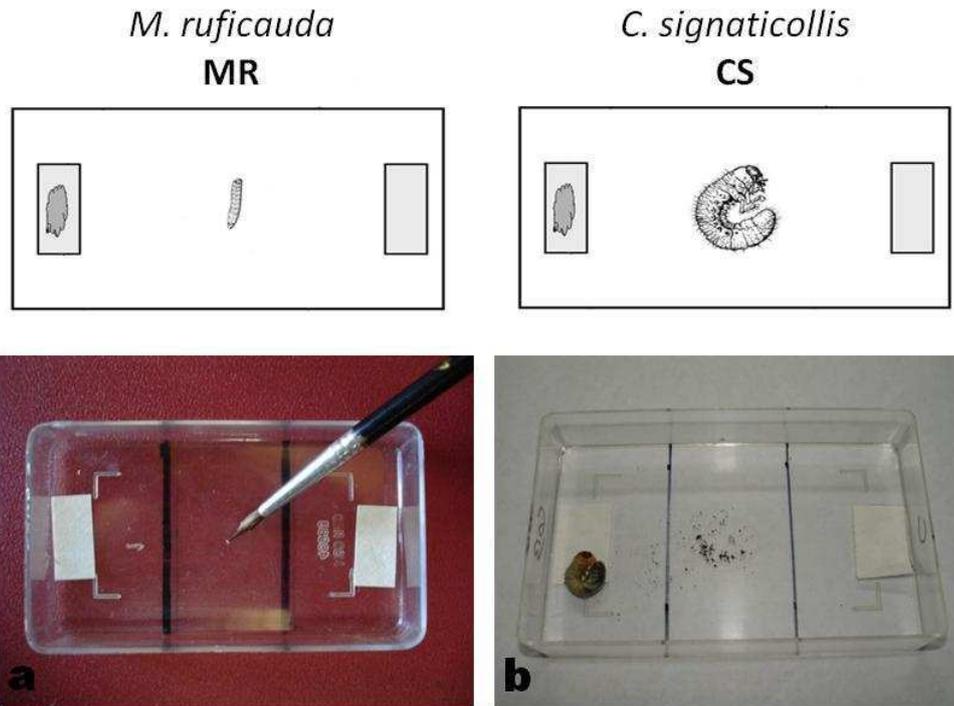


Figura 2.1. Dispositivos utilizados en los experimentos de olfatometría para la medición de las respuestas comportamentales. a) Olfatómetro “Extractos – Larvas”; b) Olfatómetro “Extractos – Gusanos”. Esquemas: Marcela K. Castelo. Fotografías: María Eugenia Barrantes, Hernán F. Groba.

En cada experimento, independientemente del olfatómetro utilizado, el procedimiento consistió en liberar al sujeto experimental en el centro de la arena y, luego del tiempo determinado para cada sujeto experimental, registrar su posición. De esta manera, se pueden obtener tres respuestas posibles: elección por el estímulo (E), el control (C), o no decisión (ND) en el caso de que el individuo experimental se encontrara en la zona media. Luego de cada experimento, cada individuo se descarta y la arena experimental se limpia con detergente no iónico y agua, y se repasa con alcohol 96° para eliminar cualquier remanente de las claves químicas. Luego, se seca cada arena experimental con una corriente de aire para eliminar la humedad. Además, para los experimentos con ambos olfatómetros se realizó una serie control únicamente con el solvente hexano (C-C), es decir, con el solvente en ambos extremos de la arena experimental. Esto permitió detectar cualquier defecto inherente al dispositivo experimental.

Condiciones experimentales

Las condiciones ambientales pueden tener influencia sobre el comportamiento de los insectos (Ahmad 1936; Roitberg et al. 1993; Gillot 2005; Amat et al. 2006). Para los parasitoides, en

trabajos previos se ha demostrado que las condiciones ambientales pueden advertir a los individuos adultos sobre el advenimiento de una tormenta, hecho que está asociado con un posible riesgo de muerte (Roitberg et al. 1993; Amat et al. 2006). En *M. ruficauda*, se realizaron estudios donde se observó la relación entre los cambios de la presión barométrica y el comportamiento de orientación de la larva de estadio II. Estos estudios revelaron que las larvas dejan de orientarse hacia el hospedador cuando la presión desciende abruptamente (Crespo y Castelo 2012). Por lo tanto, los rangos de presión y temperatura bajo los cuales se realizaron los experimentos con las larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* fueron aquellos en los cuales los insectos mostraron un comportamiento de orientación en experimentos previos (Castelo y Lazzari 2004; Crespo y Castelo 2008; Crespo y Castelo 2012). Todos los experimentos fueron realizados entre las 10:00 y las 17:00 hs bajo condiciones de laboratorio ($25,8 \pm 4,6^{\circ}\text{C}$; $54 \pm 14\%$ humedad relativa), en días donde la presión barométrica ambiental se encontraba entre los 1008–1027,4 hPa. Con el fin de mantener la humedad relativa elevada en la arena experimental se colocó en la tapa del olfatómetro “Extractos-Larvas” un papel de filtro húmedo a saturación, del mismo tamaño que la tapa, para los experimentos con parasitoides, debido a la sensibilidad a la desecación que poseen las larvas de *M. ruficauda*. Además, los experimentos se realizaron bajo oscuridad de manera de mantener condiciones experimentales similares a las condiciones naturales, debido a que ambas especies de insectos viven bajo tierra (ver *Introducción General*).

Obtención de estímulos del hospedador

En los experimentos de olfatometría se utilizaron como estímulos extractos de gusanos blancos de la especie *C. signaticollis* de tercer estadio. Los estímulos de los hospedadores se obtuvieron de extractos provenientes de los gusanos blancos, a partir de aislar diferentes partes de la porción del cuerpo del hospedador donde se almacenan o producen las claves atractivas (Castelo y Lazzari 2004). A cada larva del tercer estadio se la dispuso 5 minutos en un freezer para su adormecimiento y posterior manipulación. Para obtener los compuestos químicos atractivos presentes en las estructuras de la región abdominal, se realizaron

disecciones y macerados con mortero de vidrio de las porciones aisladas del cuerpo de las larvas del hospedador (Castelo y Lazzari 2004). Con el objeto de mantener la variabilidad natural de los individuos y diluir los posibles efectos dependientes del estado fisiológico de los insectos procesados que pudieran afectar a la clave química, se realizaron extractos utilizando de 10 a 20 gusanos blancos. La extracción química de los compuestos se realizó utilizando hexano, un solvente apolar, debido a la naturaleza química de los infoquímicos involucrados en este sistema parasitoide – hospedador (Castelo y Lazzari 2004). Dependiendo del tipo de estímulo utilizado los protocolos de extracción variaron, siendo informados en los capítulos correspondientes.

Los extractos fueron mantenidos en el freezer para evitar su degradación, mantener sus cualidades y para impedir la evaporación del solvente y el consecuente incremento de la concentración.

Descripciones morfológicas e histológicas

Se realizaron descripciones morfológicas de las antenas de los adultos y de los estadios larvales I y II de *M. ruficauda*, e histológicas del tubo digestivo de las larvas de estadio III de *C. signaticollis*. Con este fin se procedió a procesar el material utilizando diferentes protocolos y técnicas histológicas, las cuales se describen en los capítulos pertinentes. Las observaciones y descripciones del material se realizaron a partir de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Para completar las descripciones se tomaron fotografías digitales.

Análisis estadísticos

En todos los experimentos de la Tesis, que permitieron evaluar la respuesta comportamental de orientación de las larvas de *M. ruficauda* y de las larvas de *C. signaticollis* hacia los estímulos olfativos, se utilizó la misma metodología de análisis de datos. En cada experimento

se evaluó la preferencia de los insectos por cada zona de la arena experimental (estímulo o control). Se cuantificó el número de individuos presentes en cada extremo del dispositivo experimental y se comparó contra una distribución al azar mediante una prueba de bondad de ajuste de χ^2 (análisis de tabla de contingencia de una vía) (Rosner 1995; Sokal y Rohlf 1969; Zar 2010). Los individuos que permanecieron en la zona central de la arena (ND) fueron excluidos del análisis.

Para el resto de los procedimientos y experimentos, los análisis estadísticos utilizados se describen en detalle en cada capítulo experimental de la Tesis.

CAPÍTULO 3

DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS ANTENALES DEL ADULTO DE *Mallophora ruficauda*

Este capítulo dio origen a la siguiente publicación: GROBA, HF; LAURIA DE CIDRE LS & CASTELO, MK, 2013. Description of antennal structures of the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) and its relationship with resources searching behaviour. En *Zoomorphology* DOI: 10.1007/s00435-013-0212-5.

Introducción

La localización de recursos involucra la detección de diferentes señales o claves provenientes del ambiente que son detectadas por los individuos a través de los órganos sensoriales. En los insectos, la unidad estructural y funcional que participa en la recepción sensorial se denominada sensilia, la cual tiene la capacidad de detectar diferentes tipos de estímulos, tales como mecánicos, químicos, térmicos o de humedad (Zacharuk 1980; Eaton 1985; Kaissling 1986; Snodgrass 1997; Ryan 2002; Chapman 2013). En los insectos adultos, las antenas son importantes órganos sensoriales que presentan diferentes tipos de sensilias capaces de detectar diferentes estímulos, los cuales son importantes a lo largo de la vida en la localización del hábitat, búsqueda de pareja, evitación de predadores y localización de recursos (Quicke 1997; Snodgrass 1997; Ryan 2002; Sato y Touhara 2009; Chapman 2013). Particularmente en los parasitoides, las antenas son importantes en la localización del hospedador en el proceso de búsqueda del hábitat y microhábitat, la detección, discriminación y aceptación del hospedador, y selección del sitio de oviposición (Vet et al. 1995; Roux et al. 2005; Da Rocha 2007; Gao et al. 2007; Onagbola y Fadamiro 2008; Dweck 2009; Romani et al. 2010; Wang et al. 2010; Das et al. 2011; Obonyo et al. 2011; Xi et al. 2011; Zhou et al. 2011, 2013). Comúnmente, durante la búsqueda del hospedador, los parasitoides utilizan claves olfativas y/o gustativas, dependiendo del hábitat que exploten (Vet y Dicke 1992; Turlings et al. 1995; Roux et al. 2005; Da Rocha 2007; Gao et al. 2007; Onagbola y Fadamiro 2008; Dweck 2009; Das et al. 2011; Obonyo et al. 2011). Por tanto, el estudio de la morfología de las antenas y del tipo y estructura de las sensilias que estas presentan es importante en la comprensión de las diferencias de comportamiento entre especies parasitoides (Turlings et al. 1995; Roux et al. 2005; Da Rocha 2007; Gao et al. 2007; Van Baaren et al. 2007; Onagbola y Fadamiro 2008; Das et al. 2011; Xi et al. 2011).

Los parasitoides del orden Hymenoptera durante la localización de los hospedadores utilizan diferentes tipos de claves. Una vez que encuentran al hospedador, las hembras depositan sus huevos dentro o sobre el hospedador (Van Alphen y Vet 1986; Godfray 1994; Quicke 1997).

Por el contrario, muchos parasitoides dípteros presentan una búsqueda del hospedador compartida donde la hembra localiza el hábitat, deposita sus huevos en algún sustrato, y luego las larvas realizan la búsqueda activa del hospedador y se produce el encuentro (Godfray 1994; Feener Jr. y Brown 1997; Fournet et al. 2001; Brodeur y Boivin 2004; Ho et al. 2011; Trautwein et al. 2011; Boivin et al. 2012; Ichiki et al. 2012; Goubert et al. 2013; Wiman y Jones 2013). Se estima que las hembras parasitoides que cuentan con este tipo de estrategia de búsqueda pueden incrementar la probabilidad de encuentro entre el hospedador y la larva parasitoide si son capaces de detectar la presencia del hospedador en el ambiente a diferentes escalas espaciales a través de claves olfativas. Sin embargo, relativamente poca información existe en parasitoides dípteros sobre la estructura de las antenas y la morfología de los receptores olfativos involucrados en este comportamiento (Giangiuliani et al. 1994; Rahal et al. 1996; Abouzied 2008; Chen y Fadamiro 2008). Más aun, la información sobre parasitoides con comportamiento de búsqueda compartida del hospedador y pertenecientes a la familia Asilidae es extremadamente escasa.

Estudios ecológicos de campo realizados en *M. ruficauda* (Diptera: Asilidae) sugieren que los sitios de oviposición podrían estar asociados a claves relacionadas a la presencia del hospedador en el ambiente, proponiendo que el comportamiento de oviposición es desencadenado por claves químicas provenientes de la alimentación de las larvas de *C. signaticollis* sobre las raíces de las plantas (Castelo y Capurro 2000; Castelo 2003; Nussenbaum 2007; Castelo y Corley 2010), como ha sido sugerido para otras especies de asilidos (Kershaw 1912; Hardy 1929). No obstante, otros trabajos sugieren que las claves químicas no estarían asociadas al comportamiento de oviposición debido a que las hembras de *M. ruficauda* frecuentemente depositan sus desoves sobre plantas secas y soportes artificiales como son los alambrados. Además, estos trabajos demostraron que la altura de los sustratos es uno de los factores principales en la selección del sitio de oviposición (Castelo y Corley 2004; Castelo et al. 2006). Sin embargo, las hembras de *M. ruficauda* podrían estar utilizando diferentes tipos de claves durante el comportamiento de búsqueda como ocurre en otras especies de parasitoides (Godfray 1994; Vet et al. 1995; Feener Jr. y Brown 1997; Stireman III

2002; Stireman III et al. 2006; Ichiki et al. 2012; Goubert et al. 2013). Entonces, a gran escala las claves químicas podrían ser importantes en la localización de los parches de hospedadores, mientras que a escala pequeña la altura del sitio de oviposición maximizaría el encuentro con el hospedador (Castelo et al. 2006). No obstante, no existen estudios que reporten si las antenas de los adultos de *M. ruficauda* presentan receptores que sean capaces de detectar claves químicas y que avalen esta hipótesis.

Las antenas de los insectos están compuestas por tres principales partes: un escapo proximal, un pedicelo y distalmente un flagelo dividido en varias partes denominadas flagelómeros (Snodgrass 1997; Sato y Touhara 2009; Hu et al. 2010; Romani et al. 2010; Hansson y Stensmyr 2011; Wang et al. 2012; Chapman 2013; Zhang et al. 2013a, b). Generalmente se ha observado que el escapo y pedicelo muestran sensilias u órganos mecanosensoriales, mientras que el flagelo exhibe la mayoría de las sensilias olfativas (McAlpine 1981; Hu et al. 2010; Hansson y Stensmyr 2011; Wang et al. 2012; Chapman 2013; Zhang et al. 2013a, b). En el suborden Brachycera, donde pertenece la familia Asilidae, el primer flagelómero (postpedicelo o funículo) presenta fosetas sensoriales y la mayoría de las sensilias están vinculadas a la detección de compuestos químicos volátiles (Hallberg et al. 1984; Stocker 1994; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2002; Wasserman y Itagaki 2003; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontason et al. 2004, 2007; Chen y Fadamiro 2008; Smallengange et al. 2008; Sukontason et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009; Hu et al. 2010; Poddighe et al. 2010; Bisotto-de-Oliveira et al. 2011; Setzu et al. 2011; Wang et al. 2012; Zhang et al. 2013a, b). Particularmente en los asilidos, las antenas están compuestas por cuatro segmentos: el escapo y pedicelo, los cuales presentan setas gruesas; y dos flagelómeros, el postpedicelo pubescente y sin setas, y el estilo mono o bisegmentado (Wood 1981; Yeates 2002). Sin embargo, no hay información disponible en la literatura acerca de la morfología, composición y estructura de las sensilias antenales de este grupo.

En el presente capítulo se describe la morfología externa de la antena de las hembras y los machos de *M. ruficauda* utilizando técnicas de microscopía óptica (MO) y de microscopía

electrónica de barrido (MEB). En particular se estudiarán las sensilias olfativas del postpedicelo y se comparará el tipo, tamaño y densidad de otras estructuras cuticulares entre los sexos. Este conocimiento proveerá la base morfológica necesaria para entender el proceso de localización del hospedador en el adulto de este parasitoide.

Materiales y Métodos

Insectos

Los adultos de *M. ruficauda* fueron colectados en pastizales cercanos a colmenares de la localidad de Moreno (Buenos Aires, Argentina), durante los meses de enero y febrero de 2008. Una vez en el laboratorio los individuos fueron anestesiados con CO₂ y posteriormente fijados en alcohol 80%.

Morfología de la antena

Con el objeto de caracterizar la morfología general de la antena de los adultos de *M. ruficauda*, se realizaron preparaciones totales para microscopía óptica (MO) (Figura 3.1a). Para ello, se hicieron disecciones de las antenas de seis hembras y seis machos, las cuales fueron hidratadas convencionalmente a partir de una serie gradual de alcoholes hasta llegar a agua corriente. A continuación, las antenas fueron colocadas en peróxido de hidrógeno (agua oxigenada 30% v/v) durante 48 horas y luego deshidratadas gradualmente en alcoholes hasta llegar a etanol 100%. Por último, las antenas fueron secadas durante 3 minutos en estufa, aclaradas en xilol (15 a 30 minutos), y montadas utilizando como medio de montaje DPX. Posteriormente, las preparaciones fueron observadas mediante un microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star.

Se realizaron mediciones de las antenas utilizando fotografías digitales que se obtuvieron mediante una cámara acoplada al microscopio. Para cada par de antenas de un individuo se

midió el largo total, el largo y ancho máximo de los diferentes segmentos de cada antena (derecha e izquierda), el área total del postpedicelo, el número total y el largo y ancho máximo de las fosetas sensoriales. Las medidas fueron obtenidas a partir de programas específicos de procesamiento y medición de imágenes (Golden Ratio 1.1, <http://www.markuswelz.de>; ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>; Adobe Photoshop CS2 v 9.0.2).

Descripción de las estructuras cuticulares

Para analizar la composición, el tamaño y el arreglo espacial de las sensillas y otras estructuras cuticulares, se realizaron preparados de las antenas para microscopía electrónica de barrido (MEB) utilizando un protocolo para especies de dafnias modificado de Laforsch y Tollrian (2000) (Figura 3.1b). Se utilizó esta técnica debido a que el protocolo estándar que utiliza secado en punto crítico puede alterar las estructuras a analizar (Laforsch y Tollrian 2000).

Las cabezas de siete hembras y siete machos fueron disecadas e hidratadas hasta agua destilada, y luego fueron colocadas en una solución de detergente no iónico (0,3% v/v; Biopack®, Argentina) durante 30 minutos. Posteriormente, fueron enjuagadas utilizando un sonicador (~20 kHz) durante 2,5 minutos, con el fin de eliminar partículas no deseadas, y deshidratadas en una serie gradual de agua destilada, etanol 50% y 70%, durante 30 minutos por paso. Luego, las antenas fueron separadas de la cabeza y se prosiguió con la deshidratación en una serie de etanol 80%, 90%, 96% (x2) y 100% (x2) durante 25 minutos por paso. Para completar la deshidratación de las muestras y evitar la deformación de las estructuras cuticulares, cada par de antenas fue colocado en un vial de vidrio de 12 ml con 4 ml de hexametildisilazano (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano; Sigma-Aldrich, Argentina) durante 50 minutos. Luego, aproximadamente el 90% del hexametildisilazano fue retirado y se prosiguió con la evaporación del compuesto durante toda la noche en condiciones anhidras en un desecador con sílica gel bajo campana. Posteriormente al secado, las antenas fueron montadas en tacos de aluminio utilizando cinta carbón y fueron recubiertas con oro-paladio. Los preparados fueron examinados y fotografiados mediante un MEB Carl Zeiss Supra 40

perteneciente al servicio del Centro de Microscopia de Avanzada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). La terminología empleada y clasificación de los tipos de sensilias se realizó en base a la morfología y ultraestructura cuticular, y fueron comparadas con las sensilias ya descritas en la bibliografía (Zacharuk 1980; Wood 1981; Snodgrass 1997; Ryan 2002; Chapman 2013). De cada estructura cuticular hallada en las antenas se determinó el tipo, la longitud y la densidad.

Para la identificación de las estructuras cuticulares, y la estimación de la longitud y densidad de cada una, se utilizaron fotografías digitales correspondientes a un área de 0,007 mm² de la antena. Por ser el funículo o postpedicelo el segmento que exhibe la mayoría de las sensilias olfativas en los insectos, las mediciones se realizaron sólo en este artejo de la antena de los adultos de *M. ruficauda* (Chapman 2013). Se definieron y fotografiaron tres zonas en el postpedicelo: zonas proximal, medial y distal. Por cada individuo se obtuvo un dato promedio de la longitud y de la densidad de las estructuras halladas por zona del postpedicelo. La longitud de cada sensilia se definió como la distancia desde la base a la punta. El promedio de la longitud se estimó a partir de 15 datos de sensilias de cada zona del postpedicelo por individuo (hembras N=7, machos N=7). Para estimar la densidad de las sensilias se utilizó un cuadrado con un área equivalente a 400 µm², el cual podía moverse libremente por la fotografía. Este permitió calcular el número de estructuras por unidad de area submuestreando la fotografía digital. El promedio de la densidad de sensilias en cada zona del postpedicelo fue calculado a partir de 12 mediciones hechas en una de las antenas de cada individuo (hembras N=7, machos N=7). Durante el submuestreo, se garantizó que no hubiera superposición de los cuadrados utilizados entre observaciones, evitando la ocurrencia de pseudorreplicación. Las medidas fueron tomadas de la antena derecha o izquierda del individuo dependiendo de la posición o condición de las estructuras. Además, a partir de las fotografías de MO se midió la longitud y se contó la cantidad de setas presentes en el escapo y pedicelo. Para estas estructuras, se estimó el promedio de las mediciones obtenidas de ambas antenas de cada individuo.

Para estimar el número total de sensilias en el postpedicelo en ambos sexos, se calculó el producto entre la densidad promedio de sensilias presentes en todo el postpedicelo y del área total del postpedicelo, a partir de las imágenes obtenidas mediante MEB y de las fotografías de MO, respectivamente.

a) Microscopía Óptica (MO)



b) Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)



Figura 3.1. Esquema de metodología de obtención de los preparados de las antenas de *M. ruficauda* para microscopía. (a) Protocolo para microscopía óptica (MO). (b) Protocolo para microscopía electrónica de barrido (MEB).

Comparaciones de la morfología de las antenas

Con el objeto de determinar si existe heterogeneidad en la morfología de las antenas de los adultos de *M. ruficauda*, se analizó la longitud total y ancho máximo de la antena y de cada segmento, el área total del postpedicelo, y el número, ancho y longitud máxima de las fosetas sensoriales del postpedicelo, a partir de las imágenes obtenidas mediante MO. De cada medida, se calculó el promedio para cada individuo a partir de las observaciones obtenidas de ambas antenas (derecha e izquierda) y se evaluó si existen diferencias entre ambos sexos a partir de una prueba de *t* de dos colas (Zar 2010). Para analizar si existen diferencias entre sexos en el tamaño y arreglo espacial de las estructuras cuticulares del postpedicelo, se realizó un análisis de varianza con medidas repetidas (ANOVA-MR) para la longitud y densidad de las estructuras cuticulares. Esto permitió comparar al mismo tiempo entre zonas del postpedicelo (medidas repetidas) y entre sexos (Quinn y Keough 2002). En función de cumplir los diferentes

supuestos solicitados por cada prueba estadística, se transformaron las siguientes variables para poder ser analizadas: el área total del postpedicelo, el número, ancho y longitud máxima de las fosetas sensoriales, y la densidad de las microtriquias. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas estadísticos Infostat (Version 10.1, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y SPSS para Windows versión 17.0 (© SPSS, Inc., 2008, Chicago, IL, www.spss.com). Se consideró que existen diferencias significativas entre estadísticos cuando $P < 0,05$.

Resultados

Morfología de la antena

La antena de los adultos de *M. ruficauda* esta comprendida de proximal a distal por cuatro segmentos, el escapo (I), el pedicelo (II), el postpedicelo (III) y el estilo terminal (IV). La morfología de esta antena es semejante a la observada en otras especies de asilidos (Wood, 1981) (Figura 3.2).

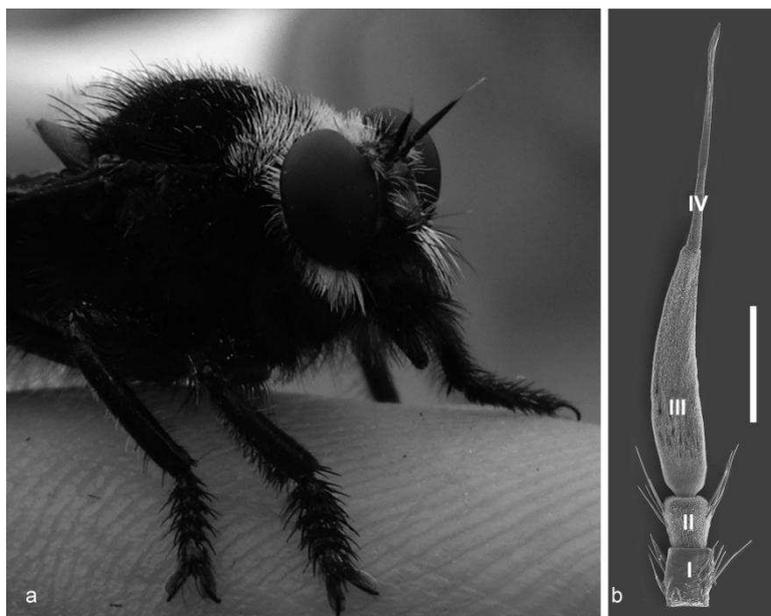


Figura 3.2. Morfología general de la antena de *M. ruficauda*. (a) Posición natural de la antena de adulto. (b) Microfotografía en MEB de la antena. I = escapo, II = pedicelo, III = postpedicelo, IV = estilo terminal. Escala = 500 μm .

El escapo es un segmento que presenta dos grupos de setas ventrales y dorsales, que se caracterizan por poseer una base articulada y una superficie cuticular con grandes hendiduras longitudinales (Figura 3.2). No se observaron diferencias significativas entre sexos para las mediciones de este segmento (Tabla 3.1). El pedicelo, al igual que el escapo, presenta dos grupos de setas, pero en contraste muestra una cobertura homogénea de pelos denominados microtriquias (Figura 3.2). Se observó que las hembras poseen un pedicelo más ancho que los machos ($t_{(0,025,10)} = 2,98$, $N = 12$, $P = 0,014$), pero no se observó ninguna diferencia en la longitud máxima ($t_{(0,025,10)} = 1,17$, $N = 12$, $P = 0,27$) (Tabla 3.1). El postpedicelo es más largo que el escapo y pedicelo (Figura 3.2, Tabla 3.1), y presenta un mayor ancho máximo en las hembras que en los machos ($t_{(0,025,10)} = 3,44$, $N = 12$, $P = 0,006$) (Tabla 3.1). El estilo terminal es un segmento rígido el cual carece de cualquier tipo de estructura ya mencionada, siendo de mayor longitud en hembras que en machos ($t_{(0,025,10)} = 2,43$, $N = 12$, $P = 0,036$) (Figura 3.2, Tabla 3.1). Tanto hembras como machos mostraron antenas sin dimorfismo sexual aparente. Tampoco se observaron diferencias en la longitud total y ancho máximo de la antena entre sexos (Tabla 3.1). En lo que respecta a las estructuras cuticulares observadas a lo largo de toda la antena se pudieron identificar setas, microtriquias, sensilias basicónicas multiporosas, sensilias tricoideas uniporosas y varias fosetas sensoriales (Figuras 3.3 y 3.4).

Descripción de estructuras cuticulares

El postpedicelo presenta cuatro tipos de estructuras cuticulares orientadas en dirección al estilo terminal de la antena, las cuales son las microtriquias, las sensilias basicónicas multiporosas, las sensilias tricoideas uniporosas y las fosetas sensoriales (Figura 3.3 y 3.4).

La superficie entera del postpedicelo se encuentra densamente cubierta por microtriquias, estructuras tipo pelo carentes de poros que presentan una inserción inflexible y ocasionalmente pueden estar ramificadas (Figura 3.3). Las microtriquias se encuentran distribuidas a lo largo de las zonas proximal, medial y distal del postpedicelo, siendo de mayor longitud en las zonas medial y distal tanto en hembras como en machos ($F_{zona(2,24)} = 51,71$, $P < 0,0001$; $F_{sexo(1,12)} =$

2,50, $P = 0,14$; Tabla 3.2). Con respecto a la densidad de las microtriquias, se observó que va decreciendo a lo largo de las tres zonas de postpedicelo en ambos sexos, siendo mas densas en los machos que en las hembras ($F_{zona(2,24)} = 67,79$, $P < 0,0001$; $F_{sexo(1,12)} = 9,60$, $P = 0,009$; Tabla 3.2).

Tabla 3.1. Medidas de los segmentos antenales de *M. ruficauda*. El rango de medidas es seguido, entre paréntesis, por la media y el desvío estándar. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (Prueba de *t* para muestras independientes, $P < 0,05$). Todas las medidas están expresadas en mm, con excepción del área del postpedicelo que se encuentra en mm².

	Medidas	♀	♂	<i>t</i> ; <i>P</i>
Antena	Longitud máxima	2,49 – 3,10 (2,88 ± 0,22)	2,17 – 3,04 (2,70 ± 0,34)	1,11 ; 0,293
	Ancho máximo	0,27 – 0,30 (0,29 ± 0,01)	0,21 – 0,31 (0,26 ± 0,04)	1,82 ; 0,139
Escapo (I)	Longitud máxima	0,33 – 0,42 (0,38 ± 0,01)	0,26 ± 0,40 (0,33 ± 0,05)	1,87 ; 0,090
	Ancho máximo	0,27 – 0,30 (0,29 ± 0,01)	0,21 – 0,31 (0,26 ± 0,04)	1,82 ; 0,139
Pedicelo (II)	Longitud máxima	0,25 – 0,29 (0,27 ± 0,02)	0,20 – 0,28 (0,26 ± 0,03)	1,17 ; 0,270
	Ancho máximo	0,22 – 0,25 (0,24 ± 0,01)	0,16 – 0,24 (0,20 ± 0,02)	2,98 ; 0,014 *
Postpedicelo (III)	Longitud máxima	1,02 – 1,27 (1,17 ± 0,09)	0,88 – 1,33 (1,14 ± 0,18)	0,42 ; 0,686
	Ancho máximo	0,26 – 0,28 (0,26 ± 0,01)	0,20 – 0,26 (0,23 ± 0,02)	3,44 ; 0,006 *
	Área	0,43 – 0,54 (0,46 ± 0,04)	0,33 – 0,57 (0,44 ± 0,09)	0,30 ; 0,768
Estilo terminal (IV)	Longitud máxima	0,98 – 1,18 (1,07 ± 0,07)	0,82 – 1,04 (0,96 ± 0,08)	2,43 ; 0,036 *
	Ancho máximo	0,046 – 0,059 (0,052 ± 0,005)	0,038 – 0,059 (0,048 ± 0,007)	1,30 ; 0,223

Tabla 3.2. Medidas de las estructuras cuticulares del postpedicelo de la antena de *M. ruficauda*. El rango de medidas es seguido, entre paréntesis, por la media y el desvío estándar. La longitud está expresada en μm . La densidad se define como número de estructuras cuticulares por μm^2 . La misma letra señala que las medidas no presentan diferencias significativas entre ellas. Las letras diferentes expresan diferencias estadísticamente significativas donde A-B es entre sexos (ANOVA-MR, $P < 0,05$), a-c es entre zonas (ANOVA-MR comparaciones de a pares, $P < 0,05$), X-Y es entre sexos (Prueba de t para muestras independientes, $P < 0,05$), y x-y es entre zonas (Prueba de t para muestras pareadas, $P < 0,05$).

Sexos		♀			♂		
		Zonas del postpedicelo	PROXIMAL	MEDIAL	DISTAL	PROXIMAL	MEDIAL
Microtriquias	Longitud	19,8 – 24,9 (22,2 ± 1,8)Aa	24,6 – 30,6 (27,3 ± 2,5)Ab	23,6 – 31,0 (26,1 ± 2,5)Ab	17,6 – 24,3 (20,3 ± 2,1)Aa	22,0 – 28,8 (25,5 ± 2,2)Ab	21,8 – 29,3 (24,8 ± 2,4)Ab
	Densidad	0,0254 – 0,0464 (0,0347 ± 0,0078)Aa	0,0196 – 0,0260 (0,0249 ± 0,0021)Ab	0,0177 – 0,0229 (0,0202 ± 0,0016)Ac	0,0307 – 0,0467 (0,0413 ± 0,0054)Ba	0,0208 – 0,0310 (0,0248 ± 0,0035)Bb	0,0198 – 0,0256 (0,0222 ± 0,0022)Bc
Sensilias Basicónicas	Longitud	-	13,7 – 17,4 (15,2 ± 1,4)Xx	14,0 – 17,9 (15,6 ± 1,5)Xx	-	13,8 – 16,0 (14,7 ± 0,8)Xx	13,9 – 16,1 (14,9 ± 0,8)Xx
	Densidad	-	0,0066 – 0,0098 (0,0084 ± 0,0010)Xx	0,0055 – 0,0092 (0,0078 ± 0,0012)Xx	-	0,0069 – 0,0140 (0,0104 ± 0,0023)Xx	0,0054 – 0,0125 (0,0085 ± 0,0025)Xx

Las setas se encuentran agrupadas en el margen dorsal y ventral del escapo y pedicelo (Figura 3.2). En el escapo, se encuentran en grupos que van desde 8 a 17 setas en hembras ($13,5 \pm 1,8$, $N = 6$) y de 9 a 19 setas en machos ($13,1 \pm 3,0$, $N = 5$). En las hembras, estas estructuras tienen una longitud de 0,18 a 0,22 mm ($0,20 \pm 0,01$ mm, $N = 6$), mientras que en los machos la longitud es de 0,15 a 0,22 mm ($0,19 \pm 0,03$ mm, $N = 5$). Por otro lado, en el pedicelo, las setas se encuentran también en dos grupos, uno en el margen dorsal y otro en el ventral. En hembras se observan en grupos de 3 a 6 unidades ($4,9 \pm 0,4$, $N = 6$) con una longitud que va desde 0,21 a 0,25 mm ($0,23 \pm 0,01$ mm, $N = 6$). En los machos, las setas se agrupan de 3 a 7 unidades ($4,4 \pm 0,29$, $N = 5$) y tienen una longitud de 0,16 a 0,28 mm ($0,21 \pm 0,05$ mm, $N = 5$). Con el objeto de determinar si el número y/o longitud de las setas es un carácter sexualmente dimórfico, se compararon ambas medidas entre sexos mediante una prueba de t para muestras independientes. Sólo se observaron diferencias significativas para el número de setas presentes en el pedicelo entre los sexos ($t_{(0,025,9)} = 2,38$, $N = 11$, $P = 0,04$), mientras que el número y la longitud de las setas del escapo, y la longitud de las setas del pedicelo mostraron ser similares estadísticamente entre sexos (número de setas en el escapo: $t_{(0,025,9)} = 0,28$, $N = 11$, $P = 0,79$; longitud en el escapo: $t_{(0,025,9)} = 0,62$, $N = 11$, $P = 0,55$; largo en el pedicelo: $t_{(0,025,9)} = 1,05$, $N = 11$, $P = 0,34$).

Las sensilias basicónicas están regularmente distribuidas entre las microtriquias y presentan una forma de clava que se angosta abruptamente en la punta. Cada sensilia presenta una base no flexible y su pared cuticular está provista de poros uniformemente distribuidos (Figura 3.4). Estas sensilias sólo se encuentran en la zona medial y distal del postpedicelo (Tabla 3.2, Figura 3.4), con un total de 3.700 sensilias en las hembras y 4.300 en machos. La densidad promedio de estas sensilias en las hembras es de 0,0084 por μm^2 en la zona medial y de 0,0078 por μm^2 en la zona distal, mientras que en los machos es de 0,0104 por μm^2 y de 0,0085 por μm^2 , respectivamente (Tabla 3.2). El promedio de densidad en el postpedicelo es de 0,0081 sensilias por μm^2 en hembras, y de 0,0094 en machos. No se observaron diferencias significativas en la longitud (Hembras: $t_{(0,025,6)} = -1,63$, $N = 7$, $P = 0,15$; Machos: $t_{(0,025,6)} = -0,88$, $N = 7$, $P = 0,41$), ni en la densidad (Hembras: $t_{(0,025,6)} = 0,97$, $N = 7$, $P = 0,37$; Machos: $t_{(0,025,6)} =$

1,52, $N = 7$, $P = 0,18$) de las sensilias basicónicas entre las zonas muestreadas para cada sexo. Tampoco se observaron diferencias significativas en la longitud (zona medial: $t_{(0,025,12)} = 0,87$, $N = 14$, $P = 0,42$, zona distal: $t_{(0,025,12)} = 0,94$, $N = 14$, $P = 0,38$) ni en la densidad (zona medial: $t_{(0,025,12)} = -2,05$, $N = 14$, $P = 0,06$, zona distal: $t_{(0,025,12)} = -0,60$, $N = 14$, $P = 0,56$) entre sexos para cada zona.



Figura 3.3. Fotografías digitales de la antena de *M. ruficauda*. (a) Microfotografía en MEB mostrando el postpedicelo (escala = 150 μm). (b) Microfotografía en MO de la cara externa del postpedicelo mostrando las fosetas sensoriales (ov, oval; nb, nube) (escala = 70 μm). (c) Microfotografía en MO de la cara interna del postpedicelo mostrando las fosetas sensoriales (sc, saco) (escala = 70 μm). (d) Detalle de una foseta sensorial (escala = 8 μm). (e) Disposición agrupada de las sensilias tricoideas en la zona proximal de la región latero-ventral del postpedicelo (escala = 100 μm).

