

Tesis Doctoral

Fisiología y ecología del comportamiento del sistema hospedador-parasitoide: *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) - *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Zermoglio, Paula Florencia

2018

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Zermoglio, Paula Florencia. (2018). Fisiología y ecología del comportamiento del sistema hospedador-parasitoide: *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) - *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6593_Zermoglio

Cita tipo Chicago:

Zermoglio, Paula Florencia. "Fisiología y ecología del comportamiento del sistema hospedador-parasitoide: *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) - *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6593_Zermoglio



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

**Fisiología y ecología del comportamiento del sistema hospedador-
parasitoide: *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) –
Mallophora ruficauda (Diptera: Asilidae)**

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

Paula Florencia Zermoglio

Directores de tesis: Dra. Marcela K. Castelo

Dr. Claudio R. Lazzari

Consejero de estudios: Dr. Martín J. Ramírez

Lugar de trabajo:

- Laboratorio de Entomología Experimental, Grupo de Investigación en Ecofisiología de Parasitoides y otros Insectos (GIEP) - Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires - CONICET, Argentina.

- Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI) - Faculté des Sciences et Techniques, Université de Tours - UMR 7261, CNRS

Buenos Aires, 2018

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV
IRBI – UMR 7261 CNRS

THÈSE présentée par :

Paula F. ZERMOGLIO

soutenue le : 17 Décembre 2018

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**Physiologie et écologie du comportement du système
hôte-parasitoïde : *Cyclocephala signaticollis*
(Coleoptera : Scarabaeidae– *Mallophora ruficauda*
(Diptera : Asilidae)**

THÈSE dirigée par :

Mme. CASTELO Marcela
M. LAZZARI Claudio

Directeur de Recherche, Univ. de Buenos Aires
Professeur, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme. D'ETTORRE Patrizia
M. SEGURA Diego

Professeur, Université Paris XIII
Directeur de Recherche, INTA, Argentine

JURY :

Mme. D'ETTORRE Patrizia
M. SEGURA Diego
Mme. BASILIO Alicia
Mme. FERNANDEZ Patricia
M. LOPEZ-VAAMONDE Carlos
Mme. CASTELO Marcela
M. LAZZARI Claudio

Professeur, Université Paris XIII
Directeur de Recherche, INTA, Argentine
Professeur, Univ. de Buenos Aires, Argentine
Chargée de Recherche, INTA, Argentine
Chargé de Recherche, INRA Orléans
Directeur de Recherche, Univ. de Buenos Aires
Professeur, Université de Tours

RESUMEN

Fisiología y ecología del comportamiento del sistema hospedador-parasitoide: *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) – *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Autor: Lic. Paula F. Zermoglio

Directores: Dra. Marcela K. Castelo, Dr. Claudio R. Lazzari

Los parasitoides son organismos que se desarrollan sobre o dentro de otro único organismo, el hospedador, alimentándose a expensas de su cuerpo, y matándolo como resultado directo o indirecto de su desarrollo. Por lo tanto, el encuentro y elección del hospedador representan etapas cruciales en la determinación del *fitness* del parasitoide. *Mallophora ruficauda* (Diptera, Asilidae), en su etapa larval es un ectoparasitoide solitario de larvas de coleópteros Scarabaeidae, que ataca preferentemente al tercer estadio de la especie *Cyclocephala signaticollis*. La búsqueda del hospedador es compartida entre la hembra adulta, quien ovipone en el hábitat de los hospedadores adultos, y el segundo estadio larval, quien busca activamente al hospedador dentro del suelo utilizando claves químicas. Según la literatura, las larvas no se alimentan hasta que se aferran al hospedador, sobre el cual permanecen luego hasta completar su desarrollo. Las primeras larvas parasitoides nacen dos meses antes de que haya hospedadores del estadio preferido, por lo que deben esperar al hospedador en el ambiente. A pesar de que sólo una larva se desarrolla por hospedador, el superparasitismo es frecuente. En esta Tesis se estudió el uso de recursos nutricionales en las larvas parasitoides y aspectos de los hospedadores adultos que podrían influir en la detección del hábitat por parte del parasitoide adulto. La utilización de recursos por parte de larva parasitoide se evaluó en términos del uso de recursos del suelo, la inversión de reservas energéticas de las hembras y la variación temporal de dichas reservas, y la elección de hospedadores de distinta calidad. Se encontró que en sustrato natural, con humedad y a temperaturas relativamente elevadas, la proporción de larvas que mudan al segundo estadio y su supervivencia son mayores que en otras condiciones. Además, las larvas son capaces de mudar al segundo estadio sin alimentarse. Las hembras ponen igual número de huevos y asignan cantidades similares de nutrientes a principio y final de la temporada reproductiva, y las larvas tempranas y tardías utilizan los nutrientes de manera similar. En cuanto a la calidad de los hospedadores, se encontró que la ocurrencia de mono y superparasitismo es independiente del peso, tamaño o reservas energéticas del hospedador. En los hospedadores adultos se evaluó el comportamiento térmico, como posible inductor del agrupamiento de hospedadores observado en el campo, y que podría ser explotado por el parasitoide adulto en la elección de sitios de oviposición. Se encontró que los hospedadores adultos presentan ciclos diarios de endotermia, concordantes con sus ciclos de actividad, que no están controlados por el sistema circadiano, y que varían en intensidad de acuerdo a la temperatura ambiente. La endotermia no estaría relacionada con el reconocimiento entre sexos, y se espera que no represente un factor importante en el agrupamiento de los hospedadores. Esta Tesis presenta resultados que contribuyen al conocimiento del sistema *M. ruficauda* - *C. signaticollis* en particular, y al conocimiento general de la fisiología y el comportamiento de los sistemas conformados por parasitoides dípteros y sus hospedadores.

PALABRAS CLAVE: parasitoides, recursos, nutrientes, calidad del hospedador, endotermia.

ABSTRACT

Physiology and behavioural ecology of the host-parasitoid system: *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) – *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Author: Lic. Paula F. Zermoglio

Supervisors: Dr. Marcela K. Castelo, Dr. Claudio R. Lazzari

Parasitoids are organisms which develop on or inside another single organism, the host, feeding on it, and killing it as a direct or indirect result of its development. Therefore, the encounter and selection of the host represent critical steps in determining the fitness of the parasitoid. *Mallophora ruficauda* (Diptera, Asilidae), in its larval stages is a solitary ectoparasitoid of scarab beetles larvae, who preferably attacks the third instar of *Cyclocephala signaticollis*. Host seeking behaviour is shared between the adult female, who lays eggs in the habitat of the adult host, and the second larval instar, who actively seeks for the host within the soil by means of chemical cues. According to the literature, the larvae do not feed until they have attacked the host, on which they then remain until they complete their development. The first parasitoid larvae are born two months before the preferred host instar is available, and therefore must wait for the host in the environment. Although only one larvae per host can complete its development, superparasitism is frequent. In this Thesis we studied the use of nutritional resources by the parasitoid larvae and aspects of the adult hosts that could influence habitat detection by the adult parasitoid. The utilization of resources by the parasitoid larvae was evaluated in terms of the use of soil resources, the energy reserves investment of the female and the temporal variation of those reserves, and the selection of hosts of different quality. We found that in natural substrate, provided with humidity and at relatively high temperature, the proportion of larvae that moult to the second instar and their survival rate are higher than under other conditions. Also, larvae are capable of moulting to the second instar without feeding. Females oviposit similar number of eggs and allocate similar quantities of nutrient reserves at the beginning and at the end of the reproductive season, and early and late larvae use nutrients in a similar fashion. Regarding the quality of the hosts, we found that events of mono and superparasitism are independent from the weight, size or energy reserves of the hosts. In the adult hosts we examined the thermal behaviour, as a possible inducer of the host gathering observed in the field, and which could be exploited by the adult parasitoid in its selection for oviposition sites. We found that adult hosts present daily endothermy cycles, in parallel with their activity cycle, which are not controlled by the circadian system, and which vary in intensity depending on the ambient temperature. Endothermy is not related with sex recognition, and it is expected that it would not represent an important factor in the gathering of the hosts. This Thesis presents results that contribute to the knowledge of the *M. ruficauda* - *C. signaticollis* system in particular, and to the general knowledge concerning physiology and behaviour of systems conformed by dipteran parasitoids and their hosts.

KEY WORDS: parasitoids, resources, nutrients, host quality, endothermy.

RÉSUMÉ

Physiologie et écologie comportementale du système hôte-parasitoïde: *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae) – *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Auteur: Lic. Paula F. Zermoglio

Directeurs: Dr. Marcela K. Castelo, Dr. Claudio R. Lazzari

Les parasitoïdes sont des organismes qui se développent sur ou à l'intérieur d'un seul autre organisme, de lequel ils se nourrissent, et qu'ils tuent en conséquence directe ou indirecte de leur développement. Par suite, la rencontre et la sélection de l'hôte représentent des étapes critiques dans la détermination de la *fitness* du parasitoïde. *Mallophora ruficauda* (Diptera, Asilidae), à ses stades larvaires est un parasitoïde solitaire des larves de scarabées, qui attaque de préférence le troisième stade larvaire de *Cyclocephala signaticollis*. Le comportement de recherche d'hôte est partagé entre la femelle adulte, qui pond des œufs dans l'habitat de l'hôte adulte, tandis que le deuxième stade larvaire cherche activement l'hôte dans le sol en utilisant des signaux chimiques. Selon la littérature, les larves ne se nourrissent pas avant d'avoir attaqué un hôte, sur lequel elles restent attachées jusqu'à la fin de leur développement. Les premières larves parasitoïdes naissent deux mois avant que le stade préféré soit disponible, et doivent donc attendre que ceci devienne disponible dans l'environnement. Bien qu'une seule larve par hôte puisse compléter son développement, le superparasitisme est fréquent. Dans cette Thèse, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'utilisation des ressources nutritionnelles par les larves de parasitoïdes et des aspects de la biologie des hôtes adultes, lesquels pourraient influencer la détection des sites adéquats pour l'oviposition par le parasitoïde adulte. L'utilisation des ressources par les larves de parasitoïdes a été évaluée en termes d'utilisation des nutriments présents dans le sol, d'investissement de la femelle et la variation temporelle des réserves allouées par celles-ci, ainsi que de la sélection d'hôtes par rapport à sa probable qualité. Nous avons observé que dans un substrat naturel, pourvu d'humidité et à des températures relativement plus élevée, la proportion de larves qui muent au deuxième stade, ainsi que leur taux de survie sont plus élevés que dans des conditions différentes. De plus, les larves sont capables de muer au deuxième stade sans se nourrir. Les femelles pondent un nombre similaire d'œufs et allouent des quantités similaires de nutriments au début et à la fin de la saison de reproduction. Les larves au début et à la fin de la saison utilisent les nutriments de la même manière. Concernant la qualité des hôtes, il a été observé que les événements de mono et superparasitisme sont indépendants du poids, de la taille ou des réserves énergétiques des hôtes. Chez les adultes de l'espèce hôte, nous avons analysé le comportement thermique des individus, en tant que facteur possible pour le rassemblement d'hôtes, qui est observable dans la nature, et qui pourrait être exploité par le parasitoïde adulte dans la sélection d'un site de ponte. Les résultats ont montré que les hôtes adultes présentent des cycles endothermiques quotidiens, parallèlement à leur cycle d'activité, que ces cycles ne sont pas contrôlés par le système circadien et que leur amplitude varie en fonction de la température ambiante. L'endothermie n'est pas liée à la reconnaissance du sexe et on s'attend à qu'elle ne représente pas un facteur important dans le rassemblement des hôtes. Cette Thèse présente des résultats qui contribuent à une meilleure connaissance du système *M. ruficauda* - *C. signaticollis* en particulier, et en général de la physiologie et le comportement des systèmes conformés par des parasitoïdes diptères et ses hôtes.

MOTS CLÉS: parasitoïdes, ressources, nutriments, qualité de l'hôte, endothermie.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis:

Marcela Castelo y Claudio Lazzari,

por abrirme las puertas de sus laboratorios, por formarme profesionalmente e incentivar mi pensamiento crítico. Por la confianza que depositaron en mí y en este proyecto. Por toda la dedicación y el cariño de estos años, por ayudarme a crecer como persona. Sin su constante apoyo la realización de esta tesis no hubiera sido posible.
Marce, Claudio, no tengo palabras para agradecerles.

Y a

José Crespo,

por todo el apoyo durante estos años, por estar siempre, firme, y con la palabra de amigo que, aunque a veces uno no quiera, necesita escuchar. Por los consejos, la ayuda constante, la compañía, por la visión amplia pero enfocada. Gracias José!

También deseo agradecer a las siguientes personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo:

- A John Wiczorek, mi esposo. Por acompañarme en todo momento durante estos años. Por el amor y el cuidado diarios y el apoyo incondicional. Por compartir la vida conmigo.
- A mis compañeros de laboratorio. A Gustavo, por la compañía, la ayuda en el campo, los mates y las charlas. - A Gustavo y a Juan por la ayuda en la cría de los insectos mientras estaba en Francia y las canciones de los viernes. A Juan, Eugenia, Hernán y Sofía, quienes hicieron muy amenas las tantas horas compartidas. A Roberto Fasmimi, que nos acompañó incondicionalmente durante los fines de semana de trabajo.
- A mis padres, Betina y Amadeo, por su apoyo, sus consejos y su amor incondicional. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Gracias.
- A mis hermanos, Andrés, Pato y Leo, por su apoyo y amor incondicionales, y a mis sobrinos, Leíto y Barby, que aguantaron una tía ausente durante tanto tiempo.
- A mi hermana del alma, Xime, por estar siempre, siempre.
- A P.T. Sparkle, A. Jack y R. Dash, por compartir tantos momentos, cerca ó a la distancia, por las charlas enriquecedoras y el incentivo a continuar siempre.
- A Fernando (Mordi) Guerrieri. Por la coordinación del Proyecto IRSES-IBIAL, que hizo posible mis estadías en Francia. Por la compañía durante mis estadías en Francia, las charlas y el café.
- A Julián Mensch por la ayuda con los insumos y la medición de nutrientes, los mates y las discusiones.
- Al Dr. Esteban Hasson y al Dr. Nicolás Frankel por permitirme utilizar sus espacios de laboratorio para desarrollar experimentos. Al los integrantes del laboratorio de Evolución, DEGE, por facilitarme material de laboratorio y por la buena onda. A la Dra. María Josefina Carlucci, del

laboratorio de Virología, FCEN-UBA, por permitirme utilizar el espectrofotómetro para mis experimentos.

- A mi consejero de estudios, Dr. Martín Ramírez.
- A los miembros del jurado que evaluó esta tesis: Prof. Dra. Parizia D’Ettorre, Dr. Diego Segura, Dr. Carlos López Vaamonde, Dra. Patricia Fernández y Dra. Alicia Basilio.
 - Al Departamento de Ecología, Genética y Evolución (DEGE-FCEyN-UBA) y al Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (IEGEB-CONICET), por brindarme lugar de trabajo para realizar parte de la tesis. A las secretarías del DEGE, Graciela y Mabel, por su amabilidad y disposición para solucionar problemas del modo más expeditivo.
 - Al Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte (IRBI), por brindarme lugar de trabajo para realizar parte de la tesis y acogerme durante tantos meses.
 - A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad de Buenos Aires. A la Subsecretaría de Relaciones Internacionales de la FCEyN, UBA. A Guido por su ayuda con los trámites de la cotutela. A los miembros de la Secretaría de Posgrado de la FCEyN, UBA.
 - A la Université de Tours. A la École Doctoral Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV). Al Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).
- Al CONICET por haberme otorgado la Beca de Postgrado para poder llevar adelante esta Tesis y por los subsidios PIP 2014-2016 N° 11220130100368CO y PIP 2009-2011 N° 11220080101597 a Marcela Castelo que facilitaron parcialmente su financiamiento.
- A la Unión Europea, Proyecto: “Integrative Biology of Insects Affecting Human Life (IBIAL)”, del 2012 People Programme, Marie Curie Actions, International Research Staff Exchange Scheme (IRSES), FP7-PEOPLE-2012-IRSES N° 319015, que facilitó el financiamiento para llevar a cabo la cotutela en Francia.
- A la Universidad de Buenos Aires por el subsidio UBACyT 2012 N° 20020110100125 a Marcela Castelo que facilitó el financiamiento para llevar a cabo este trabajo.
- A la Université de Tours por el subsidio de ayuda económica a estudiantes de doctorado “Aide aux doctorants internationaux 2016”, que facilitó parcialmente el financiamiento para realizar parte de la tesis en Francia.
- A la Familia grande, mis tías y primos, y a Granpi, que siempre están, aunque sea a la distancia.
- A los apicultores Jorge Lucía, Luis Arenas, Javier Guillem y Jorge Sanz, a los propietarios de la Quinta Zanotti en Moreno, a Fernando y Fernanda de la Estancia “La Fernanda”, al Servicio de Paz y Justicia (SERPAJ) - 'Aldea de los Niños por la Paz', sede Aldea Pilar, y a las familias Moauro y Pueyrredon, por permitirnos realizar las colectas necesarias.

A mis padres

A Raudi

“No nos conocemos a nosotros mismos, nosotros los conocedores. Pero esto tiene su razón de ser. Si nunca nos hemos buscado, ¿cómo íbamos a encontrarnos algún día? Con razón se ha dicho “donde está vuestro tesoro, allí está también vuestro corazón”; nuestro tesoro está donde se hallan las colmenas de nuestro conocimiento. Estamos siempre de camino hacia allí, como animales dotados de alas desde su nacimiento y colectores de la miel del espíritu, y en realidad es una sola cosa la que íntimamente nos preocupa: “traer algo a casa”.

Friedrich Nietzsche, 1887. Zur Genealogie der Moral: Eine Streitschrift [Sobre la genealogía de la moral: una polémica].

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	12
Introducción General	12
Los recursos nutricionales en el ambiente	13
Los parasitoides	14
Heterogeneidad y desfases temporales en los sistemas parasitoide - hospedador	21
Utilización de recursos en los parasitoides: obtención y asignación de nutrientes	22
Biología de sistema de estudio	24
El parasitoide: <i>Mallophora ruficauda</i>	24
El hospedador: <i>Cyclocephala signaticollis</i>	30
Desfases espacio-temporales en el sistema <i>M. ruficauda</i> - <i>C. signaticollis</i>	32
Objetivos de investigación	36
CAPÍTULO 2	38
Materiales y métodos generales	38
Recolección y mantenimiento de los insectos	39
Determinación colorimétrica de nutrientes	41
CAPÍTULO 3	45
Disponibilidad y utilización de recursos nutricionales en los estados inmaduros de <i>M. ruficauda</i> en la etapa de pre-parasitismo	45
Introducción	46
Materiales y métodos	50
Resultados	53
Discusión	58
CAPÍTULO 4	67
Condiciones y recursos del sustrato que afectan el desarrollo y muda del primer estadio larval de <i>M. ruficauda</i>	67
Introducción	68
Materiales y métodos	71
Evaluación del efecto del sustrato y de la temperatura sobre la supervivencia de las larvas de estadio I y la muda al estadio II	71
Evaluación del efecto del sustrato como fuente de nutrientes requeridos para la muda	73
Resultados	75
Evaluación del efecto del sustrato y de la temperatura sobre la supervivencia de las larvas de estadio I y la muda al estadio II	75
Evaluación del efecto del sustrato como fuente de nutrientes requeridos para la muda	80
Discusión	81

CAPÍTULO 5	89
Selección del hospedador en función de su calidad nutricional	89
Introducción	90
Materiales y métodos	93
Parasitismo sobre hospedadores sanos de acuerdo a su calidad nutricional	94
Superparasitismo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador	97
Patrones de parasitismo a campo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador	99
Resultados	102
Parasitismo sobre hospedadores sanos de acuerdo a su calidad nutricional	102
Superparasitismo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador	106
Patrones de parasitismo a campo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador	107
Discusión	111
CAPÍTULO 6	120
Endotermia en adultos de <i>Cyclocephala signaticollis</i>: caracterización e implicancias sobre las interacciones intra- e interespecíficas	120
Introducción	121
Materiales y métodos	123
Producción de calor endógeno, ciclo térmico y ciclo de actividad	125
Naturaleza del ritmo de termogénesis	127
Endotermia a diferentes temperaturas ambiente	127
Relación entre la generación de calor endógeno y la reproducción	129
Resultados	130
Producción de calor endógeno, ciclo térmico y ciclo de actividad	130
Naturaleza del ritmo de termogénesis	133
Endotermia a diferentes temperaturas ambiente	134
Relación entre la generación de calor endógeno y la reproducción	135
Discusión	135
CAPÍTULO 7	145
Discusión general	145
CAPÍTULO 8	151
Bibliografía	151
CAPÍTULO 9	174
Apéndice	174
Tablas	175
Hipótesis explicativas de la disponibilidad de nutrientes en los huevos de <i>M. ruficauda</i> observada en distintos momentos de la temporada reproductiva	175
Aspectos evolutivos relacionados con la existencia de una larva de primer estadio que no se alimenta	176
Peso de hospedadores en el campo	184

CAPÍTULO 1

Introducción General

Los recursos nutricionales en el ambiente

Los animales interactúan constantemente con el ambiente que los rodea. En dicha interacción están involucradas tanto las condiciones a las que el individuo está sometido como los recursos que debe buscar y escoger, que en conjunto contribuyen a la delimitación de su nicho ecológico fundamental. Un aspecto esencial de la interacción de un animal con el ambiente es aquel que responde a sus requerimientos nutricionales. Dichos requerimientos están representados por las cantidades y el balance de los nutrientes que debe ingerir el animal en un determinado período de tiempo, y que debe tener disponibles para satisfacer sus demandas metabólicas y soportar el crecimiento de sus tejidos (Simpson y Raubenheimer 2011). Las respuestas fisiológicas y comportamentales de un animal a las características nutricionales del ambiente tienen consecuencias en su supervivencia, en su tasa de desarrollo y en su éxito reproductivo (Simpson y Raubenheimer 2011). La adquisición y asignación de nutrientes son procesos complejos, en los que intervienen múltiples factores inherentes al propio individuo y al ambiente en que vive, y se espera que las presiones de selección actúen manteniendo estrategias fisiológicamente favorables de inversión de recursos según los distintos requerimientos del organismo (Raubenheimer *et al.* 2009, Simpson y Raubenheimer 2011).

En el ambiente los nutrientes se encuentran empaquetados en unidades de recurso, que constituyen mezclas de múltiples componentes (Simpson y Raubenheimer 2011). La dieta de los animales puede comprender combinaciones de varias unidades de recurso en distintas cantidades o, como es el caso de los insectos parasitoides, involucrar una única unidad de recurso, el hospedador. La decisión de consumir una determinada unidad de recurso implica la evaluación de la composición nutricional de las unidades disponibles, la evaluación del estado nutricional interno y la comparación entre estos dos parámetros (Simpson y Raubenheimer 2011). Los nutrientes pueden ser limitantes para funciones específicas como la reproducción o la dispersión, aunque las unidades de recurso que los aportan no lo sean. De esta manera, se ha sugerido que las reservas energéticas de un organismo deberían ser consideradas en términos de nutrientes individuales (Casas *et al.* 2003, 2005, O'Brien *et al.* 2002, Raubenheimer y Simpson 1999). Entre los nutrientes pueden distinguirse macronutrientes (lípidos, carbohidratos y proteínas) y micronutrientes, aquellos que son ingeridos en cantidades mínimas pero que son necesarios para funciones particulares del organismo. Aunque los primeros pueden explicar una gran proporción de la variación comportamental y fisiológica de los animales, los micronutrientes pueden jugar un rol importante en la dinámica de elección de las unidades de recurso (Simpson y Raubenheimer 2011). Por otro lado, en ciertas circunstancias, no son las cantidades de nutrientes específicas sino el balance y combinación de nutrientes lo que determina el

uso de una cierta unidad de recurso (Machovsky-Capuska *et al.* 2016, Simpson y Raubenheimer 2011).

Las unidades de recurso se encuentran en el ambiente de manera heterogénea, tanto a nivel espacial como temporal. En el contexto de la teoría de forrajeo, la heterogeneidad en la disponibilidad de los recursos tiene gran influencia sobre el comportamiento y las estrategias de búsqueda de alimento, y sus efectos dependen en gran medida de la escala considerada (Brown 2000). La explotación de una unidad de recurso dada en un determinado momento dependerá del balance entre la calidad del recurso y el estado interno del organismo, dado que buscar una nueva unidad de recurso en un ambiente heterogéneo implica un alto costo energético y en muchos casos un alto riesgo para la supervivencia. En cuanto al costo energético, los efectos de la heterogeneidad ambiental en la disponibilidad de unidades de recurso son particularmente acusados para animales de pequeño tamaño y capacidad de dispersión relativamente limitada, como los insectos. Además, en estos organismos, en los que la densidad de individuos en determinados microambientes puede ser muy alta, la explotación de unidades de recurso de distinta calidad está fuertemente influenciada por la competencia por esas las unidades de recurso.

Los parasitoides

Los parasitoides son organismos que se desarrollan sobre o dentro de otro único organismo, el hospedador, alimentándose a expensas de su cuerpo, y matándolo como resultado directo o indirecto de su desarrollo (Eggleton y Belshaw 1992, Eggleton y Gaston 1990). En el caso de los insectos parasitoides, son las larvas quienes viven a expensas de y matan al hospedador, usualmente otro artrópodo (Godfray 1994). Las asociaciones parasitoide-hospedador constituyen un sistema de estudio clásico, particularmente en ecología comportamental, dado que este tipo de interacción permite descifrar los principios fundamentales de la evolución de estrategias comportamentales y de las asociaciones entre organismos (Vet *et al.* 2002). Además del interés biológico fundamental, el estudio de los parasitoides ha atraído la atención de especialistas en diversas áreas, particularmente dada la importancia económica que tiene su uso en estrategias de control biológico (Eggleton y Belshaw 1992, Hassel 2000, Hawkins 1994, Vet *et al.* 2002).

Los parasitoides y sus hospedadores componen una proporción importante de la biodiversidad. El grupo de insectos parasitoides abarca organismos de taxa diversos, perteneciendo la mayoría al orden Hymenoptera (78%), seguidos por algunas especies del orden Diptera (20%) y, en mucho menor medida, por especies de los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Neuroptera y

Strepsiptera (Godfray 1994, Feener y Brown 1997, Pennacchio y Strand 2006). Se ha sugerido que los himenópteros parasitoides constituyen entre un 10 y un 20% de la diversidad de insectos conocida (Pennacchio y Strand 2006). Por ello, no es sorprendente que la mayoría de los estudios hayan sido dirigidos hacia este grupo y que la literatura sobre dípteros parasitoides sea en cambio más escasa (Eggleton y Belshaw 1992, Feener y Brown 1997). Consistentemente, el conocimiento de la fisiología nutricional de los parasitoides y sus hospedadores, poco estudiada, es aún más deficiente para este grupo (Clark y Mangel 2000, Strand y Casas 2008). El número de especies de dípteros parasitoides ha sido estimado en 16.000, pertenecientes a 21 familias (Eggleton y Belshaw 1992, Feener y Brown 1997), y se ha sugerido que evolutivamente el hábito parasitoide en este orden pudo haber surgido independientemente en más de 100 ocasiones a partir de ancestros saprófagos que, como sus hospedadores, vivían dentro del suelo o cerca de su superficie (Eggleton y Belshaw 1992, 1993).

Los parasitoides pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios (Godfray 1994, Figura 1.1). Primeramente, de acuerdo a su modo de producción de huevos pueden dividirse en dos clases: proovigénicos y sinovigénicos (Flanders 1950, Figura 1.1.1). Las hembras de los parasitoides proovigénicos emergen como adultos con un complemento fijo de huevos ya maduros, y asignan sus reservas energéticas a la mantención de las funciones vitales. Las hembras de los parasitoides sinovigénicos, en cambio, emergen con ovocitos total o parcialmente inmaduros y producen los huevos durante el estado adulto, debiendo asignar parte de sus reservas energéticas a su maduración (Heimpel y Collier 1996, Papaj 2000, Rivero y Casas 1999a). Entre estos dos extremos existe un continuo, pudiendo haber especies con grados de maduración de huevos intermedios, para las cuales la clasificación se determina en función de un índice de ovigenia (Jervis *et al.* 2001). Una segunda clasificación se basa en el estado en que se encuentra el hospedador al momento del parasitismo, según lo cual los parasitoides se dividen en parásitos de huevo, de larva, de pupa o de adulto (Figura 1.1.2). De acuerdo con la ubicación donde son depositados los huevos por las hembras, o con los hábitos alimenticios de las larvas, los parasitoides pueden además clasificarse en endoparasitoides y ectoparasitoides (Figura 1.1.3). En las especies endoparasitoides las hembras oviponen directamente dentro del hospedador, usualmente haciendo uso de estructuras adaptadas a tal efecto (ovipositores), y las larvas se desarrollan dentro del cuerpo del hospedador consumiendo su hemolinfa y sus tejidos. La mayoría de los dípteros parasitoides pertenecen a este grupo (Feener y Brown 1997). En las especies ectoparasitoides, en cambio, las hembras oviponen en la cercanía de o sobre el hospedador, y las larvas se desarrollan externamente, perforando la cutícula del hospedador con sus piezas bucales y permaneciendo aferradas a él hasta completar su desarrollo al menos hasta el estado de pupa.

Por otro lado, si se considera la estrategia de consumo del hospedador, los parasitoides pueden clasificarse en idiobiontes y koinobiontes (Askew y Shaw 1986, Figura 1.1.4). En los primeros la hembra mata o paraliza permanentemente al hospedador al momento de la puesta, no permitiendo que el hospedador continúe alimentándose y creciendo. Ello resulta en que las futuras larvas parasitoides tengan una cantidad de recursos limitada a aquella que el hospedador poseía al momento del parasitoidismo (= parasitismo en esta Tesis). Por el contrario, los parasitoides koinobiontes no detienen el desarrollo del hospedador, quien continúa alimentándose durante el transcurso del parasitismo. En este caso los nutrientes disponibles para las larvas parasitoides dependerán de tasa de alimentación y aprovechamiento de nutrientes del hospedador. La estrategia de vida idiobionte es común entre los parasitoides himenópteros, pero no se conocen especies idiobiontes entre los dípteros, el segundo grupo de parasitoides más abundante. Entre los dípteros, sin embargo, el grado de desarrollo que alcanzan los hospedadores una vez que han sido parasitados es muy variable entre las distintas familias (Feener y Brown 1997). En este grupo algunas especies matan al hospedador muy rápidamente, otras retrasan su desarrollo y sólo matan al hospedador cuando éste se encuentra próximo a o en el estado de pupa, mientras que un tercer grupo es capaz de entrar en verdadera diapausa y sólo se desarrolla luego de un cambio estacional (Feener y Brown 1997). Las distintas estrategias descritas pueden presentarse en diferentes combinaciones. En líneas generales, los parasitoides que matan al hospedador o arrestan su desarrollo (idiobiontes) suelen ser sinovigénicos, ectoparasitoides o endoparasitoides de estados sésiles, como los huevos o las pupas. En cambio, los parasitoides que permiten el desarrollo del hospedador (koinobiontes) son en su mayoría proovigénicos, endoparasitoides de larvas de otros insectos (Mayhew y Blackburn 1999, Wajnberg y Ris 2009). Sin embargo, estas tendencias de co-variación entre las estrategias de vida presentan numerosas excepciones (Wajnberg y Ris 2009).

Otra posible clasificación de los parasitoides está relacionada con el número de individuos que puede desarrollarse completamente sobre un mismo hospedador (Figura 1.1.5). La mayoría de los parasitoides son solitarios, en los que una única larva por hospedador llega a término, mientras que sólo algunas especies son gregarias, en las cuales varias larvas pueden completar su desarrollo a partir de un único hospedador (Godfray 1994, Godfray y Shimada 1999). La dinámica de utilización de recursos en unos y otros puede ser muy diferente, y en ciertas especies esta distinción puede no ser apropiada debido a que el modo de desarrollo puede variar de acuerdo a las características y estado del hospedador, en particular su identidad (especie), su tamaño y su calidad (Wajnberg y Ris 2009). Por otro lado, de acuerdo al rango de especies hospedadoras potenciales que un parasitoide puede atacar, éstos últimos pueden clasificarse en generalistas y especialistas (Wajnberg y Ris 2009,

Figura 1.1.6). Entre los parasitoides se ha observado que la mayoría de los dípteros son generalistas, mientras que los himenópteros son usualmente especialistas (Wajnberg y Ris 2009).