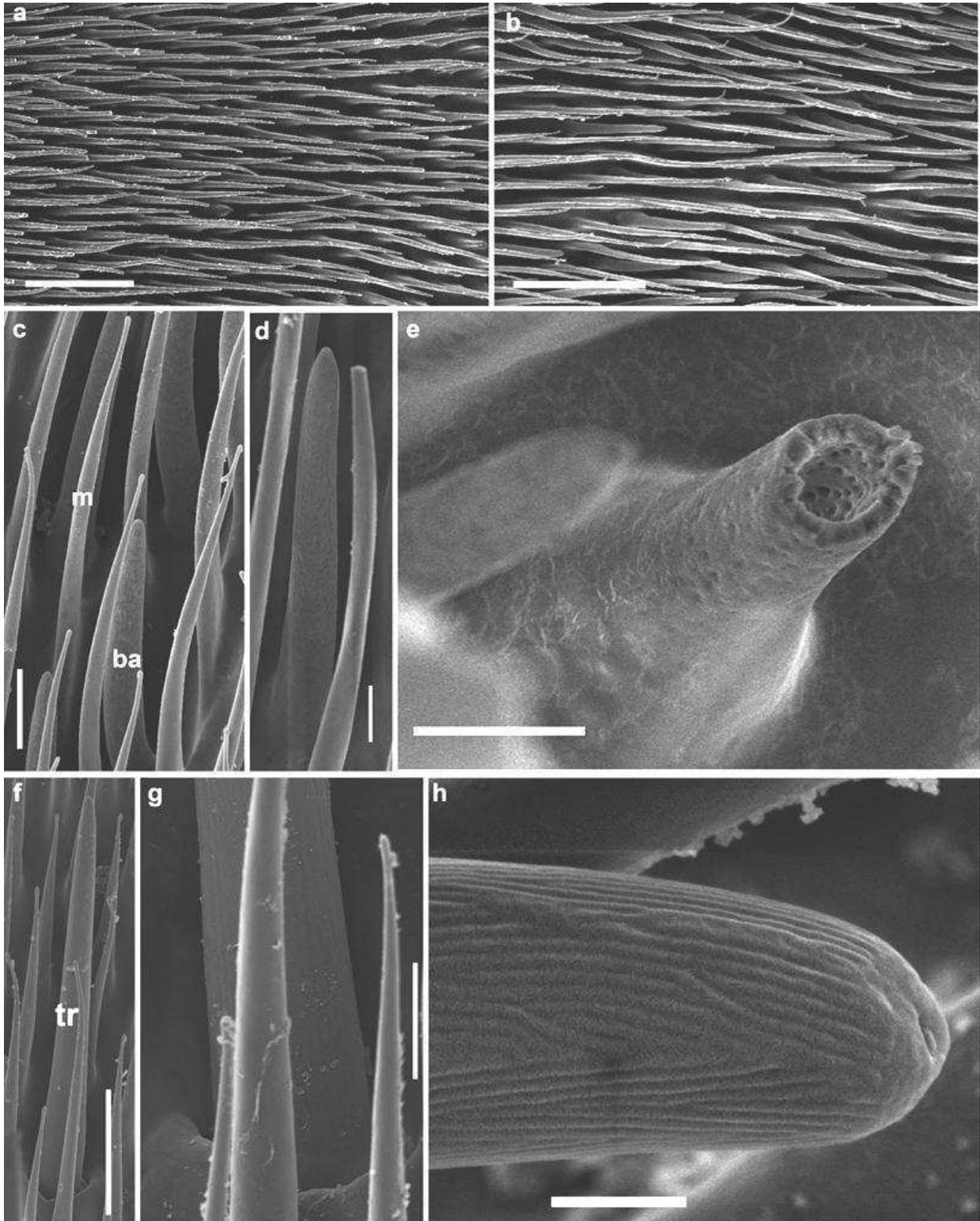


Figura 3.4. Microfotografías en MEB del postpedicelo de *M. ruficauda*. (a) Superficie cuticular de la zona proximal (escala = 20 μm). (b) Superficie cuticular de la zona medial (escala = 20 μm). (c) Detalle de superficie cuticular del postpedicelo mostrando microtriquias (m) y sensilias basicónicas (ba) (escala = 4 μm). (d) Detalle de superficie de sensilia basicónica mostrando los poros (escala = 1 μm). (e) Corte transversal de sensilia basicónica (escala = 2 μm). (f) Sensilia tricoidea (tr) (escala = 10 μm). (g) Detalle de inserción flexible de la sensilia tricoidea (escala = 3 μm). (h) Detalle de la punta de sensilia tricoidea (escala = 500 nm).

Las sensilias tricoideas se localizan en la zona proximal, agrupadas de 6 a 8 en la región latero-ventral en ambos sexos ($t_{0,025,7} = -0,59$, $N = 9$, $P = 0,57$). Estas sensilias presentan un poro en la punta, una pared estriada y una base flexible. Su longitud promedio es de $43,74 \pm$

2,81 μm (N = 4) en las hembras y de $40,67 \pm 3,48 \mu\text{m}$ (N = 5) en machos ($t_{0,025,7} = -0,04$, N = 9, $P = 0,97$) (Figuras 3.3 y 3.4f, g, h).

Las fasetas sensoriales se distribuyen desde la zona proximal hacia la medial en el postpedicelo de ambos sexos (Figuras 3.3a, b, c). A partir de los datos obtenidos por MO se observaron tres tipos morfológicamente diferentes de fasetas, las cuales se clasificaron en tipo saco, nube y oval (Figuras 3.3b, c) Estas se encuentran en mayor cantidad en la cara interna de las antenas (Figura 3.3). No existen diferencias significativas en el número, la longitud y ancho máximo de cada tipo de fasetas entre hembras y machos (Tabla 3.3). Las observaciones mediante MEB no permitieron diferenciar los diferentes tipos morfológicos de fasetas, pero mediante esta técnica se encontraron sensilias basicónicas multiporosas dentro de ellas (Figura 3.3d).

Tabla 3.3. Medidas de las fasetas sensoriales del postpedicelo de la antena de *M. ruficauda*. El rango de medidas es seguido, entre paréntesis, por la media y el desvío estándar. La longitud y el ancho están expresados en μm .

FOSETAS		♀	♂	<i>t</i> ; <i>P</i>
S A C O	Cantidad	11,00 – 17,50 (13,50 \pm 2,50)	9,50 – 17,00 (13,00 \pm 3,08)	-0,49 ; 0,637
	Longitud Máxima	24,57 – 41,06 (33,51 \pm 6,76)	27,23 – 39,00 (31,21 \pm 4,40)	-0,52 ; 0,617
	Ancho Máximo	21,63 – 33,82 (27,87 \pm 5,23)	19,74 – 27,83 (24,56 \pm 2,88)	-1,14 ; 0,282
O V A L	Cantidad	2,00 – 4,00 (2,83 \pm 0,82)	2,00 – 5,00 (2,92 \pm 1,16)	-0,04 ; 0,97
	Longitud Máxima	10,64 – 15,62 (13,19 \pm 1,82)	12,76 – 15,83 (14,15 \pm 1,10)	1,21 ; 0,25
	Ancho Máximo	9,46 – 17,14 (11,60 \pm 2,92)	10,37 – 14,10 (12,13 \pm 1,21)	0,85 ; 0,41
N U B E	Cantidad	9,00 – 12,00 (10,17 \pm 1,12)	7,50 – 11,50 (9,67 \pm 1,47)	-0,77 ; 0,46
	Ancho Máximo	21,69 – 28,54 (25,35 \pm 2,52)	23,42 – 35,65 (27,39 \pm 4,38)	0,96 ; 0,36

Discusión

En este capítulo se estudió la morfología de las antenas de los adultos de *M. ruficauda*, haciendo énfasis en las sensilias olfativas del postpedicelo. Los resultados muestran que los adultos de *M. ruficauda* presentan una antena comprimida con cuatro segmentos, los cuales concuerdan con los pocos estudios hechos sobre la morfología de las antenas de las especies de la familia Asilidae (Wood 1981; Yeates 2002). Con respecto a las estructuras cuticulares, se encontraron y describieron las setas, las microtriquias, las sensilias basicónicas multiporosas, las sensilias tricoideas uniporosas y las fosetas sensoriales. No se han encontrado reportes anteriores que describan estos tipos de estructuras en especies de la familia Asilidae. No obstante, las estructuras descritas en este trabajo son similares aquellas registradas en varias especies del suborden Brachycera, permitiendo pensar que existe un plan corporal general en referencia a las estructuras implicadas en la olfacción en las especies superiores del orden Diptera (Hallberg et al. 1984; Been et al. 1988; Itoh et al. 1991; Giangiuliani et al. 1994; Stocker 1994; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2002; Wasserman y Itagaki 2003; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontason et al. 2004, 2007, 2008; Abouzied 2008; Chen y Fadamiro 2008; Smallengange et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009; Poddighe et al. 2010; Bisotto-de-Oliveira et al. 2011; Setzu et al. 2011; Zhang et al. 2012).

Las setas descritas en las antenas de *M. ruficauda* se han observado en diferentes especies de dípteros (Ross y Anderson 1987; Been et al. 1988; Giangiuliani et al. 1994; Hunter y Adserballe 1996; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2002; Zhao y Kang 2002; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontason et al. 2004, 2007; Abouzied 2008; Chen y Fadamiro 2008; Smallengange et al. 2008; Sukontason et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009; Bisotto-de-Oliveira et al. 2011). En base a su morfología y estructura muchos autores han clasificado a estas sensilias como tricoideas (De Freitas Fernandes et al. 2004, Sukontason et al. 2004, 2007, Abouzied 2008), mientras que otros las han definido como sensilias caéticas (Bisotto-de-Oliveira et al. 2011). A pesar de estas diferencias, todos los autores están de acuerdo que estas sensilias tienen una función mecanosensorial y que pueden estar

involucradas en la orientación espacial de las antenas (Ross y Anderson 1987; Been et al. 1988; Giangliuliani et al. 1994; Hunter y Adserballe 1996; De Freitas Fernandes et al. 2002; Zhao y Kang 2002; De Freitas Fernandes et al. 2004; Abouzied 2008; Smallengange et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009). En *M. ruficauda*, estas sensilias podrían estar involucradas en la orientación espacial y además podrían tener una función importante durante la oviposición, dado que las hembras tocan el sustrato donde oviponen con sus antenas seleccionando de esta manera el micrositio de oviposición (M. Castelo, comunicación personal).

Las microtriquias que están presentes en el pedicelo y postpedicelo de *M. ruficauda*, son proyecciones de tipo pelo que muestran una morfología y estructura similar a las encontradas en otras especies del suborden Brachycera (Slifer y Sekhon 1964; Bay y Pitts 1976; Richards y Richards 1979; Hood Henderson y Wellington 1982; Mayo et al. 1987; Ross y Anderson 1987; Been et al. 1988; Giangliuliani et al. 1994; Hunter y Adserballe 1996; Rahal et al. 1996; Stocker 2001; De Freitas Fernandes et al. 2002; Zhao y Kang 2002; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontason et al. 2004, 2007; Chen y Fadamiro 2008; Smallengange et al. 2008; Sukontason et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009; Poddighe et al. 2010; Bisotto-de-Oliveira et al. 2011; Setzu et al. 2011; Zahng et al. 2012). Frecuentemente estas estructuras son denominadas espínulas, espinas o tricomas (Slifer y Sekhon 1964; Bay y Pitts 1976; Hood Henderson y Wellington 1982; Stocker 2001; Sukontanson et al. 2004, 2007; Chen y Fadamiro 2008). Sin importar la terminología, todos los autores están de acuerdo en que son proyecciones no inervadas de la cutícula sin aparente función sensorial (Bay y Pitts 1976; Mayo et al. 1987; Ross y Anderson 1987; Been et al. 1988; Giangliuliani et al. 1994; Hunter y Adserballe 1996; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2002; Zhao y Kang 2002; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontason et al. 2004, 2007; Chen y Fadamiro 2008; Smallengange et al. 2008; Sukontason et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009; Poddighe et al. 2010; Bisotto-de-Oliveira et al. 2011; Setzu et al. 2011; Zahng et al. 2012). Algunos autores han sugerido que posiblemente estas estructuras puedan modificar la corriente de aire que llega al funículo, enlenteciendo, dispersando y atrapando moléculas, permitiendo que se

incremente la concentración de los olores que llegan a las sensilias (Hood Henderson y Wellington 1982; Ross y Anderson 1987). Por tanto, la cubierta de microtriquias que reviste el postpedicelo podría aumentar la eficiencia en la olfacción en las especies de Brachycera debido a que, en contraste con otros insectos, estas estructuras sólo se encuentran en el postpedicelo de estas especies de insectos.

Ambos tipos de sensilias encontradas en el postpedicelo de *M. ruficauda* son consideradas quimiorreceptores por poseer poros en la cutícula, siendo las sensilias basicónicas multiporosas asociadas a la olfacción y las sensilias tricoideas uniporosas asociadas a una función táctil o gustativa (Slifer 1970; Zacharuk 1980; Ryan 2002). Como se describió previamente, ambas quimiosensilias han sido registradas generalmente en el postpedicelo de varias especies de insectos (Hallberg et al. 1984; Stocker 1994; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2002; Wasserman y Itagaki 2003; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontason et al. 2004, 2007; Chen y Fadamiro, 2008; Smallengange et al. 2008; Sukontanson et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009; Poddighe et al. 2010; Bisotto-de-Oliveira et al. 2011; Setzu et al. 2011).

Las sensilias basicónicas multiporosas encontradas en *M. ruficauda* son similares a aquellas halladas en otras especies de dípteros (Been et al. 1988; Itoh et al. 1991; Giangliuliani et al. 1994; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontanson et al. 2004, 2007; Abouzied 2008; Chen y Fadamiro 2008; Smallengange et al. 2008; Bisotto-de-Oliveira et al. 2011; Zhang et al. 2012). Estas sensilias han sido asociadas a la localización de recursos nutricionales y de lugares de oviposición en varias especies del orden Diptera. Particularmente, en dípteros parasitoides, estas sensilias han sido ligadas a la detección de claves químicas del hospedador (Been et al. 1988; Giangliuliani et al. 1994; Stocker 1994; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2004; Chen y Fadamiro 2008). En *M. ruficauda*, estas sensilias están distribuidas en ambas caras laterales del postpedicelo y serían el único tipo de sensilia involucrado en la detección de claves olfativas en esta especie. Por el contrario, la mayoría de los dípteros presentan varios subtipos de sensilias olfativas (Bay y Pitts 1976; Mayo et al. 1987;

Been et al. 1988; Hunter y Adserballe 1996; Rahal et al. 1996; De Freitas Fernandes et al. 2004; Sukontason et al. 2004, 2007; Chen y Fadamiro 2008; Setzu et al. 2011; Zahng et al. 2012). Se intentó identificar diferentes subtipos de sensilias a partir de la observación de la estructura interna de las mismas mediante preparados para microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, los preparados obtenidos no dieron resultados concluyentes debido a problemas en la metodología empleada. No obstante, basado en que sólo se encontró un tipo de sensilia olfativa, se puede sugerir que esta especie detectaría pocas sustancias químicas volátiles biológicamente relevantes, posiblemente sólo asociadas a los hospedadores.

Las sensilias tricoideas están caracterizadas por poseer un único poro y una inserción flexible indicando que este tipo de sensilia podría detectar compuestos químicos en superficie y estímulos mecánicos (Slifer 1970; Zacharuk 1980; Ryan 2002). No se han encontrado trabajos previos que describan una estructura similar en la antena de otras especies de Brachycera. Esta es la primera vez que se describe una sensilia con posible función bimodal, olfativa y táctil, en las antenas de los individuos de la familia Asilidae. Por otro lado, existen muchos parasitoides himenópteros que presentan este tipo de sensilias, las cuales parecen ser esenciales en la discriminación y aceptación del hospedador. En particular, las hembras de varias avispas que parasitan hospedadores ocultos en el sustrato, detectan claves químicas de contacto durante la localización usando este tipo de sensilias, mediante la ejecución de un típico comportamiento de tamborileo con sus antenas (Pettersson et al. 2001; Benedet et al. 2002; Roux et al. 2005; Gao et al. 2007; Van Baaren et al. 2007; Da Rocha et al. 2007; Onagbola y Fadamiro 2008). Por tanto, la presencia de este tipo de estructura podría estar relacionada a la estrategia de oviposición de *M. ruficauda*, dado que se ha visto que la hembra podría detectar claves referentes a la calidad de los sustratos vegetales, o claves de otras hembras que ya han ovipuesto en esos sitios, apoyando las antenas sobre los sustratos de oviposición (M.K. Castelo, comunicación personal). De esta manera, las hembras podrían estar seleccionando los lugares de oviposición basándose en las decisiones tomadas por otras hembras, dado que en el campo es común observar que los desoves se encuentran generalmente superpuestos y agrupados sobre la misma planta.

Al comparar las antenas de *M. ruficauda* con aquellas de otros dípteros parasitoides, se encuentran semejanzas y diferencias. Al igual que los machos del taquírido parasitoide *Exorista* sp., se encontraron sólo sensilias basicónicas en el postpedicelo (Abouzied 2008). Ningún otro díptero parasitoide posee un único tipo de sensilias olfativas en el postpedicelo, presentando por lo general un mínimo de tres tipos (Giangiuliani et al. 1994; Rahal et al. 1996; Chen y Fadamiro 2008). En estos parasitoides, las claves olfativas son relevantes en la detección y localización de recursos nutricionales, en contraste con *M. ruficauda* y otros asílidos que utilizan principalmente claves visuales durante la localización y captura de presas (Peterson 1981; Wood 1981; Musso 1983; O'Neill 1992a, b; Stireman III et al. 2006). Por lo tanto, la presencia de diferentes tipos de sensilias olfativas sería necesaria en la detección y reconocimiento de claves químicas complejas durante la localización de recursos. A pesar de esto, las antenas de *M. ruficauda* son similares a aquellas descritas en otras especies de dípteros parasitoides en el número total de sensilias y la presencia de fosetas sensoriales (Giangiuliani et al. 1994; Rahal et al. 1996; Chen y Fadamiro 2008). En *M. ruficauda*, estas fosetas presentan diferentes formas (i.e. simple o multicamerales) y contienen sensilias olfativas, como aquellas encontradas en el parasitoide *Trichopoda pennipes* Berthold (Tachinidae) (Giangiuliani et al. 1994). Sin embargo, la presencia de fosetas en el postpedicelo no es una característica restringida a los dípteros parasitoides. En varias especies de dípteros superiores, se ha considerado que estas estructuras están involucradas en la olfacción debido a su morfología, presencia de sensilias olfativas y los estudios fisiológicos y comportamentales llevados a cabo (Slifer y Sekhon 1964; Bay y Pitts 1976; Ross y Anderson 1987; Been et al. 1988; Itoh et al. 1991; Giangiuliani et al. 1994; Hunter y Adserballe 1996; Stocker 2001; Zhao y Kang 2002; Wasserman y Itagaki 2003; Sukontason et al. 2004, 2007; Smallengange et al. 2008; Castrejon-Gómez y Rojas 2009; Poddighe et al. 2010; Setzu et al. 2011; Zahng et al. 2012). Más aún, en algunas especies el número y morfología de estas fosetas sensoriales son considerados caracteres sexualmente dimórficos (Slifer y Sekhon 1964; Bay y Pitts 1976; Rahal et al. 1996; Sukontason et al. 2004), aunque esto no fue observado en *M. ruficauda*.

En los dípteros, el dimorfismo sexual en las antenas es moderado y probablemente se deba a las diferentes funciones y/o roles que cumplen en los machos y las hembras (Slifer y Sekhon 1964; Bay y Pitts 1976; Mayo et al. 1987; Ross y Anderson 1987; Stocker 1994; Rahal et al. 1996; Stocker 2001; De Freitas Fernandes et al. 2002, 2004; Sukontason et al. 2004; Chen y Fadamiro 2008; Setzu et al. 2011), por ejemplo, la localización de lugares de oviposición en las hembras y la localización de pareja en los machos (Rahal et al. 1996; De Fernandes Freitas et al. 2002, 2004). En *M. ruficauda* se encontró que hay mayor cantidad de sensilias basicónicas en los machos que en las hembras, y esto podría estar relacionado a una mayor sensibilidad en la detección de feromonas involucradas en el comportamiento reproductivo (Chapman 1982). Además, se observó que el ancho máximo del pedicelo y postpedicelo, y la longitud del estilo terminal, es mayor en hembras que en machos. No obstante, debido a que existen diferencias en el tamaño corporal de los individuos, tal vez estas diferencias no sean biológicamente relevantes. Finalmente, se encontró que los machos presentan una mayor densidad de microtriquias que en las hembras en las tres zonas muestreadas del postpedicelo. Esta diferencia en la microestructura de la antena podría tener un efecto en la olfacción.

La captura e interceptación de las señales químicas del ambiente pueden ser afectadas por diferentes factores, en particular la morfología de la antena, la cual influye en la llegada de los compuestos químicos desde el ambiente hasta los quimiorreceptores (Hood Henderson y Wellington 1982; Cheer y Koehl 1987a, b; Ross y Anderson 1987; Loudon 1995; Koehl 1996; Scheinder et al. 1998; Loudon, 2003; Loudon y Davis 2005). Para entender como la morfología puede influir sobre la olfacción es necesario utilizar un enfoque biomecánico (i.e. la aplicación de principios mecánicos a los sistemas biológicos) (Cheer y Koehl 1987a, b; Loudon 1995; Koehl 1996; Scheinder et al. 1998; Loudon y Koehl 2000; Loudon 2003; Loudon y Davis 2005). Para ello, un factor que se puede tomar en consideración es el arreglo de las estructuras sensoriales (Cheers y Koehl 1987a, b; Loudon 1995; Loudon 2003). Se ha considerado que en arreglos con una alta densidad de receptores (i.e. pequeños espacios entre ellos) se incrementa la sensibilidad en la detección de claves químicas (Chapman 1982; Hunter y Adserballe 1996; Rahal et al. 1996; Loudon 2003; Smallegange et al. 2008). A partir de un

enfoque biomecánico, los arreglos con estructuras sensoriales muy cercanas unas de la otras se comportan de una manera viscosa ocasionando que los fluidos diverjan en vez de pasar a través del arreglo (Cheer y Koehl 1987a, b; Loudon 1995; Koehl 1996; Loudon y Koehl 2000). Se ha calculado que aproximadamente el 80% del flujo de aire que atraviesa este tipo de arreglos no estará disponible durante la captura de volátiles por parte de los quimiorreceptores (Cheer y Koehl 1987b; Loudon 1995; Loudon y Koehl, 2000). No obstante, la cantidad remanente de corriente de aire que esta disponible y que atraviesa el arreglo de quimiorreceptores disminuye su velocidad, haciendo que las moléculas difundan hacia los receptores por un tiempo mayor y permitiendo que los receptores capturen una mayor proporción de moléculas odoríferas (Koehl 1996; Loudon 2003). Por otro lado, una mayor densidad de quimiorreceptores puede causar una interferencia entre ellos, es decir, que un receptor puede estar capturando moléculas que podría estar capturando otro receptor, lo que hace disminuir la tasa de interceptación de claves químicas. Esto puede ocurrir si los quimiorreceptores se encuentran lo suficientemente cerca y si el aire fluye muy lento entre ellos (Loudon, 2003). Probablemente en las especies de Brachycera, al igual que *M. ruficauda*, quienes poseen una antena pequeña y una alta densidad de quimiorreceptores, este problema podría ser superado mediante la presencia de las microtriquias. Estas estructuras podrían aumentar la viscosidad de la antena debido a que forman un arreglo más denso que genera el enlentecimiento del flujo de aire. Además, al encontrarse dispersas entre los quimiorreceptores y no interceptar las moléculas odoríferas que llegan a la antena, las microtriquias podrían disminuir la interferencia entre los quimiorreceptores olfativos aumentando la separación entre ellos, optimizando de esta manera el proceso de olfacción.

En conclusión se han caracterizado los receptores olfativos de las antenas de los adultos de *M. ruficauda*. Se han encontrado dos tipos de estructuras relacionadas a la detección de compuestos volátiles, como son las sensilias basicónicas multiporosas y las fosetas sensoriales. Debido a la gran cantidad estimada de sensilias basicónicas y de fosetas sensoriales, podemos considerar que esta especie detecta claves olfativas relacionadas al

hospedador a larga distancia. Además, la sensibilidad de estas estructuras podría incrementarse por la presencia de microtriquias debido a que enlentecen el flujo de aire que llega a las antenas reduciendo la interferencia entre sensilias olfativas, lo que permite aumentar la concentración de moléculas odoríferas que llegan hasta las estructuras receptoras de volátiles. Una vez que las hembras llegan al hábitat de los hospedadores y eligen la altura de oviposición, la elección del micrositio donde oviponer podría estar mediada por el contacto de los mecanorreceptores (setas) y las quimio-sensilias de contacto (sensilias tricoideas) con el sustrato, dado que las hembras oviponen en el envés de los sustratos tocándolos con la zona latero ventral de las antenas. Por otra parte, el hecho de que sólo se haya encontrado un sólo tipo de sensilia basicónica en ambos sexos sugiere que tanto machos como hembras detectan el mismo tipo de olores, como se ha observado en otras especies de dípteros (Hallberg et al. 1984; Zhao y Kang 2002). Entonces las claves químicas que detectan ambos sexos serían las mismas, las hembras podrían estar utilizándolas en la localización de los hospedadores, mientras que los machos las utilizarían en la búsqueda de hembras detectando a los hospedadores. Por tanto, las hembras utilizarían las señales químicas en un contexto de oviposición, mientras que los machos podrían utilizarlas en un contexto reproductivo. Además, el hecho de que el número de sensilias y la densidad de las microtriquias sean mayores en machos que en hembras sugiere que los machos serían más sensibles a los olores que las hembras. Finalmente, el hecho de que las sensilias tricoideas estén presentes también en el macho podría vincularse a que estarían involucradas en el comportamiento de apareamiento. Los machos podrían estar usando estas sensilias en el reconocimiento de las hembras dado que se ha visto a los machos tocar con sus antenas a las hembras durante el comportamiento de cortejo (M. Castelo, comunicación personal). Aún son necesarios más estudios que determinen que compuestos volátiles pueden ser detectados por los adultos y si estos son similares entre los sexos. Sin embargo, el gran número de estructuras olfativas descritas en el presente capítulo sostienen la hipótesis de que la detección de claves químicas es extremadamente importante en la historia de vida de *M. ruficauda*.

CAPÍTULO 4

DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEFÁLICAS Y DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS LARVAS DE *Mallophora ruficauda* EN LA TEMPORADA REPRODUCTIVA

Introducción

La localización del hospedador es fundamental en la historia de vida de los parasitoides. Existen dos tipos de estrategias en el contexto de localización y oviposición: 1) la hembra del parasitoide localiza y ovipone dentro o sobre el hospedador, o 2) la hembra localiza el hábitat del hospedador, ovipone en el sustrato y es el estado inmaduro larval el que se contacta con el hospedador (localización o búsqueda compartida) (Eggleton y Belshaw 1992, 1993; Godfray 1994; Vet et al. 1995; Feener Jr. y Brown 1997; Fournet et al. 2001; Brodeur y Boivin 2004). Por consiguiente, es probable que la Selección Natural modifique a nivel fisiológico, morfológico y comportamental a la hembra y a la larva en especies con localización compartida, de forma de optimizar este comportamiento esencial en el ciclo de vida de los parasitoides.

La búsqueda compartida del hospedador se ha registrado en diferentes especies de varias familias en todos los órdenes de insectos parasitoides (Clausen 1940; Eggleton y Belshaw 1993; Godfray 1994; Feener Jr. y Brown 1997; Brodeur y Boivin 2004). En estos parasitoides, la hembra encuentra el hábitat del hospedador y ovipone en el sustrato. Posteriormente, el contacto con el hospedador puede ocurrir de 3 formas: 1) los huevos son ingeridos por el hospedador; 2) las larvas son transportadas foréticamente hasta el hospedador; o 3) las larvas buscan activamente a su hospedador (Eggleton y Belshaw 1993; Godfray 1994; Feener Jr. y Brown 1997; Brodeur y Boivin 2004). En los casos donde existe una búsqueda activa del hospedador, las larvas serían equivalentes a las hembras adultas, detectando a los hospedadores presentes y aceptando a uno entre los individuos disponibles (aceptación). Sin embargo, las larvas enfrentan ciertas restricciones a diferencia de las hembras, como una baja expectativa de vida, una baja movilidad y una única oportunidad de parasitar (Godfray 1994; Brodeur y Boivin 2004). De esta manera, se espera que la evolución haya desarrollado diferentes aspectos de la historia de vida de las larvas de estos parasitoides, como son las estructuras sensoriales asociadas a la detección y localización de hospedadores, y los recursos

nutricionales necesarios que permitan la supervivencia de su progenie hasta el contacto con el hospedador.

Entre los parasitoides inmaduros que localizan activamente a sus hospedadores se observan diferentes adaptaciones vinculadas a la búsqueda. Generalmente es el primer estadio larval el que se encuentra adaptado a la búsqueda, mostrando individuos con características morfológicas que les otorgan una alta movilidad y que les permiten percibir la variabilidad del ambiente durante el forrajeo (Clausen 1940; Zacharuk y Shields 1991; Darling 1992; Eggleton y Belshaw 1993; Godfray 1994; Pinto et al. 1996; Darling y Roberts 1999; Overgaard Nielsen et al. 1999; Heraty 2000; Bologna y Pinto 2001; Heraty et al. 2004; Perez-Lanchaud et al. 2006; Torrens et al. 2007; Kathirithamby 2009; Bologna y Di Giulio 2011). Se han distinguido dos tipos de larvas activas, la larva *triungulina* y la larva *planidium*. No obstante la existencia de varios trabajos que estudian las características morfológicas vinculadas al desplazamiento de estas larvas durante la localización, existen muy pocos trabajos que describan los órganos sensoriales involucrados en el forrajeo (Clausen 1940; Darling 1992; Eggleton y Belshaw 1993; Godfray 1994; Pinto et al. 1996; Darling y Roberts 1999; Overgaard Nielsen et al. 1999; Heraty 2000; Bologna y Pinto 2001; Heraty et al. 2004; Perez-Lanchaud et al. 2006; Torrens et al. 2007; Kathirithamby 2009; Bologna y Di Giulio 2011). Las larvas de *M. ruficauda*, al igual que los demás asílidos, son ápodas del tipo *planidium*, fusiformes y hemicéfalas (cápsula cefálica parcialmente retraída en el tórax) (Musso 1978, 1981; Wood 1981; Crespo et al. 2011). Se ha observado que la larva de estadio I se mueve activamente al nacer, cae al suelo y se entierra, mientras que la larva de estadio II se orienta activamente hacia el hospedador (Castelo y Lazzari 2004; Crespo y Castelo 2008). Las larvas de estadio II presentan una alta movilidad y estructuras cefálicas bien desarrolladas, a diferencia del estadio I, características necesarias en la localización de su hospedador (Crespo y Castelo 2008; Crespo et al. 2011). En particular, la ablación de los palpos maxilares en las larvas de estadio II provoca la pérdida completa de orientación hacia estímulos provenientes de su hospedador (Crespo et al. 2011). Esto indica que los quimiorreceptores (sensilias olfativas) involucrados en la detección de claves químicas asociadas al hospedador se encontrarían en los palpos de este estadio larval. Hasta el

momento lo único que se conoce de la cápsula cefálica de estos individuos es que está conformada por varios pares de setas dorsales y ventrales, un par de antenas redondeadas, y un aparato bucal que se compone de un pequeño labro, un par de mandíbulas, un par de maxilas con palpos anteniformes, un labio inferior y la hipofaringe (Copello 1922; Crespo et al. 2011). Sin embargo, no se han realizado estudios que registren la presencia de sensillas olfativas, al igual que no se ha determinado si la diferencia de comportamiento entre estadio larval I y II está asociada a una diferencia morfológica de sus estructuras cefálicas.

Por otro lado, en los parasitoides inmaduros el intervalo comprendido entre el nacimiento de la larva del parasitoide y el contacto con el hospedador, es decir la sincronización temporal entre ambos, es de suma relevancia en la persistencia del sistema. En este aspecto, la aparición y duración del estadio larval del parasitoide y del hospedador determinarán, en parte, que se produzca la coexistencia en el ambiente. Al considerar a los parasitoides inmaduros como individuos con tiempo limitado, el éxito en la localización y aceptación del hospedador estará asociado a la expectativa de vida del individuo (Godfray 1994; Heimpel et al. 1998; Brodeur y Boivin 2004; Wajnberg et al. 2006; Boivin y Gauvin 2009). La expectativa de vida dependerá de varios factores ya sean condiciones ambientales, la predación y los recursos nutricionales con los que cuente el individuo (Begon et al. 2006). Previa alimentación, los recursos de sostenimiento y dispersión de los individuos recién nacidos son aquellos provenientes de los nutrientes del huevo, es decir, que provienen de la inversión materna (Diss et al. 1996; Begon et al. 2006; Boivin y Gauvin 2009; Chapman 2013). Estos recursos nutricionales son generalmente estimados indirectamente a partir del tamaño corporal y/o de la condición corporal. El tamaño corporal se determina realizando medidas corporales lineales, como ancho y longitud del cuerpo, y el peso del individuo. La condición corporal, por su parte, se ha definido como una medida del estado nutricional del animal estimando indirectamente la cantidad de reservas energéticas como el contenido de grasas del individuo (Marden y Rollins 1994; Green 2001; Peig y Green 2009, 2010), y se calcula a partir de la relación aritmética o funcional de las medidas corporales lineales y del peso (Diss et al. 1996; Jakob et al. 1996; Green 2001; Boivin y Gauvin 2009; Peig y Green 2009, 2010). Se sabe que una mayor cantidad de nutrientes en el

huevo se traduce en un mayor tamaño corporal en los individuos (Fox y Czesak 2000; Capinera 2008; Boivin y Gauvin 2009). Por otro lado, una mejor condición corporal, es decir un mejor estado nutricional o fisiológico, conduce a un mayor *fitness* o “aptitud biológica” a futuro del individuo (Jakob et al. 1996; Peig y Green 2009, 2010). En el caso de los parasitoides inmaduros los nutrientes asignados al huevo durante la oviposición son los únicos recursos con los que disponen las larvas hasta hallar a su hospedador y se ha observado que a mayor cantidad de recursos (tamaño corporal) la probabilidad de encuentro entre parasitoide – hospedador aumenta (Brodeur y Boivin 2004; Boivin y Gauvin 2009).

En *M. ruficauda* el intervalo entre el nacimiento de las larvas y el encuentro con el hospedador es altamente variable (Castelo 2003; Crespo 2007; Crespo y Castelo 2010). Durante la época reproductiva (diciembre–marzo) las hembras de *M. ruficauda* oviponen fuera del hospedador y las larvas buscan a los hospedadores en el suelo (Copello 1922; Castelo y Corley 2004a; Castelo et al. 2006; Crespo y Castelo 2008). Sin embargo, las larvas de estadio III de *C. signaticollis*, a la cual se aferra el estadio larval II de *M. ruficauda*, aparecen en el campo a principios de marzo (Remedi de Gavotto 1964; Alvarado 1980; López et al. 1994). Esto se traduce en una asincronía temporal entre el estadio del hospedador susceptible al parasitismo y el estadio del parasitoide capaz de parasitar. Este hecho sugiere que las larvas del parasitoide que nacen previo a la aparición del hospedador deberán disponer de los recursos suficientes que les permitan sobrevivir a este intervalo temporal, los cuales provienen del huevo dado que no se alimentan hasta localizar al hospedador (Copello 1922; Castelo 2003; Crespo 2007; Crespo y Castelo 2010). Estudios previos analizaron la relación entre la supervivencia y el momento de la temporada en la cual nace la larva. Se observó una supervivencia diferencial, donde las larvas nacidas a principios de la temporada (fines de diciembre, principios de enero) presentan una mayor longevidad que las larvas nacidas en momentos intermedios de la temporada (febrero) (Crespo 2007). Esta diferencia en la supervivencia y longevidad de las larvas de *M. ruficauda* podría explicarse a partir de una inversión diferencial de la hembra en los nutrientes que asigna a los huevos a lo largo de la temporada reproductiva, como ha sido observado en otros parasitoides e insectos (Diss et al. 1996; Fox y Czesak 2000; Boivin y

Gauvin 2009). Sin embargo, no se han realizado estudios que analicen si existe asignación diferencial de recursos energéticos por parte de la hembra en los huevos en esta especie.

En el presente capítulo de la Tesis se estudiaron dos aspectos vinculados a la localización del hospedador por parte de la larva del parasitoide *M. ruficauda*. En primer lugar se determinó la presencia de estructuras sensoriales en el segundo estadio larval de *M. ruficauda* involucradas en la detección de claves químicas asociadas al hospedador y si existen diferencias en las estructuras cefálicas entre el estadio I y II de esta especie que sustenten la diferencia comportamental observada entre ambos estadios. En segundo lugar, a partir de estimadores del tamaño y condición corporal de la larva de estadio I, se analizó si existe asignación diferencial de recursos nutricionales dependiendo del momento de la temporada reproductiva en el cual ovipone la hembra, de modo de entender si existe alguna estrategia fisiológica que permita a las larvas sortear la asincronía temporal que se produce hasta que el hospedador se encuentra disponible.