Por último, en cuanto a la estrategia de búsqueda del hospedador, los parasitoides pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellos en los cuales sólo la hembra adulta es quien lleva a cabo la búsqueda y aceptación del hospedador, y aquellos en los cuales existe una búsqueda compartida entre el estado adulto y los estados inmaduros (Godfray 1994, Feener y Brown 1997, Figura 1.1.7). En el primer grupo se incluyen la mayoría de los parasitoides himenópteros, quienes generalmente depositan sus huevos dentro o cerca del hospedador. En los parasitoides en los cuales la búsqueda es compartida se evidencian dos fases. En una primera fase la hembra parasitoide localiza el hábitat en que se encuentra el hospedador, donde deposita sus huevos. En la segunda fase las larvas parasitoides llevan a cabo el encuentro físico con el hospedador. Esta segunda estrategia de búsqueda compartida es la adoptada por la mayoría de los dípteros parasitoides, cuyas hembras nunca entran en contacto directo con el hospedador (Feener y Brown 1997). En este grupo, se han descrito tres posibles modos en que los estados inmaduros del parasitoide pueden entrar en contacto con el hospedador: por ingestión directa de huevos por parte del hospedador durante la alimentación, por medio de una acción de emboscada en la que la larva parasitoide espera el pasaje de un hospedador para aferrarse a él, o mediante la búsqueda activa por parte de la larva parasitoide. Si bien estos tres modos han sido descritos en parasitoides dípteros, la mayoría de las especies de este grupo poseen larvas que llevan a cabo una búsqueda activa (Feener y Brown 1997). Evolutivamente, la aparición de este tipo de larvas ha ocurrido de forma independiente en numerosas familias y se ha sugerido que, dado su pequeño tamaño, su ocurrencia permitiría la explotación de recursos que serían de otro modo inaccesibles para las hembras parasitoides (Feener y Brown 1997).

Entre los parasitoides, el superparasitismo es un fenómeno común. El término ha sido definido como la deposición de un grupo de huevos sobre un hospedador que ya ha sido previamente parasitado por un individuo de la misma especie (Godfray 1994). Aunque esta definición aplica únicamente a los casos en que las hembras buscan y aceptan al hospedador, también se utiliza el término de modo más general para referirse a la concurrencia de varios individuos parasitoides sobre un mismo hospedador, provenientes de una o más hembras e independientemente de si la búsqueda es realizada por los adultos o las larvas. Las distintas características de los parasitoides, descritas anteriormente como las posibles clasificaciones (*e.g.*, si son gregarios o solitarios, koinobiontes o idiobiontes, etc.), tienen gran influencia en la aceptación o evitación del superparasitismo y en sus consecuencias (Harvey *et al.* 2013). En himenópteros, una hembra que superparasita se encuentra en desventaja competitiva respecto al parasitoide que

ovipuso primero, y se espera que la Selección Natural favorezca la discriminación por parte del parasitoide adulto de hospedadores previamente parasitados (Feener y Brown 1997). En concordancia con esta hipótesis, numerosos mecanismos de detección de hospedadores parasitados han sido descritos para este grupo (Dorn y Beckage 2007, Godfray 1994, van Alphen y Visser 1990). La ventaja adaptativa de dicha discriminación se acentúa cuando la unidad de recurso es limitante y cuando sólo una larva por hospedador puede desarrollarse completamente (Dorn y Beckage 2007, van Alphen y Visser 1990). En el caso de los parasitoides en los cuales la larva busca al hospedador, la selección opera sobre la capacidad de la larva de discriminar hospedadores no parasitados de los parasitados. En dípteros, a pesar de que el superparasitismo es también un evento común (Feener y Brown 1997), se han reportado especies en las cuales las larvas tienen la capacidad de discriminar hospedadores de acuerdo a su grado de parasitismo previo (Crespo 2011, Crespo *et al.* 2015). Si bien durante mucho tiempo se consideró que el superparasitismo sólo podría constituir una desventaja para los parasitoides, actualmente se reconoce que bajo ciertas circunstancias podría ser beneficioso tanto para parasitoides solitarios como gregarios (Dorn y Beckage 2007, Harvey *et al.* 2013, van Alphen y Visser 1990). Por ejemplo, cuando la densidad de hospedadores es muy baja respecto a la densidad de parasitoides, y por ende el riesgo de superparasitismo es mayor, el “auto-superparasitismo” (*i.e.*, por parte de una misma hembra) podría presentar una ventaja. Del mismo modo, una baja densidad de hospedadores también afecta el tiempo invertido en la búsqueda, pudiendo resultar en que el superparasitismo sea una opción energéticamente menos costosa.

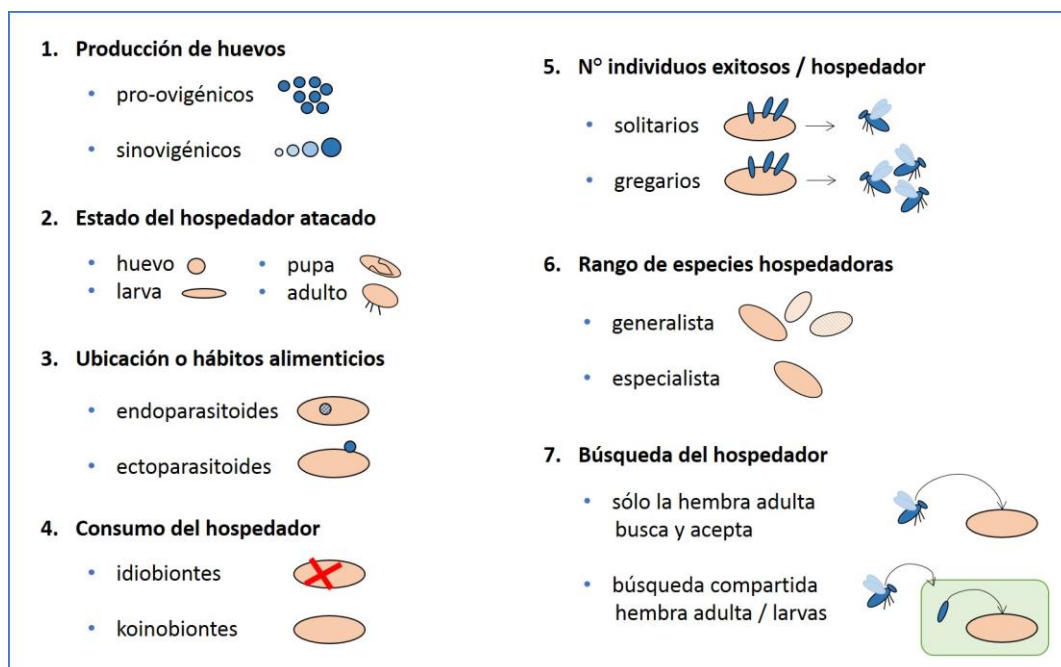


Figura 1.1. Clasificación de los parasitoides de acuerdo a diferentes criterios. Los estados/estadios del parasitoide se representan en tonos de azul y los de los hospedadores en rosado.

Para que el parasitismo sea exitoso deben cumplirse una serie de etapas sucesivas (Figura 1.2). Dichas etapas han sido divididas en dos grandes categorías: pre-oviposición y post-oviposición (Vinson 1998). Las etapas de pre-oviposición están regidas por el comportamiento de las hembras parasitoides, quienes utilizan una batería de estímulos en la búsqueda, detección y ataque del hospedador (Doutt 1959, Vinson 1998). Las etapas post-oviposición, en cambio, involucran los pasos relacionados al desarrollo del parasitoide inmaduro y dependen de las interacciones fisiológicas entre la larva parasitoide y el hospedador (Vinson e Iwantsch 1980). Estas categorías han sido definidas en función de los hábitos típicos de los parasitoides himenópteros, en los cuales es la hembra quien ataca al hospedador, y deben ser reformuladas para parasitoides en los que la búsqueda es compartida entre adultos y larvas. Para estos últimos, la fase de pre-oviposición involucra la búsqueda del hábitat del hospedador por parte de la hembra parasitoide, mientras que la búsqueda, detección y ataque del hospedador ocurren en la fase de post-oviposición, y son llevados a cabo por las larvas (Figura 1.2). De esta forma, y de modo más general, pueden dividirse los comportamientos de búsqueda en cuatro etapas: localización del hábitat del hospedador, localización del hospedador, reconocimiento y aceptación del hospedador (Doutt 1959, Vinson 1976, 1998). El proceso de parasitismo completo incluiría dichas cuatro etapas y una quinta de consumo del hospedador y desarrollo del parasitoide (Brodeur y Boivin 2004, Godfray 1994).

La primera etapa de localización del hábitat del hospedador es siempre llevada a cabo por la hembra parasitoide adulta. La selección de un determinado hábitat por parte de las hembras puede verse afectado por numerosos factores tanto intrínsecos, como su edad, su carga de huevos, su estado nutricional y su experiencia, como extrínsecos, tales como la presencia de alimento, de depredadores y de competidores (Vinson 1998). La localización del hábitat del hospedador es llevada a cabo principalmente a través de la explotación de señales químicas que son indicadores de su presencia (Godfray 1994). Dichos compuestos pueden ser producidos por los propios hospedadores, ser derivados de su actividad, *e.g.*, heces, o ser producidos por organismos asociados a él, *e.g.*, sus plantas hospedadoras, y son en general altamente volátiles, lo cual permite al parasitoide la detección a grandes distancias (Vet y Dicke 1992, Vinson 1998). En líneas generales, esta etapa implica que el parasitoide coexista con su hospedador (ver más detalle respecto a este punto más abajo), y resulta en la preferencia del parasitoide por un determinado hábitat (Vinson 1976, Wajnberg y Ris 2009). Una vez localizado el hábitat, en especies en las que los adultos atacan al hospedador, son también las hembras quienes localizan y reconocen al hospedador dentro del hábitat, agudizando su rango de acción. En esta segunda y tercera etapas del parasitismo, utilizan la integración de claves visuales, químicas y mecánicas (*i.e.*, vibratorias) (Fischer *et al.* 2001, Godfray 1994, Meyhöfer y Casas 1999, Morehead y Feener 2000, Vinson 1998). En el caso de especies con

búsqueda compartida, las hembras escogen sitios de oviposición pero la localización y el reconocimiento del hospedador son llevados a cabo por las larvas. Los mecanismos que utilizan las larvas son mucho menos conocidos, pero involucran generalmente la explotación de claves químicas (Brodeur y Boivin 2004). La cuarta etapa del parasitismo, la aceptación del hospedador, depende de la evaluación por parte del parasitoide de una serie de factores, entre los que se incluyen la identidad, la forma y el tamaño del hospedador, su edad, su movimiento, claves acústicas y claves químicas, tanto volátiles como no volátiles de contacto (Godfray 1994, Vinson 1976). Las claves químicas pueden ser a su vez indicadoras de la sanidad y estado de parasitismo previo del hospedador (Brobyn *et al.* 1988, Godfray 1994, Outreman *et al.* 2001). Asimismo, la aceptación de un hospedador depende del estado fisiológico del propio parasitoide: su condición nutricional, su carga de huevos y su esperanza de vida (Bernstein y Jervis 2008, Minkenberg *et al.* 1992, Sirot *et al.* 1997). La mayoría de los trabajos en los que se investigó esta etapa lo hicieron en modelos en los que es la hembra adulta quien toma la decisión de aceptar al hospedador. A estas hembras la capacidad de discriminar entre hospedadores les confiere una ventaja adaptativa, ya que reduce las posibilidades de parasitar a hospedadores sub-óptimos que reducirían su *fitness* (Brodeur y Boivin 2004). La literatura sobre aceptación de hospedadores en especies en que es la larva parasitoide quien toma la decisión de parasitar es escasa. La discriminación del hospedador en estas especies depende en gran medida de la tasa de encuentro potencial con los hospedadores y de la probabilidad de sobrevivir en caso de tener que competir con coespecíficos (Brodeur y Boivin 2004), y sucede principalmente a través de la evaluación de claves químicas (Crespo y Castelo 2009, Royer *et al.* 1999). Por último, la quinta etapa del parasitismo constituye el uso del hospedador una vez que ha sido aceptado, e involucra los procesos de consumo del hospedador y desarrollo del parasitoide. Esta etapa fue originalmente propuesta por Doult (1959) como de post-oviposición, definida para parasitoides donde la búsqueda es únicamente llevada a cabo por la hembra. La utilización del hospedador y el desarrollo exitoso del parasitoide dependen de las interacciones de varios factores, que pueden afectar al parasitoide de forma directa o indirecta por muerte del hospedador. Algunos de dichos factores son: la capacidad de evasión de o defensa contra el sistema inmune del hospedador; la competencia con otros parasitoides de la misma o de distinta especie sobre o dentro del hospedador; la infección del hospedador por patógenos; la idoneidad nutricional del hospedador; y las condiciones ambientales (Salt 1938, Strand y Pech 1995, Vinson e Iwantsch 1980). En especies en las que la hembra adulta busca al hospedador, las hembras contribuyen a modular algunos de estos factores al momento de la oviposición. Entre los mecanismos que utilizan se encuentran la inyección de veneno que paraliza al hospedador temporal o permanentemente, o de poliadenovirus que comprometen el sistema inmune del hospedador o modifican su desarrollo, y

la vigilancia del hospedador antes y/o después de la oviposición que reduce las chances de superparasitismo (Godfray 1994). En cambio, en las especies en que es la larva quien busca y acepta al hospedador, todos los factores deben ser regulados o tolerados por las propias larvas. La manipulación del hospedador por parte de estas larvas durante y luego del ataque es mucho menos conocida.

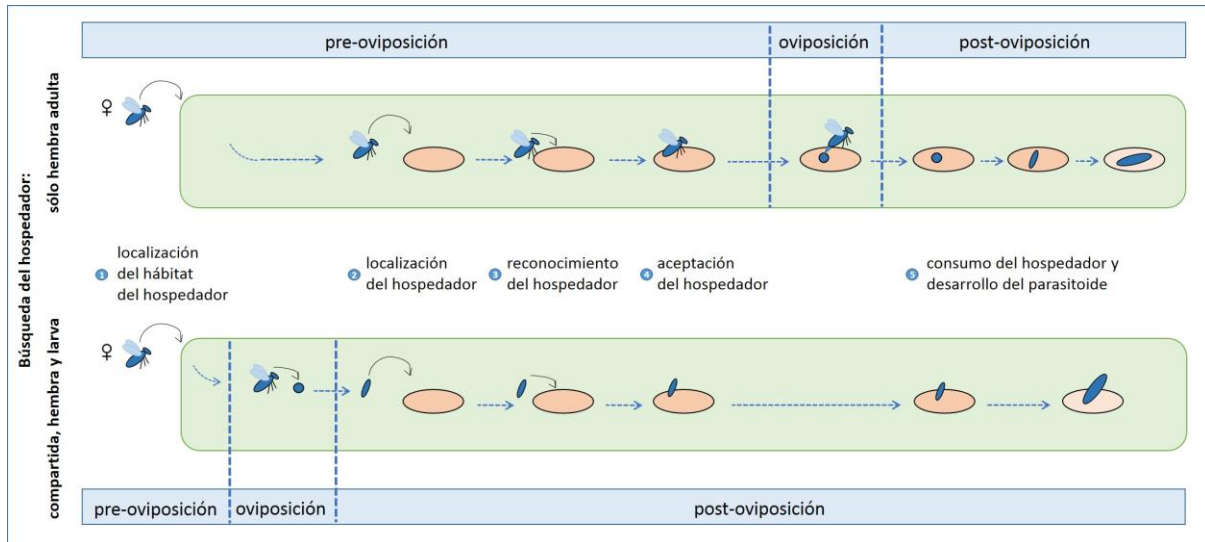


Figura 1.2. Etapas del parasitismo exitoso. Los estados/estadios del parasitoide se representan en tonos de azul y los de los hospedadores en rosado; el ambiente se representa en verde.

Heterogeneidad y desfases temporales en los sistemas parasitoide - hospedador

La heterogeneidad en un sistema parasitoide - hospedador puede ser definida como la variación en el riesgo de parasitismo entre individuos de una población de hospedadores (Chesson y Murdoch 1986, Hassell 2000). Hassell (2000) reconoce tres formas básicas en que dicha heterogeneidad puede ocurrir. La primera surge a partir de diferencias fenotípicas entre individuos hospedadores, habiendo cierta fracción de la población de hospedadores que presenta características fisiológicas o comportamentales que le permite reducir el riesgo de parasitismo (Chesson y Rosenzweig 1991). Una segunda forma ocurre simplemente dado un ambiente irregular, en el cual el nivel de parasitismo varía espacialmente entre los distintos parches del ambiente (Hassell *et al.* 1991). Por último, la heterogeneidad puede deberse a diferencias temporales cuando los ciclos de vida del parasitoide y el hospedador no están sincronizados en fase. En este último caso algunos individuos dentro de la población de hospedadores tendrán un menor riesgo de parasitismo

o serán capaces de evitarlo completamente debido al desajuste fenológico entre su ciclo de vida y el ciclo de vida del parasitoide (Godfray *et al.* 1994, Hassell 2000). Estos desfases temporales son comunes en la naturaleza (Godfray *et al.* 1994), y pueden ser particularmente marcados en sistemas en los cuales las especies intervinientes presentan generaciones discretas y donde por ende los eventos de parasitismo ocurren dentro de una ventana temporal acotada (Hassell 2000). Cuando estas formas de heterogeneidad, también llamadas “refugios” (fenotípicos, espaciales y temporales, respectivamente), son incluidas dentro de los modelos que describen la dinámica de las poblaciones de hospedadores y parasitoides, tienden a estabilizar las interacciones entre ambas (Mills y Getz 1996, Hassell 2000, Briggs y Hoopes 2004).

Se ha visto que los desfases temporales pueden sufrir variaciones entre poblaciones locales y a lo largo de los años en un mismo sistema parasitoide-hospedador. Para un mismo sistema pueden observarse situaciones de sincronía perfecta y de completa asincronía debidas a factores diversos, entre los cuales se incluyen condiciones ambientales que pueden afectar diferencialmente el desarrollo de los parasitoides y de los hospedadores, desfasando entonces sus ciclos de vida (Godfray *et al.* 1994, van Nouhuys y Lei 2004). Sin embargo, los desfases temporales pueden ser directamente el resultado de aquello que Van Valen (1973) denomina como una “carrera armamentista” que se desarrolla evolutivamente entre hospedadores (entre los cuales el escape al parasitismo es positivamente seleccionado) y parasitoides (quienes son necesariamente seleccionados de acuerdo a su capacidad de parasitar) (Brockhurst *et al.* 2014). Dentro de este marco, el desfase entre los ciclos de vida del hospedador y del parasitoide es observable en muchas especies y las “soluciones” que los parasitoides encuentran al corrimiento temporal de sus hospedadores pueden ser de diferentes tipos, entre los que se encuentran la proporción de sexos diferencial en la descendencia y la asignación diferencial de nutrientes (Godfray y Shimada 1999).

Utilización de recursos en los parasitoides: obtención y asignación de nutrientes

Los parasitoides pueden adquirir nutrientes tanto en su estado larval, cuando las larvas se alimentan del hospedador, como en su estado adulto, durante el cual pueden, según la especie, alimentarse del hospedador y/o de otras fuentes (Heimpel y Collier 1996, Jervis y Kidd 1986, Strand y Casas 2008). Los recursos adquiridos durante la etapa larval se denominan recursos o reservas capitales (Strand y Casas 2008), pero también suele llamárselos reservas teneales en referencia a las reservas de las hembras adultas al momento de la emergencia (Bernstein y Jervis 2008), ambos

términos suelen utilizarse como sinónimos. En cambio, los recursos adquiridos por las hembras adultas cuando se alimentan se denominan recursos de ingreso (Strand y Casas 2008). En los parasitoides, como ocurre en todos los insectos, los tres principales nutrientes son los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, y las proporciones requeridas de cada uno varían dependiendo del estado de desarrollo del individuo, de su condición fisiológica y de las actividades y procesos que lleva a cabo (mantenimiento corporal, oviposición, muda, etc., Rivero y Casas 1999a, Strand y Casas 2008). Cambios en la dieta o en el metabolismo de los individuos pueden afectar el modo en que se utilizan los nutrientes en los distintos estados de vida y en diferentes momentos dentro del cada estado (Casas *et al.* 2005, O'Brien *et al.* 2004).

En los parasitoides, distintos tipos de nutrientes juegan roles diferentes de acuerdo a cuáles sean las estrategias adoptadas por la especie y a la etapa de la vida en que se encuentre el individuo. Los carbohidratos obtenidos mediante la alimentación durante la vida adulta incrementan la longevidad y la supervivencia tanto en parasitoides idiobiontes como en koinobiontes (Casas *et al.* 2005, Jervis *et al.* 2008, Strand y Casas 2008). Los nutrientes involucrados en la reproducción, en cambio, son en gran medida adquiridos durante el estado larval y forman parte de las reservas teneales de los adultos, quienes los asignan a la producción de huevos o a los procesos que mantienen las funciones del organismo, permitiendo aumentar el tiempo disponible para reproducción. De esta manera, las proteínas y carbohidratos obtenidos por adultos idiobiontes que se alimentan de un hospedador aumentan la producción de huevos ricos en vitelo al permitir a las hembras invertir menor cantidad de reservas teneales de lípidos en funciones de mantención. La mayoría de los koinobiontes adultos, en cambio, no se alimentan de hospedadores, por lo cual muchas especies han desarrollado estrategias compensatorias tendientes a aumentar la adquisición de nutrientes durante su desarrollo (lípidos, esteroides y aminoácidos no esenciales, O'Brien *et al.* 2002, 2004). En cuanto a la etapa de la vida del parasitoide, los procesos de distribución de nutrientes dependen del estado fisiológico del individuo al momento de la asignación (Jervis *et al.* 2008). Se ha observado, por ejemplo, que algunas hembras parasitoides asignan menor cantidad de nutrientes a los huevos a medida que van envejeciendo (Giron y Casas 2003).

La adquisición y asignación de recursos están fuertemente ligadas a dos componentes de la historia de vida en los parasitoides: la producción de huevos y el modo de parasitismo (Strand y Casas 2008). Como se ha descrito anteriormente, los parasitoides pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo a su estrategia de producción de huevos. En los parasitoides proovigénicos las hembras emergen como adultos con un complemento fijo de huevos ya maduros, y asignan sus reservas energéticas a la mantención de las funciones vitales. En los parasitoides sinovigénicos, en

cambio, las hembras continúan la maduración de los huevos durante el estado adulto, debiendo entonces confrontar la decisión de asignar sus reservas energéticas a la producción de huevos, a la mantención somática o a ambos (Flanders 1950, Heimpel y Collier 1996, Papaj 2000, Rivero y Casas 1999b). Además, como también se ha mencionado, los parasitoides pueden clasificarse según su modo de parasitismo en idiobiontes, que detienen el desarrollo de sus hospedadores, y koinobiontes, cuyos hospedadores continúan su crecimiento (Askew y Shaw 1986). Las estrategias de parasitismo y de producción de huevos están íntimamente relacionadas, y existen tendencias generales que indicarían que los parasitoides proovigénicos suelen ser koinobiontes. Dichos parasitoides atacan estados temprano de su hospedador, de gran mortalidad, siendo la estrategia parental más favorable el poner un mayor número de huevos con menor contenido de vitelo (Mayhew y Blackburn 1999, Strand y Casas 2008). Los parasitoides sinovigénicos, en cambio, suelen ser idiobiontes, y atacan al hospedador en un estado avanzado, de menor mortalidad. Su estrategia es poner menor número de huevos con mayor contenido de vitelo, siendo para ello necesaria la alimentación durante el estado adulto (Mayhew y Blackburn 1999, Strand y Casas 2008). Sin embargo, a pesar de estas tendencias generales, las relaciones entre estas categorías no son absolutas, sino que forman un continuo.

Biología de sistema de estudio

El parasitoide: *Mallophora ruficauda*

El moscardón cazador de abejas, *Mallophora ruficauda* Wiedemann 1828, es una especie nativa del hemisferio occidental (como todas las del género *Mallophora*) con una amplia distribución geográfica disruptiva, estando presente en el sur de México y Centroamérica, el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y hasta el centro de Argentina (Artigas y Angulo 1980, Dennis y Knutson 1988). En Argentina, es una especie endémica en la Región Pampeana, habita hasta los 38° de latitud sur, y se encuentra asociada a ecosistemas de pastizal (Rabinovich y Corley 1997). Esta especie es un ectoparasitoide solitario koinobionte de larvas de escarabeidos (gusanos blancos del suelo, Coleoptera: Scarabaeidae), preferentemente de la especie *Cyclocephala signaticollis* Burmeister 1847 (Copello 1922, 1927, Castelo 2003, Castelo y Corley 2010). Además, es depredador de insectos voladores, particularmente dípteros e himenópteros (Copello 1927), mostrando predilección por el consumo de abejas melíferas (*Apis mellifera* L. 1758). El incremento poblacional de *M. ruficauda* en los últimos 100 años ha constituido a esta especie como plaga para la apicultura, afectando la

producción apícola en Argentina en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y La Pampa (Rabinovich y Corley 1997, SAGPyA 2007), que concentran el 90% de las colmenas del país. La provincia de Buenos Aires genera alrededor del 50% de la miel nacional y las pérdidas debidas a este insecto rondan los 2-3 millones de dólares (Blengino 2013, Rabaglio *et al.* 2015, Rabinovich y Corley 1997). *Mallophora ruficauda*, además de afectar la producción de miel, afecta indirectamente la producción de semillas oleaginosas, ya que al cazar abejas interfiere en el proceso de polinización. La utilización de abejas para la polinización deja beneficios de 1.000 millones de dólares al año (Mayoral 1999). La especie constituye una plaga cíclica, presentando incrementos poblacionales marcados cada cuatro años aproximadamente, durante los cuales causa el mayor daño (M. Castelo comunicación personal).

El ciclo de vida de *M. ruficauda* es anual, apareciendo los adultos únicamente durante el verano meridional (diciembre a marzo). Entre dos generaciones de adultos el ciclo consiste en cinco estadios larvales (larvas I a V) y un estado de pupa. El primer estadio larval es de corta duración y es de vida libre, las larvas de estadios II, III y IV viven aferradas y a expensas de su hospedador, mientras que el estadio V es también de vida libre y carroñero (Crespo y Castelo 2010). El estadio II es el más largo, permaneciendo como tal todo el otoño e invierno. Una vez llegada la primavera, cuando el hospedador se prepara para empupar, el desarrollo del parasitoide se acelera y en pocos días consume completamente al hospedador, alcanzando el estado de pupa. Hacia finales de diciembre emerge nuevamente el adulto cerrando así el ciclo de vida. El ciclo biológico de *M. ruficauda* se representa en la Figura 1.3 y sus pormenores se detallan a continuación.

Las hembras de *M. ruficauda* se encuentran en los pastizales desde fines de diciembre y hasta mediados de marzo, son de hábito diurno (de 9 a 19 hs) y desarrollan sus distintas actividades en intervalos temporales establecidos. La alimentación ocurre durante todo el día, con un mínimo entre las 11 y las 13 hs y un máximo entre las 15 y las 18 hs. Durante la mañana y el mediodía, cuando la alimentación es mínima, se observan los comportamientos relacionados con la reproducción: cortejo (con un pico entre las 10 y las 12 hs), cópula y oviposición (ambas con picos entre las 11 y las 13 hs) (Nussebaum 2007). La ovipuesta promedio consiste en desoves de 328 huevos, con mínimos y máximos de alrededor de 50 y 700 huevos respectivamente (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a), ubicados en dos capas superpuestas, y recubiertas por una capa de albúmina (Copello 1922 y 1927). Las dimensiones promedio de los huevos son de 0,75 x 0,34 mm (Fabiano 2018, aunque Copello 1922 reportó dimensiones levemente menores). La eclosión de los huevos se produce entre 2 y 7 días después de la puesta y las larvas de estadio I recién nacidas son dispersadas por el viento y caen al suelo (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a, Copello 1922 y 1927).

La estrategia de producción de huevos en *M. ruficauda* es sinovigénica extrema (índice de ovigenia = 0,084), las hembras adultas emergen con todos los oocitos inmaduros y deben madurarlos a lo largo de la temporada reproductiva a expensas de sus reservas teneales y de los recursos que obtienen de la alimentación (Nussebaum 2007). Se ha visto que el número promedio de ovarias por hembra es de 515 y que la carga media de huevos (oocitos maduros a un determinado momento) es de 331, con máximos de 762, lo cual es coincidente con el número de huevos que las hembras ponen por desove (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a, Nussebaum 2007). Como se ha dicho antes, el hecho de ser sinovigénica implica que la hembra parasitoide debe alimentarse continuamente durante el período reproductivo, tal de adquirir nutrientes suficientes para asignar a los huevos al mismo tiempo que para su mantenimiento corporal.

Las hembras de *M. ruficauda* seleccionan el sitio de oviposición a dos escalas distintas: hábitat y microhábitat. La selección del hábitat a gran escala (pastizal) consiste en la identificación de sitios donde hay presencia de hospedadores. Dicha selección no está relacionada con la densidad de los hospedadores en los pastizales, sino únicamente con su presencia (Nussebaum 2007). A nivel microhábitat, los sitios de puesta son elegidos por la hembra mediante la selección de la altura de oviposición. Las hembras oviponen en sustratos elevados entre 1,25 y 1,50 m de altura, tanto naturales (principalmente *Carduus acanthoides* L. 1753 y *Dipsacus fullonum* L. 1753) como artificiales (postes y alambrados), lo cual maximiza la dispersión de las larvas por el viento (Castelo 2003, Castelo y Capurro 2000, Castelo y Corley 2004a, Castelo *et al.* 2006). La selección a ambas escalas se ve reflejada en la distribución de parasitismo a campo, que a gran escala es denso-independiente y a pequeña escala es denso-dependiente inverso (Castelo 2003, Castelo y Capurro 2000).

Una vez que han eclosionado los huevos, las larvas de primer estadio de *M. ruficauda* son dispersadas por el viento y caen al suelo, medio en que se completa el desarrollo del parasitoide. Las larvas de estadio I son móviles, con dimensiones promedio de 1,8 x 0,3 mm (Fabiano 2018). Una vez en el suelo, se entierran y buscan un microhábitat apropiado donde mudan al estadio II (Copello 1922 y 1927). Experimentos de laboratorio en que se mantuvo a las larvas en sustrato artificial indican que, si bien la muda al estadio II puede producirse dentro de un período de tiempo prolongado (4 a 22 días desde el nacimiento), la duración promedio del estadio es de 7 días, mudando la mayoría de los individuos (75%) antes de los 10 días de edad (Crespo 2007, Crespo y Castelo 2010). La duración del estadio y la supervivencia de las larvas de estadio I son diferentes de acuerdo al momento de la temporada reproductiva en que las larvas hayan nacido, siendo ambas mayores en individuos tempranos que en aquellos nacidos a mediados de temporada (Crespo 2007). Respecto a individuos nacidos hacia finales de la temporada reproductiva, no se cuenta aún con

datos equivalentes de duración del estadio y supervivencia. Las larvas de estadio I no se alimentan del hospedador y, si bien se ha observado que poseen las estructuras receptoras asociadas con el reconocimiento del hospedador y que son capaces de detectar su presencia e iniciar movimientos de locomoción, no se orientan activamente hacia él (Crespo y Castelo 2008, 2010, Fabiano 2018). Más aún, de acuerdo con la bibliografía, las larvas de estadio I no se alimentan, no sólo del hospedador, sino de ninguna otra fuente, y sólo dependerían energéticamente de los nutrientes asignados por las hembras adultas a los huevos en el momento de la puesta, aunque se ha sugerido que podrían tomar oligoelementos y humedad del suelo (Copello 1922 y 1927). La existencia de una larva de primer estadio que no se alimenta es un hecho biológicamente intrigante, y se ha sugerido que podría estar vinculada con la preparación fisiológica relacionada con la búsqueda y parasitación del hospedador (Crespo 2007, Crespo y Castelo 2010).

Mallophora ruficauda es un parasitoide obligado, en el cual el encuentro con el hospedador es realizado por las larvas de estadio II. Si bien se ha observado que parasitan en baja frecuencia larvas de otras especies de escarabeidos a campo, presentan una marcada preferencia por aquellas de la especie *C. signaticollis* y en particular por su estadio larval III (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010). Las larvas parasitoides de estadio II son las únicas capaces de orientarse activamente hacia el hospedador, para lo cual utilizan claves químicas liberadas por el intestino del gusano (Castelo y Lazzari 2004, Crespo y Castelo 2008, Crespo *et al.* 2011). Dichas claves químicas provienen de la cámara de fermentación del hospedador, posiblemente derivadas de la actividad de simbioses presentes en el intestino (Groba y Castelo 2016), y resultan atractivas no sólo para la larva parasitoide sino también para las larvas de estadio III del hospedador (Groba y Castelo 2012). Si bien la identidad química de la clave y su posible función en hospedadores se desconocen, estos datos sugieren que el parasitoide estaría explotando una vía de comunicación ya establecida entre los hospedadores. La larva parasitoide se orienta hacia el hospedador mediante un proceso de klinotaxia, utilizando quimiosensilias presentes en los palpos maxilares (Crespo *et al.* 2011, Groba 2014, Pueyrredon *et al.* 2017). Morfológicamente, dichas estructuras se encuentran completamente desarrolladas únicamente en el estadio larval II (Crespo 2007, Fabiano 2018, Groba 2014, Musso 1978, 1981), durante el cual el parasitoide adquiere capacidad de búsqueda activa del hospedador.