Materiales y Métodos

Con el fin de observar la presencia de sensilias olfativas en los palpos maxilares de las larvas de *M. ruficauda* se realizaron observaciones en microscopio óptico y electrónico de barrido. Para determinar si existe una inversión diferencial de la hembra en los huevos a lo largo de la temporada reproductiva se realizaron mediciones de la cápsula cefálica de las larvas de estadio I mediante microscopio óptico y se cuantificó el peso de los individuos.

Insectos

Las larvas de *M. ruficauda* fueron criadas en el laboratorio a partir de los desoves recolectados en los pastizales de la localidad de Moreno (Buenos Aires, Argentina). Los ejemplares de estadio I se obtuvieron directamente desde los desoves el día de su nacimiento, y las larvas de

estadio II se obtuvieron a partir de ejemplares de estadio I que mudaron en el laboratorio a los siete días de vida en promedio (ver *Materiales y Métodos Generales*).

Los individuos utilizados para la observación de presencia y descripción de receptores olfativos y para la determinación del tamaño corporal fueron fijados en alcohol etílico 80% entre los 2 a 4 días post-nacimiento para las larvas estadio I. El mismo procedimiento fue realizado luego de la muda para las larvas estadio II, con el objeto de asegurar un correcto proceso de esclerotización de la cápsula cefálica y de sus estructuras cuticulares.

Para la estimación del peso individual se utilizaron larvas recién nacidas con el fin de evitar variaciones en el peso de los individuos debido al consumo de reservas y a la deshidratación.

Descripción de las sensilias olfativas en los estadios larvales de *M. ruficauda*

Con el objeto de determinar la presencia de sensilias olfativas en los palpos maxilares de las larvas de estadio I y II de *M. ruficauda*, se realizaron preparaciones totales para microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (MEB).

Las larvas para MO se montaron realizando preparados transitorios donde los individuos se montaron directamente desde el fijador (alcohol etílico 80%) utilizándolo como medio de montaje. Las preparaciones fueron observadas mediante un microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star. Mediante una cámara digital acoplada al microscopio se obtuvieron fotografías digitales.

Para las preparaciones de MEB se utilizó el mismo protocolo realizado con las antenas de los adultos, descrito en el capítulo 3 de la presente Tesis. Los individuos se hidrataron hasta llegar a agua destilada, y luego fueron colocadas en una solución de detergente no iónico (0,3% v/v; Biopack®, Argentina) durante 30 minutos. Luego, se enjuagaron utilizando un sonicador (~20 kHz) durante 1,5 minutos con el fin de eliminar partículas no deseadas y, posteriormente, se deshidrataron en una serie gradual de agua destilada, etanol 50%, 70%,

80%, 90%, 96% (x2) y 100% (x2) durante 30 minutos por paso. Para completar la deshidratación de las muestras y evitar la deformación de las estructuras cuticulares, se colocaron en un vial de vidrio de 12 ml con 4 ml de hexametildisilazano (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano; Sigma-Aldrich, Argentina) durante 50 minutos. Luego, aproximadamente el 90% del hexametildisilazano fue retirado y se prosiguió con la evaporación del compuesto durante toda la noche en condiciones anhidras en un desecador con silica gel bajo campana. Posteriormente al secado, los individuos se montaron en tacos de aluminio utilizando cinta carbón y se recubrieron con oro-paladio. Los preparados fueron examinados y fotografiados mediante un MEB Carl Zeiss Supra 40 perteneciente al servicio del Centro de Microscopia de Avanzada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

Estimación del tamaño corporal de las larvas de *M. ruficauda* a lo largo de la temporada reproductiva

Con el fin de determinar si las condiciones corporales de las larvas de *M. ruficauda* varían en función del momento de la temporada reproductiva en la cual las hembras depositaron los huevos, y de este modo estimar en forma indirecta si la hembra realiza una inversión diferencial de reservas, se estimó el tamaño de las larvas de estadio I nacidas en tres períodos de la temporada de oviposición. El tamaño corporal se estimó de dos formas: 1) se tomaron las medidas morfométricas de la cápsula cefálica, ancho máximo, longitud máxima y distancia entre antenas, de cada individuo utilizando un microscopio óptico con ocular graduado (Figura 4.1); y 2) se pesaron lotes de 100 larvas para estimar el peso individual promedio, debido a que la larva I es muy pequeña y su peso individual en una balanza de precisión es despreciable. Luego, para la estimación de la condición corporal se estimó un índice simple y orientativo a partir de una modificación del Índice Proporcional (Jakob et al. 1996), debido a que el peso de las larvas fue estimado en forma grupal. Este índice fue calculado mediante el peso corporal promedio (μg) dividido por la suma del promedio de las medidas corporales ancho máximo y longitud máxima de la cápsula cefálica (μm), para las larvas de principio, mediados y fines de la temporada reproductiva. Si bien no se puede determinar si las estimaciones son

estadísticamente significativas, esta medida es de gran utilidad para entender si existe algún patrón, aunque sea cualitativo, entre la condición corporal y la temporada reproductiva.

Para las estimaciones se utilizaron desoves colectados al inicio (fines de diciembre), en la mitad (principios de febrero) y al final (mediados de marzo) de la temporada reproductiva. Estos tres momentos se establecieron en función de la actividad de oviposición de las hembras la cual comienza a fines del mes de diciembre y culmina a fines de marzo con la llegada de los primeros fríos otoñales, y cuenta con un período de máxima deposición de huevos entre los 30 y 60 días del momento de aparición de los adultos en los pastizales cada año (Castelo 2003).

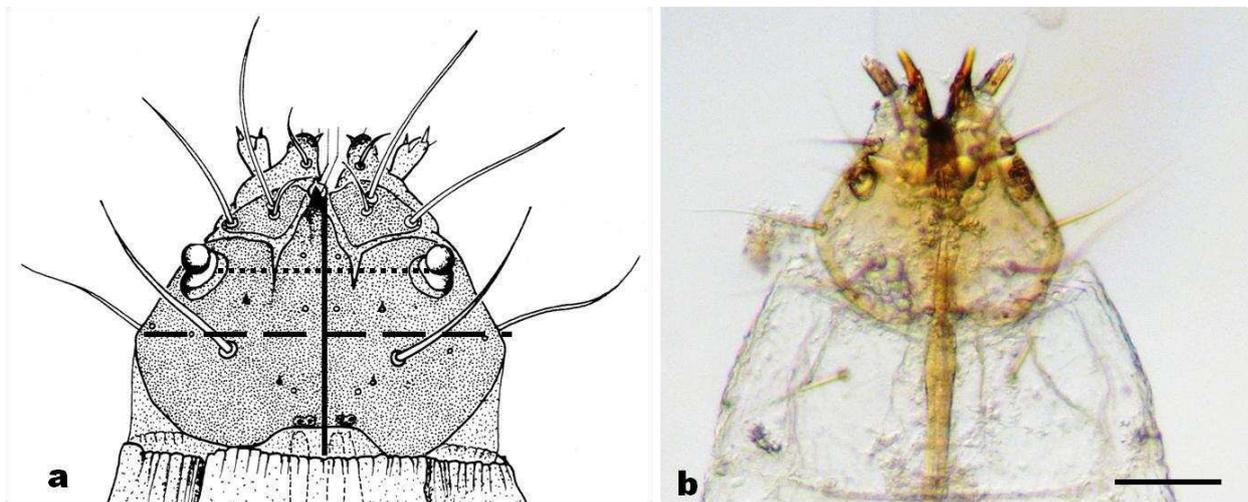


Figura 4.1. Metodología de medición de la cápsula cefálica de las larvas de *M. ruficauda*. a) Ilustración de estadio larval I de *Machimus rusticus*. Mediciones de la cápsula cefálica: ———, longitud máxima; - - - -, ancho máximo; ········, distancia entre antenas. b) Microfotografía en MO de la vista dorsal de la cápsula cefálica del estadio larval I de *M. ruficauda* (escala = 100 µm). Ilustraciones: J. J. Musso (1978). Fotografía: Hernán F. Groba.

Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias en el tamaño corporal de las larvas, dependiendo del momento de la temporada reproductiva en que las hembras pusieron sus desoves, se compararon los tamaños de las larvas nacidas al inicio, mitad y fin de la temporada de oviposición mediante un ANOVA para cada estimador del tamaño corporal calculado. Con el objeto de analizar entre cuales de los tres momentos de la temporada había diferencias en el tamaño de las larvas se realizaron comparaciones múltiples *a posteriori*. Se consideraron significativas aquellas pruebas con $P < 0,05$. Se pusieron a prueba los supuestos de

normalidad y homocedasticidad a partir de la prueba de Shapiro–Wilks y de Levene, respectivamente (Zar 2010). Todos los análisis estadísticos antes mencionados fueron efectuados utilizando el programa estadístico Infostat (Versión 10.1, FCA, Universidad de Córdoba, Argentina).

Resultados

Descripción de las sensilias olfativas en los estadios larvales de *M. ruficauda*

La descripción de las sensilias olfativas de las larvas de estadio II y la determinación de las diferencias morfológicas asociadas al comportamiento diferencial del estadio larval I y II, se realizaron mediante observaciones de preparados para MO y MEB de individuos de ambos estadios larvales.

Las preparaciones para MO permitieron distinguir las semejanzas y diferencias entre ambos estadios larvales de *M. ruficauda*. La cápsula cefálica de los individuos de ambos estadios está compuesta por un disco o placa dorsal, un par de barras tentoriales, un par de barras metacefálicas, y las piezas bucales. La placa dorsal porta diferentes estructuras como son cuatro pares de largas y delgadas setas, un par de antenas redondeadas y, en el caso del estadio I, un diente apical bien esclerotizado, ubicado dorsalmente al labro, denominado oviruptor (Figura 4.2a y b). Principalmente las diferencias entre ambos estadios se limitaron a la presencia del oviruptor en las larvas estadio I y la mayor esclerotización en el estadio II ya observada en trabajos previos (Crespo et al. 2011).

En las larvas de estadio I, las barras tentoriales se extienden hacia atrás en posición dorsal, mientras que las barras metacefálicas se originan ventralmente en el margen posterior de la placa dorsal, extendiéndose ambas hasta la mitad posterior del primer segmento torácico. Por su parte, las larvas de estadio II presentan unas barras tentoriales y metacefálicas mucho mas

desarrolladas y, en particular, las barras tentoriales se separan abruptamente en forma de V luego del margen posterior de la placa dorsal (Figura 4.2a y b).

Los principales cambios posteriores a la muda entre estadios larvales se ven reflejados en las piezas bucales. Las mandíbulas son poco desarrolladas en el estadio I siendo poco discernibles, a diferencia del estadio II que presenta mandíbulas claramente individualizadas. No obstante ambos estadios presentan dos escleritos dorsales, situados por delante de las antenas, que corresponden al componente externo del artículo basal de la mandíbula, los cuales portan tres pares de setas (Figura 4.2a y b). Las maxilas se componen, en su cara interna, de un gancho bien desarrollado y, en su cara externa, de un palpo que se origina en la parte ventral del estipes, el cual está provisto en su margen frontal de sensilias (Figura 4.2a, b, c y d). Cuando se observan ambos estadios larvales, es la larva de estadio II la que presenta un mayor desarrollo de la maxila, un mayor tamaño del gancho y palpo maxilar, y una mayor cantidad de sensilias en el palpo maxilar, cuatro en el estadio I y seis en el estadio II (Figura 4.2c y d).

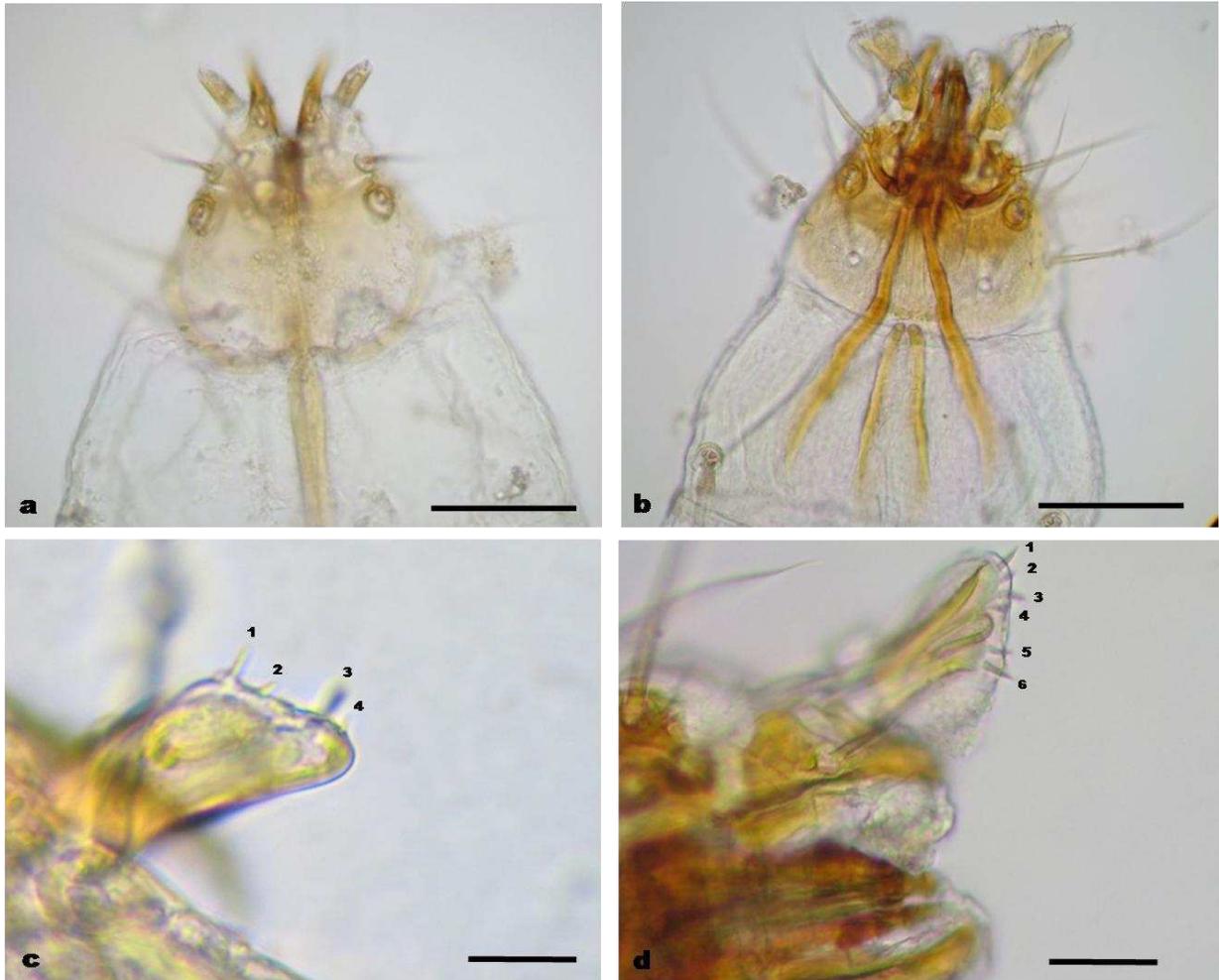


Figura 4.2. Microfotografías digitales en MO de la vista dorsal de los estadios larvales de *M. ruficauda*. (a) Cápsula cefálica de larva estadio I (escala = 100 μm), (b) Cápsula cefálica de larva estadio II (escala = 100 μm). (c) Detalle de palpo maxilar derecho de larva estadio I (escala = 30 μm), (d) Detalle de palpo maxilar izquierdo de larva estadio II (escala = 30 μm). Los números indican la posición de las sensilas en el margen frontal de los palpos.

Las preparaciones de MEB no mostraron resultados concluyentes debido a que no se obtuvieron preparados que permitieran caracterizar al estadio larval I. Los preparados de larvas de estadio II arrojaron discrepancias con las observaciones hechas en MO, debido a que sólo se observaron 5 sensilas en vez de 6 (Figuras 4.2d y 4.3b). Estas diferencias en los resultados se debieron a que no se obtuvieron buenas imágenes de la cara dorsal del palpo maxilar de los preparados de MEB, por lo que no se pudo corroborar la presencia de las 6 sensilas como se observa en los preparados de MO. Sin embargo, se pudieron ver en detalle las restantes sensilas presentes en el palpo (Figuras 4.3c, d, e, f y g).

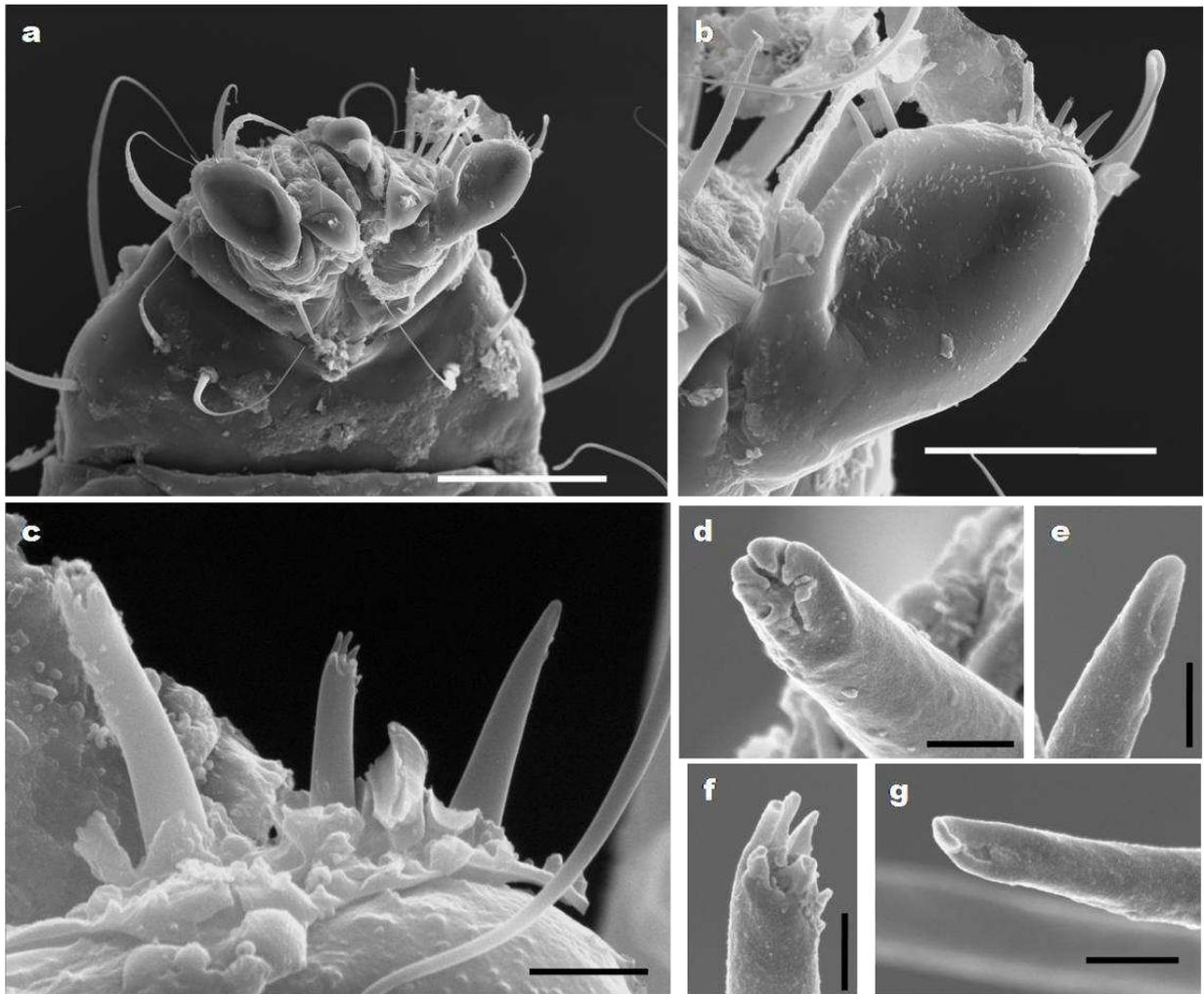


Figura 4.3. Microfotografías digitales en MEB de la larva estadio II de *M. ruficauda*. (a) Vista ventral de la cápsula cefálica (escala = 50 μm), (b) Detalle en vista ventral del palpo maxilar izquierdo (escala = 20 μm). (c) Grupo de sensilias en el margen frontal del palpo maxilar izquierdo (escala = 2 μm), (d), (e), (f) y (g) Detalle de la punta de las sensilias del margen frontal del palpo maxilar (escala = 600 nm).

Al realizar observaciones con mayor detalle, estas sensilias mostraron morfologías diferentes (Figuras 4.3d, e, f y g). Tres de las cinco sensilias descritas tienen una forma semejante a sensilias tricoideas (Figura 4.3b, e y g). Además se pudo observar que estas sensilias presentaron lo que parecería ser poros o depresiones apicales (Figuras 4.3e y g). Por otro lado, se observó una sensilia que presentó terminaciones o proyecciones digitiformes en su extremo apical (Figura 4.3c y f). A su vez, los preparados no permitieron determinar si existe un tercer tipo sensilia la cual presentan una depresión apical de forma irregular o si es otra sensilia con terminaciones digitiformes las cuales se encuentran rotas (Figura 4.3c y d). Por último, no se observó a partir de estos preparados si las sensilias presentan poros a lo largo de la pared cuticular, ni si presentaron inserciones flexibles.

Estimación del tamaño corporal de las larvas de *M. ruficauda* a lo largo de la temporada reproductiva

Se encontraron diferencias significativas para todos los estimadores del tamaño corporal calculados en función del momento de la temporada en que las larvas nacieron (Tabla 4.1, Figura 4.4). Excepto en la distancia entre antenas, los estimadores indican un aumento del tamaño corporal a lo largo de la temporada reproductiva, siendo de mayor tamaño aquellos individuos que nacen al final de la temporada (Tabla 4.1). En particular, esta diferencia es mayor para el ancho y longitud máxima de la cápsula cefálica (Tabla 4.1).

Sin embargo, los individuos nacidos en momentos intermedios de la temporada no se diferencian estadísticamente de las larvas que nacen al inicio o fines de la temporada cuando estimamos el tamaño corporal a partir del ancho máximo de la cápsula cefálica, la distancia entre antenas y el peso de los individuos (Tabla 4.1, Figura 4.4a, c, d). Sólo para la longitud máxima de la cápsula cefálica se observó que las larvas nacidas al principio de la temporada son de menor tamaño corporal que las larvas nacidas en momentos intermedios (Tabla 4.1). Sin embargo, estas últimas no se diferencian significativamente de los individuos nacidos al final de la temporada reproductiva (Tabla 4.1, Figura 4.4b).

Tabla 4.1. Estimadores del tamaño corporal de las larvas de estadio I de *M. ruficauda* en función del momento de la temporada reproductiva en que nacen. El rango de medidas es seguido, entre paréntesis, por la media, el error estándar y el número de mediciones. Las letras diferentes y los asteriscos indican diferencias significativas con un $P < 0,05$.

Estimador del tamaño corporal de la larva I	Temporada reproductiva			F ; P
	Inicio	Mediados	Fines	
Ancho máximo de la cápsula cefálica (μm)	129 – 168 (147 \pm 0,7; 107) ^a	135 – 162 (149 \pm 0,5; 113) ^{ab}	132 – 168 (151 \pm 0,5; 153) ^b	9,5 ; 0,0001 *
Longitud máxima de la cápsula cefálica (μm)	99 – 123 (113 \pm 0,5; 108) ^a	105 – 123 (114 \pm 0,4; 117) ^a	102 – 129 (117 \pm 0,4; 147) ^b	27,6 ; 0,0001 *
Distancia entre antenas (μm)	69 – 93 (87 \pm 0,6; 75) ^a	78 – 99 (86 \pm 0,4; 94) ^{ab}	78 – 105 (88 \pm 0,4; 132) ^b	4,16 ; 0,0165 *
Peso corporal de 100 individuos (mgr)	3,5 – 4,3 (3,71 \pm 0,05; 15) ^a	3,3 – 4,3 (3,80 \pm 0,06; 17) ^{ab}	3,5 – 4,5 (3,93 \pm 0,06; 20) ^b	3,56 ; 0,036 *
Índice de condición corporal promedio	1,4269	1,4449	1,4664	-

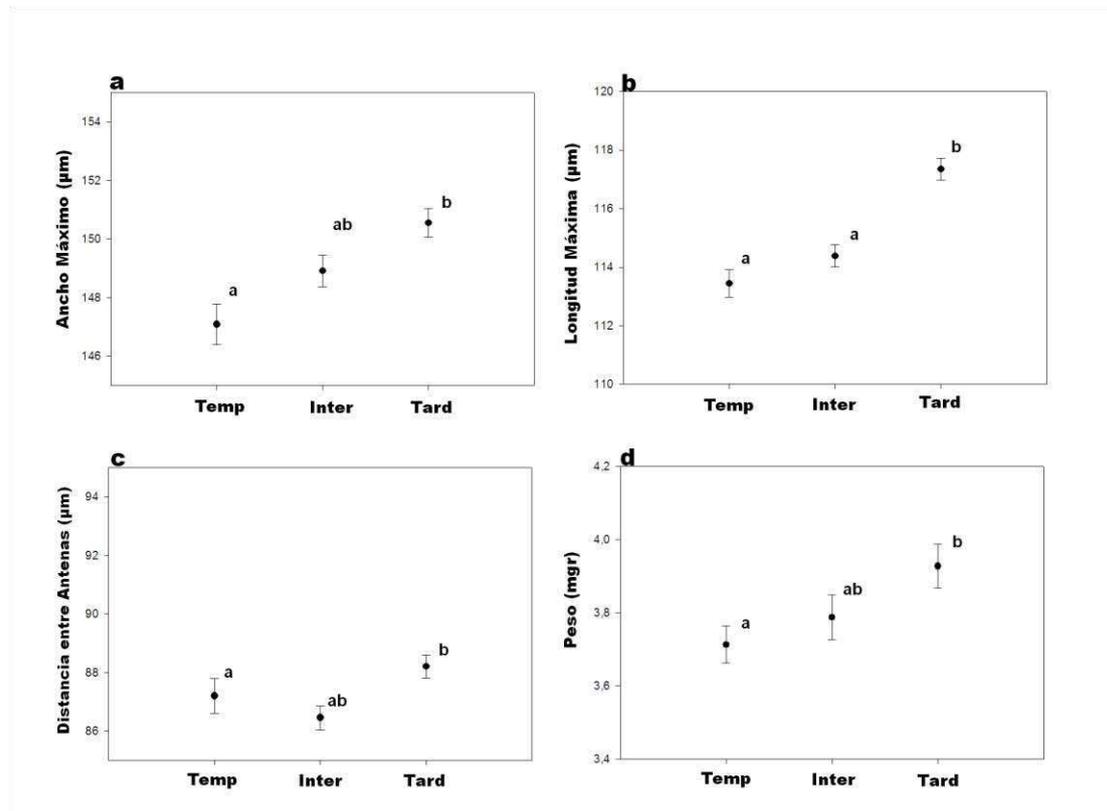


Figura 4.4. Estimadores del tamaño corporal de las larvas de estadio I de *M. ruficauda* en función del momento de la temporada reproductiva en que nacen. (a), ancho máximo medio de la cápsula cefálica; (b), longitud máxima media de la cápsula cefálica; (c), distancia media entre antenas; (d), peso medio de un lote de 100 larvas. Las barras indican el error estándar de cada muestra. Abreviaturas: Temp, principio; Inter, momentos intermedios; Tard, fines de la temporada reproductiva. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un $P < 0,05$.

Discusión

En el presente capítulo de la Tesis se estudiaron dos aspectos vinculados a la localización del hospedador por parte de la larva parasitoide de *M. ruficauda*, en particular se estudió la presencia de estructuras sensoriales involucradas en la detección de claves químicas del hospedador y se analizó indirectamente, mediante estimadores del tamaño y de la condición corporal, la asignación diferencial de recursos en el huevo por parte de la hembra dependiendo del momento de la temporada reproductiva. Los resultados de este estudio demostraron que las larvas de estadio II de *M. ruficauda* cuentan con estructuras cefálicas diferentes a las presentes en las larvas de estadio I, sugiriendo que esta diferencia entre estructuras estaría asociada al comportamiento de búsqueda y localización del hospedador. Además, se

observó, a partir de la mayoría de los estimadores calculados, que el tamaño corporal de las larvas de estadio I varía según el momento en que nacen durante la temporada reproductiva. Las características aquí descritas no se han encontrado hasta el momento en parasitoides inmaduros de otras especies.

La caracterización de las estructuras cefálicas de los estadios larvales I y II de *M. ruficauda* corroboró las diferencias morfológicas previamente observadas (Crespo et al. 2011). Las estructuras cefálicas presentaron un mayor desarrollo en larvas de estadio II. Además, se encontró que estas larvas presentan un número mayor de sensillas en los palpos maxilares que las larvas de estadio I. Esta clara diferencia morfológica podría estar vinculada al comportamiento diferencial entre estadios inmaduros de este parasitoide, dado que la orientación positiva de las larvas de segundo estadio hacia claves provenientes del hospedador no se produce en larvas de primer estadio (Crespo y Castelo 2008). Aunque no se han realizado estudios que caractericen las estructuras sensoriales asociadas al proceso de localización en parasitoides inmaduros de otras especies, se ha observado que las larvas de estas especies presentan características morfológicas asociadas a la búsqueda activa del hospedador, las cuales determinan su éxito en el parasitismo (Clausen 1940; Darling 1992; Darling y Roberts 1999; Overgaard Nielsen et al. 1999; Bologna y Pinto 2001; Poinar 2009). En otras especies de insectos existen varios trabajos que describen las estructuras sensoriales, pero enfocados desde el estudio taxonómico o fisiológico de la alimentación de insectos plaga (Zacharuk y Shields 1991; Vegliante 2005; Bahia et al. 2007; Colomb et al. 2007; Juma et al. 2008; Szpila et al. 2008; Beutel et al. 2009; Akent'eva 2011; Ellers et al. 2012). En menor medida se ha estudiado la relación de los órganos sensoriales y la localización de recursos, con varios registros en larvas acuáticas (Gaino y Rebora 1999; Baker et al. 2000; Friis et al. 2003; Rebora et al. 2007) y pocos en larvas de ambientes terrestres (Colwell y Scholl 1995; Devetak et al. 2010; Ellers et al. 2012). No obstante, todos concuerdan en la relevancia de estos

caracteres morfológicos en el comportamiento y ecología de estas especies (Zacharuk y Shields 1991; Colwell y Scholl 1995; Gaino y Reborá 1999; Baker et al. 2000; Friis et al. 2003; Vegliante 2005; Bahía et al. 2007; Colomb et al. 2007; Reborá et al. 2007; Juma et al. 2008; Szpila et al. 2008; Beutel et al. 2009; Devetak et al. 2010; Akent'eva 2011; Ellers et al. 2012). En el caso particular de *M. ruficauda*, este trabajo ha sido de utilidad en el estudio de la particular historia de vida de este parasitoide. Como ya se ha mencionado, la orientación al hospedador de la larva de segundo estadio de *M. ruficauda* se produce por el mecanismo de klinotaxis, en un ambiente donde existe un gradiente de infoquímicos producido a partir de una fuente de estímulos (Castelo y Lazzari 2004; Crespo y Castelo 2008; Crespo et al. 2011). Aunque no se ha podido determinar la existencia de sensilias olfativas mediante las técnicas utilizadas, la presencia de estas sensilias es crucial en el comportamiento de las larvas de estadio II. Por otro lado, la observación de sensilias con un único poro apical sugiere que la larva II podría contar con quimio-sensilias de contacto, las cuales tendrían relevancia en el contexto de aceptación del hospedador. No obstante, la falta de caracterización inequívoca de las estructuras sensoriales halladas demuestra la necesidad de proseguir investigando para poder establecer esta relación morfo-funcional entre las características morfológicas de los estadios inmaduros y su comportamiento.

El análisis indirecto de la asignación diferencial de recursos nutricionales dependiendo del momento de la temporada reproductiva en el cual la hembra ovipone demostró que existe una relación entre el tamaño corporal de las larvas de estadio I y el momento en el que nacen. Se observó que a medida que va avanzando la temporada reproductiva los individuos van aumentando su tamaño corporal. Sólo la distancia entre antenas mostró un patrón diferente al obtenido con los demás estimadores. La relación entre la distancia entre antenas y otras medidas como el ancho máximo sugiere que no existe un crecimiento isométrico entre todas las partes que conforman la capsula cefálica de estas larvas. Por tanto, la distancia entre antenas no seguiría una relación directa con

el tamaño corporal, como se observa con otras medidas corporales lineales (Diss et al. 1996; Jakob et al. 1996; Jiménez-Pérez y Wang 2004; Boivin y Gauvin 2009). A partir de los resultados obtenidos en este capítulo y los estudios previos de supervivencia de larvas fuera del hospedador, se observa que las larvas de *M. ruficauda* presentan una relación negativa entre el tamaño corporal y la supervivencia a lo largo de la temporada reproductiva, donde las larvas de estadio I de menor tamaño presentan una mayor supervivencia que aquellas de mayor tamaño (Crespo 2007). Estos resultados no concuerdan con lo predicho por la bibliografía donde el tamaño corporal correlaciona positivamente con diferentes características de la historia de vida del individuo como es la fecundidad, la capacidad de dispersión y la supervivencia entre otros (Diss et al. 1996; Fox y Czesak 2000; Elser y Jervis 2003; Boivin y Gauvin 2009; Da-Silva Araujo et al. 2012). Esto podría explicarse a partir de un mecanismo en el cual la hembra de *M. ruficauda*, según las condiciones ambientales, asigne diferencialmente distintos recursos específicos que les permitan a las larvas una mayor supervivencia. Casas y colaboradores (2005) han demostrado en otra especie de parasitoide que las reservas de carbohidratos ayudan en el mantenimiento del organismo hasta hallar al hospedador, es decir, que los individuos con mayores reservas de carbohidratos presentan una mayor supervivencia. Por su parte, en trabajos realizados con lepidópteros se ha demostrado la capacidad de la hembra de variar la composición de nutrientes de los huevos (Diss et al. 1996; Fox y Czesak 2000). Los resultados de la estimación del índice de la condición corporal de las larvas I de *M. ruficauda* muestran que no habría diferencias entre los diferentes momentos de la temporada reproductiva. Esto sugiere que las larvas al nacer tendrían la misma condición fisiológica durante toda la temporada reproductiva, por tanto los huevos tendrían similar contenido de reservas de grasas (Jakob et al. 1996). Para *M. ruficauda*, los resultados indican que las hembras depositarían huevos con similar cantidad de este tipo de nutrientes en todo momento de la temporada, pero con larvas de menor tamaño corporal a principios de la temporada. Este hecho sugiere que los

huevos podrían ser de menor tamaño y los desoves más grandes, como ocurre en otros insectos y artrópodos que regulan su puesta (Fox y Czesak 2000; Papaj 2000; Fournet et al. 2001; Plaistow et al. 2007; Heimpel y Casas 2008; Jervis et al. 2008), aunque esto debe ser investigado mediante nuevos procedimientos. Este resultado sigue siendo contradictorio con el patrón observado para la supervivencia, donde una mejor condición corporal conlleva a una mayor supervivencia y trae aparejadas ventajas ecológicas de gran importancia en esta especie. Debido a que las larvas que nacen apenas comienza la temporada reproductiva tienen que esperar más tiempo a la aparición del hospedador susceptible al parasitismo en el campo, en contraposición a las larvas que nacen posteriormente en la temporada, es de esperar que exista un mecanismo fisiológico que produzca la diferencia observada en la supervivencia (Crespo 2007). Sin embargo, como la condición corporal se estimó utilizando valores promedio en lugar de valores individuales para cada larva, es necesario realizar nuevamente este estudio para determinar si existe algún patrón biológico y estadísticamente significativo.

De todos modos, los resultados obtenidos podrían no ser biológicamente relevantes dado que las diferencias entre los individuos que provienen de diferentes momentos de la temporada reproductiva son bajas (aproximadamente entre el 1 y 3 % del estimador). Por tanto, son necesarios nuevos estudios donde todas las estimaciones del tamaño corporal se realicen de forma individual sobre las larvas y a su vez se efectúen análisis cuantitativos de las reservas nutricionales de los individuos, con el fin de entender si existe una relación entre el momento de la temporada en que nacen las larvas y los recursos energéticos que tienen a partir de la asignación efectuada por la hembra.

CAPÍTULO 5

ORIGEN Y ALMACENAMIENTO EN *Cyclocephala signaticollis* DE LAS CLAVES QUÍMICAS ATRATIVAS PARA EL PARASITOIDE

Este capítulo dio origen a la siguiente publicación: GROBA, HF & CASTELO, MK, 2012. Chemical interaction between a dipteran parasitoid larva and its coleopteran host: A case of exploitation of the communication system during the searching behaviour? *Bulletin of Entomological Research*, 102: 315-323.

Introducción

En el comportamiento de forrajeo de los predadores y parasitoides, la localización activa de las presas/hospedadores es mediada por diferentes tipos de claves como son las claves mecánicas, visuales y químicas (Zuk y Kolluru 1998; Gullan y Cranston 2005). En particular, el rol de las claves químicas en este comportamiento en los insectos es de suma relevancia (Vet et al. 1991; Vet y Dicke 1992; Agosta 2001; Gullan y Cranston 2005). Estas tienen su origen de la actividad de los individuos en el ambiente o de la producción activa por parte de las presas/hospedadores, las cuales intervienen en la comunicación coespecífica de estos organismos (Dicke y Sabelis 1988; Lewis y Martin 1990; Vet y Dicke 1992; Godfray 1994; Stowe et al. 1995; Vet et al. 1995; Bottrell et al. 1998; De Moraes et al. 2000; Steidle y Van Loon 2003; Wertheim 2005; Wertheim et al. 2005). A estos últimos compuestos se los denomina feromonas y debido a que median en la interacción entre individuos de la misma especie, son importantes fuentes de información para los predadores y parasitoides que pueden beneficiarse al explotar como kairomonas a estos sistemas de comunicación (Dicke y Sabelis 1988; Vet et al. 1991; Aldrich 1995; Stowe et al. 1995; Wertheim 2005; Wertheim et al. 2005).

Existen algunos estudios donde se ha determinado el origen específico de producción de feromonas en los insectos. Una posible fuente son los tejidos o células involucradas en la síntesis y producción de feromonas sexuales o de agregación (Leal 1998; Tillman et al. 1999; Ma y Ramaswamy 2003; Wyatt 2003). La ubicación anatómica de estos tejidos es muy variable, pero el abdomen es el lugar más común donde se han localizado este tipo de tejidos en Blattodea, Coleoptera y Lepidoptera (Leal 1998; Tillman et al. 1999; Ma y Ramaswamy 2003). Otra posible fuente de producción de feromonas son los microorganismos asociados a órganos de los insectos (Hoyt et al. 1971; Byers y Wood 1981; Dicke 1988; Davis et al. 2013). Existen microorganismos

que tienen una dependencia estricta con sus hospedadores y otros que pueden vivir libremente. La ubicación de estos depende de la especie de insecto con la que están asociados y de sus hábitos (Hoyt et al. 1971; Byers y Wood 1981; Dicke 1988; Davis et al. 2013).

En el sistema parasitoide-hospedador *M. ruficauda* y *C. signaticollis*, trabajos previos demostraron que la fuente de infoquímicos atractivos para la larva de estadio II del parasitoide está asociada al tubo digestivo de las larvas de tercer estadio del hospedador (Castelo 2003; Castelo y Lazzari 2004; Crespo y Castelo 2008). Además, Castelo (2003) encontró que estos infoquímicos median algún comportamiento entre las larvas de estadio III de *C. signaticollis*, demostrando que las larvas se orientan hacia extractos de la mitad posterior del cuerpo de sus coespecíficos, en particular hacia a la mitad posterior del tubo digestivo. No obstante, aun no se conoce cuál es el origen anatómico de producción o almacenamiento de estos infoquímicos. En base a la morfología e histología del tubo digestivo de *C. signaticollis*, las posibles fuentes de producción de los infoquímicos involucrados en estas interacciones pueden ser un tejido glandular o microorganismos asociados al tubo digestivo (Hoyt et al. 1971; Bauchop y Clarke 1975; Byers y Wood 1981; López-Guerrero y Morón 1990; Cazeimer et al. 1997; Egert et al. 2005).

En el presente capítulo de esta Tesis se estudiaron algunos aspectos de la ecología química del sistema parasitoide-hospedador *M. ruficauda* - *C. signaticollis*. Los objetivos particulares de este capítulo fueron determinar: 1) que parte de la mitad posterior del tubo digestivo de *C. signaticollis* está asociada a los infoquímicos utilizados por las larvas de *M. ruficauda* en la localización del hospedador; y 2) si estos infoquímicos que son atractivos para las larvas de *M. ruficauda* median algún comportamiento entre las larvas de *C. signaticollis*.

Se espera que si *M. ruficauda* utiliza en la orientación hacia el hospedador los mismos infoquímicos que median alguna de las interacciones entre los individuos de *C. signaticollis*, ambas especies se orientaran positivamente hacia los mismos estímulos.

Materiales y Métodos

Con el fin de determinar tanto el origen anatómico de producción o almacenamiento de los infoquímicos de *C. signaticollis* y si estos median una orientación positiva de las larvas de *M. ruficauda*, se utilizaron larvas de segundo estadio del parasitoide en experimentos olfatométricos de elección doble utilizando diferentes estímulos provenientes de distintas partes de la mitad posterior del intestino de *C. signaticollis*. Además utilizando los mismos estímulos que se pusieron a prueba para *M. ruficauda* se estudió si existe la orientación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* hacia sus coespecíficos.

Condiciones experimentales

Los experimentos con larvas de *M. ruficauda* se realizaron durante los meses de enero y marzo del 2007 y 2009 bajo condiciones de laboratorio ($25,7 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$; $60,0 \pm 5\%$ humedad relativa), en días con un rango de presión atmosférica de entre 1012 a 1020 hPa. Los experimentos con *C. signaticollis* se realizaron durante julio y agosto del 2008 y 2009 bajo condiciones de laboratorio ($22,5 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$; $63,0 \pm 15\%$ humedad relativa) y presión atmosférica de 1008 a 1024 hPa.

Para garantizar la ocurrencia de las respuestas comportamentales se utilizaron en los experimentos extractos de una concentración equivalente a 2,5 gusanos blancos por ml de solvente para los experimentos de *M. ruficauda*, más del doble de concentración utilizado por Castelo y Lazzari (2004). Para los experimentos de *C. signaticollis* se

utilizaron extractos de una concentración equivalente a 1 gusano blanco por ml de solvente, concentración que asegura la respuesta comportamental de los individuos (Castelo 2003).

Insectos

Las larvas de *M. ruficauda* fueron criadas en el laboratorio a partir de los desoves recolectados de enero a marzo del 2007 y 2009. La obtención y mantenimiento de los individuos previa realización de los experimentos se detalla en el Capítulo *Materiales y Métodos Generales*. Para los experimentos se utilizaron las larvas que alcanzaron el segundo estadio de entre 22 y 25 días de vida.

Las larvas de *C. signaticollis* fueron colectadas de mayo a agosto de 2008 y 2009. Las mismas fueron identificadas y mantenidas hasta su utilización en los experimentos como se detalla en el capítulo *Materiales y Métodos Generales*.

Obtención de los estímulos de *C. signaticollis*

Los estímulos utilizados en los experimentos fueron obtenidos de diferentes partes del intestino posterior de las larvas de tercer estadio de *C. signaticollis*, según el protocolo empleado por Castelo y Lazzari (2004) y Crespo y Castelo (2008). Inmediatamente después de que los individuos fueran colectados, se realizaron disecciones de diferentes partes del intestino de las larvas de *C. signaticollis*, las cuales fueron homogeneizadas utilizando hexano como solvente para obtener los extractos de los infoquímicos (Castelo y Lazzari 2004). Los extractos obtenidos fueron conservados hasta su uso en freezer para evitar la degradación de los mismos.

Con el fin de identificar el origen específico de producción de infoquímicos, los extractos de *C. signaticollis* se realizaron dividiendo a la mitad posterior del tubo

digestivo de la larva de tercer estadio en 3 regiones morfológicamente diferentes: el mesenterón posterior (M), la cámara de fermentación o rumen (CF) y el colon (C). Además, para otras dos series experimentales, se separó el contenido del epitelio del tubo digestivo para determinar si las claves son producidas por el tejido de la cámara de fermentación (López-Guerrero y Morón 1990) o por la presencia de microorganismos asociados al tubo digestivo (Chapman 2013). Se utilizaron 2 protocolos diferentes para extraer los estímulos. En el primer protocolo (protocolo I) se separó el contenido del epitelio y luego se realizó una homogenización del contenido utilizando hexano. Por otro lado el epitelio se lavó con agua destilada y homogenizó con hexano. Para el segundo protocolo (protocolo II), el epitelio fue tratado de la misma manera, pero las claves químicas presentes en el contenido de la cámara de fermentación se obtuvieron mediante una extracción en 2 fases. Esta técnica permitió separar las claves químicas disolviendo el contenido de la cámara de fermentación en 2 solventes inmiscibles (hexano-agua). Debido a que las claves químicas son no polares (Castelo y Lazzari 2004), estas fueron extraídas en la fracción del solvente no polar (hexano).

El protocolo experimental de obtención de los extractos utilizados en los experimentos comportamentales de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* de esta Tesis y los utilizados en otros estudios se detallan en la Figura 5.1. Cada uno de los extractos se realizó una única vez y se lo tomó como extracto madre. Luego, el extracto fue dividido en dos partes, utilizando cada parte del mismo extracto para realizar los experimentos comportamentales de orientación con *M. ruficauda* y *C. signaticollis*.

Respuesta de los individuos a los estímulos del hospedador/coespecífico

Los experimentos para determinar las respuestas comportamentales de orientación de los insectos fueron hechos utilizando olfatómetros de ambiente estacionario y

extractos de larvas de tercer estadio de *C. signaticollis* como se detalló previamente (ver *Materiales y Métodos Generales*). En la Tabla 5.1 se detalla el diseño experimental y el número de replicas para cada experimento.

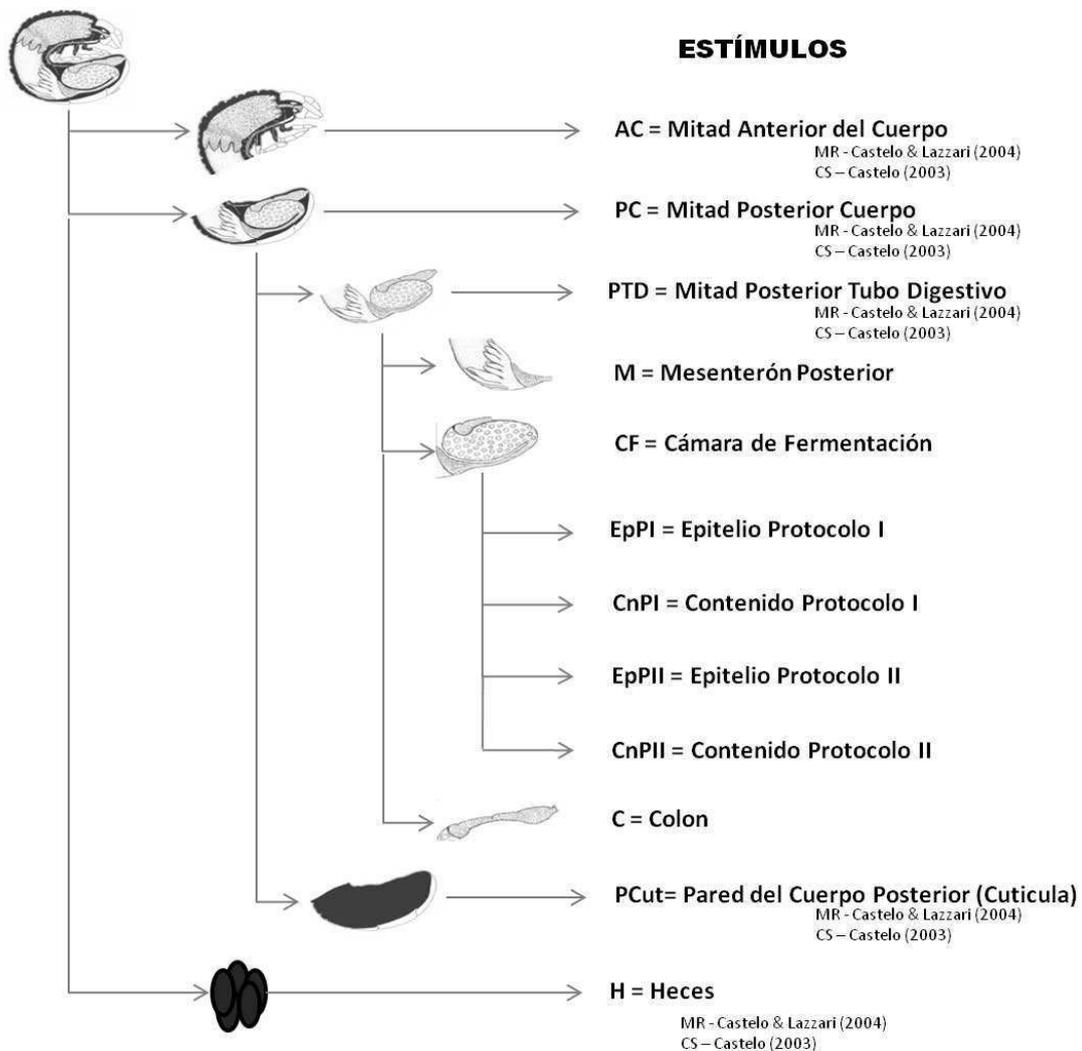


Figura 5.1. Regiones del cuerpo de la larva de *C. signaticollis* utilizadas para realizar los extractos puestos a prueba en los experimentos comportamentales. MR - Castelo y Lazzari (2004) y CS - Castelo (2003) indican los extractos utilizados en estudios previos con las larvas de *M. ruficauda*; y de *C. signaticollis*, respectivamente. El resto de los tratamientos corresponde a los puestos a prueba en esta Tesis.

Respuesta de *M. ruficauda* a estímulos del hospedador

Los experimentos de orientación de las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* hacia estímulos de larvas de *C. signaticollis* fueron llevados a cabo en el olfatómetro “Extractos-Larvas” descrito previamente en la sección *Materiales y Métodos Generales*. En cada ensayo los individuos experimentales se liberaron en el centro de

la arena y luego de 90 min de experimentación se registró su posición dentro del área (Tabla 5.1).

Respuesta de *C. signaticollis* a estímulos de coespecíficos

Para los experimentos de orientación de las larvas de *C. signaticollis* hacia estímulos de sus coespecíficos se utilizó el olfatómetro “Extractos-Gusanos” descrito previamente en la sección *Materiales y Métodos Generales*. Los individuos experimentales fueron liberados en el centro de la arena en cada ensayo, y al cabo de 45 min de experimentación se registró su posición dentro del área (Tabla 5.1).

Análisis estadístico

En los experimentos realizados se midió la respuesta de orientación de las larvas de *M. ruficauda* y de las larvas de *C. signaticollis* hacia estímulos de *C. signaticollis*. En ambos experimentos, se evaluó la preferencia de los insectos por cada zona de la arena experimental (estímulo o control), como fue descrito en el capítulo *Materiales y Métodos Generales*.

Resultados

Respuesta de *M. ruficauda* a estímulos del hospedador

Cuando los individuos de segundo estadio larval de *M. ruficauda* fueron expuestos a olores provenientes del tercer estadio larval de *C. signaticollis*, los experimentos revelaron que los infoquímicos que evocan una orientación positiva hacia el hospedador se encuentran asociados a la cámara de fermentación (Tabla 5.1, Figura 5.2). Sin embargo, las larvas se distribuyeron al azar en la arena experimental cuando fueron expuestas a extractos del epitelio y del contenido de la cámara de fermentación

con ambos protocolos (Tabla 5.1, Figura 5.3). Estos resultados sugieren que los infoquímicos atractivos utilizados por las larvas de *M. ruficauda* en el comportamiento de localización del hospedador están al menos almacenados en la cámara de fermentación, pero no permitieron determinar el origen preciso de biosíntesis de los infoquímicos.

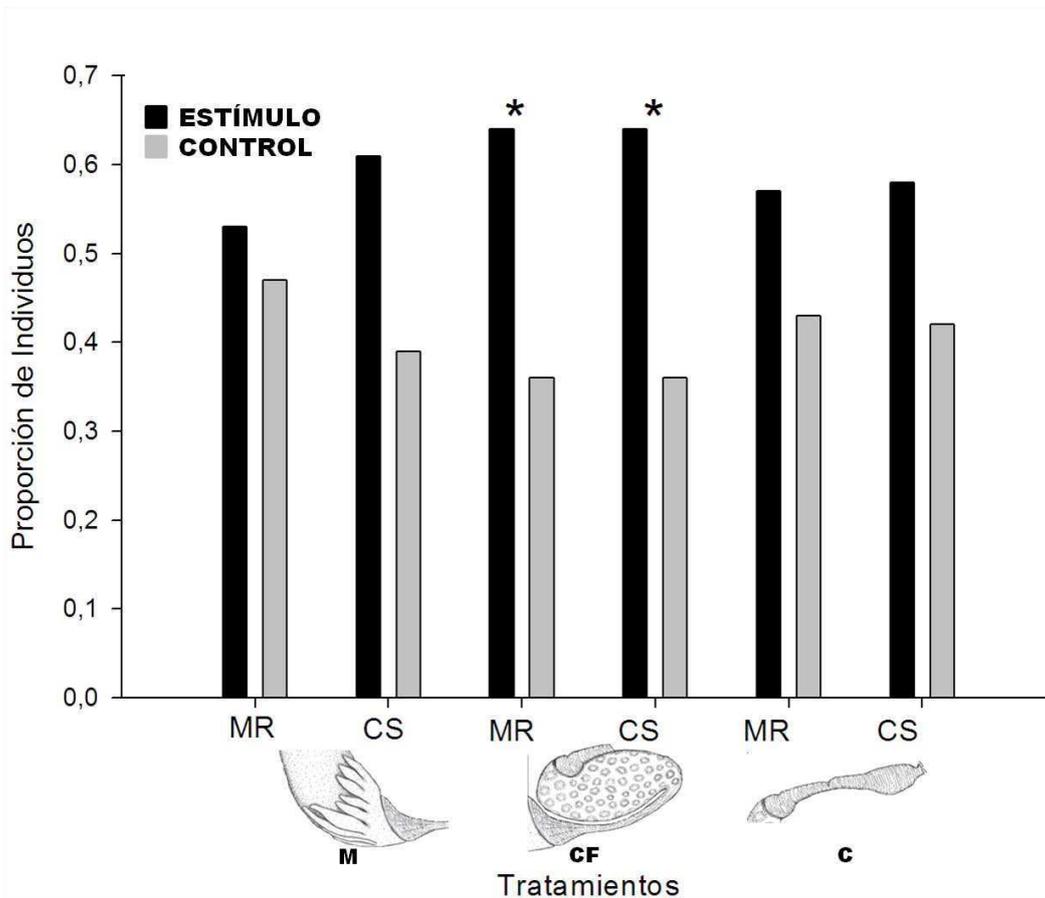


Figura 5.2. Respuesta de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* hacia estímulos de las 3 regiones de la mitad del tubo digestivo posterior del tercer estadio larval de *C. signaticollis*. Las larvas de ambas especies fueron atraídas hacia extractos de la cámara de fermentación. Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa (χ^2 , $P < 0,05$). Abreviaturas: MR, *M. ruficauda*; CS, *C. signaticollis*; M, mesenterón posterior; CF, cámara de fermentación; C, colon.

Tabla 5.1. Experimentos de olfatometría realizados para evaluar la respuesta comportamental de larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* hacia olores de diferentes partes del cuerpo del tercer estadio larval de *C. signaticollis*. Abreviaturas: MR, *M. ruficauda*; CS, *C. signaticollis*; M, mesenterón posterior; CF, cámara de fermentación; EpPI, epitelio protocolo I; CnPI, contenido protocolo I; EpPII, epitelio protocolo II; CnPII, contenido protocolo II; C, colon; Hx, hexano (control). En las columnas MR y CS se muestra el número de réplicas por experimento. Entre paréntesis se muestra el número total de individuos que tomaron una decisión (izquierda: estímulo, derecha: control) en la arena experimental. Los asteriscos denotan diferencias significativas.

Experimento (estímulo – control)	MR	CS	Descripción	MR χ^2 ; P	CS χ^2 ; P
M – Hx	100 (37-33)	70 (31-20)	Individuos expuestos a extracto del mesenterón posterior.	0,23 ; > 0,5	2,37 ; > 0,1
CF – Hx	100 (51-29)	70 (36-20)	Individuos expuestos a extracto de la cámara de fermentación.	6,05 ; < 0,025 *	4,57 ; < 0,05 *
EpPI – Hx	200 (67-74)	64 (25-22)	Individuos expuestos a extracto del epitelio de la CF (protocolo I).	0,35 ; > 0,5	0,19 ; > 0,5
CnPI – Hx	200 (61-59)	64 (28-26)	Individuos expuestos a extracto del contenido de la CF (protocolo I).	0,03 ; > 0,75	0,07 ; > 0,75
EpPII – Hx	200 (58-68)	64 (27-19)	Individuos expuestos a extracto del epitelio de la CF (protocolo II).	0,79 ; > 0,25	1,39 ; > 0,1
CnPII – Hx	200 (63-57)	64 (25-20)	Individuos expuestos a extracto del contenido de la CF (protocolo II).	0,3 ; > 0,5	0,56 ; > 0,25
C – Hx	150 (56-43)	70 (33-24)	Individuos expuestos a extracto del colon.	1,71 ; > 0,1	1,42 ; > 0,1

Respuesta de *C. signaticollis* a estímulos de coespecíficos

Cuando se analizó el comportamiento de orientación de las larvas de *C. signaticollis* frente a extractos de las 3 regiones de la mitad posterior del tubo digestivo (mesenterón posterior, cámara de fermentación y colon) de *C. signaticollis*, se observó una orientación positiva de los gusanos blancos frente a extractos de la cámara de fermentación de sus coespecíficos (Tabla 5.1, Figura 5.2).

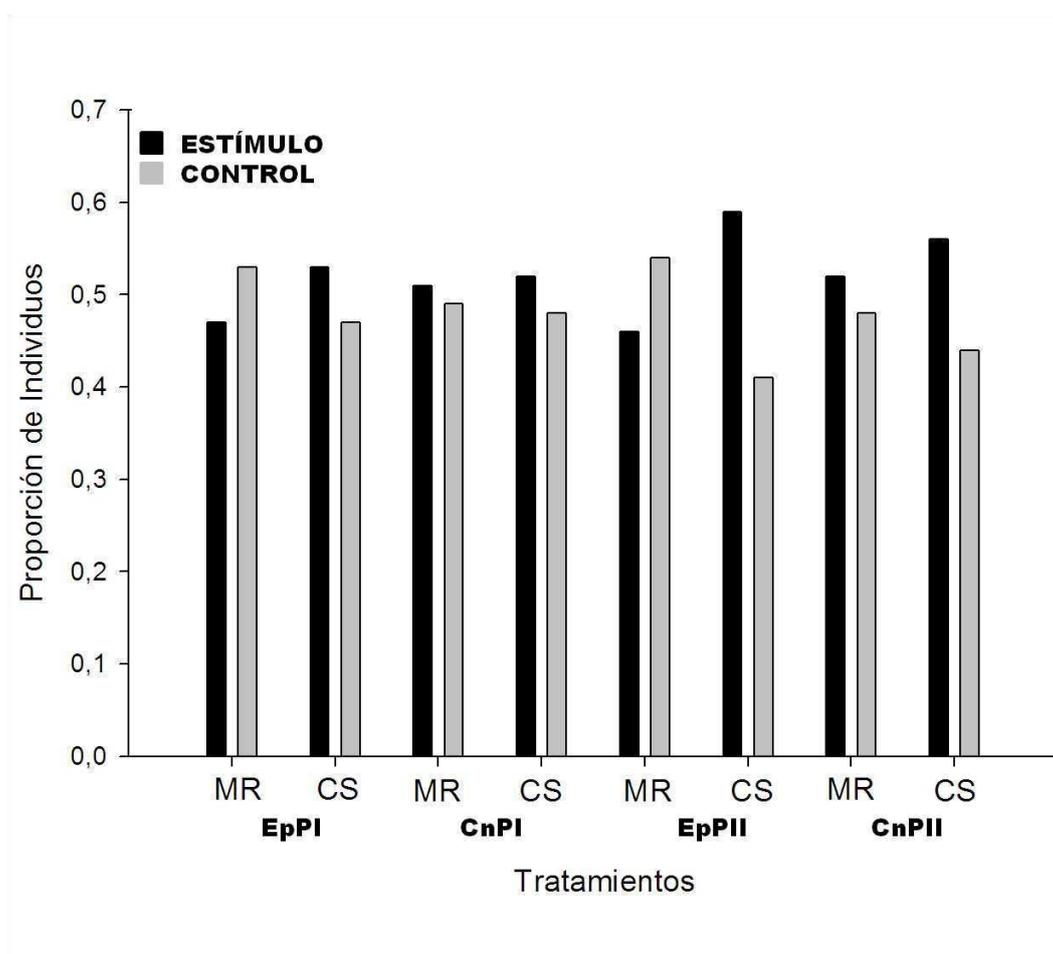


Figura 5.3. Respuesta comportamental de orientación de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* hacia estímulos extraídos de dos porciones de la cámara de fermentación del tercer estadio larval de *C. signaticollis*. Abreviaturas: MR, *M. ruficauda*; CS, *C. signaticollis*; EpPI, epitelio protocolo I; CnPI, contenido protocolo I; EpPII, epitelio protocolo II; CnPII, contenido protocolo II (Ver detalles en *Materiales y Métodos*).

Por el contrario, se encontró que las larvas *C. signaticollis* se distribuyeron al azar en la arena experimental cuando fueron estimuladas con extractos provenientes del epitelio y contenido de la cámara de fermentación de coespecíficos, para ambos

protocolos (Tabla 5.1, Figura 5.3). Este resultado es desconcertante con respecto al anterior pero sugiere que los extractos podrían perder su actividad biológica cuando se divide a la cámara de fermentación en el contenido y el epitelio.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en ambos experimentos muestran que las larvas de *M. ruficauda* y de *C. signaticollis* son atraídas por extractos de la misma porción del intestino posterior de *C. signaticollis*. Esto sugiere que ambas especies podrían estar utilizando las mismas claves, pero en contextos diferentes. Es decir en la localización del hospedador por parte del parasitoide y en algún tipo de interacción coespecífica entre individuos de *C. signaticollis*.

Discusión

En el presente capítulo se determinó que una región de la mitad posterior del tubo digestivo de *C. signaticollis* presenta las claves atractivas utilizadas por *M. ruficauda* en la orientación hacia el hospedador. Los resultados demuestran que los infoquímicos que estimulan el comportamiento de orientación positiva de las larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* están asociados a la cámara de fermentación, pero no al mesenterón o al colon del sistema digestivo del hospedador. Estos resultados concuerdan y profundizan los resultados obtenidos en el estudio de Castelo (2003) y Castelo y Lazzari (2004). No solo se ha corroborado que las larvas del parasitoide y el hospedador se ven atraídas hacia extractos de la mitad posterior del tubo digestivo sino que se ha determinado que las claves químicas involucradas están asociadas a una región particular del intestino. Se ha demostrado que en los parasitoides inmaduros pertenecientes al orden Coleoptera y Diptera el comportamiento de búsqueda es modulado por claves liberadas por sus hospedadores (Godfray 1994; Feener Jr. y Brown 1997; Brodeur y Boivin 2004). Por ejemplo, la claves químicas que

intervienen en el comportamiento de localización del hospedador en *Aleochara sp.* Gravenhorst (Coleoptera: Staphylinidae) del sur de África son producidas por su hospedador, la mosca *Haematobia thirouxi potans* Bezzi (Diptera: Muscidae) (Wright y Müller 1989). En *M. ruficauda*, la larva pasa toda su vida bajo tierra en un ambiente químicamente complejo, por tanto es de esperarse que los infoquímicos que desencadenan el comportamiento de búsqueda del hospedador sean producidos directamente por el hospedador.

Respecto al comportamiento de orientación de *C. signaticollis* frente a olores de coespecíficos, se encontró que la orientación positiva fue sólo hacia olores provenientes de la cámara de fermentación. Curiosamente, no existió orientación positiva hacia olores provenientes de extractos hechos del colon lo que indicaría que estos compuestos químicos no estarían relacionados a volátiles provenientes del alimento ni a metabolitos producto de la degradación de los nutrientes. En estudios previos se demostró que los gusanos blancos tienen una distribución agregada en el campo (Castelo y Capurro 2000). Esto indica que los químicos encontrados en la cámara de fermentación podrían actuar como feromona de agregación. Sin embargo, no se conoce cómo los volátiles dejan la cámara de fermentación y llegan al exterior. Una posibilidad es que los volátiles de alguna manera sean vehiculizados a través de la cutícula y alcancen el exterior a partir del sistema traqueal como ocurre con el producto de algunas células glandulares sintetizadoras de feromonas de otros insectos (Ma y Ramaswamy 2003).

Este estudio comportamental es el primero en plantear la posible existencia de atracción coespecífica entre larvas de escarabeidos a partir de una aproximación experimental. No obstante, existen muchos reportes que muestran que las larvas de insectos responden a claves químicas. En estos estudios los autores sugieren que estas respuestas comportamentales provocadas por claves químicas tienen

indirectamente un beneficio en los organismos que tienen vida en grupo. Algunos sugieren que aumenta o mejora la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo individual (Ghent 1960; Stamp y Bowers 1990; Inouye y Johnson 2005; Despland y Le Huu 2006; Jumean et al. 2009). Otros proponen que incrementa la eficiencia en la explotación del alimento o la habilidad defensiva contra enemigos naturales (Capinera 1980; Tsubaki y Shiotsu 1982; Deneubourg et al. 1990; Hunter 2000; Ruzicka y Zemek 2008).

Se ha propuesto otro beneficio para el comportamiento de agregación entre larvas vinculado a la búsqueda de pareja en los adultos. Por ejemplo, en la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), se registró una disminución en el tiempo de búsqueda de pareja para los machos luego de la emergencia, en la cual estarían involucrados dos comportamientos (Duthie et al. 2003). Por un lado, las larvas en su estadio final se agrupan como resultado de la atracción hacia las larvas que están construyendo el capullo y las prepupas, y por otro lado, los machos recién emergidos son arrestados por los infoquímicos liberados por las pupas de las hembras. Estos dos comportamientos permitirían que las hembras copulen apenas hayan emergido (Duthie et al. 2003). Las especies del género *Cyclocephala* son univoltinas, es decir, los adultos son activos unas pocas semanas al año (Alvarado 1980; Potter 1981). Por consiguiente, es de extrema importancia que los machos y las hembras se encuentren de una manera eficiente (Potter 1981). Entonces, el comportamiento de agregación entre larvas podría ser un beneficio, ya que la energía no invertida en la búsqueda de pareja podría invertirse en la progenie aumentando su *fitness* o aptitud biológica.

También se realizaron experimentos para determinar si los infoquímicos que atraen a las larvas de *M. ruficauda* son producidos por glándulas o microorganismos de la cámara de fermentación. Para poder llevar a cabo este objetivo, se realizaron dos

series de experimentos que no fueron concluyentes, dado que ninguno de los tratamientos realizados (extractos del contenido y del epitelio de la cámara de fermentación) evocó una respuesta de orientación en *M. ruficauda*. El hecho de que no se haya podido encontrar un resultado positivo para estos experimentos indica que las claves químicas serían altamente volátiles y pueden haberse perdido durante la disección y manipulación durante la preparación de los extractos del contenido y el epitelio de la cámara de fermentación. Se ha demostrado que compuestos con alta volatilidad cumplen un rol importante en la búsqueda del hospedador de muchas especies de larvas de insectos fitófagos, principalmente dípteros, que viven bajo tierra (Hibbard y Bjostad 1988; Villani y Wright 1990). Debido a la alta volatilidad de las claves químicas, probablemente cuando se abrió la cámara de fermentación los compuestos se perdieron durante la disección del tubo digestivo, previo a ser retenidos por el solvente de extracción. Por otro lado, existe evidencia que demuestra que las feromonas son mezclas de compuestos donde la proporción de cada uno de los componentes es importante en su actividad biológica. Por tanto, un cambio en la composición de la mezcla puede ocasionar pérdida de la actividad biológica (Greenfield 2002; Wyatt 2003; Morgan 2004; Mori 2010). Además, existe la posibilidad de que haya sinergismo entre compuestos de las diferentes porciones de la cámara de fermentación (epitelio y contenido), es decir que la atracción hacia extractos de esta región del tubo digestivo podría perderse si se la divide en las partes que la componen. Esta es otra posible razón por la cual se perdió la actividad cuando los extractos fueron ofrecidos a las larvas. Por último, otra posible explicación a la pérdida de la actividad biológica podría ser la reacción del sistema inmune del hospedador hacia las heridas infringidas durante la disección de la cámara de fermentación. En los insectos, las heridas desencadenan una cascada de reacciones de síntesis de diferentes compuestos (Fehlbaum et al. 1994; Bidla et al. 2009). Estos compuestos podrían interactuar con los infoquímicos modificando su composición o sus características químicas. Sin embargo, si el procedimiento hubiese generado cambios

en la composición de la mezcla o características de los infoquímicos, lo mismo debería haber ocurrido con los otros extractos realizados. Además, los insectos fueron sacrificados previamente a la disección y por tanto el sistema inmune de los individuos no tuvo oportunidad de desencadenar ninguna respuesta, modificando la composición o características de los infoquímicos. Sin embargo, más allá de que no se pudo identificar el origen preciso de biosíntesis de las claves, los resultados indicaron la posible existencia de una feromona involucrada en la comunicación coespecífica de *C. signaticollis* y que posiblemente las mismas claves son utilizadas por las larvas de *M. ruficauda* en la localización del hospedador. Si esto fuera cierto, entonces *M. ruficauda* estaría explotando el sistema de comunicación intraespecífica de *C. signaticollis* durante la búsqueda del hospedador.

Existen pocos casos que demuestran la explotación del sistema de comunicación del hospedador por parte de los parasitoides. Esto se debe a que en un sistema multitrófico complejo las claves químicas altamente confiables tienen una baja detectabilidad disminuyendo el encuentro con el hospedador (Vet et al. 1991; Vet y Dicke 1992; Aldrich 1995; Riba y Blas 1995; Stowe et al. 1995). Sin embargo, en parasitoides como *M. ruficauda* que tienen una búsqueda compartida del hospedador, la hembra sería atraída por claves menos confiables pero altamente detectables durante la oviposición mientras que las larvas buscarían y encontrarían a sus hospedadores orientándose hacia aleloquímicos altamente confiables y específicos del hospedador. Esta estrategia podría incrementar la eficiencia en la localización del hospedador aumentando a su vez el *fitness* o aptitud biológica de los individuos.

CAPÍTULO 6

**DETERMINACIÓN DEL AGENTE PRODUCTOR DE LAS
CLAVES QUÍMICAS ATRACTIVAS PARA EL
PARASITOIDE EN EL INTESTINO DE
*Cyclocephala signaticollis***

Introducción

Las interacciones interespecíficas entre los predadores/parasitoides (enemigos naturales) y sus presas/hospedadores (insectos fitófagos) se dan a partir de diferentes claves sensoriales (Eggleton y Belshaw 1992; Godfray 1994; Stowe et al. 1995; Feener Jr. y Brown 1997; Zuk y Kolluru 1998; Greenfield 2002). En particular las claves químicas son las más estudiadas en la localización de los insectos fitófagos de los enemigos naturales (Dicke y Sabelis 1988; Lewis y Martin 1990; Vet y Dicke 1992; Godfray 1994; Stowe et al. 1995; Vet et al. 1995; Rutledge 1996; Bottrell et al. 1998; Zuk y Kolluru 1998; Vet 1999; De Moraes et al. 2000; Wyatt 2003; Afsheen et al. 2008). En la mayoría de los casos, los infoquímicos liberados por las plantas hospedadoras de los insectos fitófagos son importantes claves utilizadas por los enemigos naturales en la localización, debido a que tienen una alta detectabilidad. También son muy utilizadas en este proceso las claves químicas originadas a partir de la actividad de los insectos fitófagos (Vinson 1984; Vet et al 1991; Vet y Dicke 1992; Godfray 1994; Stowe et al. 1995; Vet et al. 1995; Rutledge 1996; Vet 1999; Steidle y Van Loon 2003; Wyatt 2003; Afsheen et al. 2008). Entre las diferentes fuentes de infoquímicos, la explotación del sistema de comunicación de los insectos fitófagos (feromonas) por parte de los enemigos naturales ha sido registrada en muchas especies debido al compromiso evolutivo que representa. En este contexto, la necesidad de los insectos de aumentar el *fitness* o aptitud biológica a partir de la vida en grupo, encontrar pareja y lugares confiables de oviposición, hace que tenga lugar la comunicación, emitiendo feromonas, con la desventaja de ser potencialmente “espiados” por sus enemigos naturales (Dicke y Sabelis 1988; Stowe et al. 1995; Hoffmister y Roitberg 1998; Zuk y Kolluru 1998; Wertheim et al. 2003; Wyatt 2003).

La explotación del sistema de comunicación de los hospedadores por parte de los parasitoides ha sido bien documentada (Eggleton y Belshaw 1993; Wiskerke et al.

1993a, b; Godfray 1994; Aldrich 1995; Stowe et al. 1995; Vet et al. 1995; Feener Jr. et al. 1996; Rutledge 1996; Feener Jr. y Brown 1997; Glinwood et al. 1999; Hoffmeister y Gienapp 1999; Aldrich y Zhang 2002; Duthie et al. 2003; Wertheim et al. 2003; Jumean et al. 2005; Stireman III et al. 2006; Afsheen et al. 2008; Jumean et al. 2009; Dweck et al. 2010; Jang et al. 2011; Mathis et al. 2011). En los parasitoides himenópteros, este comportamiento ha sido observado en varios grupos y especies donde los hospedadores se encuentran ocultos (Wiskerke et al. 1993a, b; Hoffmeister y Gienapp 1999; Stiedle y Van Loon 2003; Jumean et al. 2005), o donde la hembra del parasitoides utiliza las feromonas de otro estado del hospedador diferente al que parasitan, como los parasitoides de huevos o larvas (Stowe et al. 1995; Stiedle y Van Loon 2003; Wertheim et al. 2003; Yong et al. 2007; Dweck et al. 2010; Conti y Colazza 2012). La utilización de feromonas en los parasitoides pertenecientes al orden Diptera se ha observado en las familias Tachinidae y Phoridae donde las hembras utilizan las feromonas de los estados del hospedador al que parasitan (Aldrich 1995; Feener Jr. et al. 1996; Feener Jr. y Brown 1997; Aldrich y Zhang 2002; Stireman III et al. 2006; Jang et al. 2011; Mathis et al. 2011). En trabajos previos y en el capítulo anterior de esta Tesis se ha encontrado evidencia que muestra que la larva de *M. ruficauda* presenta una orientación positiva hacia claves químicas procedentes de su hospedador, las cuales se ha sugerido que podrían ser las mismas que promueven el comportamiento de agregación en el campo de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* (Castelo y Capurro 2000; Castelo 2003; Castelo y Lazzari 2004; Crespo y Castelo 2008). En particular esta posible feromona de agregación se encuentra asociada al tubo digestivo de las larvas del hospedador (Castelo 2003; Castelo y Lazzari 2004), específicamente a la cámara de fermentación. En otros escarabeidos, esta región del tubo digestivo presenta tejido glandular (López Guerrero y Morón 1990) y/o comunidades de microorganismos (Egert et al. 2005; Zhang y Jackson 2008; Huang et al. 2010; Zheng et al. 2012; Chapman 2013), siendo ambos posibles agentes de producción de feromonas en los insectos (Hoyt et al. 1971; Byers y Wood 1981; Dicke

1988; Leal 1998; Tillman et al. 1999; Ryan 2002; Ma y Ramaswamy 2003; Wyatt 2003; Dillon y Dillon 2004; Davis et al. 2013).