Luego de la muda, el estadio II de *M. ruficauda* puede vivir sin aferrarse al hospedador durante un tiempo prolongado, siendo la duración promedio del estadio de 32 días, con un máximo de 125 días (Crespo 2007). Sin embargo, debe necesariamente parasitar al hospedador para completar su desarrollo (Crespo y Castelo 2010, Crespo 2011). Como sucede en las larvas de estadio I, la supervivencia es mayor para individuos nacidos al principio que para aquellos nacidos a mediados de la temporada reproductiva (Crespo 2007, no se cuenta con datos de individuos

tardíos). Mientras la probabilidad de supervivencia promedio de una larva de estadio II de 32 días de edad es del 50%, cuando sobrepasan los 50 días de edad dicha probabilidad decrece a la mitad (Crespo 2007). En conjunto, la necesidad de aferrarse a un hospedador y el decremento en la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo, juegan un rol importante en la decisión de las larvas de parasitar un hospedador potencial de cierta calidad o continuar la búsqueda de otro de mayor calidad.

La calidad del hospedador puede evaluarse teniendo en cuenta diferentes características del mismo, que abarcan su identidad (especie), su estado de desarrollo (estadio larval), su estado de parasitismo previo y su estado fisiológico general. En cuanto a la identidad del hospedador, como se ha mencionado anteriormente, las larvas parasitoides son capaces de discriminar y eligen preferencialmente a la especie *C. signaticollis* (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010). En cuanto al estado de desarrollo del hospedador, aunque tanto el estadio II como el estadio III pueden ser parasitados, en condiciones óptimas éste último es el preferido (Crespo 2011). El estado de parasitismo previo también es un factor evaluado por las larvas de *M. ruficauda* al momento de parasitar. Si bien en esta especie el superparasitismo a campo es común, sólo una larva por hospedador puede desarrollarse, y se ha visto que en condiciones óptimas no parasitan hospedadores previamente parasitados (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2009). Sin embargo, se ha visto que estas elecciones se relajan dependiendo de la edad de la larva parasitoide y del grado de agregación de coespecíficos en que haya sido criada. En particular, larvas de edad más avanzada o que han sido expuestas a altas densidades de competidores coespecíficos presentan una mayor tasa de orientación hacia y aceptación de hospedadores sub-óptimos (de otras especies, de la misma especie pero de estadio II, y monoparasitados) (Barrantes 2009, Barrantes y Castelo 2014, Crespo 2011, Crespo *et al.* 2015). Por último, el estado de los hospedadores estimado a partir de su nivel de estrés también tiene influencia sobre la decisión de las larvas parasitoides, y las larvas evitan parasitar a hospedadores perturbados (Barrantes 2015). Dado que las larvas de estadio II del parasitoide permanecen en la mayoría de los casos sobre el mismo hospedador hasta completar su desarrollo, contar con la capacidad de reconocer a priori la calidad del hospedador resultaría ventajoso para el *fitness*. Sin embargo, como se ha dicho antes, dadas las restricciones que las larvas enfrentan en cuanto a su necesidad de parasitar y la disminución progresiva de su probabilidad de supervivencia, la variación en los niveles de aceptación de hospedadores de diferente calidad observados en distintas situaciones resultaría evolutivamente adaptativo.

Una vez aferrada al hospedador, la larva parasitoide generalmente no se desprende del mismo hasta completar su desarrollo. Desde el momento del parasitismo y durante todo el invierno la larva parasitoide vive a expensas de su hospedador, pero sin aumentar considerablemente su

tamaño (Fabiano 2018). Inclusive, se ha determinado que el tamaño de las larvas de estadio II es ligeramente menor al de las larvas de estadio I (longitud corporal: 1,8 y 1,6 mm respectivamente, Fabiano 2018). Se ha descrito que en la naturaleza ambos organismos, parasitoide y hospedador, estarían transcurriendo una etapa de letargo durante dicho período. Cuando las temperaturas ambientales comienzan a incrementar en los meses de primavera (septiembre - noviembre) y el hospedador entra en estado de prepupa (ver descripción más abajo), se desencadena el desarrollo posterior del parasitoide, quien muda a sus estadios larvales III, IV y V en un breve período de tiempo (4 - 5 días por estadio) aumentando considerablemente su tamaño (Crespo 2011, Fabiano 2018). Las larvas de estadios III y IV son dependientes del hospedador vivo en cuanto a la alimentación, y es la larva de estadio IV quien mata finalmente al hospedador pero continúa alimentándose de sus restos (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2010). La supervivencia del estadio III mientras está aferrado al hospedador es de alrededor del 72%, pero es nula si el hospedador muere durante ese período (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2010). Para el estadio IV, en cambio, la supervivencia es superior al 70% tanto en presencia como ausencia del hospedador (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2010). El último estadio larval, V, es carroñero, alimentándose de los restos del hospedador pero no siendo necesario éste último para su supervivencia. Finalmente, la larva V empupa y permanece en este estado por un promedio de 24 días antes de la emergencia del adulto a comienzos del verano (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2010).

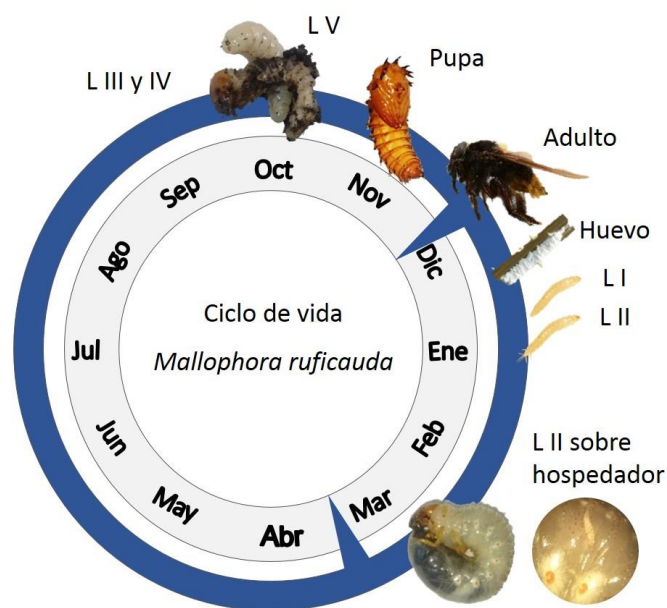


Figura 1.3. Ciclo de vida de *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Las marcas triangulares sobre el ciclo demarcan la temporada reproductiva del parasitoide. Fotografías: P. Zermoglio.

El hospedador: *Cyclocephala signaticollis*

El escarabajo argentino, *Cyclocephala signaticollis*, también llamado “casarudo rubio”, es un escarabeido nativo sudamericano, que se distribuye principalmente en Argentina y Uruguay, pero cuya presencia ha sido reportada ocasionalmente en Estados Unidos, y que ha sido accidental pero efectivamente introducido en Australia (Carne 1957, Frew et al. 2016, Mumford 1965, Remedi de Gavotto 1964). En Argentina, se encuentra en la Región Pampeana, distribuido en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, en el sur de Santa Fe, este de Córdoba y noreste de La Pampa (Remedi de Gavotto 1964).

Las larvas de la especie *C. signaticollis* forman parte del conjunto conocido como gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae), larvas fitófagas que se alimentan de raíces de plantas y que son consideradas plaga de diversos cultivos (Alvarado 1980, Potter 1998). A pesar de su estatus de plaga, el comportamiento de alimentación de esta especie no ha recibido gran atención (Frew et al. 2016). Se conoce, sin embargo, que atacan principalmente cultivos de trigo, maíz, cebada, alfalfa, lino, girasol, papa, lechuga y zanahoria (Alvarado 1980, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas 2016). En cultivos de trigo los umbrales de daño se consideran cuando las larvas de están en densidades de entre 6 y 8 individuos/m² (Carrasco et al. 2005).

Cyclocephala signaticollis presenta un ciclo de vida anual, representado en la Figura 1.4. Los adultos emergen hacia mediados de noviembre y, de acuerdo con la bibliografía, viven alrededor de 30 días, durante los cuales no se alimentan, siendo las hembras ligeramente más longevas que los machos (Alvarado 1980, Carne 1957, López et al. 1994). Remedi de Gavotto (1964) ha reportado una mayor supervivencia de los adultos (hasta 3 meses), siendo la única referencia a un período de vida más largo para este estado de la especie. Estas observaciones no han podido ser corroboradas en el laboratorio en el período de este trabajo, durante el cual se han observado supervivencias no mayores a los 40 días. Los adultos de *C. signaticollis* son de hábito nocturno, permaneciendo enterrados en el suelo durante el día, y saliendo a la superficie por las noches, entre las 7 pm y las 7 am, momento en el cual desarrollan sus actividades. El pico de actividad de los individuos, estimado a partir de su tasa de captura, se produce entre las 7 pm y la 1 am (Alvarado 1980). Es una especie dimórfica en la cual machos y hembras son fácilmente distinguibles a partir de la morfología de sus uñas tarsales, siendo mucho mayores en tamaño y fuertemente asimétricas en el macho (Carne 1957). Además, los machos son ligeramente más pequeños que las hembras, midiendo entre 13 y 14 mm y 16 mm respectivamente (Remedi de Gavotto 1964). El comportamiento nocturno de los escarabajos muestra típicamente aglomeraciones de individuos en los pastizales, pero los mecanismos subyacentes que rigen el comportamiento de agregación son desconocidos para esta

especie. Entre los factores que podrían contribuir al agrupamiento de individuos se cuentan la producción de calor y la emisión de feromonas. Durante el período de actividad nocturna se produce la cópula sobre la superficie del suelo, inmediatamente luego de lo cual las hembras se entierran (Carne 1957). Los huevos son depositados bajo tierra en forma aislada, a unos 10 cm de profundidad (López *et al.* 1994). Cuando recién han sido puestos, los huevos tienen forma ovoide, tornándose esféricos cuando están próximos a la eclosión, y miden en promedio 2 mm (López *et al.* 1994). La fecundidad media de las hembras es de 7,14 huevos y es dependiente de la temperatura, pudiendo alcanzar valores de hasta 25,7 huevos por hembra (López *et al.* 1994).

Las larvas de estadio I nacen en promedio 20 días después de la puesta (López *et al.* 1994, Remedi de Gavotto 1964). Las larvas presentan la morfología general típica del estado larval de la familia Scarabaeidae, en los cuales el cuerpo adopta una forma de "C" característica. Las larvas de estadio I son pequeñas, teniendo cápsulas cefálicas de entre 1,5 y 2,1 mm, y viven en promedio 40 días (Carne 1957, López *et al.* 1994, Remedi de Gavotto 1964). Durante el primer estadio las larvas sólo consumen detritos y materia orgánica del suelo. Las larvas de estadio II aparecen en el campo típicamente hacia fines de enero y viven en promedio 30 días (López *et al.* 1994, Remedi de Gavotto 1964). Este estadio es de mayor tamaño, y su cápsula cefálica mide en promedio entre 2,7 y 2,9 mm (Carne 1957, López *et al.* 1994).

Las larvas de estadio III (último estadio y el parasitado preferentemente por *M. ruficauda*) aparecen hacia fines de febrero - comienzos de marzo, y constituyen el estadio de mayor duración, viviendo en promedio de 217 días, con un mínimo de 179 y un máximo de 249 días (López *et al.* 1994). Las larvas de este estadio permanecen enterradas durante todo el invierno en el interior de celdas en la tierra, entre 5 y 15 cm por debajo de la superficie (López *et al.* 1994), presentando un tipo de distribución contagiosa, es decir, se encuentran agrupadas en parches (Castelo 2003, Castelo y Capurro 2000). Se alimentan típicamente de raíces de plantas cultivadas y su presencia está asociada a suelos de alta fertilidad con un contenido de materia orgánica de 6% (López *et al.* 1994). Durante los primeros meses del estadio la alimentación a campo es activa, pero cuando la temperatura ambiente disminuye en los meses del invierno, las larvas se entierran a profundidades mayores y disminuyen su frecuencia de alimentación. Su tamaño varía entre 25 y 30 mm de longitud y el ancho de su cápsula cefálica se ha reportado entre 4,4 y 5,2 mm (Carne 1957, López *et al.* 1994). Si bien la masa corporal de estas larvas no ha sido sistemáticamente detallada, López y colaboradores (1994) presentan valores estimados en laboratorio que varían entre 0,6 y 0,7 g a tiempos intermedios de la duración del estadio. Si bien las larvas de escarabeidos son externamente muy similares, la identificación de las larvas de estadio III de *C. signaticollis* se puede efectuar a partir de las características de su ráster (complejo de setas, espinas y espacios desnudos sobre la

superficie postero-ventral del cuerpo y por delante de la abertura anal), que se encuentra completamente desarrollado en el tercer estadio larval (Alvarado 1980, Frana 2003). Además, en este estadio puede asimismo diferenciarse el sexo de los individuos a partir de la observación de una estructura, la ampulla, que sólo está presente en los machos (Martínez y Lumaret 2003, Castelo, en preparación). Antes de entrar en el estado de pupa las larvas de estadio III de *C. signaticollis* transcurren por un estado intermedio de prepupa, caracterizado por la pérdida de la forma de “C” típica escarabeiforme, la interrupción de la alimentación y el vaciamiento del tracto digestivo, con la consecuente pérdida de peso corporal (López *et al.* 1994). Este estado intermedio tiene una duración de alrededor de una semana. Las primeras pupas aparecen hacia finales de octubre, siendo la duración de este estado de aproximadamente 20 días, luego de lo cual emergen los nuevos adultos (Carne 1957, López *et al.* 1994, Remedi de Gavotto 1964).

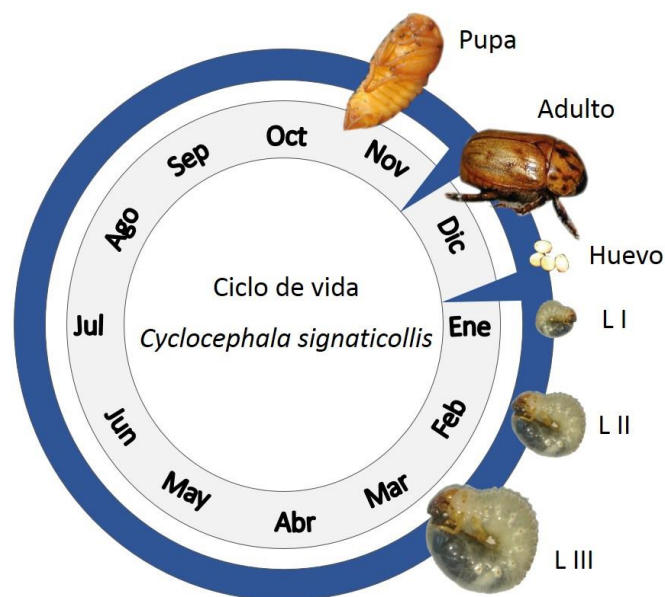


Figura 1.4. Ciclo de vida de *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Las marcas triangulares sobre el ciclo demarcan la temporada reproductiva. Fotografía: pupa: Kropiewnicki, adulto: Rittner, larvas: P. Zermoglio.

Desfases espacio-temporales en el sistema *M. ruficauda* - *C. signaticollis*

En el sistema *M. ruficauda* - *C. signaticollis* pueden identificarse desfases entre los ciclos de vida del parasitoide y el hospedador, tanto espaciales como temporales. Estos desfases están relacionadas con los hábitos de ambas especies en sus diferentes estados, con los tiempos de

emergencia y con los estados directamente involucrados en el evento de parasitismo. Los desfases espaciales afectan particularmente a la hembra parasitoide adulta, quien presenta hábitos mayormente aéreos y quien debe identificar el hábitat de la especie hospedadora, en particular del escarabajo adulto, único estado del hospedador con quien coexiste temporalmente al principio de la temporada reproductiva. Como se ha descrito anteriormente, el hospedador adulto permanece enterrado en el suelo durante el día, momento en que el parasitoide presenta sus picos de actividad y oviposición, de modo que ambas especies no se encuentran nunca en un mismo espacio en el momento en que la hembra parasitoide decide colocar sus huevos. Además, si bien coexisten estacionalmente, la hembra parasitoide enfrenta un desfase temporal diario respecto a la actividad del hospedador adulto, estando sus respectivos picos de actividad desfasados.

La información que pueden utilizar los parasitoides en su búsqueda por el hospedador puede clasificarse dentro de tres categorías básicas: claves del microhábitat o de las plantas que consume el hospedador (típico de sistemas tritróficos), claves asociadas indirectamente con la actividad de los hospedadores en el ambiente, y claves provenientes directamente del propio hospedador (Godfray 1994, Vet y Dicke 1992). La información varía consistentemente entre categorías tanto en detectabilidad como en confiabilidad, siendo aquellas que provienen del propio hospedador las más confiables y, en la mayoría de los casos, las más difíciles de detectar, sobre todo a grandes distancias (Vet y Dicke 1992, Vet *et al.* 1991). En el caso de *M. ruficauda*, por las razones que se han expuesto, la identificación del área propicia para desovar no estaría relacionada con la identificación de claves provenientes directamente del hospedador adulto sino con claves derivadas de su actividad que pudieran permanecer en el ambiente por lo menos desde la noche anterior. En la literatura se han descrito ampliamente mecanismos de reconocimiento del hábitat de hospedadores basados en sistemas tritróficos, en los cuales el parasitoide guía su búsqueda de acuerdo a claves emitidas por las plantas que han sido dañadas por los hospedadores. En el caso de *M. ruficauda* este tipo de explicaciones no sería plausible dado que los hospedadores adultos no se alimentan. Una posible vía alternativa podría contemplar que las hembras parasitoides guíen su búsqueda a partir de claves derivadas de la alimentación de las larvas hospedadoras. Sin embargo, esta opción quedaría descartada *a priori* dado los hábitos alimenticios y los momentos de la temporada en que aparecen a campo los distintos estadios larvales del hospedador. Sólo las larvas de estadio II y III del hospedador son fitófagas (las de estadio I consumen únicamente detritos del suelo), y si bien las hembras de *M. ruficauda* coexisten con dichos estadios del hospedador tardíamente en la temporada, la elección de hábitat al principio de la temporada no podría ser explicada por este tipo de hipótesis.

El hecho de que la hembra de *M. ruficauda* guíe su búsqueda a partir de claves provenientes de o relacionadas con estados o estadios del hospedador que no son el directamente parasitado no

es un caso infrecuente entre los parasitoides. Se ha documentado que los parasitoides pueden dirigirse a fuentes de información de otros estados/estadios del hospedador que no son aquel que es atacado directamente pero que son más fácilmente detectables (Vet *et al.* 1991). Las hembras que son atraídas directamente al hospedador usan generalmente señales asociadas a los sistemas de comunicación sexual de los hospedadores (Vinson 1984), que han sido seleccionados por ser indicadores confiables de la identidad y la localización de los individuos (Feener y Brown 1997). Muchas especies de parasitoides dípteros adoptan esta estrategia de localización del hospedador (Feener y Brown 1997). En el caso de *M. ruficauda*, las claves generadas por el sistema de comunicación sexual del hospedador deberían poder permanecer en el ambiente por un período de tiempo suficiente para poder ser detectadas y explotadas por la hembra parasitoide. En este caso, las claves deberían persistir desde su producción durante la noche por parte de los adultos del hospedador hasta el momento de detección por parte del parasitoide al día siguiente. En relación a esta hipótesis, uno de los factores que podría contribuir a la concentración de las claves es el agrupamiento de los hospedadores que se observa en el campo (Castelo y Capurro 2000).

Además de los desfases espacial y temporal diarios descritos, a los que debe enfrentarse la hembra de *M. ruficauda* en la búsqueda e identificación del hábitat para oviponer, en este sistema parasitoide - hospedador existe un marcado desfase temporal estacional. Las hembras del parasitoide oviponen desde fines de diciembre, y el estadio que busca al hospedador y efectúa el parasitismo (estadio larval II) aparece a campo sólo dos semanas después. El hospedador preferentemente parasitado (estadio larval III de *C. signaticollis*), en cambio, recién aparece a campo hacia fines de febrero. Ello implica que existe una ventana temporal prolongada entre la aparición del estadio que parasita y la ocurrencia efectiva del parasitismo. Este hecho tiene importantes implicancias para el parasitoide. Según la literatura, el parasitoide no se alimenta hasta que se aferra al hospedador, de modo que debe ser capaz de sobrevivir durante muchos días utilizando sus propias reservas energéticas (aquellas depositadas por la hembra en el huevo) hasta siquiera tener la posibilidad de encontrar un hospedador adecuado. Más aún, las larvas de estadio II del parasitoide presentan gran movilidad y altas tasas metabólicas asociadas (Musso 1981), lo cual implica un gasto energético elevado. Los modos en que el parasitoide podría compensar el desfase temporal podrían implicar diversos mecanismos. Por un lado, la distribución temporal por parte de las hembras del número de huevos o de su contenido de nutrientes podría presentar diferencias a lo largo de la temporada reproductiva. Este tipo de estrategias han sido observadas en parasitoides himenópteros en relación al cambio en la expectativa de vida de las hembras (Mayhew y Blackburn 1999, Strand y Casas 2008). Por otro lado, y posiblemente relacionado con la asignación diferencial de recursos de la hembra adulta, se ha visto que la supervivencia de las larvas parasitoides nacidas al principio de la

temporada reproductiva es mayor que la de aquellas nacidas a mediados de la temporada (Crespo 2007, Crespo y Castelo 2010).

La persistencia en el tiempo del sistema *M. ruficauda* - *C. signaticollis* sugiere que deben existir estrategias mediante las cuales el parasitoide compensa en parte los desfases descritos. Dichas estrategias podrían dividirse en dos grupos o etapas. El primer grupo consiste en las estrategias adoptadas por la hembra adulta en relación con la detección del hábitat del hospedador y la asignación diferencial de recursos a los huevos. Contrariamente a lo que ocurre con la mayoría de los parasitoides, las hembras de *M. ruficauda* oviponen en sustratos elevados, maximizando la dispersión de las larvas al nacer, pero también incrementando el riesgo de muerte de las mismas en comparación con especies que oviponen directamente sobre o dentro del hospedador. Por otro lado, los hospedadores se encuentran en el suelo con distribución agregada en parches (Castelo y Capurro 2000). El aumento en el riesgo de muerte para las larvas a medida que pasa el tiempo y la relativamente baja probabilidad de un encuentro con el hospedador resultan en que sea fundamental para las hembras parasitoides poder localizar el hábitat de los hospedadores en forma eficiente. De esta forma, una hembra que sea capaz de discriminar áreas pobladas por hospedadores tendrá mayor probabilidad de que su descendencia se desarrolle exitosamente. Por otro lado, la asignación diferencial de nutrientes a los huevos en diferentes momentos de la temporada reproductiva podría resultar en que una mayor proporción de su progenie tenga una mayor probabilidad de éxito.

El segundo grupo de estrategias que contribuirían a compensar el desfase entre parasitoide y hospedador sería aquel adoptado por las larvas de estadio II del parasitoide. Estas estrategias involucran las decisiones de las larvas de parasitar un determinado hospedador dadas sus características y condición (identidad, estadio, tamaño, contenido de nutrientes, estado previo de parasitismo y estado fisiológico general) y en función de su propio estado fisiológico y expectativa de vida. La elección de la larva de parasitar un hospedador con determinada condición o esperar hasta encontrar uno de mejor calidad estará, por un lado, influenciada por la disminución progresiva en su probabilidad de supervivencia y el uso de los recursos limitados con los que cuenta (provenientes de la asignación de la hembra). Por otro lado, dado que las larvas de *M. ruficauda* permanecen sobre el mismo hospedador hasta completar su desarrollo, la elección implicará la evaluación del hospedador en pos de aumentar el *fitness* en la generación siguiente. En este sentido, la larva se verá enfrentada con la situación de escoger una de dos opciones: esperar a encontrar una mejor unidad de recurso, con el riesgo que ello conlleva, o asegurar la unidad de recurso, es decir, aferrarse al primer hospedador disponible, independientemente de su calidad.

Objetivos de investigación

Contemplando los antecedentes mencionados anteriormente, en esta Tesis se planteó como **OBJETIVO GENERAL:** Estudiar la utilización de recursos en las larvas parasitoides y dilucidar aspectos de la biología de los hospedadores adultos que podrían influir en la detección del hábitat de los hospedadores por parte del parasitoide adulto, teniendo en cuenta los desfases espaciales y temporales típicos del sistema.

A partir de ello, se plantearon los siguientes **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Caracterizar la asignación de nutrientes por parte de las hembras adultas y uso de reservas energéticas en los estados inmaduros del parasitoide *M. ruficauda* previos al evento de parasitismo en distintos momentos de la temporada reproductiva. (Capítulo 3).
2. Determinar cómo afectan las características del ambiente (tipo de sustrato, humedad y temperatura) al desarrollo y muda del primer estadio larval de *M. ruficauda*, con énfasis en el uso de recursos nutricionales provenientes del sustrato. (Capítulo 4).
3. Determinar cómo influye la calidad del hospedador en cuanto a sus características nutricionales sobre las decisiones de las larvas de *M. ruficauda* de utilizarlos como unidad de recurso, en situaciones de mono y superparasitismo. (Capítulo 5).
4. Evaluar y caracterizar la ocurrencia de endotermia en los adultos de *C. signaticollis* como un posible mecanismo facilitador del agrupamiento de hospedadores observado en el campo, y que podría ser explotado por el parasitoide adulto en la selección de hábitat para la oviposición. (Capítulo 6).

En la Figura 1.5 se presenta un resumen gráfico de los interrogantes que se contestan en este trabajo y los procesos y factores involucrados.

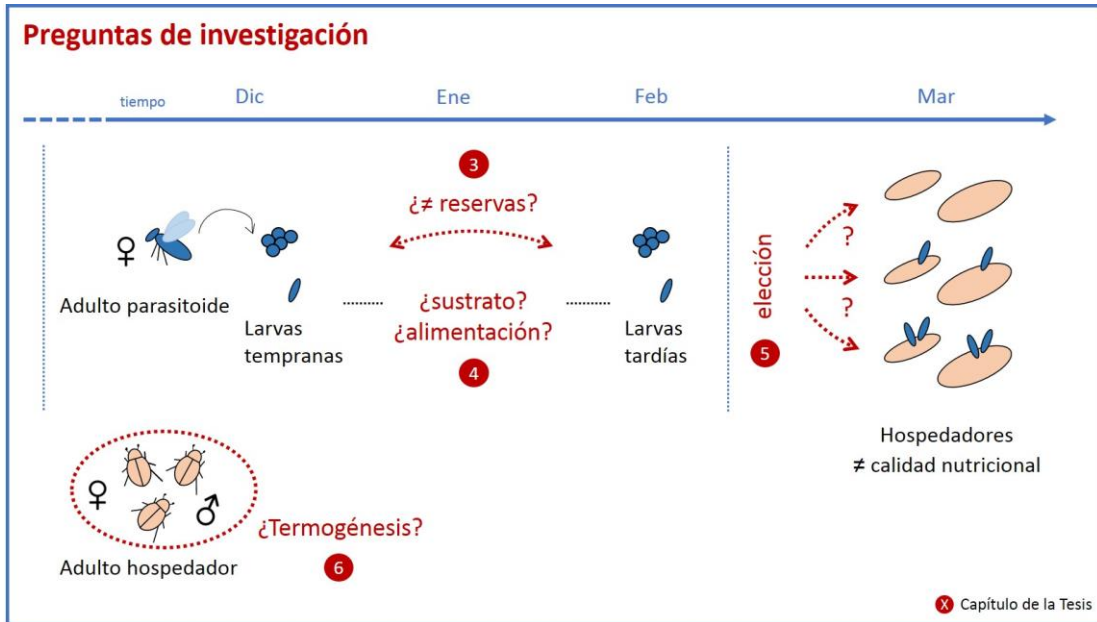


Figura 1.5. Representación gráfica de los interrogantes que se responden en esta Tesis.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos generales

Recolección y mantenimiento de los insectos

La recolección a campo de los insectos utilizados en este trabajo fue realizada en localidades de la provincia de Buenos Aires. En particular, las recolecciones de parasitoides se realizaron en pastizales en las inmediaciones de apiarios, mientras que las de hospedadores se realizaron tanto en localidades asociadas a la ocurrencia del parasitoide como en otros pastizales y bordes de cultivo. Los sitios de colecta se detallan en la Figura 2.1. Todas las larvas parasitoides utilizadas en los experimentos fueron obtenidas de desoves de *M. ruficauda* colectados a campo, a partir de los cuales se criaron los individuos en el laboratorio. En el caso de los hospedadores, los individuos utilizados en los experimentos fueron colectados a campo como larvas de estadio III.



Figura 2.1. Mapa satelital y descripción de los sitios de recolección de insectos. Coordenadas tomadas de Google Earth (*datum*: WGS84, precisión = 0,000001, incerteza = 50 m).

Los desoves de *M. ruficauda* fueron colectados durante la temporada reproductiva del parasitoide, desde finales de diciembre y hasta mediados de marzo, durante los años 2012 a 2016. La colecta se realizó cortando los soportes (ramas secas y frescas) utilizados por las hembras en la oviposición, y guardando los desoves individualmente en tubos Falcon (30 ml), de modo de no dañar la albúmina protectora ni los huevos en su interior, para su traslado al laboratorio (Figura 2.2 A). Los desoves fueron mantenidos en condiciones ambientales de laboratorio. Se observaron los desoves dos veces por día y se separaron larvas recién nacidas según fuera necesario para los experimentos. Las larvas fueron dispuestas de una de dos maneras dependiendo de los experimentos a los que serían sometidas: en forma individual o "solitaria", o en forma grupal o "comunitaria" (Figura 2.2 A).

Las larvas que fueron mantenidas en forma individual fueron colocadas en tubos Eppendorf (1,5 ml) con diferentes sustratos y condiciones ambientales de acuerdo al experimento. Las larvas mantenidas en forma grupal fueron colocadas en recipientes de vidrio (400 ml) con 100 ml de tierra negra de uso comercial para jardinería (*Tierra Fértil*, Carrefour), considerada como equivalente a un sustrato natural. En cada frasco se colocaron larvas de varios desoves nacidas en un lapso de tiempo no mayor a 48 horas, en una densidad promedio entre 400 y 600 larvas por recipiente (4 - 6 larvas / ml de sustrato). Para evitar la desecación del sustrato y minimizar contaminación externa se colocaron folios plásticos entre la tapa y el recipiente. Los recipientes fueron mantenidos en oscuridad y bajo condiciones de temperatura y humedad relativa controladas (25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ HR) hasta la posterior utilización de las larvas en experimentos.

Los hospedadores inmaduros de estadio larval III fueron colectados a campo del suelo de pastizales y bordes de cultivo desde finales del mes de febrero y hasta el mes de agosto, durante los años 2012 a 2016. Para ello se realizaron pozos en la tierra de 30 cm de profundidad, dado que en su medio natural las larvas de *C. signaticollis* y de las especies relacionadas se encuentran a profundidades medias de entre 0 y 15 cm, pudiendo alcanzar los 30 cm (Carmona *et al.* 1994, Guppy y Harcourt 1973, López *et al.* 1994). Los individuos fueron colocados individualmente en recipientes plásticos opacos (30 ml) con tierra proveniente del lugar de colecta para su traslado al laboratorio (Figura 2.2 B). En el laboratorio se reemplazó el sustrato de campo por nuevo sustrato y se llevó a cabo la identificación taxonómica de los individuos utilizando la clave dicotómica para la identificación de estadios inmaduros de escarabeidos de Alvarado (1980). Además, según lo requerían los experimentos, se registró el peso corporal, el sexo y el ancho de la cápsula cefálica de cada larva. Los individuos fueron mantenidos en los recipientes plásticos con alimento *ad libitum* (zanahoria cortada en finas rodajas cuyo tamaño dependía del tamaño del individuo). Semanalmente se realizó la aireación y limpieza de los recipientes, reponiendo alimento y descartando aquel que no hubiera sido ingerido.



Figura 2.2. Colecta y mantención de los individuos experimentales. **A:** parasitoide *M. ruficauda*; **B:** hospedador *C. signaticollis*. Fotografía: desove: P. Zermoglio; frasco: E. Barrantes; gusano en tierra: M. Castelo; gusano: P. Zermoglio, pupa: Kropiewnicki, adulto: Rittner.