En los insectos, la producción de feromonas a partir de tejidos glandulares fue muy estudiada en varios órdenes (Leal 1998; Tillman et al. 1999; Ryan 2002; Ma y Ramaswamy 2003; Wyatt 2003). En estos tejidos, la biosíntesis de las feromonas es realizada por células secretoras individuales o por grupos de células que conforman un tejido glandular (Quennedy 1998; Ryan 2002; Ma y Ramaswamy 2003). La ubicación de los tejidos glandulares es muy variable, dado que se han encontrado tejidos glandulares en las antenas, la cabeza, el tórax, las patas y el abdomen de los insectos (Tillman et al. 1999; Ryan 2002; Ma y Ramaswamy 2003). En algunas especies de coleópteros se ha determinado que la producción de feromonas tanto sexuales como de agregación se dá en tejidos glandulares del tubo digestivo (Hall et al. 2002a, b; Tittiger et al. 2005; Huma Taban et al. 2006). López Guerrero (1990) indica la posible existencia de un epitelio glandular en la cámara de fermentación de larvas de escarabajo pertenecientes a la subfamilia Dynastinae. Este hecho sugiere que podría existir tejido glandular en la cámara de fermentación de las larvas de *C. signaticollis*. En este contexto, las claves químicas percibidas por las larvas de *M. ruficauda* y de *C. signaticollis* podrían ser producidas por un epitelio secretor del tubo digestivo.

En contraste, los infoquímicos que median en las interacciones insecto–insecto producidos por sus microorganismos asociados han sido menos estudiados relegándose su importancia en estas interacciones (Dillon y Dillon 2004). No obstante, existen casos documentados en la bibliografía donde es importante la intervención de los microorganismos en la producción de feromonas (Hoyt et al. 1971; Dicke 1988; Byer 1989; Domek y Johnson 1990; Hunt y Borden 1990; Vishniac y Johnson 1990; Johnson y Vishniac 1991; Dillon et al. 2000; Six 2003; Dillon y Dillon 2004; Ganter 2006; Huma Taban et al. 2006; Lam et al. 2007; Rivera et al. 2009; Davis et al. 2013).

Entre los coleópteros, se ha visto que los microorganismos localizados en el tubo digestivo posterior producen parte de la mezcla de feromonas que participa en el comportamiento de agregación (Dicke 1988; Byers 1989; Six 2003; Huma Taban et al. 2006; Rivera et al. 2009). Existen pocos casos en escarabeidos adultos donde la producción de feromonas sexuales o de agregación involucra la participación de microorganismos. Sólo se encontró en los adultos de dos especies que los microorganismos asociados producen feromonas de agregación, pero estos no se alojan en el tubo digestivo (Hoyt et al. 1971; Domek y Johnson 1990; Vishniac y Johnson 1990; Johnson y Vishniac 1991). Para los estadios larvales de esta familia se han realizado diversos estudios donde se analizó la fauna de microorganismos en el tubo digestivo del hospedador y su función en la alimentación (Bauchop y Clarke 1975; Cazeimer et al. 1997; Egert et al. 2003; Lemke et al. 2003; Egert et al. 2005; Zhang y Jackson 2008; Huang et al. 2010; Zheng et al. 2012). No hay documentados hasta la fecha en la bibliografía estudios sobre feromonas en estadios inmaduros de esta familia. *Cyclocephala signaticollis* presenta el tubo digestivo típico de los escarabeidos, en el cual se supone se alojan microorganismos que favorecen la digestión (Egert et al. 2005; Zhang y Jackson 2008; Huang et al. 2010; Zheng et al. 2012). Hasta el momento, se desconoce la comunidad de microorganismos asociados al sistema digestivo en este taxón. Por otro lado, en estudios previos se ha determinado que en la cámara de fermentación de las larvas de tercer estadio de *C. signaticollis*, se almacenan claves químicas asociadas a la orientación hacia coespecíficos, lo que sugiere que existiría un sistema de comunicación química intraespecífico en esta especie (Castelo y Capurro 2000; Castelo 2003). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado si existen microorganismos alojados en esta región del tubo digestivo, y de existir, si están relacionados con el comportamiento de agregación en las larvas de este coleóptero, y con el comportamiento de orientación hacia el hospedador en las larvas de *M. ruficauda*.

En este contexto, es probable que los infoquímicos asociados al comportamiento de agregación entre las larvas de tercer estadio de *C. signaticollis* sean sintetizados por los microorganismos, por algún tejido glandular, o por ambos, sugiriendo que existen feromonas de agregación producidas en el tubo digestivo de las larvas del hospedador y que son utilizadas por las larvas de *M. ruficauda* como kairomonas en el contexto de búsqueda y localización de los mismos. Según los antecedentes precedidos y los resultados obtenidos en el capítulo anterior de esta Tesis, en el presente capítulo se intentó determinar indirectamente el agente o estructura de la cámara de fermentación asociado a la producción de los infoquímicos relacionados a la ecología química del sistema parasitoide–hospedador *M. ruficauda*–*C. signaticollis*. Los objetivos particulares de este capítulo fueron: 1) determinar la presencia de tejido glandular y de microorganismos asociados a la cámara de fermentación de la larva de estadio III de *C. signaticollis*; y 2) determinar si los extractos asociados a los productos metabólicos de microorganismos presentes en la cámara de fermentación de *C. signaticollis* resultan atractivos para las larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis*.

Se espera, por tanto, determinar la presencia de tejido glandular y/o microorganismos asociados en la cámara de fermentación de larvas de tercer estadio de *C. signaticollis*. Si la fuente de origen de las claves químicas atractivas en este sistema hospedador–parasitoide fuera un tejido glandular, se espera poder caracterizar al mismo mediante los preparados histológicos; mientras que si son los microorganismos asociados a esta región del tubo digestivo, se espera que los extractos de sus productos metabólicos desencadenen una orientación positiva en las larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis*. En caso contrario, no se observará actividad biológica en los extractos probados.

Materiales y Métodos

Se desarrollaron diferentes protocolos con el objetivo de determinar indirectamente la estructura o agente productor de los infoquímicos presentes en la cámara de fermentación de larvas de estadio III de *C. signaticollis* que median la orientación positiva de las larvas de *M. ruficauda* y de *C. signaticollis*. A partir de los objetivos se realizó un estudio anatómico de la cámara de fermentación de *C. signaticollis* a partir de técnicas comunes de histología con el fin de registrar la presencia de estructuras glandulares potencialmente productoras de infoquímicos. Además, para determinar si existen microorganismos en el tubo digestivo, y determinar si están asociados con los infoquímicos, se realizaron cultivos del contenido de la cámara de fermentación de *C. signaticollis* en medios con diferentes fuentes de carbono, a los cuales se les extrajeron las claves químicas luego de un tiempo de incubación. Los estímulos extraídos fueron ofrecidos a las larvas de estadio II de *M. ruficauda* y a las larvas de estadio III de *C. signaticollis* mediante ensayos comportamentales de olfatometría. Los procedimientos y protocolos experimentales efectuados se detallan a continuación en las sucesivas secciones.

Insectos

Las larvas de *M. ruficauda* fueron criadas en el laboratorio a partir de los desoves recolectados durante enero a marzo del 2011 a 2013 en campos de Pilar y Moreno. La obtención y mantenimiento de los individuos previo a la realización de los experimentos se detalla en el capítulo *Materiales y Métodos Generales*. Para los experimentos se utilizaron las larvas de *M. ruficauda* que alcanzaron el segundo estadio, de entre 20 y 50 días de vida.

Los individuos de *C. signaticollis* de tercer estadio fueron colectados del suelo en pastizales de Pilar, Mercedes y Moreno, de mayo a agosto de 2011 a 2012. La metodología de identificación y mantenimiento de las larvas hasta su utilización en los experimentos se detalla en el capítulo *Materiales y Métodos Generales*.

Determinación de presencia de estructuras glandulares en la cámara de fermentación de *C. signaticollis*

Para registrar la presencia de glándulas o epitelio glandular en el tegumento de la cámara de fermentación de larvas de estadio III de *C. signaticollis* se realizaron cortes histológicos en parafina de esta región del tubo digestivo.

Los individuos de estadio III de *C. signaticollis* fueron anestesiados en frío en un freezer durante 5 minutos. Luego se realizaron disecciones del tubo digestivo para extraer la cámara de fermentación. Las mismas fueron fijadas durante 24 hs utilizando una solución de formaldehído al 4% en un buffer isotónico con el cuerpo del individuo (Ribi 1987). Transcurrido el tiempo de fijación, las piezas se lavaron con buffer isotónico y se deshidrataron en una serie gradual de alcoholes hasta llegar a etanol 100%. Una vez llegado a este punto se prosiguió con la deshidratación, gradualmente, mediante mezclas de alcohol etílico–alcohol butílico (3:1; 1:1; 1:3) hasta llegar a alcohol butílico 100%. Luego las piezas se transfirieron a una mezcla de alcohol butílico–parafina durante 2 hs (se realizaron 2 cambios), y posteriormente se pasaron a parafina 100% (2 cambios).

A partir de las muestras en parafina, se realizaron cortes seriados de 6 a 8 μm de espesor mediante un micrótopo. Los cortes montados en portaobjetos se desparafinaron, se hidrataron en una serie gradual de alcoholes hasta llegar a agua destilada y se colorearon con hematoxilina–eosina (H–E). Se prosiguió con la deshidratación y aclaración de los cortes, y posterior montaje. Las preparaciones se

observaron mediante el uso de un microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star. Se obtuvieron fotografías digitales mediante una cámara acoplada al microscopio.

Determinación de presencia de microorganismos asociados a la cámara de fermentación de *C. signaticollis*

Determinación de la presencia de microorganismos en los insectos y en el medio de cultivo

Con el objeto de determinar la presencia de microorganismos alojados en la cámara de fermentación de *C. signaticollis* y si están vinculados con la producción de infoquímicos relevantes en la localización del hospedador de *M. ruficauda* y en la interacción intraespecífica de los individuos del estadio III de *C. signaticollis*, se realizaron ensayos comportamentales de olfatometría con diferentes estímulos asociados a la presencia/ausencia de microorganismos en el tubo digestivo.

En primer lugar se desarrolló un protocolo para obtener un extracto de *C. signaticollis* libre de microorganismos (individuos aposimbióticos) (Douglas 1989; Capinera 2008). Para ello, las larvas de estadio III de *C. signaticollis* se criaron en un medio con antibiótico tetraciclina, a razón de un gramo de antibiótico por kilo de tierra esterilizada, obteniendo de esta manera una concentración final de 0,1% m/m. Los gusanos blancos se mantuvieron durante una semana, al igual que se detalla en el capítulo *Materiales y Métodos Generales* pero utilizando tierra con tetraciclina. Transcurridos los 7 días se procedió a realizar la extracción de los estímulos del hospedador de la mitad posterior del cuerpo de las larvas, según Castelo (2003) y Castelo y Lazzari (2004). Para ello, las larvas fueron anestesiadas en frío en un freezer durante 5 minutos. Una vez anestesiadas, se le practicó a cada larva un corte transversal en el abdomen a la altura del quinto espiráculo, y la mitad posterior de cada individuo se homogeneizó en un mortero de vidrio utilizando hexano como solvente.

Luego, se realizaron dos ensayos comportamentales a modo de control para determinar si el extracto obtenido luego del procedimiento resultaba atractivo para las larvas de *M. ruficauda* y de *C. signaticollis*. El primer control consistió en verificar si las larvas de ambas especies se orientan hacia el antibiótico, ofreciéndoles un extracto de tetraciclina realizado con hexano como solvente en una concentración de 20 mgr/ml. Por otro lado, se verificó si la tierra por sí misma es atractiva para las larvas de ambas especies. Para ello, se preparó tierra estéril mediante un proceso de tindalización en autoclave, realizando un extracto de 1 mgr/ml de tierra tindalizada en hexano.

Obtención de cultivos de microorganismos y productos metabólicos asociados a la cámara de fermentación de C. signaticollis

Con el objeto de determinar si la cámara de fermentación del gusano blanco tiene microorganismos asociados y producen metabolitos vinculados a los infoquímicos utilizados en la localización del hospedador por parte de *M. ruficauda* y en las interacciones intraespecíficas de la larva de estadio III de *C. signaticollis*, se realizaron medios de cultivos para aislar a los potenciales microorganismos y sus productos metabólicos. Como se desconoce si los microorganismos están presentes y que tipo de nutrientes consumen, se utilizaron tres medios con tres fuentes de carbono diferentes: celulosa, hidratos de carbono y proteínas. Por cada fuente de carbono se realizaron cuatro tratamientos: cultivos de los potenciales microorganismos mediante inoculación del medio con extracto de la cámara de fermentación (cultivo), medio sin inocular (medio control), cultivo de los potenciales microorganismos mediante medio con antibiótico inoculado con extracto de la cámara de fermentación (cultivo + antibiótico) y medio con antibiótico sin inocular (medio control + antibiótico) (Tabla 6.1; Figura 6.1). Del material proveniente de cada tratamiento se extrajeron los infoquímicos producidos luego de la incubación, los cuales fueron ofrecidos a las larvas de ambas especies en experimentos comportamentales de olfatometría como

se detalla en la Tabla 6.1. La preparación de cada medio de cultivo se detalla a continuación.

- ***Preparación de los medios de cultivo***

La presencia de microorganismos en un medio de cultivo puede ser determinada indirectamente a partir de la degradación de los nutrientes del medio y posterior verificación de la presencia de productos metabólicos secundarios derivados de su actividad. El metabolismo o lisis de las macromoléculas de los medios de cultivo por parte de los microorganismos produce, dependiendo del medio de cultivo, procesos de celulosólisis, amilólisis o proteólisis. La acción de los microorganismos asociados a *C. signaticollis* sobre los medios de cultivo se verificó por medio de protocolos utilizados en microbiología del suelo (Pochon y Tardieux 1965). La actividad metabólica se comprobó en los medios de cultivo de los cuatro tratamientos realizados. Para la elaboración de los medios de cultivo se modificaron los protocolos establecidos por Pochon y Tardieux (1965), Bailón Lira et al. (2003) y Sánchez Colin (2004), ajustándose el pH de cada medio de cultivo para obtener las mismas condiciones de la cámara de fermentación de las larvas de los gusanos blancos (pH=10, ajuste con NaOH) (Millas y Carrillo 2008). Se prepararon, en tubos de ensayo de vidrio de 25 ml, 10 ml de medio por cada tratamiento (cultivo, medio control). Una vez preparados los tubos se llevaron a esterilizar en una autoclave durante 15 minutos a presión de una atmósfera (Figura 6.1). El detalle de la composición de cada medio de cultivo se menciona en las secciones *Medio de celulosa*, *Medio de hidratos de carbono* y *Medio de proteínas*.

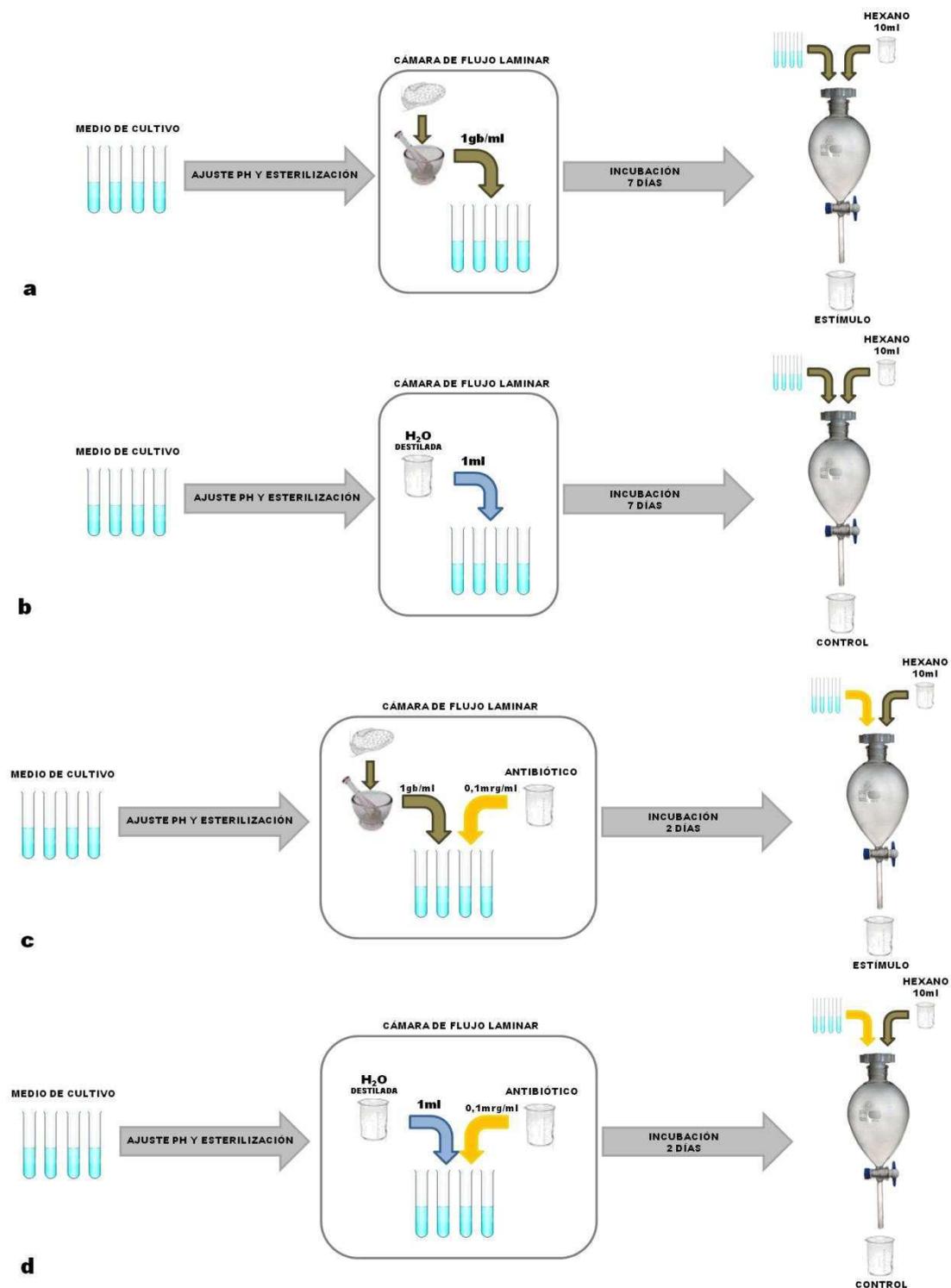


Figura 6.1. Esquema de metodología de obtención de microorganismos y productos metabólicos asociados a la cámara de fermentación de *C. signaticollis*. Obtención de los extractos de cultivos de microorganismos sin (a) y con antibiótico (c), y de los medios de cultivo sin inocular, sin (b) y con (d) antibiótico.

La preparación de los medios de cultivo con antibiótico se realizó con el mismo protocolo detallado previamente pero con la modificación del agregado de un antibiótico de amplio espectro, como la tetraciclina. Se prepararon la misma cantidad

de tubos que para los tratamientos anteriores pero con 9 ml de medio de cultivo. Además, se prepararon 100 ml de medio de cultivo para poder añadir el antibiótico posteriormente. Ambas preparaciones de medio fueron esterilizadas y luego que el medio llegó a temperatura ambiente se añadieron 0,1 gr de antibiótico a los 100 ml de medio de cultivo. Posteriormente, bajo campana de flujo laminar, se agregó 1 ml de esta preparación de medio con antibiótico a cada tubo de ensayo de 9 ml, obteniéndose una concentración final de tetraciclina de 0,1 mgr/ml en los tubos de ensayo (Figura 6.1 c y d).

- *Medio de celulosa*

En base al protocolo de Pochon y Tardieux (1965) se realizó el siguiente medio líquido:

Por 100 ml	
Solución salina estándar.....	5 ml
NO ₃ NH ₄	0,1 gr
Agua mineral.....	0,1 ml
Agua destilada.....	100 ml

Por cada tubo de ensayo preparado se agregó una tira de papel de filtro de 1 x 7 cm, como fuente de carbono del medio. La presencia de microorganismos se detecta a partir de la observación de manchas pigmentadas sobre el papel de filtro en la parte no sumergida en el líquido, que indica que se produjo celulólisis y el crecimiento de las colonias (Pochon y Tardieux 1965).

- *Medio de hidratos de carbono*

En base al protocolo de Pochon y Tardieux (1965) se realizó el siguiente medio líquido:

Por 100 ml

Solución salina estándar.....	5 ml
Harina o almidón de maíz.....	0,15 gr
NO ₃ NH ₄	0,1 gr
Agua mineral.....	0,1 ml
Agua destilada.....	100 ml

La presencia de microorganismos e hidrólisis del almidón se detecta en este caso a partir del agregado de una gota de solución de Lugol o yodo-yodurado en 0,5 ml del medio de cultivo. Si la hidrólisis es parcial o nula el color es azul-violeta y si ocurrió hidrólisis total del medio el color de la solución es amarillo ambar (Pochon y Tardieux 1965).

- *Medio de proteínas*

En base a los protocolos de Pochon y Tardieux (1965), de Bailón Lira et al. (2003) y de Sánchez Colin (2004), se realizó el siguiente medio sólido:

Por 100 ml

Solución salina estándar.....	5 ml
Extracto de carne.....	0,5 gr
Peptona.....	0,25 gr
Peptona de carne.....	0,25 gr
Agar – agar.....	1,5 gr
Agua mineral.....	0,1 ml
Agua destilada.....	100 ml

La presencia de microorganismos y proteólisis del medio se detecta en este caso por la licuefacción del medio (Pochon y Tardieux 1965). Debido a que el agar-agar puede ser degradado por microorganismos (Brock et al. 1987), se realizó un experimento control de olfatometría utilizando estímulos extraídos de un medio sólo de agar-agar para luego poder determinar si los infoquímicos se originan de la proteólisis o de la

degradación del agar-agar del medio por los microorganismos. Con este fin se preparó un medio de cultivo y un medio control como el arriba descrito, con la misma concentración agar-agar que el medio de proteínas (1,5% m/v), pero sin la fuente de proteínas (extracto de carne y peptonas). Se realizó el mismo protocolo de inoculación de los microorganismos y extracción de estímulos que con los demás cultivos como se detalla a continuación.

- ***Aislamiento de microorganismos, inoculación de los medios de cultivo y extracción de los estímulos***

Para obtener los potenciales microorganismos presentes en la cámara de fermentación se realizaron disecciones del tubo digestivo posterior de larvas de estadio III de *C. signaticollis*. Las disecciones se efectuaron haciendo en primer lugar un corte longitudinal de la pared del cuerpo del gusano blanco, y una vez encontrada la cámara de fermentación se aisló atando sus extremos con hilos de algodón embebidos en una solución de tetraciclina (1 mgr/ml) para evitar la contaminación con microorganismos foráneos al tubo digestivo. Luego, se practicó un corte en cada extremo y se extrajo la cámara de fermentación. Posteriormente, en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar, la cámara de fermentación se sumergió unos segundos en una solución de tetraciclina 1 mgr/ml para evitar la contaminación luego de la extracción. Se realizó un macerado de las porciones extraídas utilizando agua destilada esterilizada a una atmósfera de presión por 15 minutos, obteniéndose un extracto con una concentración equivalente a un individuo por ml. A continuación, se procedió a inocular los medios de cultivo con 1 ml del macerado obtenido. A los tubos del tratamiento “medio control” se les agregó 1 ml de agua destilada esterilizada con el objeto de controlar la manipulación del procedimiento de inoculación (Figura 6.1). Una vez preparados los cultivos y medios de control se incubaron a temperatura controlada de 25-28°C durante 7 días para los tratamientos sin antibiótico y 2 días

para los tratamientos con antibiótico (Figura 6.1), debido que con más tiempo de inoculación el antibiótico puede desnaturalizarse (Kühne et al. 2000).

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la extracción de los infoquímicos asociados a los cultivos y a los medios de control. Se realizó una extracción en 2 fases utilizando una ampolla de decantación. Para ello, se juntó el medio líquido acuoso correspondiente a 4 tubos de ensayo con 10 ml del solvente hexano para cada tratamiento. Se descartó la fracción acuosa conservando la fracción de hexano, la cual extrae los estímulos y de esta manera se obtiene una solución de concentración equivalente a 4 tubos/10 ml para cada tratamiento. Para el caso particular del medio de celulosa, la extracción de los infoquímicos asociados con la degradación de este medio se realizó utilizando 7 ml de hexano durante la extracción en 2 fases y por separado 3 ml del solvente para realizar el macerado en mortero de los papeles de filtro (fuente de carbono del medio). Ambas fracciones se adicionaron en el momento de usarlas como estímulos (Figura 6.1).

Respuesta de las larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* a los extractos de la cámara de fermentación de *C. signaticollis*

Los experimentos para determinar las respuestas comportamentales de orientación de los insectos hacia los potenciales infoquímicos contenidos en los extractos de la cámara de fermentación de *C. signaticollis* descritos previamente fueron hechos utilizando el olfatómetro “Extractos-Larvas” en caso de las larvas de *M. ruficauda* y el olfatómetro “Extractos-Gusanos” en el caso de *C. signaticollis*, tal como fue descrito en la sección *Materiales y Métodos Generales*. En la Tabla 6.1 se detalla el diseño experimental y el número de réplicas para cada experimento.

Los experimentos con *M. ruficauda* se realizaron durante los meses de marzo a mayo del 2011 y 2013 bajo condiciones de laboratorio ($27,5 \pm 6,3^{\circ}\text{C}$; $57 \pm 12\%$ humedad

relativa), en días con un rango de presión atmosférica de entre 1008 a 1019,2 hPa. Para los experimentos con *C. signaticollis*, las pruebas se realizaron durante abril a junio del 2011 y 2012 bajo condiciones de laboratorio ($24,2 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$; $37 \pm 11\%$ humedad relativa) y presión atmosférica de 1009,6 a 1024,1 hPa.

Análisis estadístico

En cada experimento se midió la respuesta comportamental de orientación de las larvas de *M. ruficauda* y de las larvas de *C. signaticollis* hacia los estímulos de *C. signaticollis* generados por potenciales microorganismos contenidos en su cámara de fermentación. En ambos experimentos de orientación, se evaluó la preferencia de los insectos por cada zona de la arena experimental (estímulo o control), tal como fue descrito en el capítulo *Materiales y Métodos Generales*.

Resultados

Determinación de presencia de estructuras glandulares en la cámara de fermentación de *C. signaticollis*

Con el objeto de determinar la presencia de tejido glandular en la cámara de fermentación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* se realizaron cortes histológicos los cuales fueron coloreados con la técnica de H-E. Se observó que la cámara de fermentación tiene forma de saco con una gran luz interna, la cual se encuentra repleta de material vegetal degradado (Figura 6.2). Hacia el interior de la luz se observan algunos pliegues de la pared sin llegar al centro del órgano (Figura 6.2).



Figura 6.2. Corte longitudinal de la cámara de fermentación de las larvas de tercer estadio de *C. signaticollis* (escala = 0,7 mm). Abreviaturas: mvd, material vegetal degradado; pd, pared de la cámara de fermentación; pl, pliegue de la pared de la cámara de fermentación.

La pared de la cámara de fermentación de estas larvas tiene un epitelio simple plano (Figuras 6.2 y 6.3). Se pudo observar un engrosamiento del epitelio compuesto por varias células localizado posteriormente en la cara dorsal de esta región del tubo digestivo (Figura 6.2 y 6.3). Cuando se observó con mayor detalle este engrosamiento, se distinguió que está conformado por varias células que presentan una única gran vesícula que ocupa casi todo el volumen celular, desplazando el citoplasma y el núcleo hacia la periferia de la célula, dándole a las mismas una apariencia globosa. Además, mediante los preparados obtenidos se observó que estas células parecerían descargar su contenido a la luz de la cámara de fermentación (Figura 6.3 a y b). Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos no se pudo describir correctamente esta estructura ni identificar su posible función en estos individuos.

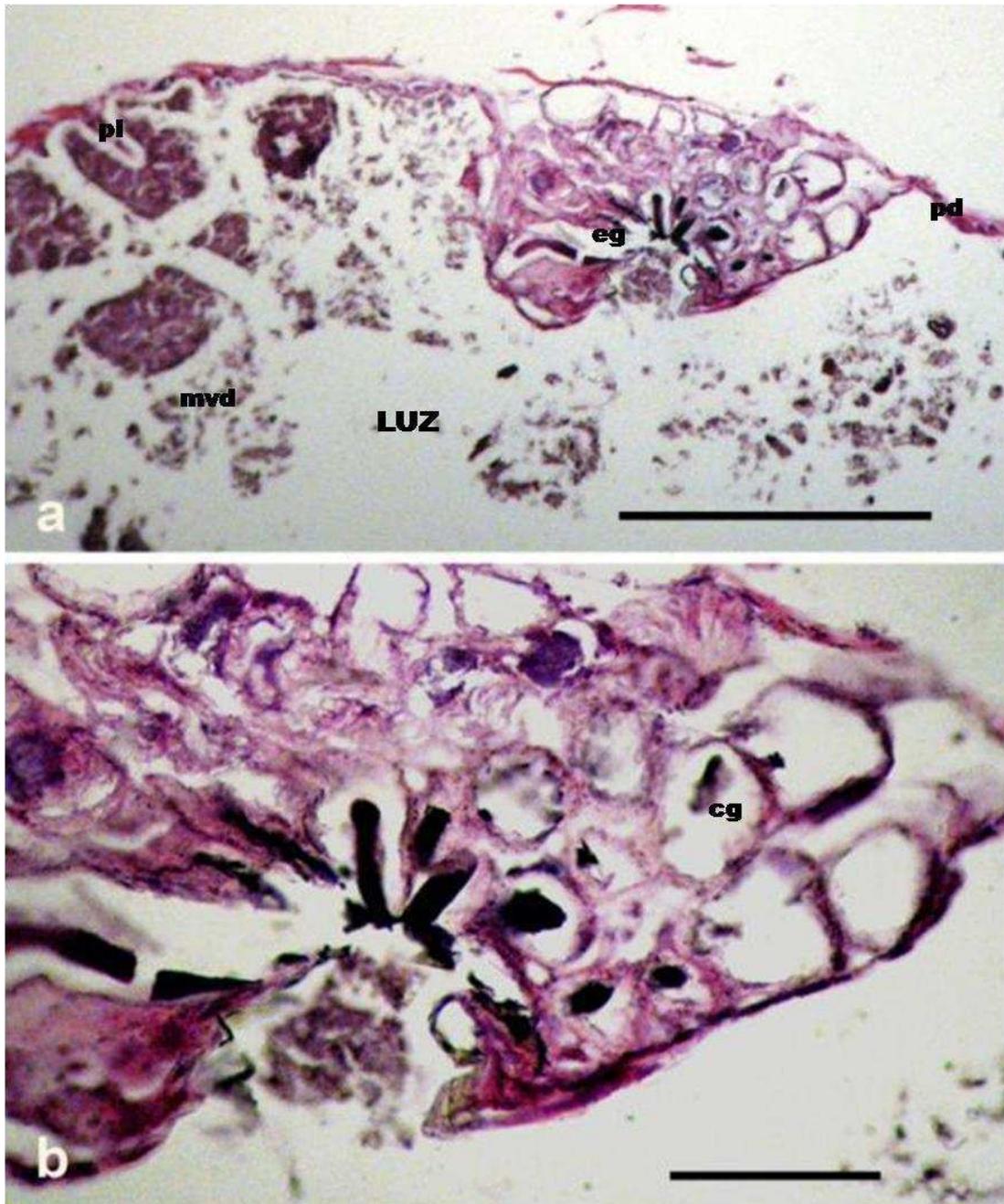


Figura 6.3. Corte longitudinal de la pared de la cámara de fermentación de las larvas de tercer estadio de *C. signaticollis* detallando la estructura hallada. a) Aumento 10x (escala = 0,5 mm); b) Aumento 40x (escala = 0,1 mm). Abreviaturas: cg, célula globosa; eg, estructura glandular; mvd, material vegetal degradado; pd, pared de la cámara de fermentación; pl, pliegue de la pared de la cámara de fermentación.

Microorganismos asociados a la cámara de fermentación de *C. signaticollis*: determinación de su presencia y obtención de cultivos y productos metabólicos

Para determinar la presencia de microorganismos en la cámara de fermentación de las larvas de *C. signaticollis* se criaron individuos en un medio con tetraciclina y se realizaron medios de cultivo con el fin de aislar y obtener los productos de

metabolismo de los microorganismos. Los individuos criados en un medio con antibiótico mostraron un deterioro (deshidratación) luego de los 7 días de tratamiento indicando la importancia de la presencia de estos microorganismos en el desarrollo de las larvas de *C. signaticollis*. En los medios de cultivos con celulosa, hidratos de carbono y proteínas inoculados con el macerado de la cámara de fermentación se observó actividad de los microorganismos, es decir, degradación de las fuentes de carbono, confirmando así la presencia de estos microorganismos. Por el contrario, en los cultivos a los que se agregó antibiótico y que fueron inoculados con macerado de la cámara de fermentación no se observó actividad metabólica de los microorganismos, debido a la acción bactericida de la tetraciclina. En ninguno de los medios de cultivo control inoculados con agua destilada se observó actividad de los microorganismos, demostrando así que no existió contaminación de los cultivos realizados.

Respuesta de las larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* a los extractos de la cámara de fermentación de *C. signaticollis*

Respuesta de M. ruficauda a estímulos del hospedador

En los experimentos de orientación hacia extractos con estímulos químicos de individuos del tercer estadio larval de *C. signaticollis* a los cuales se los trató con antibiótico, se encontró que las larvas de estadio II de *M. ruficauda* se distribuyeron al azar en la arena experimental (Tabla 6.1, Figura 6.4). Estos resultados estarían indicando que la falta de orientación frente a estímulos químicos provenientes de *C. signaticollis* podría estar asociada a la eliminación de microorganismos presentes en el tubo digestivo del hospedador.

En relación a los experimentos donde se utilizaron estímulos químicos extraídos de medios de cultivo de las tres diferentes fuentes de carbono se observó que la

respuesta de los individuos varió según el tratamiento. Cuando a los individuos se les ofreció extracto del medio de cultivo de proteínas inoculado con extracto de la cámara de fermentación del estadio III de *C. signaticollis*, se observó una orientación positiva de las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* (Tabla 6.1, Figura 6.5). A su vez, los resultados de los experimentos donde se les ofrecieron a las larvas estímulos extraídos de medios de cultivos con antibióticos confirman los resultados anteriores, dado que los extractos provenientes de medios de cultivo de proteínas con antibióticos pierden su atraktividad para los sujetos experimentales (Tabla 6.1, Figura 6.6). Este resultado refuerza lo observado en los experimentos previos, y sugiere que la actividad de los microorganismos presentes en la cámara de fermentación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* estaría involucrada en la producción de infoquímicos por proteólisis, los cuales estarían vinculados al comportamiento de localización del hospedador por parte de la larva de *M. ruficauda*. En particular, el origen de las kairomonas utilizadas por *M. ruficauda* estaría asociado al metabolismo de las proteínas por parte de estos microorganismos.

Además se observó una tendencia de orientación positiva no significativa de las larvas hacia el extracto del cultivo de la cámara de fermentación en el medio de celulosa (Tabla 6.1, Figura 6.5). Con el fin de determinar si esta tendencia fue un efecto del azar o se debió a una atracción de las larvas hacia los productos metabólicos de este cultivo, se realizó un experimento de comportamiento de elección dual aumentando al doble la concentración del extracto utilizado previamente (8 tubos/10 ml). El resultado de este experimento fue que las larvas de estadio II de *M. ruficauda* se orientaron al azar entre el estímulo y el solvente control ($\chi^2=1,44$; $N=100$, $n_{\text{ESTÍMULO}}=56$, $n_{\text{CONTROL}}=44$; $P>0,1$). Este resultado sugiere que los productos de la degradación de la celulosa por parte de los microorganismos no resultan atractivos para las larvas de *M. ruficauda* como lo son los derivados de la degradación de las proteínas.

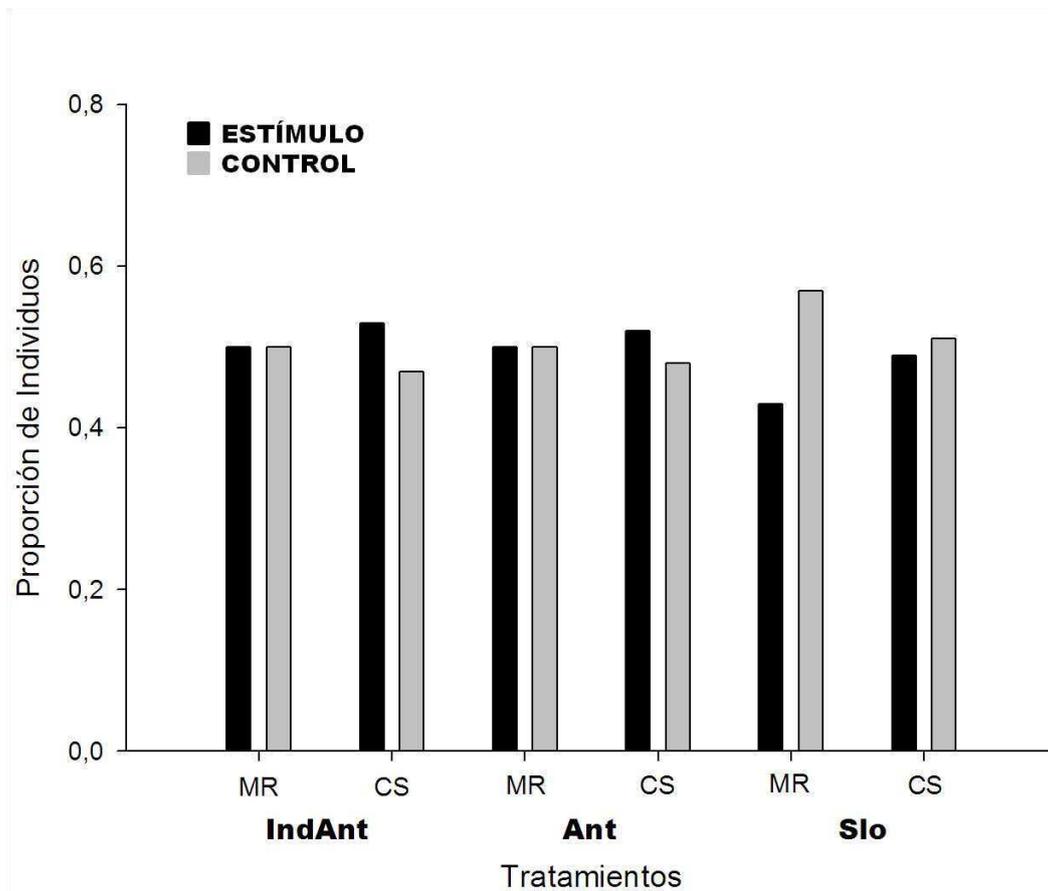


Figura 6.4. Respuesta de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* hacia estímulos químicos provenientes de extractos de individuos con antibiótico (libres de microorganismos) del tercer estadio larval de *C. signaticollis* y sus controles. Las larvas de ambas especies presentaron una distribución al azar en la arena experimental. Abreviaturas: MR, *M. ruficauda*; CS, *C. signaticollis*; IndAnt, individuo tratado con antibiótico; Ant, antibiótico (tetraciclina); Slo, suelo esterilizado.

Tabla 6.1. Experimentos de olfatometría realizados para evaluar la respuesta comportamental de larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* hacia estímulos químicos asociados a microorganismos presentes en la cámara de fermentación del tubo digestivo del tercer estadio larval de *C. signaticollis*. Abreviaturas: MR, *M. ruficauda*; CS, *C. signaticollis*; IndAnt, individuo tratado con antibiótico; Ant, antibiótico (tetraciclina); Slo, suelo esterilizado; SimbCel, cultivo de microorganismos en medio de celulosa; MedCel, medio de celulosa; SimbCelAnt, cultivo de microorganismos en medio de celulosa con antibiótico (tetraciclina); MedCelAnt, medio de celulosa con antibiótico (tetraciclina); SimbHdC, cultivo de microorganismos en medio de hidratos de carbono; MedHdC, medio de hidratos de carbono; SimbHdCAnt, cultivo de microorganismos en medio de hidratos de carbono con antibiótico (tetraciclina); MedHdCAnt, medio de hidratos de carbono con antibiótico (tetraciclina); SimbProt, cultivo de microorganismos en medio de proteínas; MedProt, medio de proteínas; SimbProtAnt, cultivo de microorganismos en medio de proteínas con antibiótico (tetraciclina); MedProtAnt, medio de proteínas con antibiótico (tetraciclina); Hx, hexano (control). En las columnas MR y CS se muestra el número de réplicas por experimento. Entre paréntesis se denota el número total de individuos que tomaron una decisión (izquierda: estímulo, derecha: control) en la arena experimental. Los asteriscos denotan diferencias significativas.

Experimento (estímulo – control)	MR	CS	Descripción	MR χ^2 ; P	CS χ^2 ; P
IndAnt – Hx	150 (50-50)	64 (29-26)	Individuos expuestos a extracto de individuos tratados con antibiótico (libres de microorganismos).	0 ; 1	0,16 ; > 0,5
Ant – Hx	200 (67-68)	64 (25-23)	Individuos expuestos a solución de antibiótico (tetraciclina) en solvente control (hexano).	0,01 ; > 0,9	0,08 ; > 0,9
Slo – Hx	150 (38-51)	64 (25-26)	Individuos expuestos a solución de suelo esterilizado en solvente control (hexano).	1,9 ; > 0,1	0,02 ; > 0,5
SimbCel – Hx	200 (85-64)	64 (22-23)	Individuos expuestos a extracto de cultivo de la cámara de fermentación en medio de celulosa.	2,96 ; > 0,05	0,02 ; > 0,5
MedCel – Hx	200 (68-77)	64 (26-24)	Individuos expuestos a extracto de medio de celulosa.	0,56 ; > 0,25	0,08 ; > 0,5
SimbCelAnt – Hx	150 (66-51)	-	Individuos expuestos a extracto de cultivo de la cámara de fermentación en medio de celulosa con antibiótico (tetraciclina).	1,92 ; > 0,1	-
MedCelAnt – Hx	150 (45-52)	-	Individuos expuestos a extracto de medio de celulosa con antibiótico (tetraciclina).	0,5 ; > 0,25	-
SimbHdC – Hx	200 (62-69)	64 (32-21)	Individuos expuestos a extracto de cultivo de la cámara de fermentación en medio de hidratos de carbono.	0,37 ; > 0,5	2,28 ; > 0,1
MedHdC – Hx	150 (55-44)	64 (31-24)	Individuos expuestos a extracto de medio de hidratos de carbono.	1,22 ; > 0,25	0,89 ; > 0,1
SimbHdCAnt – Hx	150 (60-44)	-	Individuos expuestos a extracto de cultivo de la cámara de fermentación en medio de hidratos de carbono con antibiótico (tetraciclina).	2,46 ; > 0,1	-
MedHdCAnt – Hx	150 (52-45)	-	Individuos expuestos a extracto de medio de hidratos de carbono con antibiótico (tetraciclina).	0,5 ; > 0,25	-
SimbProt – Hx	150 (79-46)	64 (29-23)	Individuos expuestos a extracto de cultivo de la cámara de fermentación en medio de proteínas.	8,71 ; < 0,005*	0,69 ; > 0,1
MedProt – Hx	150 (63-57)	64 (20-24)	Individuos expuestos a extracto de medio de proteínas.	0,3 ; > 0,5	0,36 ; > 0,5
SimbProtAnt – Hx	150 (55-45)	-	Individuos expuestos a extracto de cultivo de la cámara de fermentación en medio de proteínas con antibiótico (tetraciclina).	1 ; > 0,25	-
MedProtAnt – Hx	150 (61-48)	-	Individuos expuestos a extracto de medio de proteínas con antibiótico (tetraciclina).	1,55 > 0,1	-

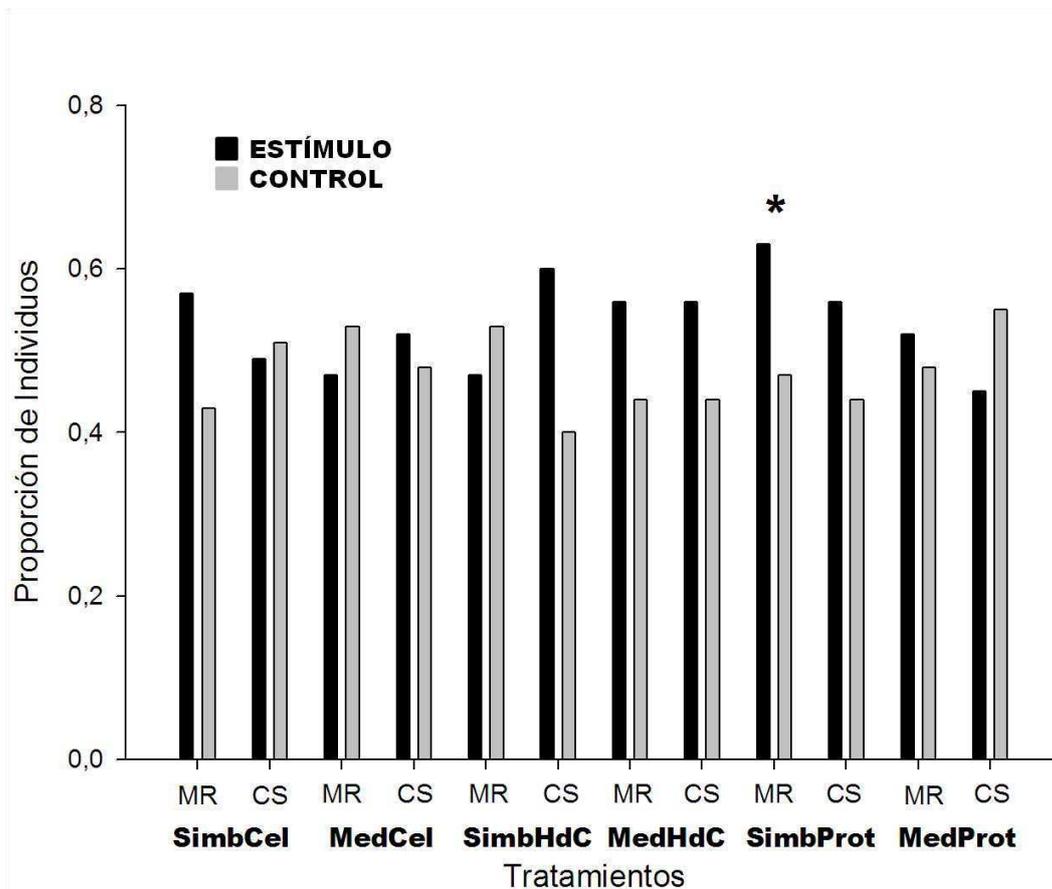


Figura 6.5. Respuesta de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* hacia estímulos químicos provenientes de medios de cultivo sin inocular e inoculados con extracto de la cámara de fermentación del tercer estadio larval de *C. signaticollis*. Las larvas de *M. ruficauda* presentaron una orientación positiva hacia extractos del cultivo de microorganismos en el medio de proteínas. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativa (χ^2 , $P < 0,05$). Abreviaturas: MR, *M. ruficauda*; CS, *C. signaticollis*; SimbCel, cultivo de microorganismos en medio de celulosa; MedCel, medio de celulosa; SimbHdC, cultivo de microorganismos en medio de hidratos de carbono; MedHdC, medio de hidratos de carbono; SimbProt, cultivo de microorganismos en medio de proteínas; MedProt, medio de proteínas.

Los experimentos de orientación realizados con medios de cultivos con antibiótico permitieron confirmar la presencia de microorganismos en la cámara de fermentación de *C. signaticollis* y si son responsables de la producción de los infoquímicos asociados a la localización del hospedador. Ninguno de los extractos de cultivo o medio produjo una atracción estadísticamente significativa de las larvas de *M. ruficauda* (Tabla 6.1, Figura 6.6). En particular, no se observó orientación positiva hacia el extracto del cultivo de proteínas (Tabla 6.1, Figura 6.6). Estos resultados determinaron que existen microorganismos en la cámara de fermentación de *C. signaticollis* y que están involucrados en la producción de los infoquímicos que median la localización del hospedador por parte de *M. ruficauda*.

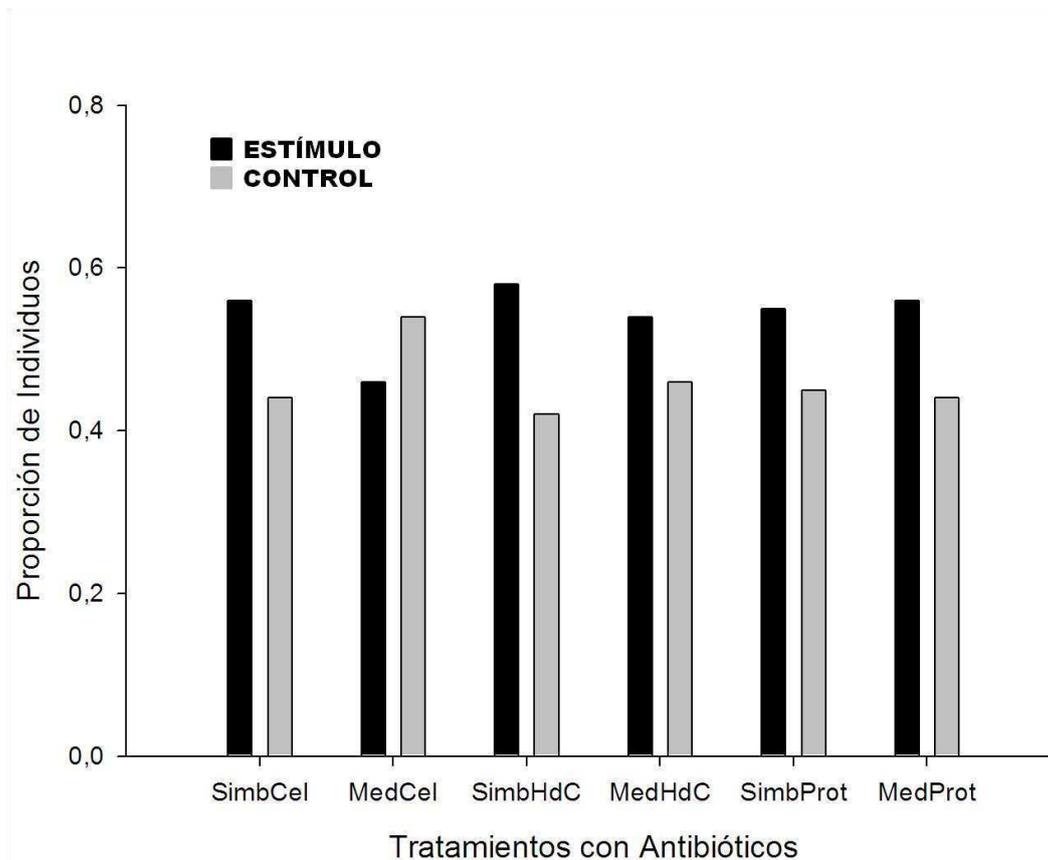


Figura 6.6. Respuesta de orientación de *M. ruficauda* hacia estímulos químicos provenientes de medios de cultivo con antibiótico (tetraciclina) sin inocular e inoculados con extractos de la cámara de fermentación del tercer estadio larval de *C. signaticollis*. Las larvas de *M. ruficauda* presentaron una distribución al azar en la arena experimental. Abreviaturas: SimbCel, cultivo de microorganismos en medio de celulosa; MedCel, medio de celulosa; SimbHdC, cultivo de microorganismos en medio de hidratos de carbono; MedHdC, medio de hidratos de carbono; SimbProt, cultivo de microorganismos en medio de proteínas; MedProt, medio de proteínas.

Respuesta de C. signaticollis a estímulos de coespecíficos

En los experimentos de orientación hacia extractos con estímulos químicos provenientes de individuos del tercer estadio larval de *C. signaticollis* a los cuales se los trató con antibiótico, se encontró que las larvas de estadio III de *C. signaticollis* se distribuyeron al azar en la arena experimental (Tabla 6.1, Figura 6.4). Esto sugiere que los infoquímicos involucrados en el comportamiento de agregación intraespecífica serían producidos por microorganismos alojados en el tubo digestivo.

A partir de los experimentos de orientación hacia extractos provenientes de los cultivos de microorganismos de la cámara de fermentación de individuos del tercer estadio larval de *C. signaticollis*, se observó que las larvas de estadio III de *C. signaticollis* se

distribuyeron al azar en el dispositivo experimental (Tabla 6.1, Figura 6.5). No obstante, existió una tendencia de orientación no significativa positiva hacia el extracto proveniente del cultivo de los microorganismos en el medio de hidratos de carbono (Tabla 6.1, Figura 6.5). Por tanto, se decidió realizar dos experimentos en los que se aumentó la concentración del extracto utilizado previamente al doble (8 tubos/10 ml) y al cuádruple (16 tubos/10 ml) con el objeto de determinar si la falta de orientación se debió a una baja concentración en el extracto de los derivados del metabolismo de este medio de cultivo. Se observó que las larvas de tercer estadio de *C. signaticollis* se distribuyeron al azar en la arena experimental en ambos experimentos ([8 tubos/10 ml]: $\chi^2=0,49$; N=64, $n_{\text{ESTÍMULO}}=28$, $n_{\text{CONTROL}}=23$; $P>0,1$; [16 tubos/10 ml]: $\chi^2=0,67$; N=64, $n_{\text{ESTÍMULO}}=24$, $n_{\text{CONTROL}}=30$; $P>0,1$).

Discusión

En el presente capítulo se realizaron estudios para identificar la estructura o agente que produce los infoquímicos involucrados en la orientación positiva de las larvas de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* hacia extractos de la cámara de fermentación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis*. A partir de las técnicas utilizadas se determinó la presencia de un engrosamiento de tejido del epitelio de la cámara de fermentación y la existencia de microorganismos en esta región del tubo digestivo. Los análisis histológicos permitieron identificar que este engrosamiento en la cara dorsal de esta región del tubo digestivo podría constituir una especialización tisular en las larvas de *C. signaticollis*. Por otro lado, la cría de individuos con antibiótico y la preparación de medios de cultivo permitieron confirmar la presencia de microorganismos en el tubo digestivo de las larvas. En ambos casos, los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en trabajos previos de otras especies de la familia Scarabaeidae (López

Guerrero y Morón 1990; Egert et al. 2003; Dillon y Dillon 2004; Egert et al. 2005; Zhang y Jackson 2008; Huang et al. 2010; Zheng et al. 2012; Huang y Zhang 2013).

La prospección histológica de la cámara de fermentación de las larvas de *C. signaticollis* mostró la presencia de una estructura que se diferenció claramente del epitelio simple que compone esta región del tubo digestivo. En base a los preparados obtenidos y a la observación de la posible secreción del contenido de éstas hacia la luz de la cámara de fermentación, se sugiere que esta estructura podría tener una posible función glandular. López Guerrero y Morón (1990) han reportado la presencia de un tejido glandular en la misma región del tubo digestivo posterior de otra especie de escarabeido. Los resultados de este capítulo de la Tesis, en conjunto con el trabajo de López Guerrero y Morón (1990), serían los primeros registros de una estructura de posible función glandular en el tubo digestivo de larvas de la familia Scarabaeidae (Menees 1958; Huang et al. 2010; Zheng et al. 2012), e incluso de otros coleópteros (Ameen y Rahman 1973; Da Silva 1976; McAllister et al. 1995). Sin embargo, debido a la falta de precisión en el detalle de la estructura hallada, es necesario realizar nuevos estudios que permitan identificar de forma inequívoca la función y estructura de este tejido.

La cría de individuos aposimbióticos (libres de microorganismos) y el cultivo de los microorganismos de la cámara de fermentación han permitido establecer que existe una estrecha relación entre los microorganismos y las larvas de estadio III de *C. signaticollis*. La eliminación de los microorganismos del tubo digestivo por medio de la administración de un antibiótico de amplio espectro generó un deterioro en las larvas de *C. signaticollis*, observándose la deshidratación y un comportamiento poco activo en estos individuos, al igual que sucede en otros insectos tratados de la misma manera (Douglas 1988, 1989). Esto indica la importancia que estos microorganismos tendrían en el ciclo de vida de *C. signaticollis*. En trabajos previos se ha demostrado

que el mantenimiento de esta relación entre insectos y microorganismos se debe a que obtienen un beneficio mutuo en la asociación. En particular, los microorganismos aportan nutrientes que los insectos no obtienen directamente de su dieta (Douglas 1988; Cazeimer et al. 1997; Egert et al. 2003; Lemke et al. 2003; Moran et al. 2003; Dillon y Dillon 2004; Kopper et al. 2004; Woolfolk et al. 2004; Egert et al. 2005; Bution y Caetano 2008; Chandler et al. 2008; Zhang y Jackson 2008; Grünwald et al. 2010; Huang et al. 2010; Feldhaar 2011; Raman et al. 2012; Zheng et al. 2012; Huang y Zhang 2013). Al respecto, el aislamiento de los microorganismos de la cámara de fermentación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* a partir de los medios de cultivo permitió determinar que éstos tienen la capacidad de degradar proteínas, hidratos de carbono y celulosa en un medio aerobio. Se logró verificar, en base a los controles realizados, que el aislamiento de estos microorganismos y sus productos metabólicos se produjo sin contaminación. Por lo tanto, si los compuestos resultantes de la degradación de los medios de cultivos generan una respuesta de orientación en los individuos de *M. ruficauda* y *C. signaticollis* se podría afirmar que éstos serían los infoquímicos involucrados en la localización del hospedador y en las interacciones intraespecíficas de este sistema de estudio.

En este capítulo de la Tesis se pudo determinar que la presencia de microorganismos en el tubo digestivo de las larvas III de *C. signaticollis* y los productos metabólicos de los microorganismos serían los responsables del comportamiento de orientación tanto del parasitoide hacia su hospedador como del hospedador hacia sus coespecíficos. Las larvas de estadio II de *M. ruficauda* dejan de orientarse frente a extractos de larvas de estadio III de *C. signaticollis* que han sido tratadas con antibiótico, sugiriendo que las larvas del parasitoide utilizarían productos de la actividad de los microorganismos alojados en la cámara de fermentación de su hospedador durante la localización. Por tanto, la presencia de los microorganismos sería fundamental en la producción de sustancias atractivas, las cuales serían utilizadas como kairomonas en el proceso de

localización del hospedador, como ha sido observado en otros parasitoides (Thibout et al. 1993; Pettersson et al. 2001; Sullivan y Berisford 2004; Boone et al. 2008). Son varios los trabajos que demuestran la importancia de la relación entre los insectos y sus microorganismos en la producción de infoquímicos (ver revisión en Davis et al. 2013). Las sustancias producidas en este tipo de interacción pueden participar en la comunicación intraespecífica de los insectos (Domek y Johnson 1990; Hunt y Borden 1990; Johnson y Vishniac 1991; Dillon et al. 2000; Ganter 2006), pueden ser explotadas por parte de sus enemigos naturales (Madden 1968; Ruther y Steidle 2000; Leroy et al. 2011), o pueden tener importancia durante la evaluación de las condiciones ambientales (Nout y Bartelt 1998; Lam et al. 2007; Steiner et al. 2007; Ponnusamy et al. 2008; Kai et al. 2009).

Contrariamente a lo esperado, cuando a las larvas de *M. ruficauda* se les ofreció como estímulo los productos metabólicos de los microorganismos resultantes de la degradación de los medios de cultivo se encontró que las larvas de estadio II de *M. ruficauda* se orientaron solamente hacia los extractos obtenidos de los medios de proteína como única fuente de carbono. Se esperaba encontrar una atracción hacia los extractos de los productos metabólicos de los medios de celulosa o hidratos de carbono debido a que son los componentes mayoritarios de la dieta de la larva de *C. signaticollis* (raíces y tubérculos de plantas). En algunos parasitoides himenópteros y taquínidos se ha encontrado que las proteínas y aminoácidos pueden actuar como kairomonas en la etapa de aceptación del hospedador al momento de oviponer (ver ejemplos en Rutledge 1996). Estas kairomonas se encuentran en la cutícula del hospedador, en las heces, en el pegamento de los huevos al sustrato, o en la hemolinfa (Rutledge 1996). Las proteínas son esenciales en el desarrollo, por tanto las mismas proteínas, los aminoácidos que las componen o los productos derivados del metabolismo de éstas podrían considerarse buenos indicadores del estado nutricional del insecto. El aporte de aminoácidos y vitaminas que realizan los microorganismos al

insecto hospedador puede efectuarse a partir del metabolismo de proteínas y otros nutrientes que consumen los insectos (Cruden y Markovetz 1987; Douglas 1988; Sasaki e Ishikawa 1995; Douglas 1998; Bernays y Klein 2002; Moran et al. 2003; Dillon y Dillon 2004; Woolfolk et al. 2004; Chandler et al. 2008). Es entonces que el normal desarrollo y crecimiento de los hospedadores dependerá de estos nutrientes fundamentales en la vida de cualquier individuo, aportados por sus microorganismos asociados, debido a la baja cantidad de proteínas que los insectos fitófagos pueden adquirir en la dieta (Bernays y Klein 2002; Moran et al. 2003; Thompson y Simpson 2003; Woolfolk et al. 2004; Klowden 2007). Por tanto, las larvas de estadio II de *M. ruficauda* al detectar claves relacionadas al metabolismo de las proteínas de las larvas de *C. signaticollis* podrían estar infiriendo tanto la identidad como la condición nutricional del hospedador. La detección de este tipo de claves por parte de la larva de estadio II de *M. ruficauda* tal vez se deba a la naturaleza entomófaga que presentan las larvas de depredadoras de la familia Asilidae (Clausen 1940; Hull 1962; Wood 1981). Sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan identificar la identidad de esta clave química, su relación con el estado nutricional del hospedador, y como es identificada por los parasitoides, con el fin de poner a prueba esta hipótesis.

En cuanto a *C. signaticollis*, los experimentos comportamentales con larvas de estadio III no permitieron determinar concluyentemente el rol de los microorganismos en la producción de infoquímicos que median el comportamiento de orientación positiva hacia coespecíficos. Al igual que *M. ruficauda*, las larvas de *C. signaticollis* no se orientaron hacia extractos de individuos criados con antibiótico. Esto sugiere que los microorganismos asociados al tubo digestivo estarían involucrados en la producción de infoquímicos que desencadenan la orientación positiva hacia coespecíficos. No obstante, no hay que descartar la posibilidad de que el deterioro ocasionado por la aplicación del antibiótico haya provocado una situación de estrés en las larvas del hospedador afectando la emisión/producción de los volátiles involucrados en la

atracción coespecífica. Asimismo, la falta de orientación hacia los productos del metabolismo de todas las fuentes de carbono ofrecidas a las larvas sugiere que la determinación de la identidad de los infoquímicos involucrados en este comportamiento es más compleja de lo esperado. Por un lado, esta falta de orientación de los individuos tal vez podría deberse a que las concentraciones probadas en los experimentos no fueron suficientes como para ser detectadas por las larvas. Es claro que la respuesta comportamental o fisiológica frente a cualquier estímulo sólo se produce si la concentración del mismo supera el umbral de detección del receptor (Wigglesworth 1949; Greenfield 2002; Klowden 2007; Chapman 2013). Es por tanto necesario realizar nuevos ensayos donde se prueben concentraciones mayores de todos los productos del metabolismo de los medios de cultivo para determinar si la concentración de los infoquímicos es la causa de la falta de respuesta de los individuos experimentales. Por otro lado, en el caso de que el comportamiento de agregación y orientación positiva hacia coespecíficos observado a campo y laboratorio fuera mediado por una feromona, es de esperar que su naturaleza este dada por una mezcla de compuestos donde su composición define su actividad biológica (Greenfield 2002; Wyatt 2003). Por tanto, la falta de orientación hacia a los diferentes productos metabólicos de la fuente de carbono podría deberse a la alteración de la composición de esta feromona durante la manipulación experimental. La alteración pudo deberse a que los cultivos realizados no permitieron aislar de forma representativa a los microorganismos asociados a la cámara de fermentación, y no se logró aislar a las especies responsables de la producción de los infoquímicos deseados. Además, la producción de las claves atractivas para las larvas del hospedador puede ser el resultado de la interacción entre los microorganismos y la estructura epitelial hallada en esta región del tubo digestivo. Entonces sería necesaria la presencia de ambos agentes en la producción de estos infoquímicos, lo cual concordaría con los resultados hallados en capítulos anteriores de la presente Tesis (ver *Capítulo 5*). Es por esto que sería necesario encarar estudios de mayor

complejidad para analizar la naturaleza de estos infoquímicos antes de descartar la existencia de una feromona, debido a los antecedentes existentes de agregación a campo y orientación positiva en el laboratorio (Castelo y Capurro 2000; Castelo 2003; Castelo y Corley 2010).

Otro aspecto importante que surge de estos experimentos es entender cómo una clave volátil que se produce en el sistema digestivo de la larva de *C. signaticollis* alcanza el medio exterior. Se ha determinado en el capítulo anterior que la clave atractiva se encuentra en la cámara de fermentación, y que en la naturaleza llega al suelo y es detectada por las larvas parasitoides. Sin embargo, por estudios previos se sabe que no se encuentra en las heces de *C. signaticollis* (Castelo y Lazzari 2004), por lo tanto la salida al exterior de estos compuestos no sería a través de la vía digestiva. Una posibilidad es que los semioquímicos lleguen al exterior por el sistema traqueal, más precisamente por los espiráculos abdominales, debido a que se ha observado durante los procedimientos de disección que la cámara de fermentación se encuentra muy traqueada. Esto puede estar relacionado al requerimiento de oxígeno por parte de los microorganismos como se ha observado en otros insectos (Woolfolk et al. 2004). Se realizaron experimentos de orientación con oclusión de los espiráculos con el fin de confirmar esta hipótesis, pero sin éxito, debido a que los individuos lograban desobstruir sus espiráculos durante los ensayos. Por lo tanto se necesita realizar experimentos con protocolos eficientes de obturación que permitan determinar de que manera los infoquímicos llegan al suelo.

Si bien a partir de estos estudios no se pudo determinar con exactitud el agente/estructura productor de los infoquímicos implicados en el comportamiento de agregación de las larvas de *C. signaticollis*, los resultados obtenidos sugieren que los productos del metabolismo de las fuentes de carbono derivados de la actividad de los microorganismos serían importantes componentes de los infoquímicos que median el

comportamiento de orientación de los parasitoides hacia sus hospedadores y de las larvas de escarabeidos hacia sus coespecíficos. Las larvas de *M. ruficauda* son parasitoides inmaduros con una única oportunidad de parasitar. Por tanto es de esperar que exploten el sistema de comunicación de su hospedador al momento de localizarlo debido a que son claves altamente confiables y específicas. Por su parte la existencia de un sistema de comunicación entre individuos inmaduros de *C. signaticollis* es factible debido a los antecedentes existentes (Castelo y Capurro 2000; Castelo 2003; Castelo y Corley 2010) y a los ya enumerados beneficios que conlleva la comunicación y vida en grupo en las larvas de insectos (Ghent 1960; Capinera 1980; Tsubaki y Shiotsu 1982; Deneubourg et al. 1990; Hunter 2000; Duthie et al. 2003; Inouye y Johnson 2005; Despland y Le Huu 2006; Ruzicka y Zemek 2008; Jumean et al. 2009). De esta manera, para la comprensión de las interacciones entre *M. ruficauda* y *C. signaticollis* en este sistema parasitoide–hospedador, se hace necesario efectuar nuevos estudios que permitan elucidar los aspectos de comunicación y reconocimiento de la identidad entre estos insectos que no fueron resueltos en esta Tesis. Es así que estos nuevos estudios permitirán entender en profundidad la naturaleza del proceso de búsqueda y explotación del sistema de comunicación química del hospedador por *M. ruficauda*.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

En la presente Tesis se estudiaron aspectos morfológicos, morfométrico-fisiológicos y comportamentales del proceso de localización del hospedador del parasitoide *M. ruficauda*. Como se describió en la *Introducción General*, los parasitoides utilizan diferentes tipos de claves sensoriales que les permiten localizar y buscar al hospedador en el hábitat, las cuales son detectadas con el equipamiento sensorial del insecto. Además, los parasitoides necesitan de los recursos nutricionales que les permitan sostenerse y desplazarse hasta hallar al hospedador. *Mallophora ruficauda* tiene un comportamiento de localización del hospedador compartido donde la hembra detecta al hospedador a una escala espacial grande oviponiendo en el hábitat del mismo, y luego la larva localiza, busca y contacta de forma activa al hospedador. Este trabajo reveló que los adultos de esta especie tienen antenas provistas de un alto número sensilias y fosetas olfativas que les permitirían detectar claves químicas asociadas a la presencia del hospedador en el ambiente. A su vez las larvas también presentan un equipamiento sensorial con el cual detectan las claves que están involucradas en el comportamiento de localización activa del hospedador y, por otro lado, cuentan con recursos nutricionales que les permiten mantenerse con vida hasta localizar a las larvas de *C. signaticollis*. Además, estudiando el origen de los infoquímicos involucrados en el comportamiento activo de búsqueda de la larva de *M. ruficauda*, se obtuvieron resultados que sugieren que las claves asociadas a este comportamiento tendrían un posible rol en la comunicación intraespecífica del hospedador, y su producción pareciera estar ligada a microorganismos asociados a las larvas III de *C. signaticollis* que se encontrarían alojados en la cámara de fermentación.

En cuanto al estudio de las estructuras antenales de los adultos de *M. ruficauda*, se encontró que presentan antenas con aproximadamente 4.000 sensilias olfativas cada una y cuentan con varias fosetas sensoriales y estructuras de recubrimiento que están típicamente asociadas a la olfacción en dípteros. Estas características sugieren que la

modalidad sensorial olfativa, tanto en hembras como en machos de *M. ruficauda*, es importante en su historia de vida. Esta modalidad estaría involucrada principalmente en la detección de hospedadores y en la selección de pareja, debido a que durante la depredación la visión juega un rol crucial en la captura de las presas en las especies de asílidos. En cuanto a la olfacción, al igual que otros parasitoides, las hembras de *M. ruficauda* podrían estar utilizando diferentes tipos de claves en la localización de hospedadores y durante la oviposición. Se ha observado que las hembras detectan, de alguna manera aun no esclarecida, la presencia del hospedador a una escala espacial grande a partir de claves químicas del hábitat. Luego, a una escala menor, seleccionan el soporte en función de la altura de la vegetación y a continuación despositan sus huevos en el sustrato posiblemente siguiendo claves químicas de contacto. Este tipo de estrategia sería ventajosa en *M. ruficauda* dado que al contar con localización compartida del hospedador le permite encontrar y parasitar eficientemente a individuos que no podría parasitar si tuviera oviposición directa. Por otro lado, la cantidad y tipo de estructuras halladas en las antenas de los machos de *M. ruficauda* sugieren que las claves olfativas serían cruciales en su comportamiento sexual. Además, la falta de dimorfismo sexual indicaría que los machos estarían utilizando la misma clave olfativa que las hembras, es decir, estarían detectando la presencia del hospedador en el ambiente. De existir este comportamiento en los machos sería beneficioso debido a que al detectar a los hospedadores encontrarían a las hembras donde estén presentes los hospedadores, dada la necesidad de oviponer de las hembras, como sucede en otros parasitoides. Debido a que en los parasitoides la localización del hospedador es crucial en la continuidad de su ciclo de vida, sería parsimonioso que el encuentro entre hembras y machos ocurra a partir de las claves relacionadas al hospedador, de tal manera de que la energía utilizada en la producción y detección de claves sexuales sea redirigida hacia otras actividades del individuo que aumenten su *fitness* o aptitud biológica. Aunque es claro que los adultos de *M. ruficauda* son capaces de detectar claves químicas presentes en el ambiente, son

necesarios estudios químicos, fisiológicos y comportamentales que determinen la identidad de las claves que detectan las hembras previo a la oviposición y si estas claves son las mismas que detectan los machos en el contexto de búsqueda de pareja.

El estudio realizado sobre las características morfológicas y fisiológicas asociadas al comportamiento activo de búsqueda de la larva de *M. ruficauda* arrojó resultados interesantes. Las larvas de primer estadio presentan una cápsula cefálica y piezas bucales menos desarrolladas, y una menor cantidad de sensilias en los palpos maxilares que las larvas de segundo estadio. Estas diferencias morfológicas entre estadios apoyan lo observado en experimentos comportamentales previos donde las larvas de estadio I tienen la capacidad de detectar el hospedador, pero no orientarse hacia él, mientras que este comportamiento sí es observado en los individuos de estadio II. Aunque no se caracterizó la función de las sensilias halladas, este trabajo es un aporte a los estudios morfo-funcionales que investigan las características asociadas a la búsqueda activa de recursos por parte de los estados inmaduros de los insectos. Estos trabajos son importantes porque ayudan a comprender la historia de vida de los individuos inmaduros, la cual es más compleja de lo que viene representando la bibliografía. Las larvas de insectos no dependen solamente de las decisiones que toman sus progenitores, sino que también son capaces de tomar sus propias decisiones y de realizar comportamientos más complejos de lo esperado. Además, los estudios morfo-funcionales muestran ser importantes herramientas en la comprensión de aspectos comportamentales, fisiológicos y ecológicos, entre otros, debido a la clara correlación entre la morfología y la función que se registra en la literatura. Por otro lado, el análisis indirecto de las diferencias en los recursos asignados a los huevos por la hembra en distintos momentos de la temporada reproductiva a partir de estimadores del tamaño y de la condición corporal no arrojó resultados concluyentes, aunque si una tendencia interesante para explorar a futuro.