Determinación colorimétrica de nutrientes

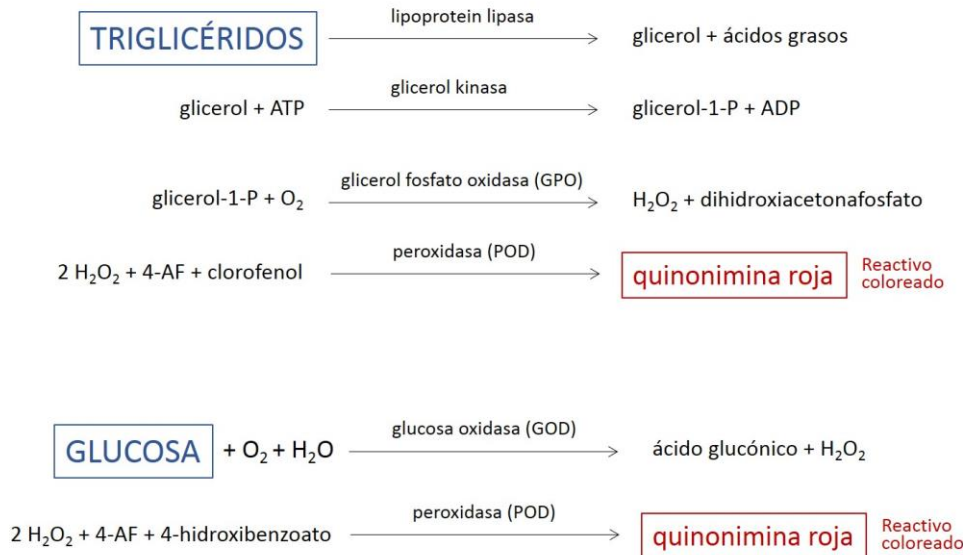
En el presente trabajo se determinaron las concentraciones de nutrientes de los estados inmaduros de los parasitoides y los hospedadores en el marco de diferentes experimentos (Capítulos 3 y 5). Para ello se aplicaron métodos colorimétricos de determinación de concentración de glucosa y triglicéridos utilizando kits pre-formulados de uso médico. El resumen del protocolo experimental se presenta en la Figura 2.3.

Dado el pequeño tamaño de los huevos y las larvas, y los umbrales de detección del método utilizado, la determinación de la concentración de nutrientes en los parasitoides inmaduros (huevos y estadios larvales I y II) se realizó utilizando lotes de huevos y larvas de cada estadio de los tratamientos específicos de cada experimento (detallados en el Capítulo 3). Los lotes de huevos y larvas fueron pesados y congelados a -15°C, luego de lo cual fueron sometidos al mismo protocolo

experimental detallado a continuación para hospedadores inmaduros, exceptuando el paso de secado previo a la determinación. Una vez obtenidos los valores de concentración de nutrientes para cada lote, se calcularon las respectivas concentraciones por individuo dividiendo los valores por el tamaño del lote.

La determinación de la concentración de nutrientes en los hospedadores inmaduros de estadio larval III se realizó en forma individual para cada hospedador. Los hospedadores fueron colectados a campo, sexados y se registró su peso corporal y el ancho de su cápsula cefálica, como se explicó anteriormente, luego de lo cual fueron congelados a -15°C . Se establecieron dos grupos de individuos: un grupo que sería secado previo a la determinación de nutrientes (“secos”) y un grupo que sería procesado sin secado (“húmedos”). Dado que en los experimentos sucesivos se ofrecen a las larvas parasitoides hospedadores vivos, el análisis de los individuos húmedos presenta un mejor estimador de las características de los hospedadores que las larvas parasitoides encuentran a campo. Los individuos que fueron secados, por otro lado, permitieron determinar la concentración de nutrientes respecto del peso seco (unidad de medida estándar utilizada en la literatura). El secado se realizó en estufa a $50 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante cinco días (ajustado a partir de Matzkin *et al.* 2009, 2011), colocando a los individuos sobre cajas de Petri abiertas, luego de lo cual se registró su peso seco (Figura 2.3). Cada insecto seco fue molido en un tubo Eppendorf conteniendo $300 \mu\text{l}$ de buffer fosfato ($1\times, 0,025 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7,4$) utilizando un molinillo eléctrico, que facilita la disgregación completa de los tejidos. Luego se agregaron otros $700 \mu\text{l}$ de buffer fosfato, se homogeneizó la solución utilizando un agitador vórtex durante 10 segundos y se centrifugó la muestra a 12.000 rpm durante 3 minutos (Figura 2.3). En el caso de los individuos húmedos, la disgregación se realizó sin buffer, agregando luego $1.000 \mu\text{l}$ del mismo antes de homogeneizar y centrifugar. Del sobrenadante, $800 \mu\text{l}$ fueron separados en nuevos tubos Eppendorf para su utilización en la determinación de nutrientes y conservados en congelador a -15°C .

Para la determinación de la concentración de nutrientes se utilizaron kits comerciales de uso médico: TG Color GPO/PAP AA para triglicéridos y Glicemia enzimática AA para glucosa (ambos de Laboratorios Wiener, Argentina). Los fundamentos de los métodos de determinación de la concentración de ambos nutrientes se basan en reacciones que producen el compuesto coloreado quinonimina, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración inicial de nutriente, y se ejemplifican en los siguientes esquemas de reacción (modificados de los protocolos provistos por Laboratorios Wiener).



Tanto para la reacción de triglicéridos como para la de glucosa, se colocaron 10 µl de muestra y 1 ml del reactivo, se homogeneizaron las soluciones utilizando un agitador vórtex durante 10 segundos y se incubaron por 20 o 25 minutos, para triglicéridos y glucosa, respectivamente (Figura 2.3). Transcurrido el tiempo de reacción correspondiente, se sembraron 200 µl de dicha mezcla por pocillo en una microplaca para la lectura de absorbancia en espectrofotómetro de placas, a longitud de onda de 490 nm (Biotek ELx808, Bad Friedrichshall, Alemania). Conjuntamente con la medición de las muestras, se leyeron las absorbancias de soluciones estándares de diferentes concentraciones, haciendo reaccionar 10 µl de solución estándar con 1 ml del reactivo e incubando como se explicó antes (Figura 2.3). Las concentraciones mínimas y máximas a utilizar para los estándares fueron determinadas en ensayos previos. En el caso de triglicéridos, en cada placa de lectura se utilizaron estándares de concentraciones 20, 50, 80, 150, 207, 250 y 400 µg/ml; en el caso de glucosa, en cada placa de lectura se utilizaron estándares de concentraciones 25, 75, 125, 250, 375, 500, 625 y 1.250 µg/ml. Los diferentes estándares se compusieron a partir de la dilución de soluciones estándar “madre” provistas en los kits comerciales. En todos los casos, y para descartar posibles errores de lectura, las muestras de cada individuo y de las soluciones estándar fueron sembradas a repetición en tres pocillos distintos por placa (Figura 2.3) y se promediaron los respectivos valores de absorbancia obtenidos. Además, se sembraron por placa tres pocillos de solvente (“blanco”), cuyo valor promedio fue restado de cada valor de absorbancia. Siendo que se utilizaron varias microplacas de lectura y que las lecturas fueron realizadas en distintos momentos, cada microplaca contó con un set de estándares del nutriente a medir y las muestras sólo fueron evaluadas en términos de los estándares sembrados en la misma microplaca (ver más abajo).

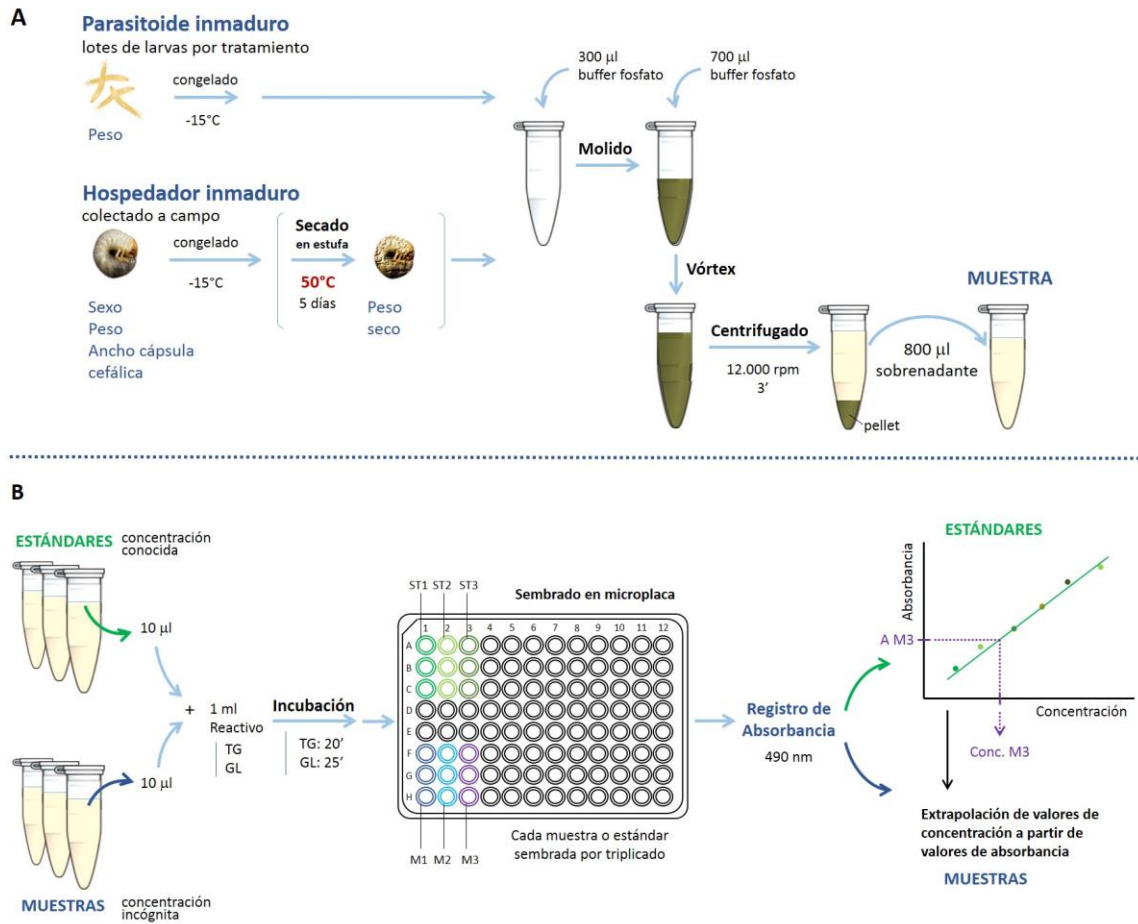


Figura 2.3. Protocolo experimental para la determinación de la concentración de triglicéridos y glucosa en parasitoides y hospedadores inmaduros. **A:** Preparación de las muestras. **B:** Reacción colorimétrica y medición de la concentración de triglicéridos y glucosa. Referencias: TG: triglicéridos, GL: glucosa, ST: estándar, M: muestra, A: absorbancia, Conc.: concentración.

Con las mediciones de absorbancia obtenidas para las diferentes concentraciones de estándares se confeccionaron curvas de concentración en función de la absorbancia para cada nutriente. Para conocer la relación entre la concentración de los estándares y la absorbancia se llevaron a cabo análisis de regresión lineal utilizando la función básica "lm" ("linear model") del programa R (R Development Core Team, 2008). Dicha función calcula el coeficiente de correlación entre las dos variables, estima los parámetros de la recta de regresión y evalúa el ajuste de cada parámetro. Dado que se espera que el cero de absorbancia corresponda a concentración cero, la intersección de la recta con los ejes se fijó en el origen de coordenadas. El ajuste de las rectas de regresión fue realizado sobre cada set de estándares ensayado. Utilizando los modelos obtenidos para los estándares de ambos nutrientes y a partir de los datos de absorbancia de las muestras de interés en cada experimento, se calcularon las concentraciones de ambos nutrientes en las muestras. La concentración de cada muestra fue calculada a partir del modelo construido para los estándares correspondientes a la microplaca de lectura en que la muestra fue sembrada.

CAPÍTULO 3

Disponibilidad y utilización de recursos nutricionales en los estados inmaduros de *M. ruficauda* en la etapa de pre-parasitismo

Introducción

En los animales, la cantidad y balance de nutrientes disponibles son fundamentales para el desarrollo. Los requerimientos nutricionales de los individuos responden no sólo a las características fisiológicas de la especie, sino también a demandas metabólicas inmediatas relacionadas con actividades o circunstancias particulares (Simpson y Raubenheimer 2011). En los insectos, los nutrientes disponibles, ya sea en forma de reservas o adquiribles a través de la alimentación, deben ser suficientes para su mantenimiento corporal, para soportar el crecimiento de sus tejidos y el proceso de muda y, en el caso de los adultos, para llevar a cabo la reproducción (Chapman 1998, Simpson y Raubenheimer 2011). Mientras que los micronutrientes son necesarios en cantidades mínimas para el desarrollo de ciertos procesos, los aminoácidos, los hidratos de carbono y los lípidos constituyen los nutrientes principales y son aquellos que determinan la ocurrencia de la mayoría de los procesos metabólicos (Chapman 1998). En líneas generales, mientras que los aminoácidos son mayormente utilizados para la formación de proteínas, con funciones enzimáticas y estructurales, los hidratos de carbono y los lípidos son los componentes de reserva energética, los que constituyen el “combustible” con que los organismos llevan a cabo las actividades cotidianas. Entre los hidratos de carbono, la glucosa es mayormente utilizada para satisfacer demandas energéticas instantáneas tales como el movimiento, y el desarrollo de muchas actividades depende de su disponibilidad inmediata (Chapman 1998, Jervis *et al.* 2008). En cuanto a los lípidos, además de formar parte de las membranas celulares, constituyen la principal forma de almacenamiento de energía, dada su menor relación volumen-valor energético respecto a los hidratos de carbono (Chapman 1998).

En los insectos parasitoides, como en todos los insectos, la manera en que los distintos tipos de nutrientes son utilizados durante la vida de los individuos varía de acuerdo a su estado de desarrollo, a su condición fisiológica y a las actividades y procesos que desarrollan, *e.g.*, mantenimiento corporal, oviposición, muda (Rivero y Casas 1999a, Strand y Casas 2008). El uso de los nutrientes durante los distintos estados de vida y en diferentes momentos dentro de cada estado puede verse influenciado por cambios en la dieta o en el metabolismo de los individuos (Casas *et al.* 2005, O'Brien *et al.* 2004). La asignación de recursos a la reproducción está determinada por el balance entre la mantención corporal de la hembra y la inversión en la producción de huevos, y dicho balance es particularmente importante en las hembras parasitoides que presentan algún grado de sinovigenia (*i.e.*, deben madurar los huevos durante su etapa adulta; Bezemer *et al.* 2005, Boggs 1981, Rivero y Casas 1999b, Strand y Casas 2008). La variación en la producción de huevos depende de la plasticidad fenotípica de las hembras en la asignación de recursos a la reproducción (Ellers y van Alphen 1997, Jervis *et al.* 2008) y dicha inversión se ve afectada por diversos factores,

entre los que se encuentra fundamentalmente su estado nutricional (Bezemer *et al.* 2005, Ellers y van Alphen 1997, Giron *et al.* 2004, Jervis *et al.* 2008). En la mayoría de los parasitoides sinovigénicos los recursos involucrados en la reproducción son adquiridos en gran medida durante la etapa larval y son asignados a las reservas teneales que se destinan al mantenimiento somático (lo cual aumenta el tiempo disponible para reproducción), a la locomoción, y a la maduración de los huevos (Jervis *et al.* 2008). Cada uno de los tres componentes involucrados en las reservas teneales (hidratos de carbono en la forma de azúcares simples y glucógeno, lípidos y proteínas) (Chapman 1998), ha sido relacionado en la literatura con funciones particulares. Los hidratos de carbono se utilizan principalmente para mantenimiento corporal y locomoción, y se ha reportado que una mayor disponibilidad de estos compuestos está relacionada con un aumento de la longevidad (Giron *et al.* 2004), pero también pueden contribuir a la ovogénesis en especies sinovigénicas (Jervis *et al.* 2008). Las reservas de lípidos se utilizan tanto para funciones somáticas como para la producción de huevos (Ellers y van Alphen 1997, Jervis *et al.* 2008), habiéndose reportado que mayores reservas de lípidos aumentan la fecundidad (Ellers y van Alphen 1997, Giron *et al.* 2004, Jervis *et al.* 2008). En cuanto a las proteínas, en algunas especies son fundamentales para el vuelo y serían utilizadas también en la producción de huevos (Chapman 1998), aunque sus efectos sobre la fecundidad y la longevidad son discutidos (Giron *et al.* 2004).

Además de contar con las reservas teneales, en general los parasitoides se alimentan también durante su etapa adulta, o bien del mismo hospedador (*host feeding*) o bien de otras fuentes, es decir, cuentan con “recursos de ingreso” (Heimpel y Collier 1996, Jervis y Kidd 1986, Jervis *et al.* 1993, Jervis *et al.* 2008, Rivero y Casas 1999a, Strand y Casas 2008). En los adultos sinovigénicos, estos recursos son utilizados como suplemento o para reaprovisionar algunas de las reservas de nutrientes teneales, y pueden tener una doble función de mantención corporal y ovogénesis (Giron *et al.* 2004, Jervis *et al.* 2008). Por ejemplo, los hidratos de carbono obtenidos por el adulto mediante la alimentación influyen positivamente las actividades de locomoción (Desouhant *et al.* 2005, Forsse *et al.* 1992, Pompanon *et al.* 1999) e incrementan la longevidad y la supervivencia tanto en parasitoides idiobiontes como en koinobiontes (Casas *et al.* 2005, Giron *et al.* 2004, Jervis *et al.* 2008, Strand y Casas 2008). De la misma manera, se ha visto que en adultos idiobiontes las proteínas y carbohidratos obtenidos al alimentarse de un hospedador aumentan la producción de huevos ricos en vitelo al permitir a las hembras invertir menor cantidad de reservas teneales de lípidos en funciones de mantención corporal (Rivero y Casas 1999b, Rivero *et al.* 2001). La mayoría de los koinobiontes adultos, en cambio, no se alimentan de sus hospedadores sino de otras fuentes como néctar y polen (Jervis *et al.* 1993, Thompson 1999), y es posible que muchas especies hayan desarrollado estrategias compensatorias inherentes a aumentar la adquisición de

nutrientes durante su desarrollo, como ocurre en otros grupos de insectos (O'Brien *et al.* 2002, 2004). En suma, el balance energético entre mantención corporal y producción de huevos, y por ende la fecundidad, se ven influenciados por la alimentación del adulto, y se ha reportado en diversas especies que adultos alimentados producen una cantidad de huevos significativamente mayor que adultos hambreados, incluso cuando otros parámetros como la longevidad permanecen constantes (Ellers y van Alphen 1997, Jervis *et al.* 2008, Rivero y West 2005, Ueno y Ueno 2007).

Las teorías clásicas formuladas respecto de los factores que modulan la fecundidad de las hembras parasitoides se han desarrollado en función del comportamiento y la fisiología de parasitoides himenópteros. En estos parasitoides, dos hipótesis contrapuestas explicarían la relación entre la supervivencia de la progenie y la fecundidad de la hembra (Jervis *et al.* 2008, Mayhew y Blackburn 1999). La primera hipótesis, planteada por Price (1973) y referida como de “mortalidad balanceada”, indica que la fecundidad está relacionada con la estrategia del parasitoide en cuanto al uso del hospedador (Price 1973, Mayhew y Blackburn 1999, Strand y Casas 2008). Los parasitoides idiobiontes atacan por regla general estadios larvales tardíos del hospedador que presentan mayor supervivencia, y de este modo reducen la mortalidad de la progenie del parasitoide. Esta menor mortalidad reduce a su vez la necesidad de las hembras de invertir en alta fecundidad, pudiendo asignar más recursos por huevo. En los parasitoides koinobiontes ocurriría todo lo contrario, habiéndose seleccionado entonces una alta fecundidad con tamaño de huevos menores (Mayhew y Blackburn 1999, Strand y Casas 2008). La segunda hipótesis, de “inversión óptima” (Pexton y Mayhew 2002), postula en cambio que la baja disponibilidad de estadios tardíos del hospedador, y no su mortalidad reducida, sería el agente de selección clave que aumentaría la inversión parental en la supervivencia del adulto a costa de la fecundidad. Si bien ambas hipótesis han recibido cierto grado de apoyo, parecería no existir una regla general, y se encuentra en la literatura evidencia de la ocurrencia de ambos escenarios (Jervis *et al.* 2008, Mayhew y Blackburn 1999, Pexton y Mayhew 2002).

En lo que respecta a las larvas parasitoides, existen diferencias en cuanto a la adquisición y uso de nutrientes dependiendo de la estrategia de búsqueda del hospedador. En especies en las cuales la hembra es quien realiza la búsqueda activa del hospedador, las larvas, que nacen sobre o dentro del él, cuentan con el recurso que les ha sido asegurado por la hembra. En este sentido, en el estado larval de estas especies puede identificarse una única etapa amplia de nutrición que involucra el consumo del hospedador hasta completar su desarrollo, y donde el factor principal que determina la dinámica energética de las larvas son las características nutricionales del hospedador. En cambio, en los parasitoides en los cuales son las larvas quienes llevan a cabo la búsqueda activa del hospedador pueden identificarse dos etapas nutricionales, pre- y post-parasitismo (ver Capítulo

1). Durante dichas etapas, la dinámica de adquisición y utilización de nutrientes es diferente, ya que depende de fuentes energéticas de distinta naturaleza. Durante el pre-parasitismo las larvas parasitoides deben subsistir utilizando los recursos que fueron asignados por las hembras adultas a los huevos y eventualmente con recursos que obtienen del medio ambiente. De este modo, las reservas asignadas por las hembras toman un rol preponderante en el éxito temprano de las larvas buscadoras, dado que dichos recursos deben ser suficientes para sostener la actividad del individuo hasta encontrar al hospedador. La etapa de post-parasitismo puede considerarse similar a la de consumo del hospedador en las especies en que las hembras son las que buscan, en cuanto toman preponderancia las características nutricionales del hospedador.

El parasitoide *M. ruficauda* presenta una serie de características que lo constituyen en un caso interesante para el estudio de la dinámica energética de las larvas parasitoides. En primer lugar, en esta especie son las larvas quienes llevan a cabo la búsqueda activa del hospedador. En particular, como se mencionó anteriormente, las larvas de estadio II son las únicas capaces de orientarse y aferrarse al hospedador, muriendo si el parasitismo no es exitoso (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2008, 2010). Para lograr el encuentro del hospedador, se espera que las larvas cuenten con las reservas energéticas suficientes para asegurar su supervivencia en el ambiente durante la búsqueda. En segundo lugar, se ha sugerido que las larvas no se alimentan hasta que se aferran al hospedador (Castelo y Lazzari 2004, Crespo y Castelo 2010, Copello 1922, 1927, 1942, Musso 1983), lo cual implica que hasta dicho momento no cuentan con recursos de ingreso, sino solamente con los recursos asignados por las hembras a los huevos. De esta forma, las reservas energéticas con que cuentan las larvas de estadio II para llevar a cabo la búsqueda del hospedador se compondrán de aquellos nutrientes que no hayan sido consumidos en el mantenimiento corporal y en el proceso de muda del primer estadio al segundo. En tercer lugar, el ciclo de vida de *M. ruficauda* se encuentra desfasado temporalmente respecto al del hospedador. El estadio del hospedador que es atacado preferentemente aparece a campo muchas semanas después de que las primeras hembras de *M. ruficauda* comienzan a oviponer (Castelo 2003, Crespo y Castelo 2010). De esta forma, las larvas que nacen temprano en la temporada deben esperar al hospedador durante un período de tiempo prolongado, sobreviviendo con sus propias reservas. Se ha visto que las larvas nacidas al principio de la temporada reproductiva presentan una mayor supervivencia, lo cual les permitiría esperar al hospedador en el ambiente por más tiempo (Crespo 2007). A nivel individual, se espera que la mayor supervivencia pudiera deberse a una de dos posibles estrategias: 1) que las larvas tempranas cuenten con una mayor cantidad de recursos disponibles que las larvas tardías debido a una asignación diferencial de las hembras, o 2) teniendo igual cantidad de recursos que las larvas tardías, que las larvas tempranas presenten una tasa de utilización menor de los nutrientes, tal que le fueran

suficientes hasta la aparición del hospedador. La segunda hipótesis parecería *a priori* menos probable dado que las larvas de estadio II mueren si no logran parasitar (Crespo y Castelo 2010), y se espera por ende un gran gasto de energía asociado a un comportamiento activo constante de búsqueda del hospedador para garantizar su supervivencia. En cuanto a la inversión energética de las hembras, a nivel poblacional, se espera que a principios de la temporada reproductiva las hembras pudieran tomar una de dos posibles estrategias: 1) poner mayor número de huevos con menor cantidad de vitelo, o 2) poner menor cantidad de huevos con mayor contenido de reservas cada uno. Dado que se espera que a nivel individual las larvas tempranas cuenten con mayor cantidad de recursos que permitan su mayor supervivencia, se espera asimismo que la estrategia de la hembra fuera poner menor cantidad de huevos más ricos en vitelo al principio de la temporada.

Dados los antecedentes expuestos, en el presente capítulo de la Tesis se planteó como **Objetivo General:** caracterizar la disponibilidad y uso de reservas energéticas (glucosa y triglicéridos) en distintos momentos de la temporada reproductiva (principio y fin) para distintos momentos de la vida del parasitoide *M. ruficauda* (huevos y larvas de los dos primeros estadios). Se plantearon como **Objetivos particulares:** 1) determinar si las hembras adoptan estrategias reproductivas diferentes en cuanto al número de huevos puestos por desove y la cantidad de nutrientes por huevo en distintos momentos de la temporada reproductiva; 2) determinar si las larvas de principio y final de temporada tienen una composición de reservas energéticas diferente, lo cual explicaría la mayor supervivencia de las larvas tempranas; 3) caracterizar la composición de reservas de las larvas de estadio I y de estadio II antes y después del proceso de búsqueda del hospedador; y 4) determinar si la tasa de utilización de reservas es similar en larvas nacidas al principio y al final de la temporada reproductiva.

Materiales y métodos

Con el fin de evaluar si la asignación de recursos de las hembras a los huevos y la disponibilidad de recursos en huevos y larvas son diferentes respecto del momento de la temporada reproductiva se colectaron desoves a campo al principio y al final de la temporada. Dado que las hembras de *M. ruficauda* oviponen desde fines de diciembre hasta mediados de marzo, se consideraron como de principio de temporada desoves puestos hasta el 15 de enero y como de final de temporada desoves puestos desde el 16 de febrero y hasta los últimos desoves de marzo.

Huevos

Para evaluar los recursos asignados por las hembras a los huevos se consideraron tanto el número de huevos por desove como su composición de reservas en diferentes momentos de la temporada reproductiva. Primeramente, se tomaron al azar grupos de desoves de cada momento de la temporada del conjunto de desoves colectados (35 desoves iniciales y 28 tardíos, Figura 3.1) y se contabilizó el número de huevos por desove bajo lupa binocular. Para ello se disolvió la albúmina protectora de los desoves con ácido acético glacial (1-2 gotas 10%), luego de lo cual se efectuaron 3 lavados consecutivos con agua destilada, cada uno de igual volumen al tratamiento con ácido. En los casos de desoves en los que algunos huevos ya habían eclosionado se contabilizó el número de coriones, que permanecen unidos a la ooteca). Se comparó el número de huevos por desove en cada momento de la temporada mediante una prueba U de Mann-Whitney (Zar 2010).

Para cuantificar las reservas energéticas de los huevos se separaron, de desoves recién colectados utilizados para el conteo previo, lotes de 100 huevos por desove, los cuales fueron congelados a -80°C para su uso posterior. Se llevó a cabo la determinación de la concentración de triglicéridos y glucosa por medio de los protocolos colorimétricos explicados en el Capítulo 2. Para analizar las diferencias entre las concentraciones de glucosa y triglicéridos de los huevos de cada momento de la temporada, se incorporaron los datos en modelos lineales generales (GLMs) que incluyen las correspondientes concentraciones en larvas de estadios I y II.

Larvas

Los desoves utilizados para obtener larvas se mantuvieron separados individualmente hasta la eclosión de los huevos de la manera que se detalla en el Capítulo 2. Para el desarrollo de todos los experimentos detallados a continuación las larvas fueron separadas individualmente al momento de su nacimiento en tubos Eppendorf conteniendo sustrato natural (tierra), donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60 - 70% HR ambiente).

Con el fin de determinar cómo afectan la muda y la espera del hospedador a la distribución y el uso de nutrientes por parte de las larvas, se realizaron experimentos en los que se separaron tres lotes de larvas por desove de un total de 22 desoves de principios de temporada y 15 desoves de final de temporada (Figura 3.1). Los tamaños de los lotes se escogieron teniendo en cuenta la tasa de mortalidad de las larvas, de modo de asegurar un número de individuos suficiente transcurrido el experimento, como se detalla a continuación. Las larvas del primer lote (20 individuos/desove) fueron inmediatamente congeladas a -80°C al momento del nacimiento (larvas recién nacidas). Las larvas de ambos lotes restantes fueron mantenidas individualmente en tubos Eppendorf con sustrato natural y se les realizó un seguimiento diario para registrar el evento de muda. Las larvas

del segundo lote (30 individuos/desove) fueron congeladas a -80°C el día en que ocurrió la muda (larvas recién mudadas). Por último, las larvas del tercer lote (30 individuos/desove) fueron mantenidas en los tubos hasta 30 días después del día de muda, tiempo que se consideró de espera del hospedador. En estos casos, para aumentar la superficie de búsqueda y dado que las larvas presentan geotropismo positivo, tendiendo a ubicarse y permanecer en el extremo del tubo, los mismos fueron mantenidos en posición horizontal. Una vez cumplidos los 30 días, las larvas fueron congeladas a -80°C para la posterior medición de sus reservas energéticas. Los lotes de larvas congeladas fueron sometidos a protocolos de cuantificación colorimétrica de triglicéridos y glucosa como se especifica en el Capítulo 2. Dado que luego de llevar a cabo ensayos preliminares (no mostrados) se comprobó que los métodos de detección utilizados requieren un volumen mínimo de muestra, fue necesario agrupar larvas de distintos desoves. Para ello, a cada larva individual se le asignó un número al azar y se conformaron grupos de larvas, seleccionadas al azar de entre el total disponible para cada momento de la temporada y para cada momento de vida. De esta forma, si bien el número total de réplicas se vio reducido, se garantizó la aleatoriedad e independencia de las muestras. Las muestras sobre las cuales se realizaron las mediciones de nutrientes correspondieron entonces a seis tratamientos: estadio I recién nacidas de principio de temporada ($N = 7$), estadio I recién nacidas de fin de temporada ($N = 5$), estadio II recién mudadas de principio de temporada ($N = 9$), estadio II recién mudadas de fin de temporada ($N = 6$), estadio II con tiempo de espera del hospedador de principio de temporada ($N = 8$), y estadio II con tiempo de espera del hospedador de fin de temporada ($N = 6$). El número de larvas utilizadas por réplica en cada tratamiento se detallan en la Tabla 9.1 del Capítulo 9.

Con el fin de evaluar la disponibilidad de nutrientes en distintos momentos de la temporada reproductiva, se construyeron modelos lineales generales (GLMs) con distribución de error normal y función de enlace identidad. Las variables respuesta fueron la concentración media de glucosa y la concentración media de triglicéridos ($\mu\text{g/ml}$), y los predictores fueron el momento de la temporada (2 niveles: larvas tempranas y tardías) y el momento de vida (cuatro niveles: huevos, larvas I recién nacidas, larvas II recién mudadas y larvas II que han sido sometidas a un tiempo de espera). Se construyeron modelos con y sin interacción entre los predictores, que fueron comparados utilizando la función *anova* y a partir de los valores de AIC (criterio de información de Akaike) se escogió el modelo de mejor desempeño para evaluar los resultados. Luego, para comparar el efecto de los niveles de los predictores, se realizaron comparaciones múltiples *a posteriori* utilizando la prueba de rangos de Tukey (Tukey's HSD, función *glht* del paquete *multcomp* del programa R, Hothorn *et al.* 2016).

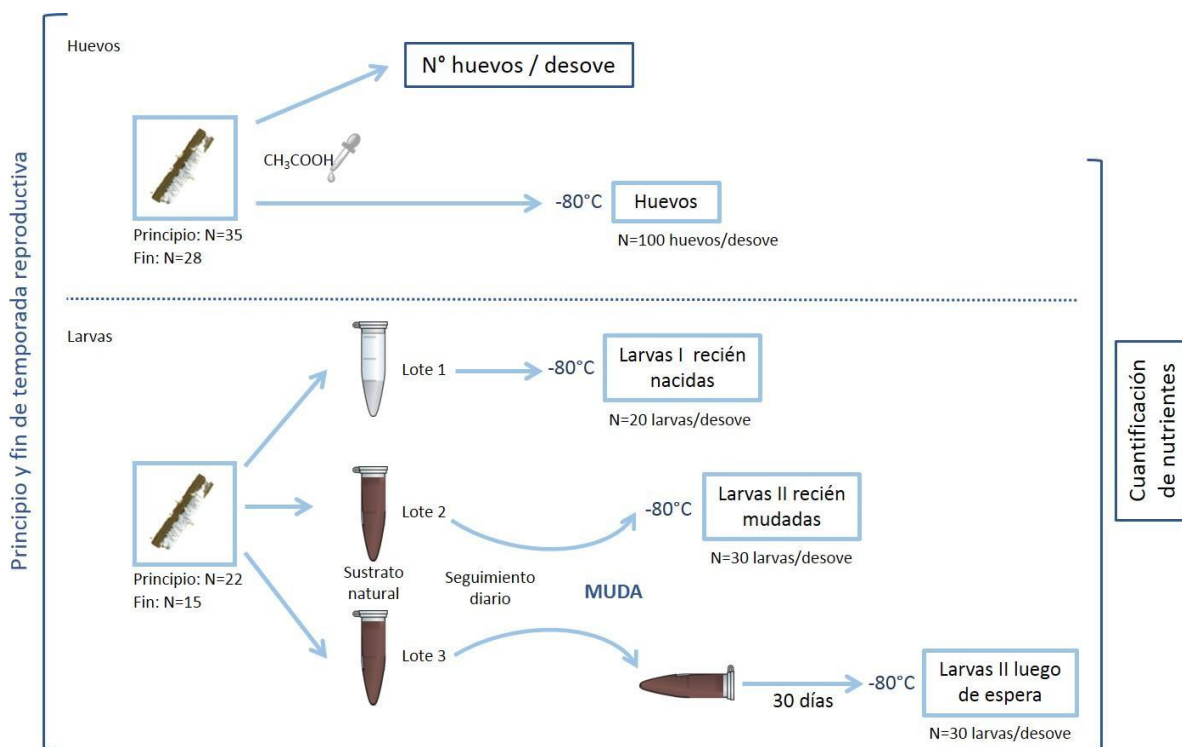


Figura 3.1. Protocolo experimental y métodos empleados en la determinación del contenido de nutrientes de los huevos y la utilización de dichos recursos por parte de las larvas de estadio I y de estadio II de *M. ruficauda* (utilización de recursos en el proceso de muda y durante la espera del hospedador).

Resultados

El número de huevos promedio por desove no difirió dependiendo del momento de la temporada ($U = 426,5$ $p = 0,384$): a principio de temporada fue de $465,20 \pm 154,93$ y a fin de temporada de $432 \pm 161,15$ (Figura 3.2).

De los lotes de larvas dispuestos para los ensayos de medición de nutrientes algunas murieron durante el experimento, contándose al final del mismo con un total de 440 larvas de estadio I, 552 larvas de estadio II recién mudadas y 462 larvas de estadio II que transcurrieron 30 días esperando a su hospedador. Dichas larvas fueron agrupadas al azar como se explica en la sección Materiales y métodos de este capítulo.

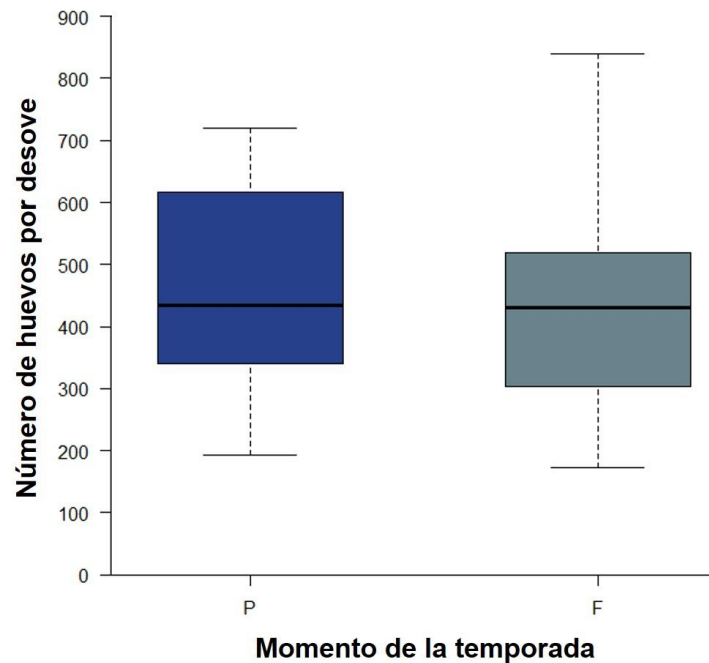


Figura 3.2. Número de huevos por desove de *M. ruficauda*, a principios (P) y final de temporada (F).

Para evaluar la concentración de glucosa en diferentes etapas de la vida y en distintos momentos de la temporada se desarrollaron dos modelos, uno con interacción y otro sin interacción entre estos factores. En el primer modelo se obtuvo una interacción no significativa. La comparación entre modelos mostró que no hubo diferencias significativas entre los modelos ($p = 0,291$), y que, a partir de los valores de AIC (-191,62 y -193,51 incluyendo y excluyendo interacción respectivamente) el modelo sin interacción mostró un mejor desempeño. Por estos motivos, se conservó el modelo sin interacción y se evaluaron los efectos principales de cada factor. Las concentraciones de glucosa promedio halladas para cada tratamiento se detallan en la Tabla 3.1. La concentración de glucosa promedio no difirió entre momentos de la temporada (Tablas 3.1 y 3.2, Figura 3.3). La concentración de glucosa promedio de los huevos fue similar a la encontrada en larvas de estadio I recién nacidas pero significativamente mayor que aquella encontrada en las larvas de estadio II, para ambos momentos de la temporada (Tablas 3.1 y 3.3, Figura 3.3).

Tabla 3.1. Concentración de glucosa y triglicéridos en huevos y larvas de *M. ruficauda*. Referencias: H: huevo; LI: larva de estadio I recién nacida; LII: larva de estadio II recién mudada; LII+: larva de estadio II que ha esperado al hospedador durante 30 días. Valores promedio por individuo \pm error estándar.

Nutriente	Momento de la vida	Momento de la temporada	
		Principio	Final
Glucosa (ug/ml)	H	0,269 \pm 0,057	0,241 \pm 0,013
	LI	0,184 \pm 0,004	0,178 \pm 0,019
	LII	0,166 \pm 0,015	0,117 \pm 0,014
	LII+	0,161 \pm 0,031	0,102 \pm 0,009
Triglicéridos (ug/ml)	H	0,393 \pm 0,027	0,347 \pm 0,034
	LI	0,885 \pm 0,125	0,960 \pm 0,242
	LII	0,626 \pm 0,060	0,560 \pm 0,125
	LII+	0,511 \pm 0,124	0,664 \pm 0,123

Tabla 3.2. Concentración promedio de glucosa en huevos y larvas de *M. ruficauda*. Modelo lineal general sin interacción, evaluando el efecto del momento de la temporada y del momento de la vida. Referencias: MomP: principio de temporada, MomF: final de temporada, LI: larva de estadio I recién nacida, LII: larva de estadio II recién mudada, LII+: larva de estadio II que ha esperado al hospedador durante 30 días.

	Estimador	Error estándar	Valor t	Valor p
Huevo, MomP (intercepto)	0,222	0,014	16,164	< 0,001
LI	-0,042	0,019	-2,226	0,030
LII	-0,087	0,018	-4,783	< 0,001
LII+	-0,106	0,019	-5,701	< 0,001
MomF	-0,004	0,019	-0,277	0,783

Tabla 3.3. Concentración promedio de glucosa en huevos y larvas de *M. ruficauda*. Comparaciones entre los distintos tratamientos. Salida del programa R mostrando los resultados de la prueba de rangos de Tukey. Referencias: H: huevo; LI: larva de estadio I recién nacida; LII: larva de estadio II recién mudada; LII+: larva de estadio II que ha esperado al hospedador durante 30 días.

Comparación	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
LI - H	-0,042	0,019	-2,226	0,115
LII - H	-0,087	0,018	-4,783	< 0,001
LII+ - H	-0,106	0,019	-5,701	< 0,001
LII - LI	-0,044	0,022	-2,021	0,178
LII+ - LI	-0,064	0,022	-2,860	0,021
LII+ - LII	-0,019	0,021	-0,909	0,798

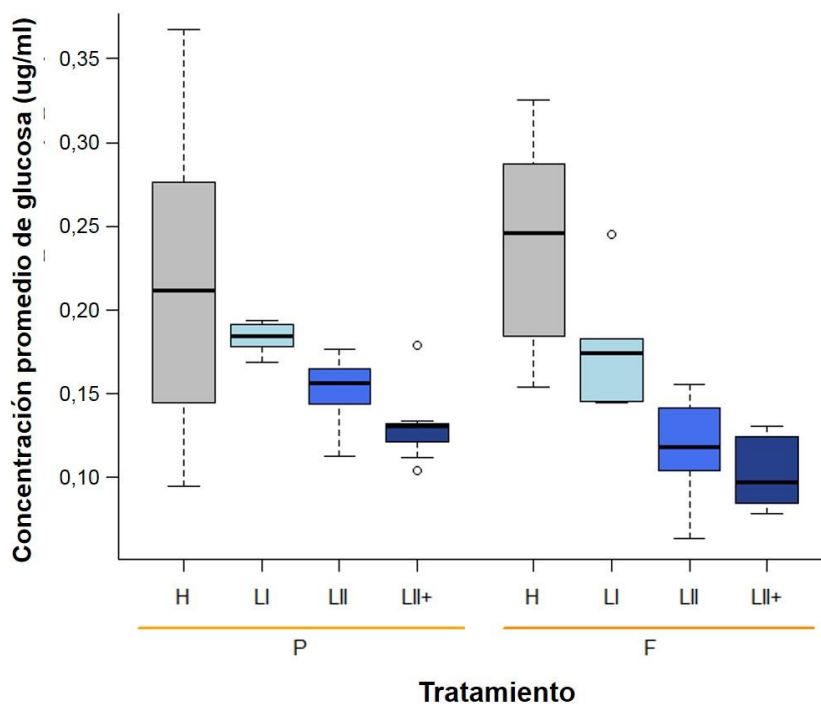


Figura 3.3. Concentración promedio de glucosa en huevos (H), larvas de estadio I recién nacidas (LI), larvas de estadio II recién mudadas (LII) y larvas de estadio II que han esperado al hospedador por 30 días (LII+) de *M. ruficauda*, de principios (P) y final (F) de la temporada reproductiva.

Para evaluar la concentración de triglicéridos en diferentes etapas de la vida y en distintos momentos de la temporada se construyeron dos modelos, uno con interacción y otro sin interacción entre estos factores. En el primer modelo se obtuvo una interacción no significativa. La comparación entre modelos mostró que no hubo diferencias significativas entre los mismos ($p = 0,607$) y que, a partir de los valores de AIC (AIC = 19.724 y 15.764 incluyendo y excluyendo interacción respectivamente), el modelo sin interacción muestra un mejor desempeño. Por estos motivos, se conservó el modelo sin interacción y se evaluaron los efectos principales de cada factor. La concentración promedio de triglicéridos hallada para cada tratamiento se detalla en la Tabla 3.1. La concentración promedio de triglicéridos no difirió entre momentos de la temporada (Tablas 3.1 y 3.4, Figura 3.4). En cuanto a los distintos momentos de la vida, la concentración promedio de triglicéridos de los huevos fue significativamente menor que la encontrada en las larvas de estadio I recién nacidas y de estadio II recién mudadas y marginalmente menor que aquella encontrada en larvas de estadio II que han esperado al hospedador (Tablas 3.1 y 3.5, Figura 3.4). A su vez, las larvas de estadio I recién nacidas presentaron una concentración promedio de triglicéridos mayor que las larvas de estadio II (Tablas 3.1 y 3.5, Figura 3.4). No se encontraron diferencias significativas en la concentración promedio de triglicéridos entre larvas de estadio II recién mudadas y de estadio II que han esperado al hospedador por 30 días (Tablas 3.1 y 3.5, Figura 3.4).

Tabla 3.4. Concentración promedio de triglicéridos en huevos y larvas de *M. ruficauda*. Modelo lineal general sin interacción, evaluando el efecto del momento de la temporada y del momento de la vida. Referencias: MomP: principio de temporada, MomF: final de temporada, LI: larva de estadio I recién nacida, LII: larva de estadio II recién mudada, LII+: larva de estadio II que ha esperado al hospedador durante 30 días.

	Estimador	Error estándar	Valor t	Valor p
Huevo, MomP (intercepto)	0,374	0,052	7,254	< 0,001
LI	0,537	0,088	6,094	< 0,001
LII	0,221	0,082	2,711	0,009
LII+	0,198	0,084	2,364	0,021
MomF	0,012	0,063	0,186	0,853

Tabla 3.5. Concentración promedio de triglicéridos en huevos y larvas de *M. ruficauda*. Comparaciones entre los distintos tratamientos. Salida del programa R mostrando los resultados de la prueba de rangos de Tukey. Referencias: H: huevo; LI: larva de estadio I recién nacida; LII: larva de estadio II recién mudada; LII+: larva de estadio II que ha esperado al hospedador durante 30 días.

Comparación	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
LI - H	0,537	0,088	6,094	< 0,001
LII - H	0,221	0,082	2,711	0,034
LII+ - H	0,198	0,084	2,364	0,083
LII - LI	-0,316	0,100	-3,167	0,008
LII+ - LI	-0,340	0,101	-3,350	0,004
LII+ - LII	-0,023	0,096	-0,245	0,995

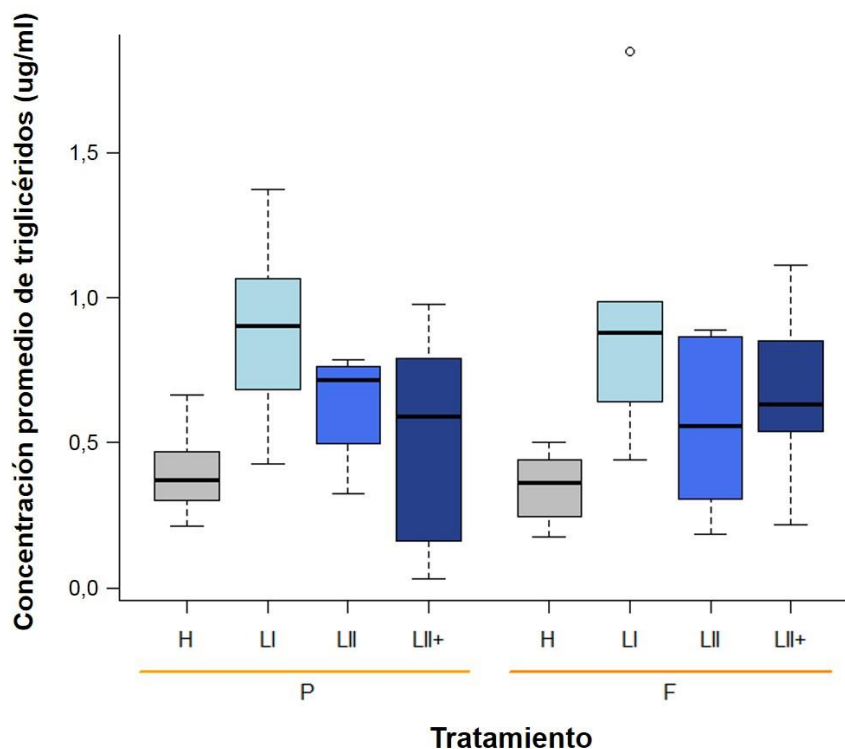


Figura 3.4. Concentración promedio de triglicéridos en huevos (H), larvas de estadio I recién nacidas (LI), larvas de estadio II recién mudadas (LII) y larvas de estadio II que han esperado al hospedador por 30 días (LII+) de *M. ruficauda*, de principios (P) y final (F) de la temporada reproductiva.

Discusión

En el presente trabajo se evaluó en primer lugar si las hembras asignan recursos a la progenie de manera diferencial en función del momento de la temporada reproductiva. Dado el desfase temporal entre la aparición de las primeras larvas parasitoides y del hospedador, y considerando que las larvas tempranas presentan mayor supervivencia (Crespo 2007), se esperaba que la asignación de recursos por parte de las hembras fuera distinta en diferentes momentos de la temporada. En particular, se esperaba que a principio de temporada los desoves presentaran un menor número de huevos con mayor cantidad de nutrientes por huevo. Los resultados obtenidos no apoyan esta hipótesis, por el contrario, mostraron que tanto el número de huevos por desove como su contenido de nutrientes fueron similares al principio y al final de la temporada reproductiva. Esto podría estar relacionado con diversos factores, como las posibilidades de alimentación de las hembras, su balance energético entre el mantenimiento corporal y la reproducción, su edad y su expectativa de vida. Estos factores se discuten a continuación y se resumen en la Figura 9.1 (Capítulo 9).

En los parasitoides sinovigénicos la alimentación de la hembra adulta puede ser un factor determinante en cuanto al esfuerzo reproductivo. La hembra de *M. ruficauda* es sinovigénica extrema (Nussebaum 2007), por lo cual se espera que el balance en la asignación de nutrientes a la mantención corporal y a la reproducción juegue un rol decisivo en la determinación de su longevidad y fecundidad. *Mallophora ruficauda* no depende exclusivamente de las reservas teneales adquiridas en la etapa larval, sino que se alimenta activamente durante toda la temporada reproductiva (Castelo 2003, Nussebaum 2007). Si bien no se conoce qué proporción de los recursos destinados a la reproducción son recursos obtenidos durante la vida imaginal (y no recursos obtenidos durante la etapa larval), el hecho de que las hembras tengan una mayor tasa de alimentación que los machos (Nussebaum 2007) podría considerarse un indicador de la importancia relativa de la alimentación en la producción de huevos. *Mallophora ruficauda* es depredador de otros insectos voladores (Castelo 2002, 2003, Copello 1927) y sus recursos de ingreso dependerán entonces únicamente de su propia capacidad de caza y asimilación de nutrientes y de la disponibilidad de presas. En particular, *M. ruficauda* se encuentra usualmente asociada a colmenares y más del 90% de sus presas son abejas obreras, cuya actividad es incesante y elevada durante toda la temporada reproductiva, con lo cual el alimento se encuentra disponible *ad libitum* (Castelo 2002, Copello 1922, 1927, 1942, Werthein 1981). De este modo, el patrón de asignación de recursos observado a escala de temporada no sería dependiente de la disponibilidad de presas al principio y al final de la temporada. Futuros estudios que analicen la frecuencia de alimentación y ovipuesta y la

composición de las reservas teneales y de reservas de ingreso de las hembras podrían aportar más elementos para analizar en profundidad el estado nutricional de las hembras y su efecto en la asignación de nutrientes a los huevos a distintas escalas temporales.

El balance energético entre mantenimiento corporal y reproducción y la consecuente asignación de recursos a los huevos varían en los parasitoides, como en otros animales, dependiendo de la expectativa de vida de las hembras (Bezemer *et al.* 2005, Giron *et al.* 2004, Jervis *et al.* 2008). En particular, se ha indicado que la variación intraespecífica en la riqueza nutricional del vitelo depende de la edad de la hembra (Jervis *et al.* 2008), y que las hembras de algunas especies parasitoides asignan menor cantidad de nutrientes a los huevos a medida que van envejeciendo (Giron y Casas 2003). En el caso particular de *M. ruficauda*, se desconoce la longevidad media de las hembras, y sólo se cuenta con datos indirectos sobre el número de desoves que una hembra sería capaz de oviponer durante su vida adulta (ocho ovocitos por ovariola, Nussebaum 2007). Esto implica que no se sabe con certeza si los desoves de principio y fin de temporada son puestos por los mismos individuos, y si la edad de las hembras podría estar modificando la inversión de nutrientes en los huevos. No obstante, a partir de los resultados del presente trabajo se podría concluir que poblacionalmente la inversión en reproducción sería similar en ambos períodos de la temporada. Ello podría interpretarse a partir de dos posibles explicaciones alternativas: o bien las hembras no sufrirían una merma apreciable en su capacidad reproductiva en función de la edad, o bien las hembras de principio de temporada no serían las mismas que las de final de temporada. Para comprender más cabalmente el potencial efecto de la edad sobre la asignación de nutrientes a la reproducción son necesarios estudios que evalúen la expectativa de vida y la capacidad de puesta de las hembras a lo largo de su vida. Dichos estudios son dificultosos debido a diversas causas, entre las que se encuentran: 1) las hembras criadas en el laboratorio o en clausuras a campo cesan su alimentación y oviposición y mueren (M. Castelo comunicación personal); 2) el seguimiento de los individuos a campo en condiciones abiertas presenta desafíos relacionados con el hábitat en que se desarrollan (pastizales altos con vegetación mixta donde el seguimiento visual individual no es realizable); 3) el marcado tradicional de insectos adultos y la utilización de dispositivos de seguimiento electrónico no son posibles debido al estrés sufrido por los adultos durante el procedimiento de aplicación (M. Castelo comunicación personal). Una posible alternativa, sin embargo, sería estimar la longevidad de las hembras a partir de análisis de parentesco y similitud genética de larvas provenientes de desoves de distintos momentos de la temporada. Entretanto, los resultados del presente trabajo indican que aún si el envejecimiento de las hembras fuera una causa de asignación diferencial de nutrientes a los huevos, este efecto no se vería reflejado a nivel

poblacional y no parecería afectar la dinámica de desfase entre los ciclos de vida del parasitoide y su hospedador.

Como se ha mencionado en la Introducción, existen dos hipótesis que relacionan la supervivencia de la progenie y la fecundidad de las hembras, la llamada de “mortalidad balanceada” (Price 1973) y la llamada de “inversión óptima” (Pexton y Mayhew 2002). El caso de *M. ruficauda* constituye un ejemplo de la limitación en la aplicación de modo general de dichas hipótesis. En primer lugar, se trata de un parasitoide koinobionte cuyas larvas atacan un estadio avanzado del hospedador, lo cual no se condice con la generalidad descrita en los parasitoides koinobiontes. En segundo lugar, las hembras no se superponen espacialmente con el estadio del hospedador que es atacado y sólo lo hacen de modo parcial temporalmente, y por ende no presentan una evaluación directa de la disponibilidad del hospedador. Por último, si bien podrían estar afectando la asignación de recursos en función de indicadores indirectos de la presencia del hospedador, como ser estimaciones de la población de hospedadores adultos, los resultados del presente trabajo indican que poblacionalmente las hembras no varían sus parámetros reproductivos, *i.e.*, fecundidad y asignación de nutrientes por huevo, hacia el final de la temporada reproductiva, *i.e.*, cuando aumenta la disponibilidad real del hospedador. De esta forma, ninguno de los modelos clásicos podría aplicarse a la hora de explicar los patrones de asignación de reservas observados en las hembras de *M. ruficauda*.

Independientemente de los factores que podrían afectar a las hembras de manera individual, en el presente trabajo se muestra que a nivel poblacional la inversión de *M. ruficauda* en cuanto a número de huevos y cantidad de nutrientes depositados en los mismos sería similar a principio y final de la temporada reproductiva. Este resultado tiene dos implicancias importantes respecto de la biología del parasitoide. Por un lado, las hembras no estarían interviniendo activamente en la determinación de la mayor supervivencia observada en las larvas tempranas. En segundo lugar, si se considera de acuerdo a la literatura que las larvas no se alimentan hasta que se han aferrado al hospedador, tanto las larvas tempranas como las tardías contarían con iguales cantidades de recursos para consumir durante el tiempo que les lleve encontrar al hospedador. De esta forma, la mayor supervivencia de las larvas tempranas podría tener que ver únicamente con el uso que realicen de las reservas de nutrientes con las que cuentan. Este punto se discute más abajo a la luz de los resultados hallados en este trabajo respecto de la dinámica de nutrientes en los estados inmaduros.

El segundo objetivo del presente capítulo fue caracterizar la dinámica de nutrientes en estados inmaduros de *M. ruficauda*, *i.e.*, huevos, larvas de estadio I y de estadio II, en los distintos momentos de la temporada reproductiva, evaluando el consumo de reservas en los procesos de

muda y espera del hospedador. Se discuten a continuación, por un lado, la caracterización de la dinámica de nutrientes inter-estadio y, en segundo término, los patrones observados en la comparación entre individuos de distintos momentos de la temporada reproductiva.

En el presente trabajo se evaluaron las concentraciones de nutrientes a través de diferentes estados/estadios de vida de *M. ruficauda*. En particular, se cuantificaron las concentraciones de nutrientes de reserva (glucosa y triglicéridos) en huevos, larvas de estadio I recién nacidas, larvas de estadio II recién mudadas y larvas de estadio II que han esperado al hospedador durante 30 días. Los resultados obtenidos indicarían que en líneas generales no habría diferencias significativas en la concentración de glucosa entre las distintas etapas de vida analizadas, excepto entre huevo y larvas de estadio II. Sin embargo, se observó un patrón de disminución de dicha concentración en función la etapa de vida considerada. En particular, el contenido de glucosa fue en promedio 29% más bajo en las larvas de estadio I que en los huevos, 22% más bajo en las larvas de estadio II recién mudadas que en las larvas de estadio I, y 8% más bajo en las larvas de estadio II que han esperado al hospedador respecto a las recién mudadas. Estos porcentajes reflejan, por un lado, que los procesos de embriogénesis y muda implican un gasto neto de glucosa libre. En los insectos, la glucosa se utiliza en general para demandas energéticas inmediatas (Chapman 1998, Jervis *et al.* 2008), además de ser necesaria en particular como factor participante en los procesos de conjugación y desconjugación de ecdisteroides que regulan la ocurrencia de la muda (Warren *et al.* 1986). Por lo tanto, no es sorprendente que la concentración de glucosa libre disponible sea más elevada en el huevo y en la larva de estadio I que tendrá que atravesar el proceso de muda. Una vez que las larvas han mudado, la concentración de glucosa podría disminuir en relación a dos factores. En primera instancia, las larvas consumen glucosa para mantenimiento corporal. En otros insectos se ha observado que conforme transcurre el tiempo y las larvas adquieren nutrientes por alimentación, el costo de mantenimiento corporal relativo y la consecuente tasa de consumo de glucosa disminuyen (Medrano y Gall 1976). No obstante, si, como indica la literatura, las larvas de *M. ruficauda* no se alimentan hasta aferrarse al hospedador, existe un consumo permanente sin reposición de las reservas nutricionales. En segundo lugar, es posible que las reservas en hidratos de carbono se acumulen en forma de trehalosa y glucógeno (Chapman 1998). En este caso, al medir únicamente glucosa libre se podría estar subestimando la cantidad total de reservas de hidratos de carbono. Futuros ensayos que cuantifiquen particularmente trehalosa y glucógeno podrían revelar diferencias más acusadas entre los distintos estadios/estados. No obstante, los resultados presentados en este trabajo sugieren que los patrones de disminución de la concentración de glucosa observados podrían reflejar tanto el uso constante como la transformación de este compuesto en otros metabolitos de reserva. Estos factores podrían explicar además que los porcentajes de disminución

de la concentración de glucosa observados entre larvas de estadio II recién mudadas y aquellas que han esperado al hospedador hayan sido menores que aquellos hallados al comparar otros estados/estadios. La disminución de glucosa libre en el proceso de espera podría atribuirse entonces mayormente al mantenimiento corporal de las larvas.

En cuanto a la concentración de triglicéridos en las larvas, los resultados mostraron un decremento equivalente al descrito para glucosa, desde larvas de estadio I a larvas de estadio II recién mudadas, hasta larvas de estadio II que han esperado al hospedador. Estas disminuciones fueron en promedio de 35,5% y 18%, respectivamente. Similarmente, podría argumentarse que el proceso de muda constituye un gasto de reservas energéticas elevado y que durante el tiempo de espera del hospedador las reservas de lípidos se consumen para mantenimiento corporal. Mientras que, como se ha mencionado antes, la glucosa se utiliza mayormente para atender demandas metabólicas inmediatas, el almacenamiento de energía en forma de lípidos responde a necesidades a más largo plazo (Chapman 1998), ya que estas moléculas presentan una relación volumen - potencial energético más alta que los hidratos de carbono y por ende permiten almacenar energía de modo más económico para el organismo. En este sentido, sería esperable que la mayor cantidad de reservas, y las que serán gastadas ante la falta de alimentación, sean lipídicas. Este hecho podría explicar que los porcentajes de disminución de la concentración de triglicéridos observados fueran ligeramente mayores que los observados para glucosa.

Los resultados del presente estudio mostraron que la concentración de triglicéridos en los huevos de *M. ruficauda* fue significativamente menor que la cuantificada en las larvas. Estos resultados son llamativos, dado que se esperaba encontrar mayores concentraciones lipídicas en los huevos y que estas disminuyeran como consecuencia del proceso de muda. Como para otros animales, los lípidos constituyen reservas esenciales para la mayoría de los insectos y, como tales, sus vías metabólicas están muy conservadas evolutivamente a través de numerosos taxa (Arrese y Soulages 2010, Turkish y Sturley 2009). Las reservas de lípidos que las hembras asignan a los huevos cumplen un rol fundamental en el desarrollo de los embriones y posteriormente de las larvas. Consecuentemente, tanto en parasitoides como en otros insectos, se ha visto que los huevos son ricos en reservas lipídicas (Giron y Casas 2003, Telfer 2009). Estudios en algunas especies indican que a lo largo del desarrollo del huevo la concentración de los diferentes tipos de lípidos varía drásticamente (Forte *et al.* 2002). En particular, la concentración de triglicéridos, presente desde la fase de oocito, disminuye de forma significativa hacia el final del desarrollo del huevo (Forte *et al.* 2002, Telfer 2009). Si se tuviera en cuenta el factor temporal del desarrollo de los huevos, podría entonces argumentarse sobre la baja concentración de lípidos hallada. No obstante, en el presente trabajo las mediciones se llevaron a cabo sobre desoves de puesta reciente, y la disminución de

reservas dentro de la etapa de huevo no daría cuentas de la mayor concentración de lípidos cuantificada en las larvas de estadio I recién nacidas. Para explicar los resultados observados en *M. ruficauda*, deberían cumplirse entonces dos hipótesis simultáneamente. En primer lugar, las hembras no estarían asignando una gran cantidad de triglicéridos a los huevos, o bien debido a una baja inversión lipídica total o a la inversión en otros tipos de lípidos (*e.g.*, diglicéridos, Telfer 2009). En segundo lugar, *M. ruficauda* debería ser capaz de llevar a cabo procesos de lipogénesis inmediatamente antes de la formación completa de las larvas de primer estadio. Aunque la lipogénesis es común en insectos durante sus fases de alimentación, se ha reportado que muchas especies parasitoides son incapaces de llevar a cabo este proceso (más de 70 especies registradas, Giron y Casas 2003, Visser 2015, Visser *et al.* 2010). Estas especies están distribuidas en un amplio rango taxonómico entre los parasitoides, y se ha sugerido que la falta de lipogénesis ha evolucionado independientemente en muchos grupos a partir de la interacción parasítica con el hospedador, mediante la alteración de la dinámica transcripcional del gen *fas* (*fatty acid synthase*, por su sigla en inglés, Visser 2015, Visser *et al.* 2010). En este contexto, donde el parasitoide puede obtener lípidos directamente de su hospedador, la capacidad propia de producir lípidos resultaría redundante y revestiría un costo energético mayor que el no tenerla (Visser y Ellers 2008). Sin embargo, no sólo existen excepciones de especies parasitoides capaces de generar lípidos a partir de fuentes externas de alimento (Visser 2015), sino que la ausencia de lipogénesis ha sido puesta a prueba únicamente en individuos adultos, en su mayoría himenópteros. Hasta el momento, no se cuenta con ningún estudio equivalente en estados inmaduros que justifique descartar la existencia de lipogénesis en esas etapas de la vida y en otros grupos taxonómicos. En el caso particular de *M. ruficauda*, los resultados de este trabajo sugerirían que podría haber lipogénesis entre la etapa de huevo y de larva. Sin embargo, mediciones de otros tipos de lípidos son necesarias para descartar que la mayor concentración de triglicéridos en las larvas no provenga de la conversión de otros tipos de lípidos inicialmente asignados a los huevos.

En lo que respecta a los distintos momentos de la temporada reproductiva, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que, tanto en huevos (como se ha discutido anteriormente) como en larvas, la concentración de los nutrientes analizados no varía respecto del momento de la temporada. Más aún, no se encontró una interacción significativa entre el momento de temporada y el estado/estadio analizado, lo cual implicaría que la tasa de consumo de los nutrientes no difiere estadísticamente entre individuos de principio y fin de temporada. Estos resultados son intrigantes. Dado que se halló que la hembra de *M. ruficauda* no asignaría nutrientes a la reproducción de manera diferencial en el tiempo, cabría esperar que el uso de los nutrientes fuera diferente en larvas de principio y fin de temporada. En particular, a igual cantidad de recursos

asignados, las larvas de principio de temporada deberían consumir nutrientes a una tasa menor tal que las reservas que poseen sean suficientes para sobrevivir hasta la aparición del hospedador.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la supervivencia diferencial observada en larvas de distintos momentos de la temporada (Crespo 2007) no podría explicarse por una cantidad o un uso diferencial de reservas nutricionales. Una posible alternativa sería que la supervivencia pudiera estar determinada por factores ambientales, tales como la temperatura y la humedad. Mientras que en los meses de enero, febrero y marzo las temperaturas del suelo a 20 cm de profundidad son de 25,5°C, 25,0°C y 23,5°C, respectivamente, en los meses de abril y mayo disminuyen a 19,8°C y 16,1°C, respectivamente (Zanek *et al.* 2015). Por otro lado, la humedad estimada a partir del monto mensual de precipitaciones, también disminuye considerablemente en ese período (116,2 mm en enero, 127,5 mm en febrero y 131,8 mm en marzo, frente a 92,7 mm en abril y 64,5 mm en mayo). Estos cambios en las condiciones ambientales implicarían que larvas tardías nacidas a principios de marzo que tuvieran una supervivencia similar a las tempranas se verían expuestas a una disminución considerable de la humedad y la temperatura (alrededor de 7°C) en el medio. Dados dichos antecedentes y los resultados respecto al uso de nutrientes presentados en este capítulo, resultaría probable entonces que los factores que podrían determinar la supervivencia diferencial de larvas de distintos momentos de la temporada sean de carácter ambiental.