El patrón inverso entre el tamaño corporal y la supervivencia de los individuos de estadio I, dependiendo del momento de la temporada reproductiva en la que nacen, sugiere que existiría una diferencia cualitativa en los recursos nutricionales que las hembras de *M. ruficauda* asignan a sus huevos. Frente a estos resultados, la mejor manera de realizar estudios sobre la cuantificación de los recursos nutricionales y la inversión parental de los individuos es mediante métodos directos que minimicen los factores que introducen variabilidad. La aplicación de índices de condición corporal es sumamente útil cuando se quiere mantener la integridad de los individuos, pero no es adecuada cuando se quiere conocer en detalle los aspectos tratados en esta Tesis, más aún cuando se trata de evaluar la condición corporal en larvas tan pequeñas. Lo observado en este trabajo sugiere que la inversión parental en insectos puede tener una dinámica compleja, en la cual la hembra no sólo determinaría la cantidad de recursos a invertir en cada descendiente sino que además tendría la capacidad de decidir el tipo de recursos que asigna en cada momento en el cual se favorecerían la supervivencia de su prole incrementando su *fitness* o aptitud biológica. Sin embargo, son necesarios estudios de estimación directa que determinen los recursos nutricionales presentes en los huevos a lo largo de la temporada reproductiva con el objetivo de identificar si existe una asignación diferencial.

Luego, en esta Tesis se estudió el origen, el agente/estructura productora y el rol ecológico de las claves químicas involucradas en el comportamiento de búsqueda y localización del hospedador en el sistema *M. ruficauda*–*C. signaticollis*. Se determinó que el origen de estas claves está en la cámara de fermentación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis*. Los resultados de los experimentos comportamentales llevados a cabo con larvas del hospedador sugieren que los extractos obtenidos de esta región del tubo digestivo contienen compuestos volátiles involucrados en el comportamiento de agregación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* observado a campo. Esto indica que las larvas de estadio II de *M. ruficauda* estarían

explotando el sistema de comunicación química de su hospedador al momento de localizarlo. Se ha observado entonces que, al igual que otras especies de parasitoides, *M. ruficauda* utiliza el sistema de comunicación de su hospedador durante la búsqueda, debido probablemente a su alta especificidad y confiabilidad.

Por último, se prosiguió con la determinación indirecta del agente/estructura productora de estos infoquímicos y se identificó un engrosamiento del epitelio con posible función glandular y la presencia de microorganismos en la cámara de fermentación de las larvas del hospedador. La falta de orientación tanto del parasitoide como del hospedador frente a extractos de individuos de estadio III de *C. signaticollis* criados en presencia de antibiótico sugiere que los microorganismos asociados a la cámara de fermentación podrían estar involucrados en la producción de estos infoquímicos. Sin embargo, queda por determinar a futuro la identidad de estos microorganismos asociados mediante medios de cultivo selectivos o diferenciales, y técnicas de biología molecular. Luego, al estudiar si los productos metabólicos de la degradación de las fuentes de carbono de los microorganismos son los infoquímicos asociados a los comportamientos de orientación positiva del parasitoide y del hospedador, se observó que las larvas del parasitoide fueron atraídas por los productos de degradación de las proteínas, mientras que las larvas de *C. signaticollis* no mostraron orientación frente a ninguno de los estímulos probados. Estos resultados no permiten corroborar la hipótesis de que ambas especies explotan las mismas claves. Sin embargo, este hecho pudo deberse a que se modificó la composición de la feromona involucrada en el comportamiento de agregación del hospedador o que la concentración de los estímulos probados en las larvas no fue lo suficientemente alta. No obstante, no se descarta la posibilidad de que las larvas de estadio II de *M. ruficauda* exploten el sistema de comunicación química durante la búsqueda del hospedador. La baja expectativa de vida, la baja movilidad y la única oportunidad de parasitar que presentan las larvas parasitoides, en contraposición con las hembras

parasitoides, hacen suponer que al momento de localizar activamente a su hospedador las larvas utilicen claves altamente confiables que efectivamente permitan el encuentro entre ambas especies. Dado que es natural que los hospedadores se comuniquen entre sí mediante mensajes específicos e inequívocos, es entonces evolutivamente adaptativo que los enemigos naturales de los insectos fitófagos utilicen este tipo de claves en la búsqueda y localización de manera de asegurar su alimentación, sobrevivencia y reproducción.

En conclusión, en la presente Tesis se estudiaron aspectos morfológicos, fisiológicos y comportamentales que llevan a *M. ruficauda* a localizar a su hospedador *C. signaticollis*, los cuales contribuyen a ampliar aspectos de su ciclo de vida hasta hoy desconocidos (Figura 7.1). No obstante, este estudio ha abierto otros interrogantes que deberán resolverse a futuro. Aunque se determinó morfológicamente la importancia de la modalidad olfativa en los adultos de *M. ruficauda* aun se necesitan estudios que determinen que tipo de infoquímicos son capaces de detectar y cual es su rol en el sistema. Asimismo, son necesarios más estudios sobre las capacidades sensoriales de las larvas del parasitoide y como regulan el proceso de localización activa del hospedador. También se debe profundizar el estudio de la asignación de recursos hacia su progenie por parte de las hembras de *M. ruficauda*, mediante análisis cuantitativos de las reservas energéticas de los huevos y entender como podrían influir esas reservas en sortear la asincronía entre la aparición del parasitoide y el estadio susceptible al parasitismo del hospedador. Por su parte, el estudio de origen y producción de las claves volátiles involucradas en la localización del hospedador, generó otras incertidumbres como conocer el por qué de la pérdida de la actividad biológica en los estímulos presentados al hospedador durante los procedimientos; que función y que secreta la estructura hallada en la cámara de fermentación de la larva de estadio III de *C. signaticollis*; y cual es la identidad química de la clave atractiva encontrada. Estas nuevas preguntas permitirán a futuro entender

en mayor profundidad la interrelación entre estas dos especies y a su vez aumentará el conocimiento de aquellos sistemas similares al estudiado en esta Tesis.



Figura 7.1. Esquema de los interrogantes estudiados en esta Tesis vinculados a los atributos y comportamientos de la larva y del adulto de *M. ruficauda* durante la localización del hospedador y los principales resultados encontrados.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

- Abouzied, E.M. 2008. Ultrastructure of the sensory organs of male *Exorista* sp. (Diptera: Tachinidae) collected from Al-Baha, Ksa. *Bulletin of Entomological Society of Egypt* 85: 13-28.
- Afsheen, S., Wang, X., Li, R., Zhu, C., Lou, Y. 2008. Differential attraction of parasitoid in relation of specificity of kairomones from herbivores and their by-products. *Insect Science* 15: 381-397.
- Agosta, W. 2001. Thieves, deceivers and killers: tales of Chemistry in nature. Princeton University Press, New Jersey, USA. 241pp.
- Ahmad, T. 1936. The influence of ecological factors on the Mediterranean flour moth, *Ephestia kühniella* and its parasite, *Nemeritis canescens*. *Journal of Animal Ecology* 5(1): 67-93.
- Akent'eva, N.A. 2011. Morphology of the antennal sensory cone in insect larvae from various orders. *Biology Bulletin* 38(5): 459-469.
- Aldrich, J.R. 1995. Chemical communication in the true bugs and parasitoid exploitation, en *Chemical Ecology of Insect 2*, Carde, R.T. y Bell, W.J. (Eds.), pp 318-363. Springer Publishing, Nueva York, E.E.U.U., 434 pp.
- Aldrich, J.R., Zhang, A. 2002. Kairomone strains of *Euclytia flava* (Townsend), a parasitoid of stink bugs. *Journal of Chemical Ecology* 28(8): 1565-1582.
- Ali, A.D., Harivandi, M.A. 1987. White grubs in lawns. *Biology and Insect Management Series*. Cooperative Extension, University of California. Leaflet 21442,
- Alvarado, L.J. 1979. Comparación poblacional de "gusanos blancos" (larvas de Coleópteros Scarabaeidae) en tres situaciones de manejo. INTA, Generalidades, Carpeta de Producción Vegetal, tomo II, Inf. 16: 5 pp.
- Alvarado, L.J. 1980. Sistemática y bionomía de los estados inmaduros de coleópteros Scarabaeidae que habitan en el suelo. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina, 199 pp.
- Alvarado, L.J. 1983. Daños de insectos del suelo en semillas de plantas cultivadas. INTA Estación Experimental Regional Agropecuaria Pergamino, Informe Técnico nº 180: 7 pp. Trabajo presentado al IX Seminario Panamericano de semilla, Bs. As., 1980.
- Alvarado, L., Senigagliesi, C., Marta, L. 1981. Composición poblacional de larvas de Scarabaeidae tras sucesivos cultivos de maíz. Informe de la Estación Experimental Regional Agropecuaria INTA Pergamino: 156-167.
- Álvarez Castillo, H.A., López, A.N., Vincini, A.M., Carmona, D., Manetti, P.L. 1993. Relevamiento de los insectos del suelo en cultivos de papa del sudeste bonaerense. Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA – Estación Experimental Agropecuaria Balcarce Boletín Técnico 118: 18 pp.
- Amat, I., Castelo, M.K., Desouhant, E., Bernstein, C. 2006. The influence of temperature and host availability on the host exploitation strategies of sexual and asexual parasitic wasps of the same species. *Oecologia* 148: 153-161.
- Ameen, M.-U., Rahman, M.F. 1973. Larval and adult digestive tracts of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 2(2): 137-152.
- Artigas, J.N. 1970. Los Asílidos de Chile (Diptera: Asilidae). *Gayana Zoología* 17: 1-437.
- Artigas, J.N., Angulo, A.O. 1980. Revisión del género *Mallophora* Maquart por sistemática alfa y taxonomía numérica (Diptera: Asilidae). *Gayana Zoología* 43: 1-182.
- Artigas, J.N., Papavero, N., Serra, A.L.. 1991. The American genera of Asilidae (Diptera): keys for identification with an atlas of female spermatheca and other morphological details. 6. Tribe Atomosiini and a catalogue of the neotropical species. *Gayana Zoología* 55(1): 53-85.
- Bahia, A.C., Secundino, N.F.C., Miranda, J.C., Prates, D.B., Souza, A.P.A., Fernandes, F.F., Barral, A., Pimenta, P.F.P. 2007. Ultrastructure comparison of external morphology of immature stages of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Medical Entomology* 44(6): 903-914.

- Bailón Lira, L., Gonzalez Melendez, R.C., Cervantes Sandoval, A. 2003. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 174 pp.
- Baker, G.T., Davis, J., Monroe, W., Chandrapatya, A. 2000. Cuticular sensory receptors on the antenna and maxillary palp of a fly larva *Nephrotoma suturalis* (Diptera: Tipulidae). *Invertebrate Biology* 119(3): 342-348.
- Barrantes, M.E., Castelo, M.K. 2014. Host specificity of the larval parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) and the influence of the age on this process. *Bulletin of Entomological Research*, en prensa. Doi:10.1017/S0007485314000029.
- Bauchop, T., Clarke, R.T.J. 1975. Gut microbiology and carbohydrate digestion in the larva of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *New Zeland Journal Zoology* 2: 237-243.
- Bay, D.E., Pitts, C.W. 1976. Antennal olfactory sensilla of the face fly *Musca autumnalis* Degreer (Diptera: Muscidae). *International Journal Insect Morphology & Embryology* 5(1): 1-16.
- Been, T.H., Schomaker, C.H., Thomas, G. 1988. Olfactory sensilla on the antenna and maxillary palp of the sheep head fly, *Hydrotaea irritans* (Fallen) (Diptera: Muscidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 17(2): 121-133.
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L. 2006. Ecology: from individuals to ecosystems. 4^{ta} Edición, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, Inglaterra, 752 pp.
- Benedet, F., Leroy, T., Gauthier, N., Thibaudeau, C., Thibout, E., Renault, S. 2002. Gustatory sensilla sensitive to protein kairomones trigger host acceptance by an endoparasitoid. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269: 1879-1886.
- Bernays, E.A., Klein, B.A. 2002. Quantifying the symbiont contribution to essential amino acids in aphids: the importance of typtophan for *Uroleucon ambrosiae*. *Physiologica Entomology* 27: 275-284.
- Beutel, R.G., Kristensen, N.P., Pohl, H. 2009. Resolving insect phylogeny: the significance of cephalic structures of the Nannomecoptera in understanding endopterygote relationships. *Arthropod Structure & Development* 38: 427-460.
- Bidla, G., Hauling, T., Dushay, M.S., Theopold, U. 2009. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *Journal of Innate Immunity* 1: 301-308 pp.
- Bisotto-de-Oliveira, R., Redaelli, L.R., Santana, J. 2011. Morphometry and distribution of sensilla on the antennae of *Anastrepha fraterculus* (wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology* 40(2): 212-216.
- Boivin, G., Gauvin, M.J. 2009. Egg size affects larval performance in a coleopteran parasitoid. *Ecological Entomology* 34: 240-245.
- Boivin, G., Hance, T., Brodeur, J. 2012. Aphid parasitoids in biological control. *Canadian Journal of Plant Science* 92: 1-12.
- Bologna, M.A., Di Giulio, A. 2011. Biological and morphological adaptations in the pre-imaginal phases of the beetle family Meloidae. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LIX*: 141-152.
- Bologna, M.A., Pinto, J.D. 2001. Phylogenetic studies of Meloidae (Coleoptera), with emphasis on the evolution of phoresy. *Systematic Entomology* 26: 33-72.
- Boone, C.K., Six, D.L., Zheng, Y., Raffa, K.F. 2008. Parasitoids and dipteran predators exploit volatiles from microbial symbionts to locate bark beetles. *Environmental Entomology* 37(1): 150-161.
- Bottrell, D.G., Barbosa, P., Gould, F. 1998. Manipulating natural enemies by plant variety selection and modification: a realistic strategy? *Annual Review of Entomology* 43: 347-367.
- Brock, T.D., Smith, D.W., Madigan, M.T. 1987. Microbiologia. 4^{ta} Edición, Prentice-Hall Hispanoamericana, Méjico D.F., Méjico, 906 pp.
- Brodeur, J., Boivin, G. 2004. Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Review of Entomology* 49: 27-49.

- Brown, B.V., Feener Jr., D.H. 1991. Behavior and host location cues of *Apocephalus paraponerae* (Diptera: Phoridae), a parasitoid of the great tropical ant, *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Formicidae). *Biotropica* 23(2): 182-187.
- Bution, M.L., Caetano, F.H. 2008. Ileum of the Cphalotes ants: a specialized structure to harbor symbionts microorganisms. *Micron* 39: 897-909.
- Byers, J.A. 1989. Chemical ecology of bark beetles. *Experientia* 45: 271-283.
- Byers, J.A., Wood, D.L. 1981. Antibiotic-induced inhibition of pheromone synthesis in a bark beetle. *Science* 213(14): 763-764.
- Capinera, J.L. 1980. A trail pheromone from silk produced by larvae of the range caterpillar *Hemileuca oliviae* (Lepidoptera: Staruniidae) and observations on aggregation behavior. *Journal of Chemical Ecology* 6(3): 655-664.
- Capinera, J.L. 2008. Encyclopedia of Entomology. 2^{da} Edición, Springer Publishing, Dordrecht, Holanda, 4346 pp.
- Carmona, D.M., Vincini, A.M., López, A.N., Álvarez Castillo, H.A., Manetti P.L. 1994. Cambios estacionales en la comunidad de "insectos del suelo" en el cultivo de papa en el sudeste bonaerense. Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA – Estación Experimental Agropecuaria Balcarce Boletín Técnico 126: 15 pp.
- Casas, J., Pincebourde, S., Mandon, N., Vanner, F., Poujol, R., Giron, D. 2005. Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology* 86(3): 545-554.
- Castelo, M.K. 2003. Comportamiento de localización y patrones de explotación de hospedadores (Coleoptera: Scarabaeidae) por el moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 169 pp.
- Castelo, M.K., Capurro, A.F. 2000. Especificidad y denso-dependencia inversa en parasitoides con oviposición fuera del hospedador: el caso de *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) en la pampa argentina. *Ecología Austral* 10: 89–101.
- Castelo, M.K., Corley, J.C. 2004a. Oviposition behavior in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 97(4): 1050–1054.
- Castelo, M.K., Corley, J.C. 2004b. Evaluación de la capacidad reguladora del moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) sobre los gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 33(1): 59-78.
- Castelo, M.K., Corley, J.C. 2010. Spatial density-dependent parasitism and specificity in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Austral Ecology* 35: 72-81.
- Castelo, M.K., Crespo, J.E. 2012. Incidence of non-immunological defenses of soil white grubs on parasitism success of *Mallophora ruficauda* larva (Diptera: Asilidae). *Insects* 3: 692-708.
- Castelo, M.K., Lazzari, C.R. 2004. Host-seeking behavior in larvae of the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Journal of Insect Physiology* 50: 331-336.
- Castelo, M.K., Ney-Nifle, M., Corley, J.C., Bernstein, C. 2006. Oviposition height increases parasitism success by the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 231–243.
- Castrejon-Gomez, V.R., Rojas, J.C. 2009. Antennal sensilla of *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America* 102(2): 310-316.
- Gazemier, A. E., Hackstein, J. H. P., Op den Camp, H. L. M., Rosenberg, J., van der Drift, C. 1997. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. *Microbiology Ecology* 33: 189–197.
- Chandler, S.M., Wilkinson, T.L., Douglas, A.E. 2008. Impact of plant nutrients on the relationship between a herbivorous insect and its symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B* 275: 565-570.
- Chapman, R.F. 1982. Chemoreception: The significance of receptor numbers. *Advances in Insect Physiology* 16: 247-356.

- Chapman R.F. 2013. The insects: Structure and function. 5^{ta} Edición, Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 954 pp.
- Cheer, A.Y.L., Koehl, M.A.R. 1987a. Fluid flow through filtering appendages of insects. *IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine & Biology* 4: 185-199.
- Cheer, A.Y.L., Koehl, M.A.R. 1987b. Paddles and rakes: fluid flow through bristled appendages of small organisms. *Journal of Theoretical Biology* 129: 17-39.
- Chen, L., Fadamiro, H.Y. 2008. Antennal sensilla of the decapitating phorid fly, *Pseudacteon tricuspis* (Diptera: Phoridae). *Micron* 39: 517-525.
- Cherry, R.H., Schueneman, T.J. 1998. Insect management in sugarcane. Department of Entomology, University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. ENY-406 Series.
- Chown, S.L., Terblanche, J.S. 2007. Physiological diversity in insects: ecological and evolutionary contexts, en *Advances In Insect Physiology* Volume 33, Simpson, S.J. (Ed.), pp 50-152. Academic Press, Londres, Inglaterra, 249 pp.
- Clark, B.R., Faeth, S.H. 1997. The consequences of larval aggregation in the butterfly *Chlosyne lacinia*. *Ecological Entomology* 22: 408-415.
- Clausen, C.P. 1940. Entomophagous insects. 1^{ra} Edición, McGraw-Hill Book Company Inc., Nueva York (E.E.U.U.) y Londres (Inglaterra), 698 pp.
- Clements A.N., Bennett F.D. 1969. The structure and biology of a new species of *Mallophora* Macq. (Diptera: Asilidae) from Trinidad. *Bulletin of Entomological Research* 58(3): 455–463.
- Colomb, J., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Stocker, R.F. 2007. Architecture of primary taste center of *Drosophila melanogaster* larvae. *The Journal of Comparative Neurobiology* 502: 834-847.
- Colwell, D.D., Scholl, P.J. 1995. Cuticular sensilla on newly hatched larvae of *Gasterophilus intestinalis* and *Oestrus ovis*. *Medical and Veterinary Entomology* 9: 85-93.
- Conti, E., Colazza, S. 2012. Chemical ecology of egg parasitoids associated with true bugs. *Psyche*, Article ID 651015, 11 pp.
- Copello, A. 1922. Biología del moscardón cazador de abejas (*Mallophora ruficauda* Wiederman). *Physis* 6: 30–42.
- Cranshaw, W.S., Zimmerman, R. 1998. Billbugs and white grubs. Colorado State University, Insect Series *Home & Garden* 5: 516,
- Crespo, J.E. 2007. Supervivencia y duración de los estadios larvales del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae): el papel de la edad en el comportamiento de orientación hacia el hospedador. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 77 pp.
- Crespo, J.E. 2011. Ecología y fisiología del comportamiento de localización del hospedador en el parasitoide *Mallophora ruficauda*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 135 pp.
- Crespo, J.E., Castelo, M.K. 2008. The ontogeny of host-seeking behaviour in a parasitoid dipteran. *Journal of Insect Physiology* 54: 842-847.
- Crespo, J.E., Castelo, M.K. 2009. Insights to the host discrimination and host acceptance behavior in a parasitoid (Diptera: Asilidae): Implications for fitness. *Journal of Insect Physiology* 55(11): 1072-1078.
- Crespo, J.E., Castelo, M.K. 2010. Life-history traits in a parasitoid dipteran species with free-living and obligate parasitic immature stages. *Physiological Entomology* 35: 160-167.
- Crespo, J.E., Castelo, M.K. 2012. Barometric pressure influences host-orientation behavior in the larva of a díptera ectoparasitoid. *Journal of Insect Physiology* 58: 1562-1567.
- Crespo, J.E., Lazzari, C.R., Castelo, M.K. 2011. Orientation mechanisms and sensory organ involved in host location in a dipteran parasitoid larva. *Journal of Insect Physiology* 57: 191-196.

- Crouzel I.S. 1965. Parasitismo en gusanos blancos en la República Argentina (Coleoptera, Scarabaeidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 27(1/4): 83-87.
- Cruden, D.L., Markovetz, A.J. 1987. Microbial ecology of the cockroach gut. *Annual Review of Microbiology* 41: 617-643.
- Crutchfield, B.A., Potter, D.A. 1995. Damage relationships of Japanese beetle and southern masked chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in cool-season turfgrasses. *Journal of Economic Entomology* 88: 1049-1056.
- Danks, H.V. 2006. Insect adaptations to cold and changing environments. *Canadian Entomologist* 138: 1-23.
- Da Rocha L., Moreira G.R.P., Redaelli L.R. 2007. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Gryon gallardoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Scelionidae) Females. *Neotropical Entomology* 36(5): 721-728.
- Da Silva, I. 1976. Estrutura histológica do tubo digestivo da larva de *Oncideres saga saga* (Dalman, 1823) (Coleoptera, Cerambycidae). *Acta Biológica Paranaense* 5(1,2): 99-106.
- Da-Silva Araujo, M., Gil, L.H.S., De-Almeida e Silva, A. 2012. Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darling* under laboratory conditions. *Malaria Journal* 11:261, 9 pp.
- Darling, D.C. 1992. The life history and larval morphology of *Aperilampus* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Philomidinae), with a discussion of the phylogenetic affinities of the Philomidinae. *Systematic Entomology* 17: 331-339.
- Darling, D.C., Roberts, H. 1999. Life history and larval morphology of *Monacon* (Hymenoptera: Perilampidae), parasitoids of ambrosia beetles (Coleoptera: Platypodidae). *Canadian Journal of Zoology* 77: 1768-1782.
- Das, F., Chen, L., Sharma, K.R., Fadamiro, H.Y. 2011. Abundance of antennal chemosensilla in two parasitoid wasps with different degree of host specificity may explain sexual and species differences in their response to host-related volatiles. *Microscopy Research and Technique* 74: 900-909.
- Davis, T.S., Crippen, T.L., Hofstetter, R.W., Tomberlin, J.K. 2013. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 39: 840-859.
- De Freitas Fernandes, F., Linardi, P.M., Chiarini-Garcia, H. 2002. Morphology of the antenna of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterrebridae) based on scanning electron microscopy. *Journal of Medical Entomology* 39(1): 36-43.
- De Freitas Fernandes, F., Paolucci Pimenta, P.F., Linardi, P.M. 2004. Antennal sensilla of the new world screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 41(4): 545-551.
- De Freitas Fernandes, F., Souza Freitas, E.P., Linardi, P.M., Paolucci Pimenta, P.F. 2005. Ultrastructure of contact-chemoreceptor sensilla found among the genae of female *Gasterophilus nasalis*. *Journal of Parasitology* 91(5): 1218-1220.
- De Moraes, C.M., Lewis, J.W., Tumlinson, J.H. 2000. Examining plant-parasitoid interactions in tritrophic systems. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29(2): 189-203.
- De Santis L.G. 1989. El moscardón cazador de abejas. *Revista Industria Apícola* 1(1): 16-24 [Edit. por Coop. Apícola Ltda. del Oeste Mones Cazón. Prov. Bs. As., Argentina]
- Deneubourg, J.L., Gregoire, J.C., Le Fort, E. 1990. Kinetics of larval gregarious behavior in the bark beetle *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Insect Behavior* 3(2): 169-182.
- Dennis D.S., Knutson L. 1988. Descriptions of pupae of South American robber flies (Diptera, Asilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 81(6): 851-864.
- Derby, C.D., Steullet, P. 2001. Why do animals have so many receptors? The role of multiple chemosensors in animal perception. *Biological Bulletin* 200: 211-215.
- Despland, E., Le Huu, A. 2006. Pros and cons of group living in the forest tent caterpillar: separating the roles of silk and of grouping. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 181-189.

- Devetak, D., Lipovšek, S., Pabst, M.A. 2010. Larval morphology of the antlion *Neuroleon microstenus* (McLachlan, 1898) (Neuroptera, Myrmeleontidae), with notes on larval biology. *Zootaxa* 2428: 55-63.
- Dicke, M. 1988. Microbial allelochemicals affecting the behavior of insects, mites, nematodes, and protozoa in different trophic levels, en *Novel aspects of insect-plant interactions*, Barbosa, P. y Letourneau, D.K. (Eds.), pp 125-163. Wiley-InterScience Oxford, Inglaterra, 362 pp.
- Dicke, M. 2006. Chemical ecology from genes to communities – Integrating ‘omics’ with community ecology, en *Chemical ecology – From gene to Ecosystem*, Dicke, M. y Takken, W. (Eds.), pp. 175-189. Serie Wageningen UR Frontis, Springer Publishing, Dordrecht, Holanda, 190 pp.
- Dicke, M., Grostal, P. 2001. Chemical detection of natural enemies by arthropods: an ecological perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 1-23.
- Dicke, M., Sabelis, M.W. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology* 2: 131-139.
- Dillon, R.J., Dillon, V.M. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Reviews of Entomology* 49: 71-92.
- Dillon, R.J., Vennard, C.T., Charnley, A.K. 2000. Exploitation of gut bacteria in the locust. *Nature* 403: 851.
- Diss, A.J., Kunkel, J.G., Montgomery, M.E., Leonard, D.E. 1996. Effects of maternal nutrition and egg provisioning on parameters of larval hatch, survival and dispersal in the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. *Oecologia* 106: 470-477.
- Domek, J.M., Johnson, D.T. 1990. Inhibition of aggregation behavior in the Green June Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) by antibiotic treatment of food substrate. *Environmental Entomology* 19(4): 995-1000.
- Douglas, A.E. 1988. Experimental studies on the mycetome symbiosis in the leafhopper *Euscelis incisus*. *Journal of Insect Physiology* 34(11): 1043-1053.
- Douglas, A.E. 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews* 64: 409-434.
- Douglas, A.E. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* 43: 17-37.
- Duthie, B., Gries, G., Gries, R., Krupke, C., Derksen, S. 2003. Does pheromone-based aggregation of codling moth larvae help procure future mates? *Journal of Chemical Ecology* 29(2): 425-436.
- Dweck, H.K.M. 2009. Antennal sensory receptors of *Pterolamus puparum* female (Hymenoptera: Pterolamidae), a gregarious pupal endoparasitoid of *Pieris rapae*. *Micron* 40: 769-774.
- Dweck, H.K.M., Svesson, G.P., Akman Gündüz, E., Anderbrant, O. 2010. Kairomonal response of the parasitoid, *Bracon hebetor* Say, to the male-pheromone sex pheromone of its host, the greater waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Journal of Chemical Ecology* 36: 171-178.
- Eaton, J. 1985. Nervous system: sensory system, en *Fundamentals of insect physiology*, 1^{era} Edición, Blum, M.R. (Ed.), pp. 287-356. Wiley-InterScience, New York, E.E.U.U., 598pp.
- Egert, M., Wagner, B., Lemke, T., Brune, A., Friedrich, M.W. 2003. Microbial community structure in midgut and hindgut of humus-feeding larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6659-6668.
- Egert, M., Stingl, U., Bruun, L.D., Pommerenke, B., Brune, A., Friedrich, M.W. 2005. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* 71(8): 4556-4566.
- Eggleton, P., Belshaw, R. 1992. Insect Parasitoids: An Evolutionary Overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 337: 1-20.
- Eggleton, P., Belshaw, R. 1993. Comparisons of dipteran, hymenopteran and coleopteran parasitoids: provisional phylogenetic explanations. *Biological Journal of the Linnean Society* 48: 213-226.

- Ellers, E.J., Talarico, G., Hansson, B.S., Hilker, M., Reinecke, A. 2012. Sensing the underground – Ultrastructure and function of sensory organs in root-feeding *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. Public Library of Science ONE 7(7): e41357. doi:10.1371/journal.pone.0041357.
- Elser, J., Jervis, M. 2003. Body size and the timing of egg production in parasitoid wasp. *Oikos* 102: 164-172.
- Feener Jr., D.H., Brown, B.V. 1997. Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology* 42: 73-97.
- Feener Jr., D.H., Jacobs, L.F., Schmidt, J.O. 1996. Specialized parasitoid attracted to a pheromone of ants. *Animal Behaviour* 51: 61-66
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Largueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C., Hoffmann, J.A. 1994. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 269(52): 33159-33163 pp.
- Feldhaar, H. 2011. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* 36: 533-543.
- Fournet, S., Poinso, D., Brunel, E., Nénon, J.P., Cortesero, A.M. 2001. Do female coleopteran parasitoids enhance their reproductive success by selecting high-quality oviposition sites? *Journal of Animal Ecology*, 70: 1046-1052.
- Fox, C.W., Czesak, M.E. 2000. Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annual Reviews of Entomology* 45: 341-369.
- Friis, H. Bauer, T., Betz, O. 2003. An insect larva with a “pig-snout”: structure and function of nasale of *Hyphydrus ovatus* L. (1763) (Coleoptera: Dytiscidae). *Journal of Zoology (London)* 261: 59-68.
- Fritzsche Hoballah, M.E., Tamo, C., Turlings, T.C.J. 2002. Differential attractiveness of induced odors emitted by eighty maize varieties for parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology* 28(5): 951-968.
- Gaino, E., Rebor, M. 1999. Larval antennal sensilla in water-living insects. *Microscopy Research and Technique* 47: 440-457.
- Ganter, P.F. 2006. Yeast and invertebrate associations, en *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Rosa, C. A. y Gabor, P. (Eds.), pp 303-370. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, 580 pp.
- Gao, Y., Luo, L.Z., Hammond, A. 2007. Antennal morphology, structure and sensilla distribution in *Microplitis pallidipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Micron* 38: 684-693.
- Ghent, A.W. 1960. A study of the group-feeding behaviour of larvae of the jack pine sawfly, *Neodiprion pratti banksianae* Roh. *Behaviour* 16(1/2): 110-148.
- Giangiuliani, G., Lucchi, A., Vinson, S.B., Bin, F. 1994. External anatomy of adult antennal sensilla of the fly, *Trichopoda pennipes* F. (Diptera: Tachinidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 23(2): 105-113.
- Gillot, C. 2005. Entomology. 3^{era} Edicion, Springer Publishing, Dordrecht, Holanda, 831 pp.
- Glinwood, R.T., Du, Y.-J., Powell, W. 1999. Responses to aphid sex pheromone by the pea aphid parasitoids *Aphidius ervi* and *Aphidius eadyi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92: 227-232.
- Godfray, H.C.J. 1994. Parasitoids. Behavior and Evolutionary Ecology. Princeton University Press, Nueva Jersey, E.E.U.U., 473 pp.
- Goubert, C., Josso, C., Louapre, P., Cortesero, A.M., Poinso, D. 2013. Short- and long-range cues used by ground-dwelling parasitoids to find their host. *Naturwissenschaften* 100:177–184
- Green, A.J. 2001. Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82(5): 1473-1483.
- Greenfield, M.D. 2002. Signallers and Receivers: Mechanisms and Evolution of Arthropod Communication. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 414pp.

- Grünwald, S., Pilhofer, M., Höll, W. 2010. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Systematic and Applied Microbiology* 33: 25-34.
- Guerrieri, E., Poppy, G.M., Powell, W., Tremblay, E., Pennacchio, F. 1999. Induction and systemic release of herbivore-induced plant volatiles mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 25(6): 1247-1261.
- Guerrieri, E., Poppy, G.M., Rao, R., Pennacchio, F. 2002. Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 28(9): 1703-1715.
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. 2005. The insects: an outline of Entomology. 3^{ra} Edición, Wiley-Blackwell Publishing, Malden, E.E.U.U., 511 pp.
- Hall, G.M., Tittiger, C., Blomquist, G.J., Andrews, G.L., Mastick, G.S., Barkawi, L.S., Bengoa, C., Seybold, S.J. 2002a. Male Jeffrey pine beetle, *Dendroctonus jeffreyi*, synthesizes the pheromone component frontalin in anterior midgut tissue. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1525-1532.
- Hall, G.M., Tittiger, C., Blomquist, G.J., Andrews, G.L., Mastick, G.S., Kuenzli, M., Luo, X., Seybold, S.J., Blomquist, G.J. 2002b. Midgut tissue of male pine engraver, *Ips pini*, synthesizes monoterpenoid pheromone component ipsdienol *de novo*. *Naturwissenschaften* 89:79-83.
- Hallberg, E., Hansson, B.S. 1999. Arthropod sensilla: morphology and phylogenetic considerations. *Microscopy Research and Technique* 47: 428-439.
- Hallberg, E., Van Der Pers, J.N.C., Haniotakis, G.E. 1984. Funicular sensilla of *Dacus oleae*: fine structural characteristics. *Entomologia Hellenica* 2: 41-46.
- Hansson, B.S., Stensmyr, M.C. 2011. Evolution of insect olfaction. *Neuron* 72: 698-711.
- Hardie, J., Gibson, G., Wyatt, T.D. 2001. Insect behaviours associated with resource finding, en *Insect movement: mechanisms and consequences*, Woïwod, I.P. et al. (Eds.), pp 87-109. CAB International Press, Londres, Inglaterra, 458 pp.
- Hardy, G.H. 1929. Revisional notes on described Australian robber flies of the genus *Ommatius* (Asilidae). *Proceedings of Royal Society of Queensland* 40(6): 61-65.
- Hassell, M.P. 2000. The spatial and temporal dynamics of host-parasitoid interactions. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 199 pp.
- Hawkins, B.A. 1994. Pattern and process in host-parasitoid interactions. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 190 pp.
- Heimpel, G.E., Casas, J. 2008. Parasitoid foraging and oviposition behavior in the field, en *Behavioral Ecology Of Insect Parasitoids: From Theoretical Approaches To Field Applications*, Wajnberg E., et al. (Eds.), pp 51-70. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, Inglaterra, 476 pp.
- Heimpel, G.E., Mangel, M., Rosenheim, J.A. 1998. Effects of time limitation and egg limitation on lifetime reproductive success of a parasitoid in the field. *American Naturalist* 152(2): 273-289.
- Heraty, J., Hawks, D., Kostecki, J.S., Carmichael, A. 2004. Phylogeny and behavior of the Gollumiellinae, a new subfamily of the ant-parasitic Eucharitidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Systematic Entomology* 29: 544-559
- Heraty, J.M. 2000. Phylogenetic relationship of Oraseminae (Hymenoptera: Eucharitidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93(3):374-390.
- Hibbard, B.E., Bjostad, L.B. 1988. Behavioral responses of western corn rootworm larvae to volatile semiochemicals from corn seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 14(6): 1523-1539.
- Ho, G.T.T., Ichiki, R.T., Nakamura, S. 2011. Reproductive biology of the microtype tachinid fly *Zenillia dolosa* (Meigen) (Diptera: Tachinidae). *Entomological Science* 14: 210-215.
- Hoffmeister, T.S., Gienapp, P. 1999. Exploitation of host's chemical communication in parasitoid searching for concealed host larvae. *Ethology* 105: 223-232.