Las distintas estrategias y comportamientos de los parasitoides son influenciadas en gran medida por su estado interno (Crespo *et al.* 2015, Lewis *et al.* 1998, Lucchetta *et al.* 2007, Sirot *et al.* 1997, Wajnberg *et al.* 2008). Entre los factores que determinan el estado interno, uno de los que tiene mayor influencia en el desempeño del individuo es su nivel nutricional (Lewis *et al.* 1998, Wajnberg *et al.* 2008). En *M. ruficauda* la cantidad inicial de nutrientes fue semejante en larvas tempranas y tardías, pero las larvas tempranas consumen más recursos durante su etapa pre-parasitaria, *i.e.*, poseen una tasa de consumo similar, por un tiempo más prolongado. De este modo, sería esperable que la condición corporal de las larvas tempranas al momento de la aparición de los hospedadores a campo (dos meses más tarde) fuese inferior a aquella de las larvas tardías. Es decir, la mayor supervivencia observada en larvas tempranas (Crespo 2007) no necesariamente implicaría que el estado fisiológico de estas larvas sea igual al de larvas tardías al momento de parasitar al hospedador. La caracterización del estado corporal de las larvas de *M. ruficauda* no es trivial, dado que hoy día no se cuenta con un indicador único confiable, o grupo de indicadores, que permitan evaluar la condición de los individuos, como podría ser una combinación de sus estados nutricional e inmunológico. No obstante, dado que dicha condición se refleja en las estrategias que los individuos adoptan en diversas situaciones, podría ser estimada a partir de ensayos comportamentales. Por

ejemplo, podrían llevarse a cabo estudios que analicen la incidencia de la edad de las larvas en la tasa de parasitismo de hospedadores de distinta calidad respecto a su identidad, a su estadio o a su estado previo de parasitismo. Si el estado corporal de las larvas de edad avanzada (*i.e.*, de principios de temporada) fuese inferior, se esperaría que muestren una menor selectividad derivada de la urgencia de aferrarse a un hospedador aun cuando éste no sea óptimo. En efecto, experimentos llevados a cabo por Crespo (2011) mostraron que larvas de estadio II longevas no muestran orientación preferencial cuando se les ofrecen estímulos de hospedador sano y monoparasitado. Si bien se ha visto que en los casos de superparasitismo el orden de llegada de las larvas al hospedador no determina qué larva completa su desarrollo (Barrantes 2015), se esperaría que larvas de edad más avanzada tuvieran menores probabilidades de sobrevivir y ganar la competencia contra sus coespecíficas. Los resultados de los ensayos realizados en el presente trabajo serían coherentes con estas predicciones y con los estudios previos (Crespo 2011), y apoyarían la hipótesis de que las larvas tempranas tendrían un estado corporal más deteriorado que las tardías, y ello tendría un efecto en su selectividad y en última instancia en su éxito.

Debe mencionarse, por último, que en estudios recientes se ha observado que existiría una relación entre el estadio del hospedador que es parasitado, la posición en que la larva se aferra sobre el cuerpo del hospedador, y la probabilidad de ganar la competencia en casos de superparasitismo (Castelo *et al.*, en preparación). Se conoce que las larvas parasitoides, si bien atacan preferentemente al estadio III del hospedador, en menor frecuencia pueden también aferrarse al estadio II. Castelo y colaboradores han registrado que las larvas que atacan al hospedador en estadio II, luego de la muda del hospedador al estadio III se encuentran mayoritariamente aferradas a la coxa de las patas III del hospedador. Por otro lado, han observado que las larvas aferradas en esa posición ganan la competencia contra otras larvas más frecuentemente. En este sentido, el aferrarse al hospedador tempranamente, aunque éste fuera subóptimo al momento del parasitismo, podría incrementar las chances de éxito de las larvas, por asegurarse la posición sobre el hospedador asociada con mayores chances de sobrevivir. Si se contemplan estos resultados, podría especularse que las larvas tempranas presentarían una mayor frecuencia de parasitismo sobre hospedadores de estadio II que las tardías. Si este fuera el caso, las larvas tempranas contarían con un mecanismo alternativo que les permitiría reducir los efectos del desfase temporal. Aún con las mismas cantidades de nutrientes y las mismas tasas de consumo que las larvas tardías, las larvas tempranas podrían sobrevivir explotando hospedadores subóptimos pero con el beneficio a futuro de incrementar sus chances de ganar la competencia en caso de superparasitismo.

En conclusión, *M. ruficauda* es un parasitoide que presenta particularidades en cuanto a la relación entre su ciclo de vida y el de su hospedador. Entre la aparición de las primeras larvas parasitoides y la del hospedador existe un marcado desfase temporal, el cual implica que las larvas tempranas deban esperar al hospedador en el ambiente por un período de tiempo prolongado. Además, antes de aferrarse al hospedador las larvas no se alimentan, de modo que deben sobrevivir hasta ese momento utilizando únicamente las reservas energéticas asignadas por las hembras a los huevos. En el presente capítulo se presentaron dos resultados principales: 1) las hembras destinarían igual cantidad de recursos a principio y fin de la temporada reproductiva, y 2) las larvas de principio y de fin de temporada utilizarían los recursos energéticos de manera similar. Estos resultados implican dos hechos importantes para comprender la dinámica de *M. ruficauda*. En primer lugar, las hembras no tendrían un mecanismo de asignación diferencial por el cual contrarrestar el desfase temporal respecto a la aparición del hospedador. En segundo lugar, las larvas tempranas llegarían al encuentro con el hospedador en inferioridad de condiciones (*i.e.*, peor estado corporal) respecto a las larvas tardías. Dicha inferioridad podría resultar en un éxito de parasitismo reducido, aunque evolutivamente, otros mecanismos como la parasitación de un estadio más temprano del hospedador, podrían contribuir a contrarrestar estos efectos.

CAPÍTULO 4

Condiciones y recursos del sustrato que afectan el desarrollo y muda del primer estadio larval de *M. ruficauda*

Introducción

El suelo es uno de los hábitats más diversos de la tierra, y alberga organismos de numerosos taxa y funcionalmente muy disímiles (Wurst *et al.* 2012). El suelo es un medio compacto pero poroso, que presenta condiciones físico-químicas particulares y variables, como condiciones de humedad y temperatura amortiguadas respecto al ambiente externo, y ofrece a la biota un medio en el cual moverse y por el que se propagan señales químicas y mecánicas, además de refugios o materiales para construirlos y alimento en la forma de macro y micronutrientes (Killham 1994, Lavelle y Spain 2001, Lilly 1956, McColloch y Haye 1922, Young *et al.* 1998). Condiciones desfavorables en el sustrato pueden alterar la fisiología de los organismos que habitan en él, limitando su expectativa de vida, interfiriendo con los procesos de crecimiento y muda, y/o afectando el tamaño corporal que pueden alcanzar, lo cual a su vez puede tener efectos sobre su supervivencia como adultos y sobre su fecundidad (Berrigan y Lighton 1993, Colin *et al.* 2015, Eskafi y Fernández 1990, Grant y Villani 2003, Killham 1994, Tsunoda *et al.* 2014).

Entre las diversas propiedades y características del suelo pueden identificarse tres factores que afectan en gran medida a los organismos que habitan en él, y especialmente a los de menor tamaño: la composición, estructura y textura, la humedad y la temperatura del sustrato. La textura del sustrato afecta la motilidad. En insectos, la relación entre las variables de movimiento y las características físico-mecánicas del medio ha sido estudiada en varios taxa. En curculiónidos, por ejemplo, se ha visto que la dirección y velocidad de movimiento de individuos adultos son diferentes en distintos sustratos (Kindvall *et al.* 2000), mientras que en larvas la composición y estructura del suelo afectan la dirección y la profundidad máxima a la que pueden enterrarse (Harrison *et al.* 1993). Además, se ha encontrado en diversas especies que la adhesión a sustratos rugosos depende de la microestructura de los sustratos, pues ello afecta la manera en que las estructuras de desplazamiento del individuo interactúan con el sustrato e influye sobre las fuerzas friccionales asociadas (Gorb y Gorb 2009, Zhou *et al.* 2014). Los efectos de la textura del sustrato sobre la motilidad de los organismos pueden influir sobre su capacidad de encontrar refugios y alimento, y en última instancia sobre su supervivencia. Por ejemplo, se ha visto que la motilidad y consecuente encuentro del hospedador en nematodos es dependiente de la estructura del sustrato en que se encuentran (Barbercheck y Kaya 1991).

El segundo factor, la humedad del suelo, también afecta la vida de los organismos que habitan en él. Tanto por exceso como por defecto, la disponibilidad de agua en el suelo afecta tanto la supervivencia y el desarrollo de los individuos, como su nivel de actividad y sus interacciones con otros organismos (Eskafi y Fernández 1990, Grant y Villani 2003, Killham 1994, Tsunoda *et al.* 2014).

Por último, una de las variables principales que pueden afectar la vida de los insectos en el suelo es la temperatura. Como poiquiloterms (*i.e.*, organismos que no regulan su temperatura corporal de manera endógena), la temperatura afecta a los estados inmaduros principalmente a través de la aceleración de su desarrollo. Entre los insectos, existen numerosos ejemplos en los que se ha mostrado que a mayor temperatura ambiental la duración de los estadios larvales y el tiempo invertido en la muda respecto a la duración total del estadio son menores que a temperaturas más bajas (Ayres y MacLean 1987, Bazzocchi *et al.* 2003, Chen *et al.* 1987, Chown y Nicolson 2004, Couret *et al.* 2014, Davidowitz y Nijhout 2004, Frouz *et al.* 2002, Kingsolver *et al.* 2015, Sánchez-Ramos *et al.* 2015, Stamp 1990, Stamp y Bowers 1994, Tomberlin *et al.* 2009). Por ejemplo, en larvas de *Manduca sexta* L. 1763, Stamp (1990) observó que el tiempo invertido en el proceso de muda respecto a la duración total del estadio a 20°C es 8% mayor que el observado a 30°C. Por otro lado, los efectos deletéreos de las temperaturas elevadas han sido estudiados ampliamente. La exposición a altas temperaturas puede provocar un aumento en la mortalidad por aceleración del metabolismo general y la consecuente acumulación de metabolitos tóxicos provenientes de reacciones oxidativas, disrupción funcional de las membranas celulares, desnaturalización enzimática y daño a los ácidos nucleicos (Chown y Nicolson 2004, Monaghan *et al.* 2009, Park y Kwak 2014, Zhang S. *et al.* 2015). Para distintos insectos se ha mostrado que a mayores temperaturas la expresión y actividad enzimática de marcadores de estrés oxidativo aumentan significativamente (Cui *et al.* 2011, Li *et al.* 2011, Park y Kwak 2014).

La mayoría de los dípteros parasitoides presentan ciclos de vida en los cuales la actividad de los adultos se desarrolla en gran medida por encima del suelo y el desarrollo de los estados inmaduros de larva y pupa involucran fases subterráneas (Eggleton y Belshaw 1993, Feener y Brown 1997). Las larvas de estas especies parasitoides completan su desarrollo dentro del suelo, atacando a hospedadores que también habitan en él (Eggleton y Belshaw 1993, Feener y Brown 1997), y lo más común es que las larvas de primer estadio sean buscadoras activas del hospedador (Feener y Brown 1997). En los dípteros parasitoides la etapa subterránea presenta a su vez dos fases, una fase pre-parasitismo durante la cual la larva debe buscar al hospedador, y una fase de parasitismo propiamente dicho, que transcurre una vez que la larva ha encontrado y se ha aferrado al hospedador. Durante la etapa de pre-parasitismo las larvas deben subsistir utilizando los recursos que fueron asignados por las hembras adultas a los huevos y eventualmente con recursos que puedan obtener del sustrato. El sustrato, un medio con características físico-químicas y biológicas particulares, se cree que juega un rol fundamental en la supervivencia de las larvas de primer estadio y en su éxito de parasitismo.

Durante la etapa larval, *M. ruficauda* (Diptera: Asilidae) es un ectoparásitoide obligado que ataca a los gusanos blancos del suelo, en particular de la especie *C. signaticollis* (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010, Copello 1922, 1927). Como se ha mencionado en la Introducción General, las hembras adultas oviponen en sustratos altos y cuando las larvas nacen, son dispersadas por el viento y caen al suelo, donde se entierran (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a, Copello 1922, 1927). A partir de ese momento, el resto del desarrollo se llevará a cabo dentro del suelo, y los individuos estarán sujetos a las condiciones y recursos que éste provea. Las larvas de estadio I, aunque móviles, no son capaces de orientarse activamente hacia un hospedador (Crespo y Castelo 2010). Son las larvas de estadio II quienes buscan activamente un hospedador al que aferrarse. Es decir, *M. ruficauda* debe experimentar un proceso de muda antes de alcanzar el estadio capaz de buscar al hospedador. Dado que el proceso de muda en los insectos constituye una instancia de gran vulnerabilidad (Chapman 1998), se espera que el sustrato y las condiciones que éste ofrezca (en particular de temperatura y humedad) afecten la supervivencia de las larvas y su capacidad de muda al estadio II, único capaz de asegurar alimento (hospedador) para completar el desarrollo del individuo.

En la literatura se ha indicado que, además de no orientarse activamente hacia el hospedador, el primer estadio larval de *M. ruficauda* no se alimenta, aunque podría estar adquiriendo algunos nutrientes y agua del sustrato (Castelo y Lazzari 2004, Crespo y Castelo 2010, Copello 1922, 1927, 1942, Musso 1983). Entre los asílidos, se ha reportado que las larvas de primer estadio de otras dos especies, *Machimus rusticus* Meigen 1820 y *Machimus pilipes* Meigen 1820 no se alimentan (Musso 1983), ambas descritas como especies depredadoras en estadios larvales sucesivos. Sin embargo, la no alimentación del primer estadio larval es contradictoria con la generalidad descrita para los dípteros parasitoides (Eggleton y Belshaw 1992, Feener y Brown 1997), con lo reportado en la única otra especie del género *Mallophora* en la cual se ha descrito parasitoidismo (*Mallophora media* Clements en Clements y Bennett 1969), y con el comportamiento de los insectos en general. El hecho de poseer una larva móvil que no se alimenta e incapaz de buscar a su hospedador es un hecho biológicamente intrigante, puesto que implica que debe contar desde el huevo con todos los recursos nutricionales necesarios para llevar a cabo su desarrollo y el proceso de muda al estadio II, lo cual representaría una gran inversión energética parental en un estadio larval vulnerable.

En *M. ruficauda* existe un desfase temporal en la aparición de las primeras larvas y del estadio del hospedador que parasitan. Ello implica que las larvas tempranas deben esperar al hospedador en el ambiente y vivir a expensas de las reservas contenidas en el huevo. En el Capítulo 3 de esta Tesis se mostró que las hembras asignan igual cantidad de recursos nutritivos a los huevos

a principio y fin de temporada, y que las larvas tempranas y tardías utilizan los recursos de manera similar. Si, como indica la literatura, las larvas no se alimentan hasta que se aferran al hospedador, las larvas tempranas estarían en desventaja respecto a las larvas tardías en cuanto a su estado fisiológico al momento del encuentro con el hospedador.

Contemplando los antecedentes y las contradicciones antes mencionadas respecto a los asílidos estudiados por otros autores, surge la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios que determinen mediante experimentos específicos si existe alimentación del primer estadio larval de *M. ruficauda* y si éste es capaz de mudar al segundo estadio en ausencia de alimento, evaluando los resultados en el contexto evolutivo de la familia Asilidae y de los parasitoides dípteros en general.

Teniendo en cuenta todo lo antedicho, en el presente capítulo de la Tesis se planteó como **Objetivo General:** determinar cómo afectan el tipo de sustrato y la temperatura al desarrollo y muda del primer estadio larval de *M. ruficauda*. Se plantearon como **Objetivos Particulares:** 1) Determinar cómo afectan las características del sustrato y la temperatura de cría a la supervivencia de las larvas de estadio I y al proceso de muda al estadio II; y 2) Determinar si la presencia de sustrato como fuente potencial de nutrientes es indispensable para la muda de larvas del estadio I al estadio II.

Materiales y métodos

Para el desarrollo de este Capítulo se colectaron desoves de *M. ruficauda* y se mantuvieron individualmente en tubos Falcon hasta la eclosión de los huevos (ver Capítulo 2). Para todos los experimentos detallados a continuación las larvas fueron separadas individualmente al momento de su nacimiento en tubos Eppendorf conteniendo diferentes sustratos, donde se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 - 70% HR ambiente), salvo expresa indicación.

Evaluación del efecto del sustrato y de la temperatura sobre la supervivencia de las larvas de estadio I y la muda al estadio II

Con el objeto de determinar cómo afecta el tipo de sustrato al desarrollo del estadio I y a la muda al estadio II, se desarrollaron experimentos considerando dos tipos de sustratos, uno artificial que ofrece espacialmente dos dimensiones, y otro natural que es tridimensional. Se llevaron a cabo

dos series experimentales, detalladas a continuación. Las series difirieron en el número de larvas utilizadas por desove, y en las temperaturas consideradas.

Para la primera serie experimental se separaron 10 larvas recién nacidas por desove ($N = 45$ desoves), en dos lotes de 5 larvas cada uno (Figura 4.1: “Primera serie experimental”), que se mantuvieron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada lote fue asignado a uno de dos tratamientos: sustrato artificial (papel de filtro, $0,5 \times 1\text{cm}$) con una gota de agua destilada (aproximadamente $0,05\text{ ml}$), o sustrato natural ($1,5\text{ ml}$ de tierra negra comercial). En lo sucesivo, se utilizan los pares de términos “sustrato artificial” y “papel”, y “sustrato natural” y “tierra” como sinónimos. Se utilizó agua sobre el sustrato papel para mantener la humedad dentro de los tubos y evitar la desecación de los individuos. El papel de filtro utilizado fue previamente esterilizado con el fin de reducir la probabilidad de crecimiento de colonias bacterianas o fúngicas que pudiesen afectar a los individuos. Para cada tratamiento se registraron los eventos de muerte y muda luego de 15 días desde el día del nacimiento. El límite de 15 días fue establecido en función de que la muda ocurre entre 4 y 22 días después del nacimiento y de que en el 75% de los casos sucede antes del día 10 de vida (Crespo 2007, Crespo y Castelo 2010). Se calculó la proporción de larvas que mudó al estadio II por lote por tratamiento y la proporción promedio para cada tratamiento. Para estimar la supervivencia, dado que las larvas que no mudan perecen, se consideró como número de larvas muertas la suma de larvas que murieron durante el experimento y de larvas que permanecieron en estadio I al final del experimento. Para determinar si existen diferencias entre los tratamientos en las tasas de muda y supervivencia se utilizaron modelos lineales generalizados (GLMs) con respuesta binomial y función de enlace *logit* (Crawley 2007). La variable respuesta fue la proporción promedio de muda o supervivencia, según correspondiera, y el predictor fue el tratamiento (2 niveles: sustrato artificial o natural). A partir de esta primera serie experimental se evaluó cualitativamente la variabilidad entre desoves y se reformuló el procedimiento para los experimentos sucesivos.

La segunda serie experimental consistió en dos experimentos, cada uno a distintas temperaturas. El primer experimento de la serie fue llevado a cabo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, asignando, en vez de lotes de 5 individuos, lotes de 20 larvas por desove por tratamiento, y efectuando el registro de muerte y muda diariamente (Figura 4.1: “Experimentos sustrato”). Los datos obtenidos fueron evaluados en conjunto con aquellos obtenidos a partir de los experimentos que se detallan a continuación, referidos al efecto de la temperatura en la muda.

Con el objeto de determinar cómo afecta la temperatura al proceso de muda de las larvas de *M. ruficauda*, se realizó un segundo experimento en el cual se repitió el primer experimento de la serie pero exponiendo a los individuos a una temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Para ello, y con el fin de poder comparar con los resultados de los experimentos anteriores, se separaron 20 larvas por

desove de 15 desoves utilizados anteriormente, y se sometieron a los mismos tratamientos (Figura 4.1: “Experimentos sustrato”, variando la temperatura). Los eventos de muerte y muda fueron registrados diariamente y las proporciones correspondientes fueron calculadas.

La comparación entre las proporciones de supervivencia y muda en cada tratamiento y condición (sustratos natural y artificial, y temperaturas de 25°C y 30°C) se realizó ajustando los datos a modelos lineales generalizados (GLMs) con respuesta binomial y función de enlace *logit*. La variable respuesta fue la proporción promedio de muda o supervivencia, y se tomaron como predictores el sustrato de cría (2 niveles, natural y artificial) y la temperatura (considerada categórica, con dos niveles, 25°C y 30°C). Tanto para la supervivencia como para la muda se construyeron modelos con y sin interacción entre los predictores, y se escogieron los modelos de mejor desempeño comparándolos mediante la función *anova* y los valores de AIC. Además, se analizó si el momento de la muda coincide temporalmente cuando las larvas son criadas en diferentes sustratos y temperaturas. Para ello, se evaluaron los tratamientos respecto del número de días transcurridos hasta la muda de la primera larva del lote y el número de días transcurridos hasta que hubieran mudado el 50% de las larvas de cada lote. Dichos análisis se realizaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis y contrastes de Dunn *a posteriori*, utilizando el paquete “*dunn.test*” del programa R (Dinno 2016).

Tanto en la primera serie experimental como en los experimentos sucesivos se dieron casos en los que algunas larvas resultaron perdidas. En estos casos, dichas larvas no fueron computadas como muertas ni como habiendo mudado y fueron excluidas del análisis, siendo entonces las proporciones calculadas sobre totales inferiores.

Evaluación del efecto del sustrato como fuente de nutrientes requeridos para la muda

Los experimentos anteriores indicaron que la proporción de muda de las larvas de *M. ruficauda* en diferentes sustratos fue diferente (ver sección Resultados). Dado dichos resultados, resulta pertinente cuestionar si, como indica la literatura, las larvas I no requieren alimentarse para mudar al segundo estadio o si necesitan obtener algún nutriente del sustrato. Dado que en los experimentos anteriores el papel podría ofrecer una fuente de alimento, se realizaron nuevos experimentos introduciendo nuevos tratamientos en los cuales no existe la posibilidad de que las larvas se alimenten. Para ello, se separaron larvas recién nacidas y se mantuvieron en una de las siguientes condiciones (tratamientos, Figura 4.1: “Experimentos Alimentación”): sin sustrato; sin sustrato con una gota de agua de ósmosis (generada por ósmosis inversa); sin sustrato con una gota

de agua destilada; con sustrato papel sin agua; con sustrato papel con una gota de agua de ósmosis; con sustrato papel con una gota de agua destilada; con tierra comercial. La utilización de agua, tanto destilada como de ósmosis, fue prevista para mantener la humedad dentro de los tubos y evitar la desecación de los individuos. El agua de ósmosis posee un grado de pureza superior al del agua destilada, asegurando mayor desalinización y ausencia de microorganismos (minerales y colonias bacterianas o fúngicas de las que la larva pudiese alimentarse). Como precaución, en los tratamientos en que se utilizó papel de filtro, éste fue previamente esterilizado.

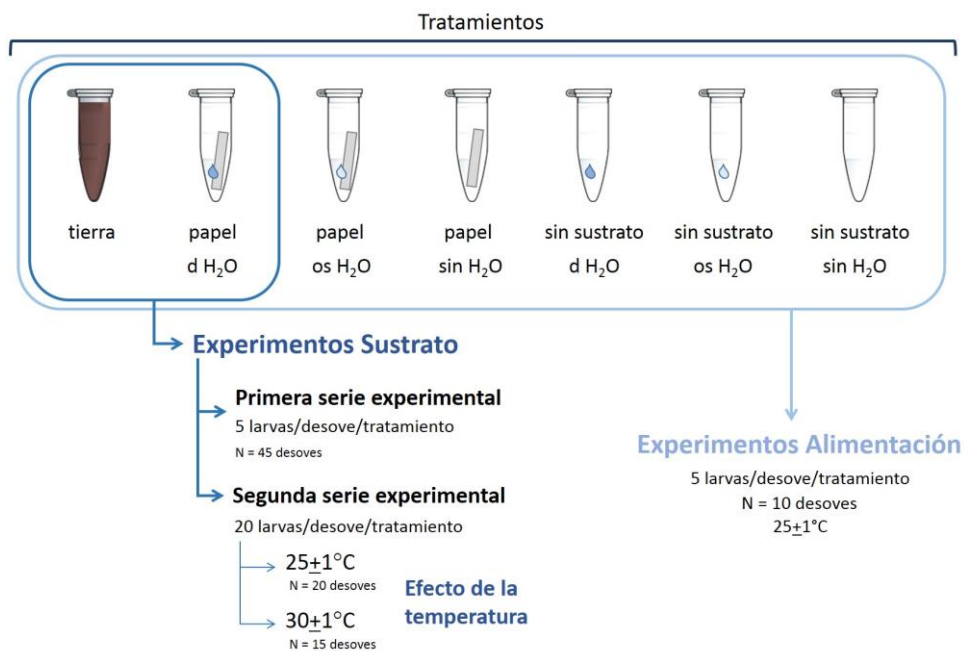


Figura 4.1. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto del sustrato y de la temperatura en la supervivencia del estadio I y en la muda al estadio II de larvas de *M. ruficauda* ("Experimentos Sustrato") y para evaluar la ocurrencia de la muda en relación a la alimentación ("Experimentos Alimentación"). Referencias: d H₂O: agua destilada, os H₂O: agua de ósmosis.

El experimento para evaluar la probabilidad de muda en función del tipo de sustrato se llevó a cabo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando 35 larvas por desove (N = 10 desoves) que fueron asignadas a los siete tratamientos descritos, en lotes de cinco individuos cada uno. Se realizó un seguimiento diario de supervivencia y muda de los individuos hasta el día 15 luego del nacimiento. Las proporciones de supervivencia y muda fueron comparadas para todos los tratamientos. Para ello se construyeron modelos lineales generalizados (GLMs) con respuesta binomial y función de enlace *logit*. La variable respuesta fue la proporción promedio de supervivencia o de muda, según correspondiera, y el predictor fue el tratamiento (cinco niveles). Entre los niveles del predictor no se incluyeron los

tratamientos “sin sustrato” ni “sustrato papel sin agua”, dado que en ambos tratamientos la mortalidad fue del 100% y la varianza en la proporción de muda fue por tanto cero (ver sección Resultados). Luego, para comparar los efectos de cada nivel del tratamiento se realizaron comparaciones múltiples *a posteriori* utilizando la prueba de rangos de Tukey (Tukey’s HSD, función *glht* del paquete *multcomp* del programa R, Hothorn *et al.* 2016).

Resultados

Evaluación del efecto del sustrato y de la temperatura sobre la supervivencia de las larvas de estadio I y la muda al estadio II

La primera serie experimental se llevó a cabo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando lotes de 5 larvas por desove. En esta primera serie las larvas criadas en sustrato artificial presentaron una proporción de muda más variable y menor que aquellas criadas en sustrato natural ($64,7 \pm 27,8\%$ vs. $98 \pm 6,5\%$, respectivamente, Figura 4.2). Además, la supervivencia fue menor en larvas criadas en sustrato artificial que en sustrato natural ($62,2 \pm 28,4\%$ vs. $90,2 \pm 12,5\%$, respectivamente, Figura 4.3). De acuerdo al modelo, la probabilidad de muda es significativamente mayor en sustrato natural que en sustrato artificial, siendo 28 veces superior en tierra (Tabla 4.1, *odd-ratio* = 28,313). En cuanto a la supervivencia, la chance de sobrevivir es significativamente mayor en sustrato natural que en sustrato artificial, siendo 17 veces superior en tierra (Tabla 4.2, *odd-ratio* = 17,193).

Tabla 4.1. Efecto del sustrato de cría (artificial: papel, o natural: tierra) sobre la proporción de larvas I de *M. ruficauda* que muda al estadio II: Primera serie experimental. Salida del programa R: modelo lineal generalizado (GLM).

	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
Sustrato artificial (intercepto)	0,593	0,140	4,233	< 0,001
Sustrato natural	3,343	0,524	6,381	< 0,001

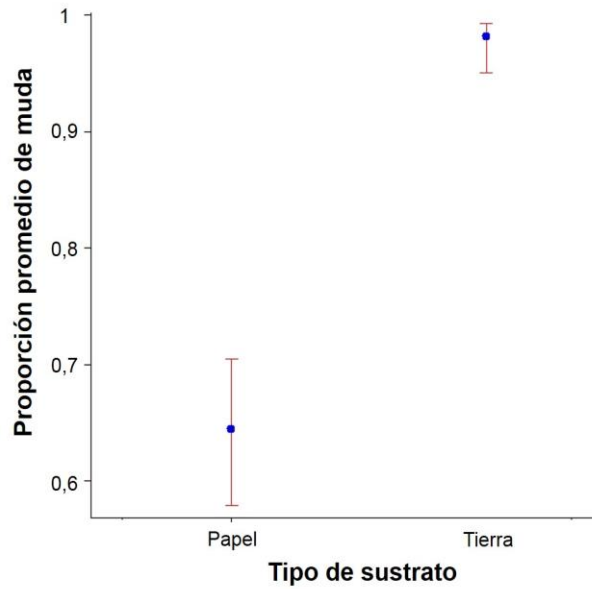


Figura 4.2. Efecto del sustrato de cría sobre la proporción promedio de larvas I de *M. ruficauda* que mudan al estadio II (sustrato artificial: papel, sustrato natural: tierra): primera serie experimental.

Tabla 4.2. Efecto del sustrato de cría (artificial: papel, o natural: tierra) sobre la probabilidad de supervivencia de larvas de estadio I de *M. ruficauda*: primera serie experimental. Salida del programa R: modelo lineal generalizado (GLM).

	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
Sustrato artificial (intercepto)	0,523	0,139	3,774	< 0,001
Sustrato natural	2,845	0,409	6,961	< 0,001

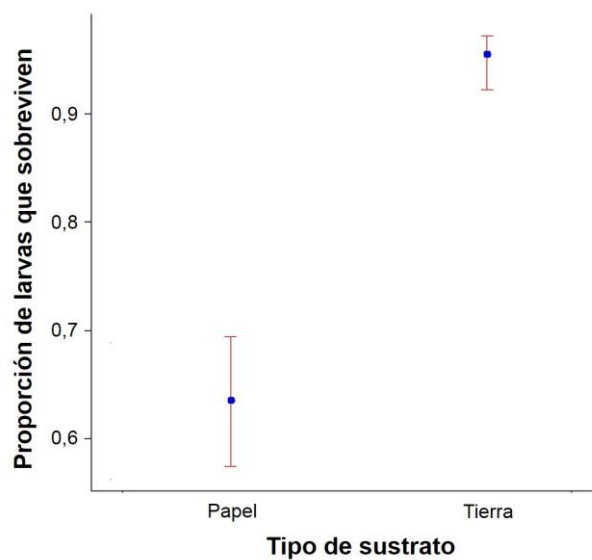


Figura 4.3. Efecto del sustrato de cría sobre la supervivencia de larvas de estadio I de *M. ruficauda* en sustrato artificial, papel, y en sustrato natural, tierra: primera serie experimental.

En la segunda serie experimental de seguimiento diario, en que se utilizaron 20 larvas por lote, se encontró que las larvas criadas en sustrato natural presentaron una mayor tasa de muda que aquellas criadas en sustrato artificial ($90,5 \pm 13,85$ % vs. $62,5 \pm 28,68$ % respectivamente, Figuras 4.4 y 4.5). Además, a 30°C la tasa de muda de las larvas fue mayor que la tasa de muda a 25°C , para ambos sustratos ($94 \pm 5,7$ % en sustrato natural y $77 \pm 19,25$ % en sustrato artificial, Figuras 4.4 y 4.5). Se construyeron dos modelos para la tasa de muda. En el modelo con interacción, la interacción entre la temperatura y tipo de sustrato no fue significativa. Por otra parte, los modelos con y sin interacción no mostraron diferencias significativas ($p = 0,310$), y los valores de AIC de ambos modelos fueron muy similares (AIC = 515,84 con interacción, AIC = 514,87 sin interacción). Por estos motivos, se conservó entonces el modelo más sencillo sin interacción, y sólo se analizaron los efectos principales. De acuerdo al modelo escogido, las chances de mudar en sustrato natural son 5 veces mayores que en sustrato artificial (Tabla 4.3, *odd-ratio* = 5,045). En cuanto a la temperatura, las chances de mudar a 30°C son 1,5 veces mayores que a 25°C (Tabla 4.3, *odd-ratio* = 1,499).