- Hood Henderson, D.E., Wellington, W.G. 1982. Antennal sensilla of some aphidophagous Syrphidae (Diptera): fine structure and electroantennogramme study. *Canadian Journal of Zoology* 60: 3172-3186.
- Hoyt, C.P., Osborne, G.O., Mulcock, A.P. 1971. Production of an insect sex attractant by symbiotic bacteria. *Nature* 230(16): 472-473.
- Hu, F., Zhang, G.N., Jia, F.X., Duo, W., Wang, J.J. 2010. Morphological characterization and distribution of antennal sensilla of six fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 103(4): 661-670.
- Huang, S.-W., Zhang, H.-Y. 2013. The impact of environmental heterogeneity and life stage on the hindgut microbiota of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Public Library of Science ONE* 8(2): 14pp.
- Huang, S.-W., Zhang, H.-Y., Marshall, S., Jackson, T.A. 2010. The scarab gut: A potential bioreactor for bio-fuel production. *Insect Science* 17: 175-183.
- Huma Taban, A., Fu, J., Blake, J., Awano, A., Tittiger, C., Blomquist, G.J. 2006. Site of pheromone biosynthesis and isolation of HMG – CoA reductase cDNA in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 61: 153-163.
- Hunt, D.W.A., Borden, J.H. 1990. Conversion of verbenols to verbenone by yeast isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Chemical Ecology* 16(4): 1385-1397.
- Hunter, A.F. 2000. Gregariousness and repellent defences in the survival of phytophagous insects. *Oikos* 91(2): 213-224.
- Hunter, F.F., Adserballe, C.F. 1996. Cuticular structures on the antennae of *Hypoderma bovis* De Geer (Diptera: Oestridae) females. *International Journal of Morphology & Embryology* 25(1/2): 173-181.
- Ichiki, R.T., Ho, G.T.T., Wajnberg, E., Kainoh, Y., Tabata, J., Nakamura, S. 2012. Different uses of plant semiochemicals in host location strategies of the two tachinid parasitoids. *Naturwissenschaften* 99: 687-694.
- Inouye, B.D., Johnson, D.M. 2005. Larval aggregation affects feeding rate in *Chlosyne poecile* (Lepidoptera: Nymphalidae). *The Florida Entomologist* 88(3): 247-252.
- Itoh, T., Yokohari, F., Tanimura, T., Tominaga, Y. 1991. External morphology of sensilla in the sacculus of an antennal flagellum of the fruit fly *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 20(4/5): 235-243.
- Jakob, E.M., Marshall, S.D., Uetz, G.W. 1996. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos* 77: 61-67.
- Jang, S.A., Cho, J.H., Park, G.M., Choo, H.Y., Park, C.G. 2011. Attraction of *Gymnosoma rotundatum* (Diptera: Tachinidae) to different amounts of *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae) aggregation pheromone and the effect of different pheromone dispensers. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14: 119-121.
- Jervis, M.A., Eilers, J., Harvey, J.A. 2008. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annual Reviews of Entomology* 53: 361-385.
- Jiménez-Pérez, A., Wang, Q. 2004. Effect of body weight on reproductive performance in *Cnephasia jactatana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Behavior* 17(4): 511-522.
- Johnson, D.T., Vishniac, H.S. 1991. The role of *Trichosporon cutaneum* in eliciting aggregation behavior in *Cotinis nitida* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Environmental Entomology* 20(1): 15-21.
- Juman, G., Chintawi, M., Ahuya, P.O., Njagi, P.G.N., Le Rü, B., Magoma, G., Silvain, J.F., Calatayud, P.A. 2008. Distribution of chemo- and mechanoreceptors on the antennae and maxillae of *Busseola fusca* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128: 93-98.
- Jumean, Z., Fazel, L., Wood, C., Cowan, T., Eveden, M.L., Gries, G. 2009. Cocoon-spinning larvae of oriental fruit moth and indianmeal moth do not produce aggregation pheromone. *Agricultural and Forest Entomology* 11: 205-212.

- Jumean, Z., Unruh, T., Gries, R., Gries, G. 2005. *Mastrus ridibundus* parasitoid eavesdrop on cocoon-spinning codling moth, *Cydia pomonella*, larvae. *Naturwissenschaften* 92: 20-25.
- Kai, M., Hausteiner, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., Piechulla, B. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 1001-1012.
- Kaissling, K.E. 1986. R.H. Wright Lectures on Insect Olfaction. Simon Fraser University, Burnaby, Canadá, 182 pp.
- Kathirithamby, J. 2009. Host-parasitoid associations in Strepsiptera. *Annual Review of Entomology* 54: 227-249.
- Kershaw, J.C. 1912. The ootheca of an Asilid. *Journal of Bombay Natural History Society* 21: 610-613.
- Klaschka, U. 2008. The infochemical effect – a new chapter in ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research* 15: 452-462.
- Klowden, M.J. 2007. Physiological systems in insects. Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, 688 pp.
- Koehl, M.A.R. 1996. Small-scale fluid dynamics of olfactory antennae. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 27(2-3): 127-141.
- Kopper, B.J., Klepzig, K.D., Raffa, K.F. 2004. Components of antagonism and mutualism in *Ips pini*-fungal interactions: relationship to a life history of colonizing highly stressed and dead trees. *Environmental Entomology* 33(1): 28-34.
- Kühne, M., Ihnen, D., Möller, G., Agthe, O. 2000. Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journal of Veterinary Medicine A. Physiology, Pathology and Clinical Medicine* 47(6): 379-384.
- Laforsch, C., Tollrian, R. 2000. A new preparation technique of daphnids for scanning electron microscopy using hexamethyldisilazane. *Archiv für Hydrobiologie* 149(4): 587-596.
- Lam, K., Babor, D., Babor, E.M., Moore, M., Gries, G. 2007. Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behavior of adult flies. *Animal Behaviour* 74: 81-92.
- Leal, W.S. 1998. Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. *Annual Review of Entomology* 43: 39-61 pp.
- Lemke, T., Stingl, U., Egert, M., Friederich, M.W., Brune, A. 2003. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6650-6658.
- Leroy, P.D., Sabri, A., Heuskin, S., Thonart, P., Lognay, G., Verheggen, F.J., Fancis, F., Brostaux, Y., Felton, G.W., Haubruge, E. 2011. Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies. *Nature Communications* DOI: 10.1038/ncomms1347, 7 pp.
- Lewis, W.J., Martin, W.R. 1990. Semiochemicals for use with parasitoids: status and future. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3067-3089.
- Linsley, E.G. 1960. Ethology of some bee-and-wasp killing robber flies of southeastern Arizona and western New Mexico (Diptera: Asilidae), en *University of California publications in entomology*, pp. 357-392. University of California Press, Berkeley, E.E.U.U., 392 pp.
- López, A.N., Álvarez Castillo, H.A., Carmona, D., Manetti, P.L., Vincini, A.M. 1994. Aspectos morfológicos y biológicos de *Cyclocephala signaticollis* Burm. (Coleoptera: Scarabaeidae). Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA – Estación Experimental Agropecuaria Balcarce Boletín Técnico 123: 18 pp.
- López Guerrero, Y., Moron, M. A. 1990. Estudio morfológico e histológico del aparato digestivo larvario de *Dynastes hyllus* Chev. (Coleoptera: Melolonthidae, Dynastinae). *Folia Entomológica Mexicana* 79: 65-83.
- Loudon, C. 1995. Insect morphology above the molecular level: biomechanics. *Annals of Entomological Society of America* 88(1): 1-4.
- Loudon, C. 2003. The biomechanical desing of an insect antenna as an odor capture device, en *Biochemistry and molecular biology: the biosynthesis and detection of pheromones and plant*

- volatiles*, Blomquist, G.J. y Vogt, R.G. (Eds.), pp 609-630. Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, 768 pp.
- Loudon, C., Davis, E.C. 2005. Divergence of streamlines approaching a pectinate insect antenna: consequences for chemoreception. *Journal of Chemical Ecology* 31(1): 1-13.
- Loudon, C., Koehl, M.A.R. 2000. Sniffing by a silkworm moth: wing fanning enhances air penetration through and pheromone interception by antennae. *The Journal of Experimental Biology* 203: 2977-2990.
- Ma, P.W.K., Ramaswamy, S.B. 2003. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing tissue, en *Biochemistry and molecular biology: the biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*, Blomquist, G.J. y Vogt, R.G. (Eds.), pp 19-52. Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, 768 pp.
- Ma, Z.S., Krings, A.W. 2009. Insect sensory systems inspired computing and communications. *Ad Hoc Networks* 7: 742-755.
- Madden, J.L. 1968. Behavioural responses of parasites to the symbiotic fungus associated with *Sirex noctilio* F. *Nature* 218: 189-190.
- Marden, J.H., Rollins, R.A. 1994. Assessment of energy reserves by damselflies engaged in aerial contests for mating territories. *Animal Behaviour* 48: 1023-1030.
- Marín-Loaiza, J.C., Céspedes, C.L. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotécnica Mexicana* 30(4): 327-351.
- Mathis, K.A., Philpott, S.M., Moreira, R.F. 2011. Parasite lost: chemical and visual cues used by *Pseudacteon* in search of *Azteca instabilis*. *Journal of Insect Behavior* 24: 186-199.
- Matthews, R.W., Matthews, J.R. 2010. Insect behavior. 2^{da} Edición. Springer Publishing, Dordrecht – Heidelberg – Londres – Nueva York, 522 pp.
- Mayo, I., Anderson, M., Burguete, J., Robles Chillida, E.M. 1987. Structure of superficial chemoreceptive sensilla on the third antennal segment of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 16(2): 131-141.
- Mayoral, L. 1999. Negocios apícolas: tendencias globales, capacidades y carencias en la empresarización del sector. Una perspectiva argentina. *Revista Electrónica de Administración* 5(2): 19.
- McAllister, J.C., Steelman, C.D., Carlton, C.E. 1995. Histomorphology of the larval and adult digestive system of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 68(2): 195-205.
- McAlpine, J.F. 1981. Morphology and Terminology – Adults, en *Manual of Nearctic Diptera* Volume 1, McAlpine, J.F. (Ed.), pp 9-63. Department of Agriculture Research Branch, Ottawa, Canadá, 674 pp.
- Menees J.H. 1958. The anatomy and histology of the larval alimentary canal of the European chafer, *Amphimallon majalis* Razoumowsky (Scarabaeidae). *Journal of the New York Entomological Society* 66(1/2): 75-86.
- Millas, P., Carrillo, R. 2008. Rol de los microorganismos en el proceso digestivo de las larvas de *Hylamorpha elegans* (Burm.) (Coleoptera: Scarabaeidae) alimentadas con suelo sin raíces, en *Libro de resúmenes del VII Congreso Argentino de Entomología*, Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
- Moran, N.A., Plague, G.R., Sandström, J.P., Wilcox, J.L. 2003. A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 100(2): 14543-14548.
- Morgan, E.D. 2004. Biosynthesis in insects. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra, 199 pp.
- Mori, K. 2010. Pheromones in chemical communication, en *The chemistry and biology of volatiles*, Herrmann, A. (Ed.), pp. 123-150. Wiley-InterScience Oxford, Inglaterra, 402 pp.
- Musso, J.J. 1978. Recherches sur le développement, la nutrition et l'écologie des Asilidae (Diptera-Brachycera). Tesis Doctoral, Faculté des Sciences et Technique de Saint-Jérôme, Université d'Aix-Marseille, Marsella, Francia, 312 pp.

- Musso, J.J. 1981. Morphology and development of the immature stages of some robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis* 7: 89–104.
- Musso, J.J. 1983. Nutritive and ecological requirements of robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis* 9(1/2): 35–50.
- Nicastro, D., Mezler, R.R., Hruschka, H., Smola, U. 1998. Evolution of small sense organs: sensilla on the larval antennae traced back to the origin of the Diptera. *Naturwissenschaften* 85: 501-505.
- Nout, M.J.R., Bartelt, R.J. 1998. Attraction of a flying nitidulid (*Carpophilus humeralis*) to volátiles produced by yeasts grown on sweet corn and a corn-based medium. *Journal of Chemical Ecology* 24(7): 1217-1239.
- Nussenbaum, A.L. 2007. Comportamiento de oviposición y estrategia de ovigenia en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 86 pp.
- Obonyo, M., Schulthees, F., Chimtawi, M., Mascarel, G., Ahuya, P.O., Le Ru, B., Van Den Berg, J., Silvain, J.F., Calatayud, P.A. 2011. Sensilla on antennae, ovipositor and tarsi of the larval parasitoid, *Cotesia sesamiae* (Cameron 1906) and *Cotesia flavipes* Cameron 1891 (Hymenoptera: Braconidae): a comparative scanning electron microscopy study. *Annales de la Société Entomologique de France* 47(1-2): 119-127
- Onagbola E.O., Fadamiro H.Y 2008. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Micron* 39: 526-535.
- O’Niell, K.M. 1992a. Temporal and spatial dynamics of predation in robber fly (*Efferia staminea*) population (Diptera: Asilidae). *Canadian Journal of Zoology* 70: 1546-1552.
- O’Niell, K.M. 1992b. Patch-specific foraging by the Robber Fly *Megaphorus willistoni* (Diptera: Asilidae). *Environmental Entomology* 21(6): 1333-1340.
- Orre, G.U.S., Wratten, S.D., Jonsson, M., Hale, R.J. 2010. Effects of an herbivore-induced plant volatile on arthropods from three trophic levels in brassicas. *Biological Control* 53: 62-67.
- Overgaard Nielsen, B., Funch, P., Toft, S. 1999. Self-injection of dipteran parasitoid into a spider. *Naturwissenschaften* 86: 530-532.
- Papaj, D.R. 2000. Ovary dynamics and host use. *Annual Review of Entomology* 45: 423-448.
- Peig, J., Green, A.J. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118: 1883-1891.
- Peig, J., Green, A.J. 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology* 24(6): 1323-1332.
- Pérez-Lachaud, G., Heraty, J.M., Carmichael, A., Lachaud, J.-P. 2006. Biology and behavior of *Kapala* (Hymenoptera: Eucharitidae) attacking *Ectatomma*, *Gnamptogenys*, and *Pachycondyla* (Formicidae: Ectatomminae and Ponerinae) in Chiapas, Mexico. *Annals of Entomological Society of America* 99(3): 567-576.
- Peterson, B.V. 1981. Phoridae, en *Manual of Nearctic Diptera* Volume 2, McAlpine, J.F. (Ed.), pp 689-712. Department of Agriculture Research Branch, Ottawa, Canadá, 674 pp.
- Pettersson, E.M., Hallberg, E., Birgersson, G. 2001. Evidence for the importance of odour-perception in the parasitoid *Rhopalicus tutela* (Walker) (Hym., Pteromalidae). *Journal of Applied Entomology* 125: 293-301.
- Pinto, J.D., Bologna, M.A., Bouseman, J.K. 1996. First-instar larvae, courtship and oviposition in *Eletica*: amending the definition of the Meloidae (Coleoptera: Tenebrionoidea). *Systematic Entomology* 21: 63-74.
- Plastow, S.J., St. Clair, J.J.H., Grant, J., Benton, T.G. 2007. How to put all your eggs in one basket: empirical patterns of offspring provisioning throughout a mother’s lifetime. *The American Naturalist* 170(4): 520-529.
- Plotnick, R.E., Dombos, S.Q., Chen, J. 2010. Information landscapes and sensory ecology of the Cambrian Radiation. *Paleobiology* 36(2): 303-317.

- Pochon, J., Tardieux, P. 1965. *Técnicas de análisis en microbiología del suelo*. Editorial T.E.I. (Técnica e Investigación), Burgos, España, 117 pp.
- Poddighe, S., Dekker, T., Scala, A., Angiov, A.M. 2010. Olfaction in the female sheep botfly. *Naturwissenschaften* 97: 827-835.
- Poinar, G.O.Jr. 2009. *Meloe dominicanus* n. sp. (Coleoptera: Meloidae) phoretic on the bee *Proplebia dominicana* (Hymenoptera: Apidae) in Dominican amber. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 111(1): 145-150.
- Ponnusamy, L., Xu, N., Nojima, S., Wesson, D. M., Schal, D., Apperson, C.S. 2008. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 105(27): 9262-9267.
- Potter, D.A. 1981. Seasonal emergence and flight of northern and southern masked chafers in relation to air and soil temperature and rainfall patterns. *Environmental Entomology* 10: 793-797.
- Potter, D.A. 1998. *Destructive turfgrass insects: biology, diagnosis and control*. Ann Arbor Press, Chelsea, Inglaterra, 336 pp.
- Quennedey, A. (1998) Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis, en *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Volume 11 A: Insecta*, Harrison F.W., Locke, M. (Eds.), pp 177-207. Wiley-Liss Publishing, Nueva York, E.E.U.U., 1296 pp.
- Quicke, D.L.J. 1997. *Parasitic wasps*. Springer Publishing, Londres, Inglaterra, 492 pp.
- Quinn, G.P., Keough, M.J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 537 pp.
- Rabinovich, M., Corley, J.C. 1997. An important new predator of honeybees. the robber fly *Mallophora ruficauda* Wiedemann (Diptera-Asilidae) in Argentina. *American Bee Journal* 137(4): 303-306.
- Rabinovich, M., Quiroga, R.M. 1995. Moscardón cazador de abejas. *Jornada de Sanidad Apícola*. Pigué, Buenos Aires, Argentina. 5 pp.
- Rahal, Y., Barry, P., Hawlitzky, N., Renou, M. 1996. Antennal olfactory sensilla of the parasitoid fly, *Pseudoperichaeta nigrolineata* Walker (Diptera: Tachinidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 25: 145-152.
- Raman, A., Wheatley, W., Popay, A. 2012. Endophytic fungus – Vascular plant – Insect interactions. *Environmental Entomology* 41(3): 433-447.
- Rebora, M., Piersanti, S., Almaas, T.J., Gaino, E. 2007. Hygroreceptors in the larva of *Libellula depressa* (Odonata: Libellulidae). *Journal of Insect Physiology* 53: 550-558.
- Redmond, C.T., Potter, D.A. 2010. Incidence of turf-damaging white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) and associated pathogens and parasitoids on Kentucky golf courses. *Environmental Entomology* 39(6): 1838-1847.
- Remedi de Gavotto, A.L. 1964. Ciclo biológico de *Cyclocephala signaticollis* Burm. (Coleoptera, Scarabaeidae) y caracteres específicos de su larva. *INTA, Revista de Investigaciones Agropecuarias Serie 5*, 1(10): 151-161.
- Reuter, O. M. 1913. *Lebensgewohnheiten und Instinkte der Insekten bis zum Erwachen der sozialen Instinkte*. Übersetzt von A. u. M. Buch. Friedländer & Sohn. 448 pp.
- Riba, J.M., Blas, M. 1995. Entomofauna asociada a *Trypodendron lineatum* (Olivier, 1975) (Coleoptera, scolytidae). *Orsis* 10: 105-122.
- Ribi, W.A., 1987. *Biological electron microscopy. A Handbook in biological electron microscopy*. MPI für Biologische Kybernetik, in-house published, 106 pp.
- Richards, A.G., Richards, P.A. 1979. The cuticular protuberances of insects. *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 8: 143-157.
- Riffell, J.A. 2012. Olfactory ecology and the processing of complex mixtures. *Current Opinion in Neurobiology* 22: 236-242.

- Rivera, F.N., González, E., Gómez, Z., López, N., Hernández – Rodríguez, C., Berkov, A., Zúñiga, G. 2009. Gut-associated yeast in bark beetles of genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 325-342.
- Roitberg, B.D., Sircom, J., Roitberg, C.A., van Alphen, J.J.M., Mangel, M. 1993. Life expectancy and reproduction. *Nature* 364: 108.
- Romani, R., Isidoro, N., Bin, F. 2010. Antennal structures used in communication by egg parasitoids, en *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma*, Consoli, F.L. et al. (Eds), pp 57-96, Volumen 9 de la serie *Progress in biological control*, Springer Publishing, Dordrecht – Heidelberg – Londres – Nueva York, 479 pp.
- Romero López, A.A., Arzuffi, R., Morón, M.A. 2005. Feromonas y atrayentes sexuales de coleópteros Melolonthidae de importancia agrícola. *Folia Entomologica Mexicana* 44(2): 233-245.
- Rosner, B. 1995. Fundamentals of biostatistics. 4^{ta} Edición. Duxbury Press, Belmont, E.E.U.U., 682 pp.
- Ross, K.T.A., Anderson, M. 1987. Morphology of the antennal sensilla of the cabbage root fly, *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 16(5/6): 331-342.
- Roux, O., Van Baaren, J., Gers, C., Arvanitakis, L., Legal, L. 2005. Antennal structure and oviposition behaviour of *Plutella xylostella* Specialist Parasitoid: *Cotesia plutellae*. *Microscopy Research and Technique* 68: 36-44.
- Rutledge, C.E. 1996. A survey of identified kairomones and synomones used by insect parasitoids to locate and accept their hosts. *Chemoecology* 7: 121-131.
- Ruiz, F. 1925. Voracidad de los Asílidos (Dípteros). *Revista Chilena de Historia Natural* 29: 220-224.
- Ruther, J., Steidle, J.L.M. 2000. Mites as matchmakers: semiochemicals from host-associated mites attract both sexes of the parasitoid *Lariophagus distinguendus*. *Journal of Chemical Ecology* 26(5): 1205-1217.
- Ruzicka, Z., Zemek, R. 2008. Deterrent effects of larval tracks on conspecific larvae in *Cycloneda limbifer*. *BioControl* 53: 763-771
- Ryan, M.F. 2002. Insect Chemoreception: Fundamental and Applied. Kluwer Academic Publishers, Nueva York - Boston - Dordrecht - Londres - Moscú, 349 pp.
- Salvadori, J.R. 1997. Manejo de corós em cereais de inverno. *EMBRAPA* 3: 1-8.
- Sanchez Colin, M.deJ. 2004. Microbiología de suelos: técnicas, métodos y medio de cultivo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 52 pp.
- Sabelis, M.W., Van Baalen, M., Pels, B., Egas, M., Janssen, A. 2002. Evolution of exploitation and defense in tritrophic interactions, en *Adaptative dynamics of infectious diseases: in pursuit of virulence management*, Dieckmann, U., et al. (Eds.), pp 297-321. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 552 pp.
- Sasaki, T., Ishikawa, H. 1995. Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* 41(1): 41-46.
- Sato, K., Touhara, K. 2009. Insect olfaction: receptors, signal, transduction, and behavior, en *Chemosensory systems in mammals, fishes, and insects*, Meyerhof, W. y Korsching, S. (Eds.), pp 129-138, Volumen 47 de la serie *Results and Problems in Cell Differentiation*, Richter, D. y Tiedge, H. (Eds.), Springer Publishing, Nueva York, E.E.U.U., 261 pp.
- Schneider, D. 1964. Insect antennae. *Annual Reviews of Entomology* 9: 103-122.
- Schneider, R.W.S., Lanzen, J., Moore, P.A. 1998. Boundary-layer effect on chemical signal movement near the antennae of the sphinx moth, *Manduca sexta*: temporal filters for olfaction. *Journal of Comparative Physiology A* 182: 287-298.
- Setzu, M.D., Poddighe, S., Angioy, A.M. 2011. Sensilla on the antennal funiculus of the blow fly, *Protophormia terraenovae* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* 42: 471-477.

- Six, D.L. 2003. Bark beetle – fungus symbioses, en *Insect symbiosis*, Bourtzis, K. y Miller, T.A. (Eds.), pp 97 - 114. CRC Press. Boca Raton - Londres - Nueva York - Washington D.C., 368 pp.
- Slifer, E.H. 1970. The structure of arthropod chemoreceptors. *Annual Review of Entomology* 15: 121-142.
- Slifer, E.H., Sekhon, S.S. 1964. Fine structure of the sense organs on the antennal flagellum of a flesh fly, *Sarcophaga argyrostoma* R.D. (Diptera, Sarcophagidae). *Journal of Morphology* 114: 185-208.
- Smallengange, R.C., Kelling, F.J., Den Otter, C.J. 2008. Types and number of sensilla on antennae and maxillary palps of small and large houseflies, *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). *Microscopy Research and Technique* 71: 880-886.
- Smitley, D.R. 1996. Incidence of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) and other scarab larvae in nursery fields. *Journal of Economic Entomology* 89(5): 1262-1266.
- Snodgrass RE updated by Schouest L (1997) Principles of insect morphology. Book online. <http://dl.mahmoudvand.ir/pdf/booken/Snodgras-Principles%20of%20Insect%20Morphology.pdf>. Consultado última vez 21 de Agosto de 2013.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1969. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research. 1^{ra} Edición, : W. H. Freeman Publisher, Nueva York, E.E.U.U., 831 pp.
- Somashekar, K., Krishna, M.S., Hehde, S.N., Jayaramu, S.C. 2011. Effects of age on female reproductive success in *Drosophila bipectinata*. *Journal of Insect Science* 11:132 available online: insectscience.org/11.132
- Stamp, N.E., Bowers, M.D. 1990. Variation in food quality and temperature constrain foraging of gregarious caterpillars. *Ecology* 71(3): 1031-1039.
- Steidle, J.L.M., Van Loon, J.J.A. 2003. Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 108: 133–148.
- Steiner, S., Erdmann, D., Steidle, J.L.M., Ruther, J. 2007. Host hábitat assessment by a parasitoid using fungal volátiles. *Frontiers in Zoology* 4(3): 10 pp.
- Stireman III, J.O. 2002. Host location and selection cues in generalist tachinid parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103: 23-34.
- Stireman III, J.O., O'Hara, J.E., Monty Wood, D. 2006. Tachinidae: evolution, behavior, and ecology. *Annual Review of Entomology* 51: 525-555.
- Stocker, R.F. 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell & Tissue Research* 275: 3-26.
- Stocker, R.F. 2001. *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microscopy Research and Technique* 55: 284-296.
- Stowe, M.K., Turlings, T.C.J., Loughrin, J.H., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H. 1995. The chemistry of eavesdropping, alarm and deceit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 92: 23-28.
- Su, C.Y., Menuz, K., Carlson, J.R. 2009. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell* 139: 45-59.
- Sukontanson, K., Sukontason, K.L., Paingjai, S., Boonchu, N., Chaiwong, T., Ngern-klun, R., Sripakdee, D., Vogtsberger, R.C., Olson, J.K. 2004. Antennal sensilla of some forensically important flies in families Calliphoridae, Sarcophagidae and Muscidae. *Micron* 35: 671-679.
- Sukontanson, K., Methanitkorn, R., Chaiwong, T., Kurahashi, H., Vogtsberger, R.C., Sukontason, K.L. 2007. Sensilla of the antenna and palp of *Hydrotaea chalcogaster* (Diptera: Muscidae). *Micron* 38: 218-223.
- Sukontason, K., Methanitkorn, R., Kurahashi, H., Vogtsberger, R.C., Sukontason, K.L. 2008. External morphology of *Chrysomya pinguis* (Walker) (Diptera: Calliphoridae) revealed by scanning electron microscopy. *Micron* 39: 190-197.

- Sullivan, B.T., Berisford, C.W. 2004. Semiochemicals from fungal associates of bark beetle may mediate host location behavior or parasitoids. *Journal of Chemical Ecology* 30(4): 703-717.
- Szpila, K., Pape, T., Rusinek, A. 2008. Morphology of the first instar of *Calliphora vicina*, *Phormia regina* and *Lucilia illustris* (Diptera, Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology* 22: 16-25.
- Thibout, E., Guillot, J.F., Auger, J. 1993. Microorganisms are involved in the production of volatile kairomones affecting the host seeking behavior of *Diadromus pulchellus*, a parasitoid of *Acrolepiopsis assectella*. *Physiological Entomology* 18: 176-182.
- Tillman, J.A., Seybold, S.J., Jurenka, R.A., Blomquist, G.J. 1999. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 481-514.
- Tittiger, C., Keeling, C.I., Blomquist, G.J. 2005. Some insights into the remarkable metabolism of the bark beetle midgut, en *Chemical ecology and phytochemistry of forest ecosystems*, Romeo, J. (Ed.), pp 57-78, Volumen 39 de la serie *Recent Advances in Phytochemistry*, Proceedings of Phytochemical Society of North America, Elsevier Science Publishing, Toronto, Canadá, 318 pp.
- Thompson, S.N., Simpson, S.J. 2003. Nutrition, en *Encyclopedia of insects*, Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.), pp 807-813. Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, 1266 pp.
- Torrens, J., Heraty, J.M., Fidalgo, P. 2007. Biology and description of a new species of *Laurella* Heraty (Hymenoptera: Eucharitidae) from Argentina. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 109:45-51.
- Trautwein, M.D., Weigmann, B.M., Yeates, D.K. 2011. Overcoming the effects of rogue taxa: evolutionary relationships of the bee flies. *PLOS Currents Tree Of Life* 3: RRN1233.
- Tricca, G., Trujillo-Cenóz, O. 1980. The sexual behavior of the robberfly *Mallophora ruficauda* Wied. (Asilidae, Asilinae) in normal and experimental conditions. *Physiology & Behavior* 25: 627-632.
- Tsubaki, Y., Shiotsu, Y. 1982. Group feeding as a strategy for exploiting food resources in the burnet moth *Pryeria sinica*. *Oecologia* 55: 12-20.
- Turlings, T.C.J., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Röse, U.S.R., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 92: 4169-4174.
- Turlings, T.C.J., Wäckers, F. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants, en *Advances in Insect Chemical Ecology*, Carde, R.T. y Millar, J.G. (Eds.), pp 21-75.. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 352 pp.
- Turner, M.G. 2005. Landscape ecology: what is the state of the science? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 319-344.
- Van Alphen J.J.M., Vet L.M.E. 1986. An evolutionary approach to host finding and selection, en *Insect parasitoids. 13th Symposium of Royal Entomological Society of London*, Waage, J. y Greathead, D. (Eds.), pp 23-61. Academic Press, Londres, Inglaterra, 389 pp.
- Van Baaren, J., Boivin, G., Bourdais, D., Roux, O. 2007. Antennal sensilla of hymenoptera parasitic wasp: variations linked to host exploitation behavior, en *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* Volume 1, Méndez-Vilas, A. y Díaz, J. (Eds.), pp. 345-352. FORMATEX, 468 pp.
- Van Helsdingen, P.J. 2011. Spiders in a hostile world (Arachnoidea, Araneae). *Arachnologische Mitteilungen* 40: 55-64.
- Vegliante, F. 2005. Larval head anatomy of *Heterogymis penella* (Zygaenoidea, Heterogynidae), and a general discussion of caterpillar head structure (Insecta, Lepidoptera). *Acta Zoologica (Stockholm)* 86: 167-194.
- Vet, L.E.M. 1999. From chemical to population infochemical use in an evolutionary context. *Journal of Chemical Ecology* 25(1): 31-49.
- Vet, L.E.M., Dicke, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37: 141-172.
- Vet, L.E.M., Hemerik, L., Visser, M.E., Wäckers, F.E. 2002. Flexibility in host-search and patch-use strategies of insect parasitoids, en *The Behavioural Ecology of Parasites*, Lewis, E.E., et al. (Eds.), 39-64 pp. CAB International, Nueva York, E.E.U.U., 358pp.

- Vet, L.E.M., Lewis, W.J., Carde, R.T. 1995. Parasitoid foraging and learning, *Chemical Ecology of Insect 2*, Carde, R.T. y Bell, W.J. (Eds.), pp 65-101. Springer Publishing, Nueva York, E.E.U.U., 434 pp.
- Vet, L.E.M., Wäckers, F.L., Dicke, M. 1991. How to hunt for hiding host: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology* 41: 202-213.
- Villani, M.G., Wright, R.J. 1990. Environmental influences on soil macroarthropod behavior in agricultural system. *Annual Review of Entomology* 35: 249-269 pp.
- Vinson, S.B. 1984. How parasitoids locate their hosts: a case of insect espionage, en *Insect Communication*, Lewis, T. (Ed.), pp 325–348. Academic Press, Londres, Inglaterra, 414 pp.
- Vishniac, H.S., Johnson, D.T. 1990. Development of yeast flora in adult Green June Beetle (*Cotinis nitida*, Scarabaeidae). *Mycologia* 82(4): 471-479.
- Wajnberg, E., Bernhard, P., Hamelin, F., Boivin, G. 2006. Optimal patch time allocation for time-limited foragers. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60:1-10.
- Wang, X.Y., Yang, Z.Q., Gould, J.R. 2010. Sensilla on the antennae, legs and ovipositor of *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the Emerald Ash Borer *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). *Microscopy Research and Technique* 73: 560-571.
- Wang, Q.K., Zhang, M., Li, K., Zhang, D. 2012. Olfactory sensilla on antennae and maxillary palps of *Fannia hirticeps* (Stein, 1892) (Diptera: Fanniidae). *Microscopy Research and Technique* 75: 1313-1320.
- Wasserman, S.L., Itagaki, H. 2003. The olfactory responses of the antenna and maxillary palp of the fleshfly, *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae), and their sensitivity to blockage of nitric oxide synthase. *Journal of Insect Physiology* 49: 271-280.
- Wertheim, B. 2005. Evolutionary ecology of communication signals that induce aggregative behaviour. *Oikos* 109: 117-124.
- Wertheim, B., Van Baalen, E.A., Dicke, M., Vet, L.E.M. 2005. Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: an evolutionary ecological perspective. *Annual Review of Entomology* 50: 321-346.
- Wertheim, B., Vet, L.E.M., Dicke, M. 2003. Increased risk of parasitism as ecological costs of using aggregation pheromones: laboratory and field study of *Drosophila* – *Leptopilina* interaction. *Oikos* 100: 269-282.
- Wertheim I. 1981. 40 años en el mundo maravilloso de las abejas. Dist. G.D.A., Buenos Aires, 238 pp.
- Wigglesworth, V.B. 1942. The principles of insect physiology. 2^{da} Edición, Methuen & Co. LTD, Londres, Inglaterra, 434 pp.
- Wiman, N.G., Jones, V.P. 2013. Influence of oviposition strategy of *Nemorilla pyste* and *Nilea erecta* (Diptera: Tachinidae) on parasitoid fertility and host mortality. *Biological Control* 64: 195-202.
- Wiskerke, J.S.C., Dicke, M., Vet, L.E.M. 1993a. *Drosophila* parasitoid solves foraging problem through infochemical detour: the role adult fly pheromone. *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society Amsterdam* 4: 79-84.
- Wiskerke, J.S.C., Dicke, M., Vet, L.E.M. 1993b. Larval parasitoid uses aggregation pheromone of adult hosts in foraging behavior: a solution to the reliability-detectability problem. *Oecologia* 93: 145-148.
- Wood, D.M. 1981. Tachinidae, en *Manual of Nearctic Diptera* Volume 2, McAlpine, J.F. (Ed.), pp 1193-1270. Department of Agriculture Research Branch, Ottawa, Canadá, 674 pp.
- Wood, G.C. 1981. Asilidae, en *Manual of Nearctic Diptera* Volume 1, McAlpine, J.F. (Ed.), pp 549-574. Department of Agriculture Research Branch, Ottawa, Canadá, 674 pp.
- Woolfolk, S.W., Cohen, A.C., Inglis, G.D. 2004. Morphology of the alimentary canal of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults in relation to microbial symbionts. *Annals of the Entomological Society of America* 97(4): 796-808.

- Wright, E.J., Müller, P. 1989. Laboratory studies of host finding, acceptance and suitability of the dung-breeding fly *Haematobia thirouxi* potans (Dipt.: Muscidae) by *Aleochara* sp. (Col.: Staphylinidae). *Entomophaga* 34(2): 61-71.
- Wyatt, T.D. 2003. Pheromones and animal behavior: Communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 391 pp.
- Xi, Y.Q., Yin, X.M., Zhu, C.D., Guerrieri, E., Zhang, Y.Z. 2011. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of *Ooencyrtus phongi* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Microscopy Research and Technique* 74: 936-945.
- Yeates, D.K. 2002. Relationships of extant lower Brachycera (Diptera): a quantitative synthesis of morphological characters. *Zoologica Scripta* 31(1): 105-121.
- Yeates, D.K., Greathead, D. 1997. The evolutionary pattern of host use in the Bombyliidae (Diptera): a diverse family parasitoid flies. *Biological Journal of the Linnean Society* 60: 149-185.
- Yong, T.H., Pitcher, S., Gardner, J., Hoffmann, M.P. 2007. Odor specificity testing in the assessment of efficacy and non-target risk for *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Science and Technology* 17: 135-153.
- Zacharuk, R.Y. 1980. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annual Review of Entomology* 25: 27-47.
- Zacharuk, R.Y., Shields, V.D. 1991. Sensilla of immature insects. *Annual Reviews of Entomology* 36: 331-354.
- Zar, J.H. 2010. Biostatistical Analysis. 5^{ta} Edición, Pearson Prentice Hall International, Nueva Jersey, E.E.U.U., 663 pp.
- Zhang, D., Wang, Q.K., Hu, D.F., Li, K. 2012. Sensilla on the antennal funiculus of the horse stomach bot fly, *Gasterophilus nigricornis*. *Medical and Veterinary Entomology* 26: 314-322.
- Zhang, D., Wang, Q.K., Liu, X.H., Li, K. 2013a. Sensilla on antenna and maxillary palp of predaceous fly, *Lispe neimongola* Tian et Ma (Diptera: Muscidae). *Micron* 49: 33-39.
- Zhang, D., Wang, Q.K., Yang, Y.Z., Chen, Y.O., Li, K. 2013b. Sensory organs of the antenna of two *Fannia* species (Diptera: Fanniidae). *Parasitological Research* 112(6): 2177-2185.
- Zhang, H., Jackson, T.A. 2008. Autochthonous bacterial flora indicated by PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragments from the alimentary tract of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Applied Microbiology* 105: 1277-1285.
- Zhao, Y.X., Kang, L. 2002. Role of plant volatiles in host plant location of the leafminer, *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae). *Physiological Entomology* 27: 103-111.
- Zheng, W., Zhao, Y., Zhang, H. 2012. Morphology and ultrastructure of the hindgut fermentation chamber of melolonthine beetle *Holotrichia parallela* (Coleoptera: Scarabaeidae) during larval development. *Micron* 43: 638-642.
- Zhou, H., Wu, W.J., Zhang, Z.F., Zhang, Y. 2011. Antennal sensilla of *Apanteles cypris* Nixon (Hymenoptera: Braconidae), a larval endoparasitoid of *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee (Lepidoptera: Pyralidae). *Microscopy Research and Technique* 74: 1199-1208.
- Zhou, H., Wu, W.J., Niu, L.M., Fu, Y.G. 2013. Antennal sensilla of female *Encarsia guadeloupae* Viggiani (Hymenoptera: Aphelidae), a nymphal parasitoid of the spiraling whitefly *Aleurodicus dispersus* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Micron* 44: 365-372.
- Zuk, M., Kolluru, G.R., 1998. Exploitation of sexual signals by predators and parasitoids. *The Quarterly Review of Biology* 73(4): 415-438.