Tabla 4.3. Efecto del sustrato y la temperatura de cría sobre la proporción promedio de larvas I de *M. ruficauda* que muda al estadio II. Se evaluaron sustratos artificial y natural y temperaturas de cría de 25°C y 30°C . Salida del programa R: modelo lineal generalizado (GLM). Segunda serie experimental.

	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
Sustrato artificial 25°C (intercepto)	0,545	0,098	5,563	<0,001
30°C	0,405	0,139	2,906	0,004
Sustrato natural	1,612	0,154	10,534	<0,001

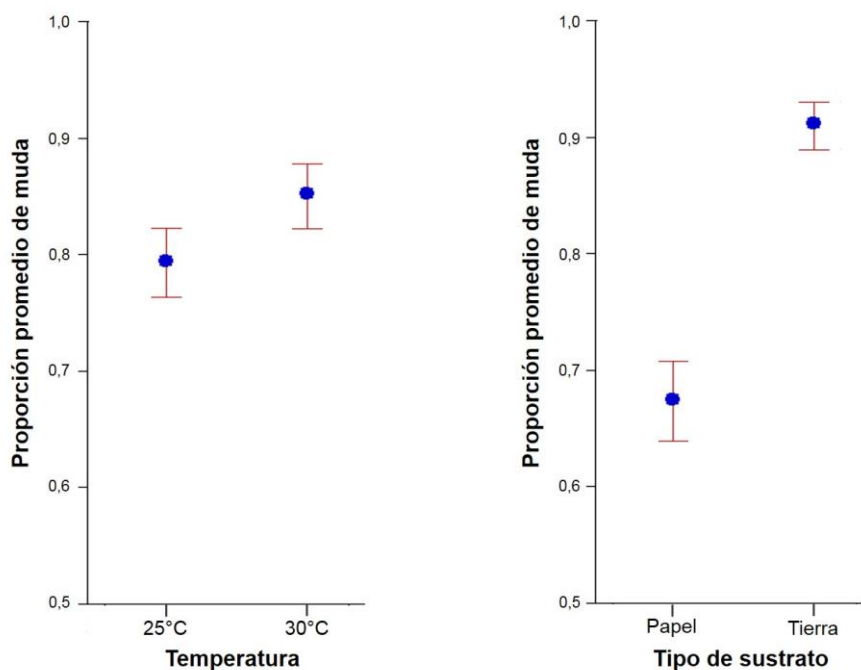


Figura 4.4. Efecto del sustrato y la temperatura de cría sobre la proporción promedio de larvas I de *M. ruficauda* que muda al estadio II. Segunda serie experimental.

La comparación entre los tiempos que tarda en mudar la primera larva de cada lote mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($H = 50,376$, $p < 0,001$). Las primeras larvas en mudar fueron aquellas mantenidas en sustrato natural a 30°C, seguidas por aquellas en sustrato natural a 25°C y en sustrato artificial a 30°C (entre las que no se observaron diferencias), y por último por las mantenidas a 25°C en sustrato artificial (Figura 4.5, Tabla 4.4). Consistentemente, el número de días que tardaron el 50% de las larvas en mudar mostró diferencias significativas entre tratamientos ($H = 52,966$, $p < 0,001$), siendo menor en sustrato natural a 30°C, seguido de sustrato natural a 25°C, sustrato artificial a 30°C y sustrato artificial a 25°C (Figura 4.5, Tabla 4.4).

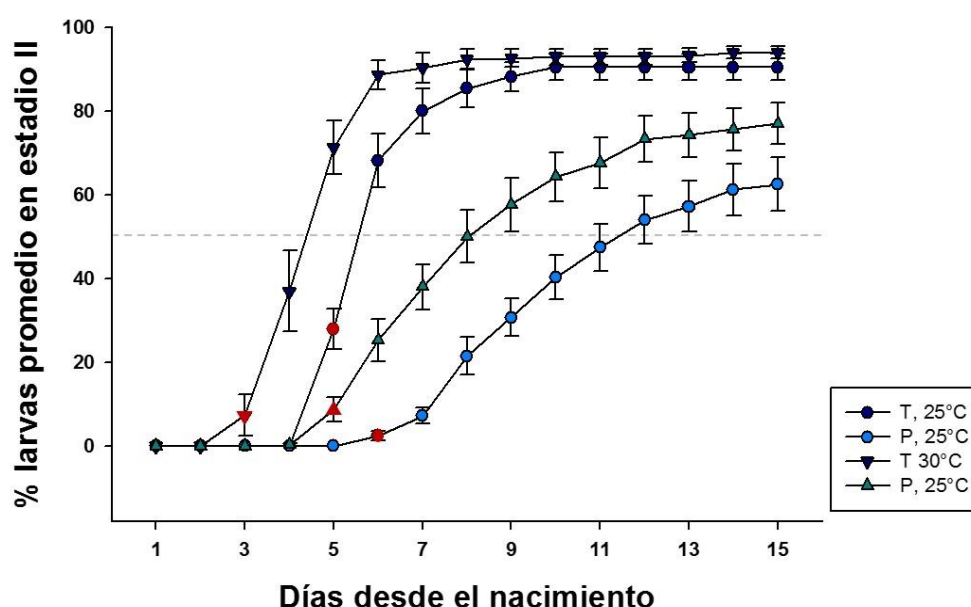


Figura 4.5. Porcentaje acumulado promedio de muda de larvas de *M. ruficauda* criadas en sustratos artificial y natural a distintas temperaturas (25° y 30°C), calculado a partir de 15 y 20 lotes de 20 larvas cada uno (tratamiento a 30°C y a 25°C respectivamente). Las barras verticales indican los correspondientes errores estándar. La línea punteada indica el 50% de muda, mientras que los símbolos en rojo representan el momento en que muda la primera larva en cada tratamiento. Segunda serie experimental. Referencias: T: sustrato natural (tierra), P: sustrato artificial (papel).

Tabla 4.4. Comparación del número de días que tardan en mudar al estadio II las larvas I de *M. ruficauda* en distintos sustratos y temperaturas. Muda de la primera larva y muda del 50% de las larvas de cada lote evaluado. Los valores corresponden a la los valores de P de la prueba de Dunn. Segunda serie experimental.

Comparación entre tratamientos (Sustrato, temperatura)		Artificial, 25°C	Artificial, 30°C	Natural, 25°C
Artificial, 30°C	1° larva	0,001	-	-
	50% muda	0,050	-	.
Natural, 25°C	1° larva	0,000	0,214	-
	50% muda	0,000	0,001	.
Natural, 30°C	1° larva	0,000	0,000	0,001
	50% muda	0,000	0,000	0,043

Respecto a la supervivencia, el experimento de seguimiento diario mostró que tanto a 25°C como a 30°C las larvas criadas en sustrato natural presentaron una mayor tasa de supervivencia que aquellas criadas en sustrato artificial ($88,0 \pm 15,1$ % vs. $66,0 \pm 25,9$ % a 25°C y $94,0 \pm 5,7$ % vs. $77,0 \pm 19,2$ % a 30°C, respectivamente, Figura 4.6). Además, a 30°C la supervivencia de las larvas fue mayor que la supervivencia a 25°C, para ambos sustratos. Respecto a la elección del modelo con o sin interacción, se observaron patrones similares a los encontrados en los modelos construidos para la muda. En el modelo con interacción, la interacción entre la temperatura y tipo de sustrato no fue significativa. Por otra parte, los modelos con y sin interacción no mostraron diferencias significativas ($p = 0,623$), y los valores de AIC de ambos modelos fueron muy similares (AIC = 348,79 con interacción, AIC = 347,03 sin interacción). Por estos motivos, se conservó entonces el modelo más sencillo sin interacción, y sólo se analizaron los efectos principales. De acuerdo al modelo escogido, las chances de supervivencia en sustrato natural son 4,6 veces mayores que en sustrato artificial (Tabla 4.5, *odd-ratio* = 4,648). En cuanto a la temperatura, las chances de supervivencia a 30°C son 1,7 veces mayores que a 25° (Tabla 4.5, *odd-ratio* = 1,689).

Tabla 4.5. Efecto del sustrato y la temperatura de cría sobre la probabilidad de supervivencia de larvas de *M. ruficauda*. Se evaluaron sustratos artificial, papel, y natural, tierra, y temperaturas de cría de 25° y 30°C. Salida del programa R: modelo lineal generalizado (GLM). Segunda serie experimental.

	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
Sustrato artificial 25°C (intercepto)	0,724	0,117	6,167	<0,001
30°C	0,524	0,161	3,255	0,001
Sustrato natural	1,536	0,181	8,476	<0,001

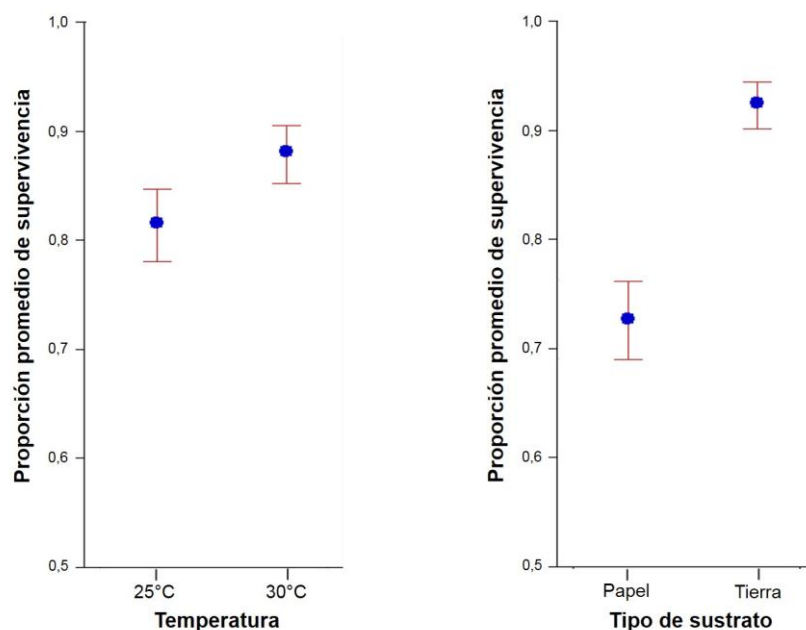


Figura 4.6. Efecto del sustrato y la temperatura de cría sobre la supervivencia promedio de larvas de *M. ruficauda*. Segunda serie experimental.

Evaluación del efecto del sustrato como fuente de nutrientes requeridos para la muda

Los experimentos utilizando diferentes sustratos mostraron que las larvas de *M. ruficauda* fueron capaces de mudar al segundo estadio sin obtener ningún tipo de nutriente del sustrato. En todos los tratamientos una proporción de larvas fue capaz de mudar, excepto en aquellos en que no se proporcionó fuente de humedad (tratamientos “sin sustrato” y “sustrato papel sin agua”), en los cuales la mortalidad fue del 100% (Figura 4.7). La proporción de muda, sin embargo, fue mayor en el sustrato natural que en todos los otros tratamientos (Figura 4.7). De acuerdo al modelo, las chances de mudar en tierra fueron significativamente mayores que en los otros tratamientos, entre los cuales no se hallaron diferencias significativas (Tablas 4.6 y 4.7; *odd-ratios* respecto a tierra = 0,014 para agua de ósmosis, 0,020 para agua de ósmosis + papel, 0,017 para agua destilada, y 0,026 para agua destilada + papel). En este experimento no hubo larvas perdidas y por lo tanto la supervivencia fue equivalente a la tasa de muda, dado que las larvas mueren si no alcanzan el segundo estadio. La proporción de larvas que sobrevivieron en los tratamientos sin humedad (“sin sustrato” y “sustrato papel sin agua”) fue de 0%, y significativamente mayor en el tratamiento con sustrato natural que en los demás tratamientos, entre los cuales no se hallaron diferencias significativas.

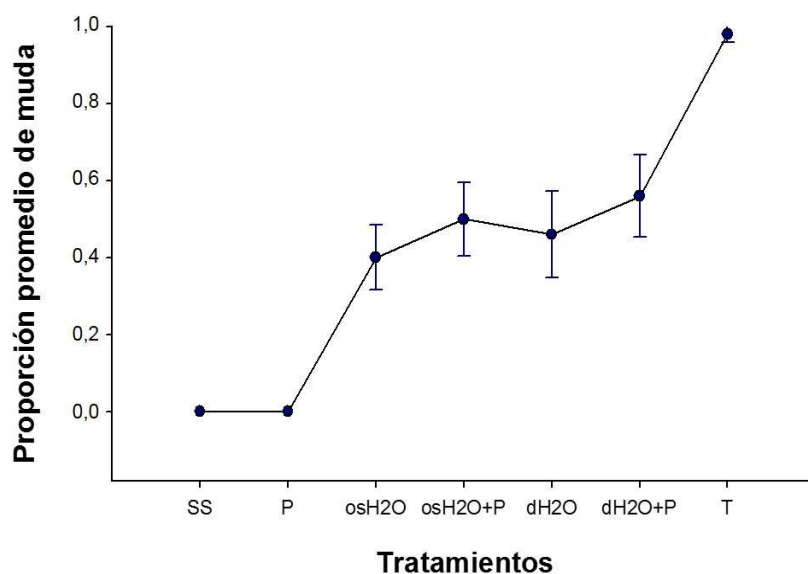


Figura 4.7. Efecto del sustrato de cría y de la alimentación sobre la proporción promedio de larvas I de *M. ruficauda* que mudan al estadio II, computado sobre larvas en estadio II al día 15 desde el nacimiento. Las barras verticales indican los correspondientes errores estándar. Referencias: SS: sin sustrato, P: sustrato artificial (papel), osH2O: agua de ósmosis, dH2O: agua destilada, T: sustrato natural (tierra).

Tabla 4.6. Efecto del sustrato y de la alimentación sobre la probabilidad de muda al estadio II de larvas I de *M. ruficauda*. Salida del programa R: modelo lineal generalizado (GLM). Referencias: dH₂O: agua destilada, dH₂O+P: agua destilada y papel, osH₂O: agua de ósmosis, osH₂O+P: agua de ósmosis y papel. Los valores de referencia se establecieron para el tratamiento sustrato tierra.

	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
tierra (intercepto)	-3,892	1,010	3,854	<0,001
dH₂O	-4,052	1,049	-3,863	<0,001
dH₂O+P	-3,651	1,049	-3,479	<0,001
osH₂O	-4,297	1,050	-4,091	<0,001
osH₂O+P	-3,892	1,049	-3,711	<0,001

Tabla 4.7. Efecto del sustrato y de la alimentación sobre la probabilidad de muda al estadio II de larvas I de *M. ruficauda*. Comparaciones entre los distintos tratamientos. Salida del programa R mostrando los resultados de la prueba de rangos de Tukey. Referencias: dH₂O: agua destilada, dH₂O+P: agua destilada y papel, osH₂O: agua de ósmosis, osH₂O+P: agua de ósmosis y papel.

	Estimador	Error estándar	Valor z	Valor p
dH₂O - Tierra	-4,052	1,049	-3,863	<0,001
dH₂O+P - Tierra	-3,651	1,049	-3,479	0,004
osH₂O - Tierra	-4,297	1,050	-4,091	<0,001
osH₂O+P - Tierra	-3,892	1,049	-3,711	0,002
dH₂O+P - dH₂O	0,402	0,402	0,999	0,844
osH₂O - dH₂O	-0,245	0,405	-0,606	0,972
osH₂O+P - dH₂O	0,160	0,401	0,400	0,994
osH₂O - dH₂O+P	-0,647	0,406	-1,594	0,477
osH₂O+P - dH₂O+P	-0,241	0,402	-0,601	0,972
osH₂O+P - osH₂O	0,406	0,404	1,003	0,842

Discusión

En el presente capítulo se evaluaron los efectos del tipo de sustrato y de la temperatura sobre la supervivencia de las larvas de estadio I de *M. ruficauda* y la muda al estadio II, así como la ocurrencia de muda en ausencia de alimento. Dichos efectos son discutidos a continuación, a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo.

En la primera parte del presente capítulo se consideraron tres factores que afectan a los organismos que habitan en el suelo: la presencia de sustrato, la humedad y la temperatura. A continuación se discute cómo estos factores afectan la supervivencia y la muda de las larvas I de *M. ruficauda*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que el sustrato tuvo efectos sobre la tasa de muda y la supervivencia de las larvas de primer estadio de *M. ruficauda*. En particular, las larvas

presentaron una mayor proporción de muda y una mayor supervivencia cuando fueron criadas en tierra. Este hecho podría estar ligado a numerosos factores relacionados con los beneficios que ofrece el medio subterráneo a los organismos que habitan en él, que se discuten a continuación.

Las larvas de *M. ruficauda* nacen de desoves ubicados a cierta altura del suelo, son dispersadas por el viento y caen al suelo, donde se entierran (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a, Copello 1922, 1927). La larva de estadio I presenta una gran motilidad (Crespo y Castelo 2008), que ha sido asociada con la búsqueda de microambientes con condiciones propicias para su desarrollo (Crespo y Castelo 2008, Copello 1922, 1927). Como se ha observado en adultos y larvas de otros insectos (Harrison *et al.* 1993, Kindvall *et al.* 2000), la motilidad de las larvas en el suelo posiblemente se vea afectada por la textura del sustrato. Las larvas de *M. ruficauda*, como las de todos los dípteros, son ápodas y mantienen por ende la mayor parte de su cuerpo en contacto con el sustrato que las rodea. Este amplio contacto incrementa la fricción a que se ve sometido el individuo y la consecuente fuerza que debe aplicar para moverse, resultando en que la locomoción represente un alto costo energético (Berrigan y Lighton 1993). Para las larvas de estadio I de *M. ruficauda*, que no buscan activamente al hospedador, la iniciativa de movimiento podría estar regida por algún otro beneficio potencial que compense la inversión energética en locomoción. Como se ha mencionado al comienzo de este párrafo, se cree que la gran movilidad de este estadio podría no sólo facilitar el entierro una vez que las larvas caen al suelo, sino estar relacionada también con la búsqueda de refugios, en particular para llevar a cabo el proceso de muda. En la vida de los insectos la muda constituye un momento de vulnerabilidad, puesto que durante estos períodos, y hasta que la nueva cutícula esclerotiza, se encuentran temporalmente desprovistos de las capas más duras de tegumento que los protegen de depredadores y agentes infecciosos (Chapman 1998). La búsqueda de microambientes adecuados para llevar a cabo el proceso de muda podría representar un mecanismo efectivo que evitaría estas amenazas. En este sentido, la estructura del sustrato condiciona la disponibilidad de refugios, y un mejor sustrato sería aquel que ofrezca mayor cantidad de refugios apropiados y por ende un menor costo en locomoción en encontrarlos. El comportamiento de las larvas de *M. ruficauda* dentro del suelo no ha sido estudiado hasta el momento debido a las dificultades técnicas que presenta el rastreo de los individuos dentro del suelo, asociadas a su pequeño tamaño. Sin embargo, es posible que parte del aumento en la tasa de muda observado en sustrato natural respecto al sustrato artificial esté influenciado por la propia estructura del sustrato (*i.e.*, tridimensional vs. bidimensional) y la concomitante disponibilidad de refugios. Para corroborar esta hipótesis, deberían llevarse a cabo nuevos estudios que contemplen sustratos con diferentes granulometrías y utilicen técnicas sofisticadas de seguimiento de individuos subterráneos (Johnson *et al.* 2004).

Como se ha mencionado en la Introducción, así como el tipo de sustrato, la disponibilidad de agua en el suelo afecta la supervivencia y el desarrollo de los individuos, su nivel de actividad y sus interacciones con otros organismos (Eskafi y Fernández 1990, Grant y Villani 2003, Killham 1994, Tsunoda *et al.* 2014). En los experimentos de este trabajo se observó que las larvas de *M. ruficauda* son extremadamente sensibles a la desecación, mostrando una tasa de mortalidad del 100% en los tratamientos sin humedad. Este resultado es esperable dado el pequeño tamaño de las larvas y la gran relación superficie-volumen, que resulta en una alta tasa de pérdida de agua por transpiración (Chown y Nicolson 2004). Si bien los insectos poseen una capa de cera sobre la epicutícula que restringe la pérdida de agua por transpiración, la permeabilidad de dicha capa es dependiente de la temperatura y variable dependiendo del estrés mecánico al que esté sometida (Beament 1961, Edney 2012, Wigglesworth 1945). En particular, las larvas de insectos que viven en el suelo muestran una gran variabilidad en sus tasas de evaporación de agua debido a la abrasión de la capa de cera debida al roce con partículas del suelo (Wigglesworth 1945). Dado que la humedad relativa en los medios de cría utilizados fue fijada *a priori* en uno de dos niveles (*i.e.*, con y sin agua), el efecto de este factor sobre la tasa de muda y supervivencia de las larvas de *M. ruficauda*, sólo fue evaluado en esos dos niveles. En condiciones hídricas intermedias se espera que, a partir de un valor de humedad umbral, las larvas presenten tasas de muda y supervivencia intermedias, y que las tasas varíen de acuerdo al efecto combinado de humedad, granulometría del sustrato y temperatura.

En cuanto al tercer factor considerado, la temperatura, los resultados de este trabajo indicaron que el desarrollo de las larvas se vio afectado por la temperatura de manera que, independientemente del sustrato en que se encontraron, a mayor temperatura la proporción de larvas que mudaron fue mayor y la duración del estadio I fue menor (*i.e.*, las larvas mudan antes). Estos resultados son acordes con los hallados en otras especies de insectos pertenecientes a diversos taxa, y son esperables de acuerdo a la generalidad observada en los artrópodos. Como se menciona en la Introducción, se ha observado en distintas especies que a temperaturas mayores la duración de los estadios larvales y el tiempo invertido en la muda son menores que a temperaturas más bajas (*e.g.*, Couret *et al.* 2014, Frouz *et al.* 2002, Tomberlin *et al.* 2009).

En cuanto a la supervivencia de las larvas, los resultados hallados en este trabajo indicaron que la supervivencia efectiva de las larvas de estadio I de *M. ruficauda* fue mayor a 30°C que a 25°C. En especies de insectos de diferentes taxa, se ha reportado que el aumento de temperatura está relacionado con un aumento del estrés oxidativo y un consecuente aumento de la mortalidad (Cui *et al.* 2011, Li *et al.* 2011, Park y Kwak 2014). No obstante, la temperatura de supervivencia óptima varía entre especies y, para una misma especie, puede depender de numerosos factores, como el estadio considerado y el sexo del individuo, entre otros (Bazzocchi *et al.* 2003, Karolewski *et al.*

2007, Sánchez-Ramos *et al.* 2015). Por ejemplo, para algunos organismos las tasas de mortalidad a temperaturas intermedias dentro del rango de tolerancia pueden ser mayores que a temperaturas más elevadas (Régnière *et al.* 2012, Vargas *et al.* 1996). Además el desempeño de los organismos a distintas temperaturas puede verse afectado por diversas variables, tanto relacionadas con el ambiente como con el propio individuo: la duración de la exposición a una determinada temperatura, la exposición previa y su relación con la aclimatación de los individuos, el rango geográfico y las características del hábitat (como ser la presencia de microambientes), el estado de desarrollo y el estado nutricional de los individuos y su genética (Colinet *et al.* 2015, Kingsolver *et al.* 2011, Logan *et al.* 2014, Sinclair *et al.* 2012, 2016). Los efectos de la duración y el patrón de exposición térmica han sido referidos como efectos dependientes del tiempo (Kingsolver y Woods 2016), y pueden afectar a los individuos tanto de manera positiva como negativa, dependiendo de la escala temporal que se evalúe. A temperaturas elevadas, la tasa de crecimiento puede verse incrementada en un principio, pero luego sufrir un decremento rápido si la exposición a dichas temperaturas, incluso si son no letales, se prolonga en el tiempo (Kingslover y Woods 2016). Por ejemplo, se ha reportado para huevos y larvas de *M. sexta* que temperaturas que maximizan el desarrollo a escalas temporales cortas (*i.e.*, menores a un día), pueden tener efectos negativos o incluso letales cuando la duración de la exposición es mayor (Kingsolver 2000, Kingsolver y Wood 1997, Kingsolver *et al.* 2004, Potter *et al.* 2009, Reynolds y Nottingham 1985). Las variaciones diarias de temperatura en el ambiente también pueden afectar el desempeño térmico (Kingsolver *et al.* 2009, 2015, Niehaus *et al.* 2012). En insectos se ha mostrado que la exposición previa a condiciones de temperatura elevada resulta en respuestas de resistencia al calor (Bahrndorff *et al.* 2009, Hoffmann *et al.* 2003, Karl *et al.* 2012). Si bien los rangos de tolerancia térmica de *M. ruficauda* no se conocen hasta el momento, es posible que la temperatura óptima para la especie se encuentre por encima de 25°C. De ser así, al menos parte del aumento de la supervivencia y la tasa de muda podrían explicarse considerando que 30°C estuviera más cerca del valor de temperatura óptimo. Dado que la temperatura puede tener efectos diferenciales en distintos momentos de la vida del insecto, no puede descartarse que la exposición continua a 30°C pueda afectar diferencialmente la supervivencia de las larvas de estadio II y/o sucesivos y el *fitness* del adulto. En polillas, por ejemplo, se ha mostrado que la exposición de los estadios larvales a altas temperaturas afecta la supervivencia, la fecundidad y los patrones de oviposición de los adultos dependiendo de la duración de la exposición y el estadio afectado (Zhang W. *et al.* 2015). No obstante, debe subrayarse que dado que sólo el estadio II de *M. ruficauda* es capaz de buscar activamente a su hospedador, de lo cual depende su supervivencia futura (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2008, Crespo y Castelo 2010, Crespo *et al.* 2011), el hecho de estar expuesto a una mayor temperatura durante el primer estadio,

al aumentar las probabilidades de alcanzar el segundo estadio, podría favorecer indirectamente la supervivencia general de la especie.

Un aspecto importante a considerar cuando se evalúan los efectos de la temperatura sobre los rasgos de historia de vida de los insectos es la representatividad de las condiciones de laboratorio respecto a las condiciones naturales a las que están sometidos los individuos. La mayor temperatura evaluada en este trabajo (30°C) corresponde a un valor que se observa normalmente durante el día en la Región Pampeana en los meses de verano. Sin embargo, dentro del suelo la temperatura no es necesariamente aquella medida en el exterior, y datos de temperatura dentro del sustrato indican que las temperaturas medias del suelo durante este período son inferiores. Por ejemplo, en una estación tipo de la Región Pampeana (EEA San Pedro, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), las series históricas de datos agroclimáticos entre 1967 y 2012 muestran que las temperaturas medias del suelo a 10 cm de profundidad son de 23,9°C y 25,6°C en diciembre y enero, respectivamente (Zanek *et al.* 2015). Estos valores son equiparables a la temperatura utilizada en los tratamientos a 25°C, y podría especularse que las condiciones naturales favorezcan tasas de muda y supervivencia similares a las halladas en dichos tratamientos. Sin embargo, al evaluar la temperatura en el suelo deben considerarse dos factores de variación importantes. Primeramente, el suelo presenta termoclinas, y la temperatura disminuye conforme aumenta la profundidad (Lavelle y Spain 2001). Por ejemplo, las series históricas presentadas por Zanek *et al.* (2015) muestran que las temperaturas medias del suelo a 5 cm de profundidad en diciembre y enero son de 24,3°C y 25,9°C, mientras que a 20 cm los valores son de 23,6°C y 25,5°C, respectivamente. En segundo lugar, las temperaturas reportadas constituyen valores medios, pero durante el transcurso del día las temperaturas en el suelo pueden alcanzar valores más elevados (Lavelle y Spain 2001). Estos dos factores modifican espacial y temporalmente las condiciones térmicas del sustrato, y podrían tener influencia en el efecto de la temperatura sobre las larvas. En este sentido, en numerosos trabajos se ha argumentado que el estudio del efecto de la temperatura sobre el desempeño de los insectos debería ser centrado en la evaluación de temperaturas fluctuantes y no de valores de temperatura fijos, ya que las primeras reflejan mejor las condiciones naturales (*e.g.*, Colin *et al.* 2015, Kingsolver *et al.* 2015). En comparación con condiciones térmicas constantes, se ha observado también que las fluctuaciones de temperatura dentro de los rangos de tolerancia pueden acelerar el desarrollo de los insectos, aumentar su longevidad y fecundidad e incluso su tolerancia a temperaturas más extremas (Colin *et al.* 2015). Considerando que las larvas de *M. ruficauda* podrían estar expuestas en su ambiente natural a temperaturas altas y a fluctuaciones, podría esperarse que la velocidad y tasa de muda sean similares o aún mayores a las reportadas a 30°C en el presente estudio.

Además de presentar variaciones térmicas espaciales a mediana escala (*i.e.*, cm a m), el suelo es un medio térmicamente heterogéneo a micro escala (Lavelle 2012, Lavelle y Spain 2001). Variaciones en las características del sustrato, tales como su composición material, su granulometría, el grado de aireación y de saturación de agua, pueden influenciar la disposición de micrositios con temperaturas distintas (Lavelle y Spain 2001). De esta forma, el suelo ofrece a los organismos que habitan en él, y en particular a los de pequeño tamaño, variedad de microambientes entre los cuales desplazarse en busca de las condiciones de temperatura óptimas. En este trabajo se evaluaron dos sustratos muy diferentes en cuanto a conformación, pero no se encontró interacción entre el efecto del sustrato y de la temperatura sobre las tasas de muda y supervivencia. Este resultado podría atribuirse a que los volúmenes de sustrato natural utilizado fueron pequeños, lo cual podría disminuir los efectos amortiguadores de la temperatura que serían esperables en volúmenes mayores. Para entender mejor cómo afecta la temperatura al desarrollo de los primeros estadios larvales de *M. ruficauda*, futuros estudios deberían evaluar la supervivencia y tasas de muda en sustratos con volúmenes mayores y en condiciones de temperatura fluctuantes que reflejen más cabalmente las condiciones naturales.

El suelo, además de brindar las condiciones y recursos descritos anteriormente, provee a los organismos que lo habitan con nutrientes fundamentales para su desarrollo (Lavelle 2012, Lavelle y Spain 2001). Las larvas depredadoras de los asílidos no son la excepción, y se alimentan de otros invertebrados que habitan el sustrato (Dennis *et al.* 2013, Knutson 1972). No obstante, la literatura indica que en general las larvas de primer estadio de esta familia no se alimentan (Brown *et al.* 2010, Dennis *et al.* 2013, Knutson 1972). Por ejemplo, Musso (1978, 1983) reportó que las larvas de primer estadio de *M. rusticus* y *M. pilipes* sólo subsisten utilizando las reservas de nutrientes provenientes del huevo. Existe sin embargo una excepción reportada en *M. media* cuyas larvas de estadio I se alimentan del hospedador (Clements y Bennett 1969).

Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron que la proporción de muda y la chance de mudar son significativamente mayores cuando las larvas son criadas en sustrato natural. El sustrato puede influir sobre las larvas de diversas maneras a través de los factores físicos discutidos anteriormente (humedad, refugios, medio de locomoción), pero también es posible que el sustrato natural aporte algún nutriente particular (ausente en los otros sustratos analizados) que incremente las chances de mudar de las larvas. Ello podría explicar al menos parcialmente las diferencias en las tasas de muda observadas. De acuerdo con la bibliografía, las larvas de estadio I de *M. ruficauda* no se alimentan activamente, aunque se ha sugerido que pueden tomar agua y oligoelementos del suelo (Crespo y Castelo 2010, Castelo y Lazzari 2004, Copello 1922, 1927, 1942, Musso 1983). Sin embargo, este hecho es apuntado como una observación, y no se contaba hasta el momento con

experimentos específicos de alimentación que pusieran a prueba esta hipótesis. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera evidencia experimental que muestra que larvas de primer estadio de un asílido parasitoide privadas de alimento son capaces de mudar al segundo estadio. En otras palabras, si bien no se descarta que las larvas tengan la capacidad de obtener algún nutriente del sustrato en condiciones naturales, los experimentos llevados a cabo en este trabajo muestran que la alimentación no sería necesaria para la muda de las larvas del primer al segundo estadio. Restaría determinar en estudios futuros si el no ingerir alimento tiene influencia sobre la condición fisiológica de los individuos, si aquellas larvas que mudan en ausencia de sustrato ven afectadas su probabilidad de supervivencia o alguna característica directamente relacionada con su *fitness*, como ser la capacidad de búsqueda del hospedador. Es importante mencionar que durante el desarrollo de los experimentos se consideró la posibilidad de que, aún sin sustrato agregado, las larvas pudiesen estar utilizando como nutriente algún elemento del tubo plástico en que se mantuvieron. Dicha posibilidad se consideró remota, pero se realizaron de todas maneras ensayos accesorios equivalentes a los presentados en este trabajo utilizando tubos de vidrio (P. Zermoglio, datos no mostrados). En dichos ensayos se obtuvieron los mismos resultados: las larvas son capaces de mudar sin alimentarse.

La evidencia a favor de la hipótesis de no alimentación implica que los recursos energéticos provenientes únicamente de la asignación de nutrientes a los huevos por parte de la hembra adulta serían suficientes para la supervivencia y muda de las larvas al estadio II. En *M. ruficauda* la hembra adulta se alimenta durante la temporada reproductiva (Castelo 2003, Copello 1927, Nussebaum 2007) y los recursos con que dispone deben repartirse entre su propio mantenimiento corporal y la producción de huevos (Boggs 1981). La hembra de *M. ruficauda* tiene una estrategia sinovigénica extrema (Nussebaum 2007), y se esperaría que el costo de producir larvas que no se alimentan tuviera un efecto sobre sus parámetros reproductivos y sobre su supervivencia, dado que debería asignar gran cantidad de recursos a la maduración de huevos que contengan suficientes nutrientes, recursos que no utilizará en su propio mantenimiento corporal. Un factor a considerar es la alta mortalidad de los estados inmaduros, característica de los insectos. Si bien no se han cuantificado, muchos factores en la ecología de *M. ruficauda* estarían relacionados con a una alta mortalidad en los primeros estadios del desarrollo. Entre estos factores pueden contarse la dispersión de las larvas I al nacer por acción el viento (Castelo 2003, Castelo y Capurro 2000, Castelo y Corley 2004a, Castelo *et al.* 2006), la baja probabilidad de encuentro del hospedador (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a, Castelo y Lazzari 2004) y la existencia de competencia intraespecífica durante el superparasitismo (Barrantes 2015, Castelo 2003, Crespo 2011, Crespo y Castelo 2009). Teniendo todos estos factores en cuenta, es de esperar que la estrategia de las hembras sea poner un gran

número de huevos, lo cual aumentaría su probabilidad de éxito. En efecto, se ha reportado que el número medio de huevos por desove es de 328 (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a), un valor alto entre los asílidos (Dennis *et al.* 2013). Las hembras adultas se enfrentan entonces a una gran inversión energética a la hora de poner huevos, pues éstos son numerosos y deben contener nutrientes suficientes que permitan la existencia de un primer estadio larval que no se alimente. La asignación de recursos a los huevos por las hembras fue estudiada en el Capítulo 3 del presente trabajo. Siendo que la formación de larvas I es costosa energéticamente y afecta directamente el *fitness* del individuo, se espera que la persistencia evolutiva de este estadio estuviera ligada a ventajas adaptativas propias del estadio. Algunas de estas ventajas podrían ser el constituir un factor de dispersión adicional que reduzca los efectos denso-dependientes de la competencia intraespecífica por superparasitismo, o de búsqueda del microhábitat de los hospedadores. Alternativamente, la persistencia del estadio podría constituir un resabio de una condición ancestral. La discusión sobre estos aspectos evolutivos se presenta en el Capítulo 9, contextualizando los rasgos de la historia de vida de la especie en función de la historia evolutiva del grupo.

En conclusión, del análisis de los resultados presentados en este capítulo se desprende que la humedad y el tipo de sustrato juegan un rol importante en el desarrollo del primer estadio larval de *M. ruficauda*, en particular en cuanto a sus tasas de muda y supervivencia. El sustrato aporta un soporte físico tridimensional, pero no resulta un recurso fundamental en cuanto a alimentación, dado que las larvas son capaces de mudar al segundo estadio prescindiendo de su presencia. Este estudio constituye la primera evidencia experimental de una larva parasitoide que no se alimenta. Hasta el presente no se cuenta con estudios exhaustivos sobre los hábitos alimentarios de grupos filogenéticamente cercanos a esta especie y que comparten rangos de distribución geográfica similares. Por ello, el interrogante sobre la persistencia evolutiva de un primer estadio larval móvil que no se alimenta en relación con la inversión energética que significa para la hembra permanece abierto.

CAPÍTULO 5

Selección del hospedador en función de su calidad nutricional

Introducción

En el ambiente los nutrientes se encuentran empaquetados en unidades de recurso, y la decisión de consumir una unidad de recurso determinada está relacionada con la composición nutricional de las unidades que se hayan disponibles, la evaluación del estado nutricional interno y la comparación de dichos parámetros (Simpson y Raubenheimer 2011). Para los parasitoides, los hospedadores constituyen las unidades de recurso. Al momento de parasitar, la idoneidad nutricional del hospedador es un factor que afecta su desarrollo (Salt 1938). Los factores que determinan si un hospedador es nutricionalmente idóneo incluyen la cantidad y calidad de nutrientes que contiene y la presencia y disponibilidad de niveles adecuados de factores de crecimiento accesorios (Simpson y Raubenheimer 2011, Vinson e Iwantsch 1980). La insuficiencia nutricional del hospedador puede afectar a los parasitoides de diversas maneras, ya sea afectando su emergencia o aumentando su mortalidad pre-emergencia y/o reduciendo su longevidad y fecundidad (Vinson e Iwantsch 1980). En este sentido, resultaría adaptativo para los parasitoides poder discriminar la calidad de los hospedadores con respecto a sus reservas nutricionales antes de parasitarlos.

Los nutrientes que los parasitoides puedan obtener de una unidad de recurso dependerán de la calidad de los hospedadores. Los hospedadores pueden ser considerados como recursos de distinta calidad dependiendo de factores tales como la especie del hospedador y su estadio (Harvey 2000, Kant *et al.* 2012, Mohamed *et al.* 2006), su peso y tamaño (Silva-Torres *et al.* 2009, Wang y Messing 2004), su grado de parasitismo previo (Brodeur y Boivin 2004, Godfray 1994, van Alphen y Visser 1990) y su estado fisiológico general. Estos factores están frecuentemente relacionados entre sí, y todos ellos tendrán efecto sobre los nutrientes disponibles para el parasitoide.

En líneas generales, se considera que hospedadores de mayor tamaño representan hospedadores de mejor calidad para los parasitoides, puesto que contienen mayor cantidad de nutrientes (Harvey 2005, Harvey *et al.* 2013, Silva-Torres *et al.* 2009, Wang y Messing 2004). Se ha reportado en numerosos casos que el tamaño de los parasitoides es mayor cuando se desarrollan a partir de hospedadores de mayor tamaño (Harvey 2005). Muchas características morfológicas, fisiológicas y ecológicas de los animales están ligadas al tamaño corporal (Brown y West 2000, Calder 2001, Peters 1983). En la literatura, tamaño y masa corporal suelen utilizarse como sinónimos, y en muchos estudios se habla de “tamaño” en referencia a la variable peso. Posiblemente esto se deba a que el peso y el tamaño suelen estar correlacionados positivamente. Sin embargo, estos dos parámetros no son estrictamente equivalentes. A pesar de que ambos, peso y tamaño, suelen tener relaciones similares con otros parámetros, como la concentración de nutrientes y la supervivencia,

dichas relaciones no son necesariamente iguales. El peso suele ser un indicador corriente de la cantidad de nutrientes presentes en los individuos, pero puede ser afectado por otros factores como el nivel de hidratación. Entre los insectos, además del peso, se utiliza a menudo el tamaño de las partes duras (*e.g.*, ancho de cápsula cefálica, largo de patas o alas, etc.) como estimador confiable de tamaño, dado que las estructuras cuticulares no varían su tamaño durante su desarrollo intra-estadio.

La relación entre el peso o tamaño del hospedador y su calidad, sin embargo, puede no ser equivalente en parasitoides con diferentes estrategias de vida. Particularmente, para parasitoides idiobiontes, quienes detienen el desarrollo del hospedador, se considera que, al momento de parasitar, un hospedador de mayor peso es un hospedador de mayor calidad (Harvey *et al.* 2013). En los parasitoides koinobiontes, en cambio, los cuales no detienen el desarrollo del hospedador inmediatamente después del ataque, el tamaño final del hospedador es usualmente muchas veces mayor que el tamaño que presenta al momento del parasitismo (Godfray 1994). En este escenario, la importancia del peso o tamaño inicial del hospedador como indicador de calidad puede ser más compleja de definir (Harvey 2005, Harvey *et al.* 2013).

La calidad de los hospedadores, además de estar relacionada con el peso/tamaño y la cantidad de nutrientes, está también caracterizada por el grado de parasitismo previo, tanto por parte de coespecíficos como por individuos de otras especies (aunque en este trabajo sólo se analizará la competencia intraespecífica). En líneas generales, el superparasitismo es desventajoso para los parasitoides en comparación con parasitar un hospedador sano, pues el hospedador es un recurso único que debe repartirse entre todos los parasitoides inmaduros que se alimenten de él. Sin embargo, se ha visto que en algunos casos el superparasitismo podría resultar beneficioso (Dorn y Beckage 2007, Harvey *et al.* 2013, van Alphen y Visser 1990). En particular, cuando la densidad de hospedadores es muy baja, puede resultar más costoso energéticamente y de mayor riesgo para la supervivencia el buscar un hospedador sano que el parasitar uno previamente atacado. Por otro lado, las consecuencias de la competencia por el hospedador sobre el *fitness* del parasitoide varían dependiendo de la estrategia de vida del parasitoide, y se han registrado tendencias opuestas en distintas especies (Harvey *et al.* 2013). Por ejemplo, en endoparasitoides koinobiontes solitarios se ha reportado que el superparasitismo puede resultar en tamaños corporales de la progenie tanto mayores como menores, en una reducción de la supervivencia y un aumento del tiempo de desarrollo (Harvey 2005). En koinobiontes gregarios, en cambio, se ha observado que el superparasitismo incrementa el número pero disminuye el tamaño de individuos que se desarrollan exitosamente sobre un mismo hospedador (Harvey 2000).

Además de las características del hospedador mencionadas anteriormente, la evaluación de la calidad de un hospedador como recurso está influenciada por el estado interno del parasitoide. En parasitoides en los que es la hembra quien lleva a cabo el parasitismo, la aceptación del hospedador depende de la condición nutricional de la hembra, de su carga de huevos y de su esperanza de vida (Bernstein y Jervis 2008, Minkenberg *et al.*, 1992, Sirot *et al.* 1997). Por ejemplo, se ha mostrado que hembras de *Venturia canescens* Gravenhorst 1829 con expectativa de vida corta escogen hospedadores de menor calidad que hembras con expectativa de vida más larga (Fletcher *et al.* 1994).

En el parasitoide *M. ruficauda*, las larvas llevan a cabo la búsqueda y aceptación del hospedador, y una vez que se han aferrado a él, permanecen en la mayoría de los casos sobre el mismo hospedador durante el resto de su desarrollo. La elección del hospedador será un momento crucial en la vida del parasitoide, puesto que determinará su éxito futuro. En esta especie se ha estudiado la elección de hospedadores de acuerdo a ciertos aspectos de su calidad. Por ejemplo, se sabe que las larvas de *M. ruficauda* parasitan preferentemente a la especie *C. signaticollis*, y que son capaces de discriminar el estadio del hospedador, atacando preferentemente al estadio III (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010, Crespo 2011). También se conoce que son capaces de discriminar hospedadores estresados de no estresados, parasitando preferentemente a los segundos (Barrantes 2015). Además, se ha demostrado en experimentos de laboratorio que las larvas son capaces de discriminar hospedadores sanos de hospedadores previamente parasitados, y que se orientan preferentemente hacia hospedadores sanos (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2009). Esta discriminación podría ser adaptativa, especialmente considerando que *M. ruficauda* es un parasitoide solitario, en el cual sólo una larva por hospedador puede completar el desarrollo. Estas elecciones, sin embargo, son afectadas por la edad de la larva parasitoide y el grado de agregación de coespecíficos, y se ha encontrado que larvas de edad más avanzada o que han sido expuestas a altas densidades de competidores coespecíficos presentan una mayor tasa de orientación hacia y aceptación de hospedadores sub-óptimos (Barrantes 2009, Barrantes y Castelo 2014, Crespo 2011, Crespo *et al.* 2015). En cuanto a la elección de hospedadores según su disponibilidad de nutrientes, se cuenta con evidencia indirecta. Por un lado, Crespo y Castelo (2009) determinaron a campo que el peso de los hospedadores superparasitados es mayor que aquel de los monoparasitados (0,71 g y 0,64 g respectivamente). Sin embargo, Barrantes (2015) mostró que en experimentos de laboratorio, en que ofrecían múltiples hospedadores de distinto peso simultáneamente, la ocurrencia de mono y superparasitismo fue independiente del peso de los hospedadores. Las diferencias reportadas por los distintos autores fueron atribuidas a que el muestreo de Crespo y Castelo se realizó en un período de tiempo específico y acotado, pero podrían también deberse a que el diseño experimental

de Barrantes incluía varios hospedadores al mismo tiempo, y ello podría haber enmascarado posibles tendencias a parasitar hospedadores de determinado peso. En estos estudios sólo se consideró el peso de los hospedadores como estimador de su calidad nutricional.

En el contexto de la historia de vida de *M. ruficauda*, dado que las larvas del parasitoide permanecen sobre el mismo hospedador hasta completar su desarrollo, contar con la capacidad de reconocer a priori hospedadores de mejor calidad en cuanto a sus nutrientes podría resultar ventajoso para el *fitness*. Sin embargo, debe considerarse que las larvas se enfrentan a dos restricciones importantes: su necesidad de parasitar (*i.e.*, si no parasitan mueren) y la disminución progresiva de sus propias reservas y de su probabilidad de supervivencia a medida que pasa el tiempo, dado que no se alimentan hasta que se han aferrado al hospedador. En este sentido, la larva se enfrenta a uno de dos escenarios: esperar a encontrar una unidad de recurso de calidad óptima, o aferrarse a un hospedador disponible independientemente de su calidad y asegurarse la unidad de recurso.

Dados los antecedentes antes mencionados, en este capítulo de la Tesis se planteó como **Objetivo general**: determinar cómo influye la calidad del hospedador en cuanto a sus características nutricionales sobre las decisiones de las larvas de *M. ruficauda* de utilizarlos como unidad de recurso. Se plantearon los siguientes **objetivos particulares**: 1) determinar si las larvas parasitoides parasitan de modo diferencial a hospedadores sanos de la especie *C. signaticollis* de distinta calidad nutricional en cuanto a su peso corporal ó tamaño; 2) determinar si la frecuencia de superparasitismo varía de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador en cuanto a su peso corporal; 3) caracterizar la disponibilidad de hospedadores de la especie *C. signaticollis* en cuanto a su calidad nutricional, explorando los patrones de parasitismo a campo.

Materiales y métodos

En este Capítulo se evaluó mediante experimentos de laboratorio la ocurrencia de parasitismo y de superparasitismo sobre *C. signaticollis* de acuerdo a las características nutricionales de los hospedadores, y se caracterizó la disponibilidad de hospedadores a campo en cuanto a su calidad nutricional. Para todos los experimentos se utilizaron larvas de estadio III de los hospedadores *C. signaticollis* colectadas a campo y mantenidas individualmente con sustrato natural y alimento *ad libitum*, como se especifica en el Capítulo 2. En el lapso de 24 hs posteriores al evento de colecta, se registraron las siguientes características para cada individuo: 1) su sexo, determinado

bajo lupa binocular de acuerdo a la presencia en los machos de la “ampulla”, una estructura esclerotizada ubicada ventralmente en el centro del noveno segmento abdominal (Martínez y Lumaret 2003); 2) su peso corporal, medido con balanza (precisión 0,001g); 3) el ancho máximo de la cápsula cefálica por encima de la inserción de las antenas, medido con calibre (precisión 0,01 mm; Figura 5.1); y 4) su estado de parasitismo: no parasitado, monoparasitado (una sola larva aferrada), ó superparasitado (dos o más larvas aferradas). Algunas de las variables medidas no pudieron ser registradas en todos los individuos; el número de individuos en que se midió cada variable se indica en la Tabla 5.1 de la sección Resultados. Algunos de estos individuos fueron utilizados en las series experimentales y otros en la caracterización a campo, como se especifica más abajo. Las medidas de peso y ancho de cápsula cefálica de todos los individuos se utilizaron para conocer el rango máximo de ambas variables, necesario para los experimentos posteriores.

En los experimentos en que se utilizaron larvas parasitoides, éstas fueron provenientes de desoves colectados a campo separadas al momento de su nacimiento y mantenidas en forma grupal en alta densidad como se especifica en el Capítulo 2.

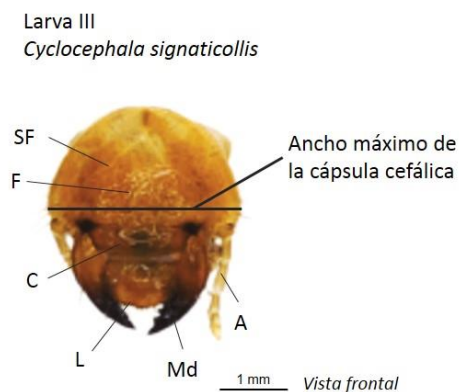


Figura 5.1. Cápsula cefálica de la larva estadio III de *C. signaticollis*. Referencias: A: antenas, Md: mandíbulas, L: labro, C: clípeo, F: frente, SF: sutura frontal.

Parasitismo sobre hospedadores sanos de acuerdo a su calidad nutricional

Con el fin de determinar si las larvas de *M. ruficauda* parasitan a los hospedadores en función de calidad nutricional larvas del parasitoide fueron sometidas a experimentos de elección dual de parasitismo artificial en los cuales se les ofrecieron simultáneamente dos hospedadores de diferente peso corporal en una arena experimental (Figura 5.2). De entre los hospedadores traídos

de campo se escogieron duplas de hospedadores que presentaran al menos 0,4 g de diferencia en sus pesos corporales. Este valor fue adoptado dado que el rango de peso de los hospedadores a campo varía entre 0,2 y 1,3 g (ver sección Resultados), significando entonces 0,4 g casi un 40% de la variación natural de los pesos. De las posibles combinaciones de pesos, se escogieron duplas tal de abarcar todo el rango de pesos que los hospedadores presentan, es decir, tanto diferencias en la sección inferior, intermedia como superior del rango total. Cada hospedador del par fue colocado individualmente en una jaula de contención tetraédrica construida con malla mosquitero plástica (7 cm de arista aproximadamente), tal de restringir su rango de acción y evitar el contacto con el otro, con sustrato natural (tierra) y suministro de alimento *ad libitum* (Figura 5.2). Cada jaula del par (hospedadores de bajo y alto peso) fue colocada en lados opuestos de un recipiente plástico circular (500 ml) que fue llenado con tierra hasta completitud (Figura 5.2). A modo de control de la tasa de aferramiento de las larvas, se realizaron paralelamente experimentos ofreciendo a las larvas parasitoides hospedadores de igual peso. En total se realizaron 205 réplicas (110 experimentales y 95 controles).

Se utilizaron larvas de *M. ruficauda* de estadio II criadas en condición de alta densidad, las cuales fueron colocadas sobre la superficie del sustrato conteniendo el par de hospedadores de diferente o igual peso corporal (tratamiento y control respectivamente, Figura 5.2), permitiendo que la larva se orientara libremente y se aferrase a uno de ellos. Los recipientes fueron colocados en cajas cerradas alternando la disposición de los hospedadores pesados y livianos, y mantenidos durante 7 días en oscuridad y condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ HR), luego de lo cual se registró qué hospedador fue parasitado. A partir de estos datos se calculó la proporción de hospedadores de alto peso (vs. bajo peso) que fueron parasitados y, dado que los datos no son independientes, se realizó una prueba de bondad de ajuste Chi-cuadrado (χ^2 , Zar 2010) para determinar si dichas proporciones difieren de las esperadas por azar. Para descartar efectos del nivel de aferramiento, la proporción total de hospedadores parasitados (pesados + livianos) fue comparada contra la proporción de hospedadores parasitados del control mediante un test de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson para comparación de dos proporciones.

Dado que la estimación de tamaño del hospedador puede no estar única y/o directamente ligada al peso, se repitió el experimento considerando como nueva variable el tamaño estimado a partir del ancho máximo de la cápsula cefálica. Las larvas parasitoides fueron entonces sometidas a dos tratamientos: elección entre hospedadores de igual peso y distinto ancho de cápsula (N = 69) o elección entre hospedadores de distinto peso e igual ancho de cápsula (N = 55) (Figura 5.2). Se adoptó un valor de 0,3 mm como diferencia mínima entre anchos de cápsula de los hospedadores utilizados para cada par. Se determinó la proporción de hospedadores parasitados según cada

condición y se evaluó si dichas proporciones diferían de las esperadas por azar utilizando pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrado (χ^2).

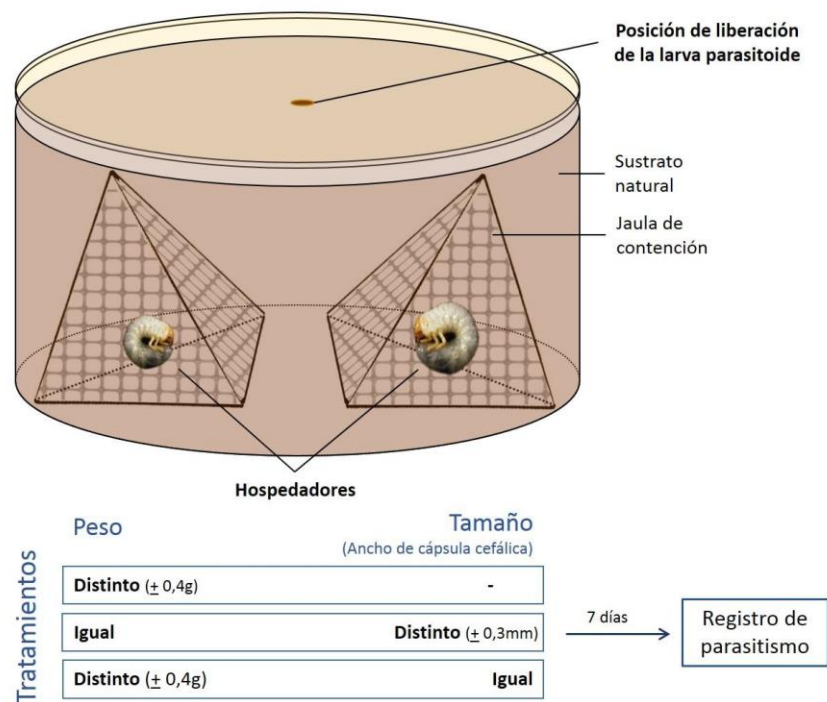


Figura 5.2. Diseño experimental para poner a prueba la ocurrencia de parasitismo según el peso de los hospedadores y el ancho de su cápsula cefálica (utilizado como estimador de tamaño).

Los resultados de los experimentos anteriores indicaron que ni el peso ni el tamaño de los hospedadores afectaron diferencialmente el evento de monoparasitismo (ver Sección Resultados). Dado que es probable que ambas variables estén correlacionadas, se llevó a cabo un análisis de correlación entre el peso y el tamaño corporal estimado a partir del ancho de la cápsula cefálica. Para ello, se utilizó el índice de correlación de Spearman (Figura 5.3 A). En este análisis se consideraron todos los individuos colectados en el campo para los cuales se contó con las medidas de dichas variables (N = 1265). Este análisis permitió determinar si ambas variables deberían seguir siendo consideradas independientemente en los análisis posteriores, o si, por el contrario, presentaban un alto grado de correlación y por tanto resultarían redundantes. Los resultados de este análisis mostraron una correlación positiva (ver Sección Resultados), por lo que en lo sucesivo no se consideró el tamaño como variable en los análisis.

Por último, se estudió la concentración de nutrientes y su relación con otras características de los individuos: peso y sexo. Para ello, se midieron las concentraciones de triglicéridos y glucosa en individuos sanos de peso y sexo conocido (N = 42), distribuidos en el rango de pesos total hallado a

campo (ver sección Resultados). Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un método colorimétrico, como se explica en el Capítulo 2. Para determinar cómo el peso y el sexo afectan la concentración de nutrientes, se construyeron modelos lineales generales (GLMs) con distribución de error normal y función de enlace identidad (Crawley 2007, Figura 5.3 B). Las variables respuesta consideradas fueron la concentración de triglicéridos y la concentración de glucosa (en ug/ml), y se utilizaron como predictores el peso (variable continua) y el sexo (dos niveles: macho y hembra). La inclusión del sexo como predictor en los modelos estuvo fundada en que la dinámica de acumulación de distintos nutrientes en hembras y machos de algunas especies pueden ser diferentes (Scriber y Slansky 1981). Para cada nutriente se consideraron modelos con y sin interacciones. Los modelos se compararon utilizando la función *anova* y a partir de los valores de AIC (criterio de información de Akaike) se escogió el modelo de mejor desempeño para evaluar los resultados.

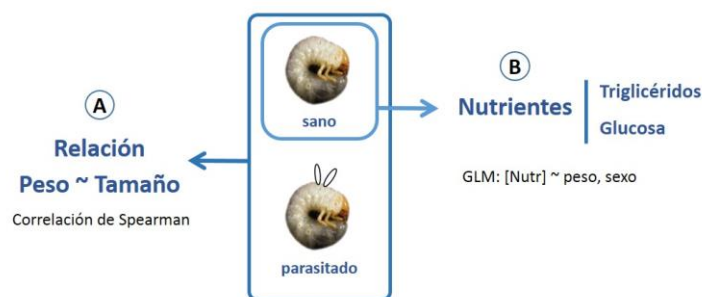


Figura 5.3. Análisis llevados a cabo para determinar la relación entre el peso corporal y el tamaño (A) y entre la concentración de nutrientes y el peso, tamaño y sexo (B), de los hospedadores de la especie *C. signaticollis* de campo. Referencias: [Nutr]: concentración de nutrientes.

Superparasitismo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador

Para determinar si existe relación entre la calidad nutricional del hospedador y la decisión de la larva de *M. ruficauda* de superparasitar, se realizaron experimentos de parasitismo artificial ofreciendo a las larvas *M. ruficauda* un hospedador previamente monoparasitado. De entre los hospedadores sanos (no parasitados) traídos del campo se seleccionaron individuos de diferente peso corporal abarcando todo el rango de peso observado. Luego, se colocó una larva parasitoide de estadio II en un recipiente sobre la superficie del sustrato donde se encontraba enterrado el hospedador y se permitió durante un tiempo de 3 días que buscara y se aferrara al hospedador. Luego de transcurrido ese período, se registró si había ocurrido el evento de parasitismo (Figura 5.4).

El aferramiento de una larva parasitoide al hospedador, en un volumen de sustrato pequeño como el utilizado, en general no requiere más de 24 horas (datos del grupo de investigación no mostrados), por lo cual un lapso de 3 días se consideró suficiente para verificar el evento de parasitismo. Aquellos hospedadores que no fueron parasitados en dicho intervalo de tiempo fueron descartados del experimento. Dado que las larvas de *M. ruficauda* no distinguen entre hospedadores sanos y monoparasitados si el evento del primer parasitismo es reciente (Martínez *et al.* 2017), los hospedadores monoparasitados fueron mantenidos en sus recipientes durante los 7 días posteriores a la confirmación del monoparasitismo. De este modo se aseguraron alrededor de 10 días de parasitismo real, tiempo suficiente para que una larva parasitoide sea capaz de distinguir si el hospedador ya ha sido previamente parasitado. Una vez transcurrido este tiempo, los hospedadores monoparasitados fueron nuevamente pesados para registrar posibles aumentos o descensos de peso, y se sometieron a una segunda parasitación con una nueva larva parasitoide proveniente de un lote de cría distinto de larvas. Al cabo de 3 días se registró si los hospedadores estaban superparasitados (Figura 5.4). En total se utilizaron 269 hospedadores monoparasitados, distribuidos en el rango de pesos de 0,2 a 1,2 g (Figura 5.4). Se evaluó si los hospedadores fueron superparasitados diferencialmente de acuerdo a su peso corporal considerando intervalos de peso de 0,1 g (*e.g.*, 0,3 - 0,4 g, 0,4 - 0,5 g, etc.) utilizando una prueba de igualdad de proporciones Chi-cuadrado (χ^2).

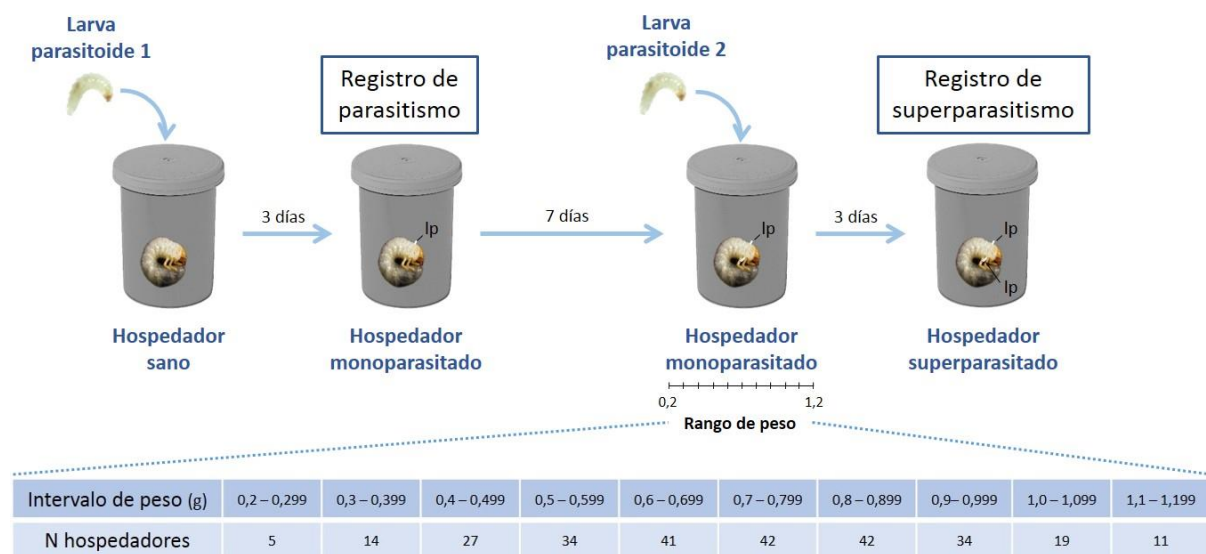


Figura 5.4. Diseño experimental para poner a prueba la ocurrencia de superparasitismo según el peso de los hospedadores. Referencias: lp: larva parasitoide.

Patrones de parasitismo a campo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador

Luego de haber estudiado en el laboratorio si la calidad nutricional de los hospedadores en cuanto a su peso y tamaño tienen efecto sobre la frecuencia de mono y superparasitismo, y dado que no se encontraron patrones relacionados con estas variables (ver Sección Resultados), se analizaron los patrones de parasitismo entre todos los individuos colectados en el campo en relación a su calidad nutricional.

En primera instancia, se evaluó si el peso de los individuos mono y superparasitados presentaba diferencias a nivel global, *i.e.*, considerando a todos los hospedadores colectados. Para ello, los pesos promedio de individuos mono y superparasitados se compararon utilizando una prueba U de Mann-Whitney (Figura 5.5 A). Además, se construyeron curvas de distribución de frecuencias para el peso de individuos mono y superparasitados, que fueron comparadas mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov (Lehmann y D'Abbrera 2006), (Figura 5.5 A). Esta prueba tiene como hipótesis nula que ambos grupos (mono y superparasitados) provienen de poblaciones con idéntica distribución. Es importante mencionar que la prueba evalúa no sólo las medidas de las medianas, sino también las varianzas y la forma de las curvas de distribución.

En segundo lugar, para comprender si los patrones globales observados respecto al grado de parasitismo y peso de los hospedadores son representativos de lo que ocurre al momento del parasitismo, se discriminó a los hospedadores de acuerdo al momento en que fueron colectados. Este análisis se fundamenta en el estilo de vida koinobionte del parasitoide, *i.e.*, no detiene el desarrollo del hospedador inmediatamente sino al final del desarrollo, lo cual implica que, aún parasitado, el hospedador continúa alimentándose y potencialmente aumentando su peso a medida que transcurre el tiempo. De esta forma, los patrones de parasitismo y su relación con el peso de los hospedadores evaluados globalmente podrían no reflejar diferencias en la elección del hospedador al momento del parasitismo, que sucede sobre los hospedadores sólo a fines del verano y durante el otoño. Teniendo en cuenta que las larvas parasitoides de segundo estadio sobreviven hasta alrededor de 120 días sin aferrarse al hospedador (Crespo 2007), y que las últimas larvas parasitoides nacen en el campo durante marzo, se discriminó a los hospedadores en dos grupos. El primer grupo consistió en individuos colectados entre febrero y abril inclusive, susceptibles al parasitismo, y el segundo grupo en individuos colectados entre junio y agosto, no susceptibles al parasitismo. Al primer grupo se lo denominó "con riesgo de parasitación (CRP)", puesto que representa el período en que las larvas parasitoides están forrajeando, es decir, están buscando al hospedador y pueden parasitarlo, y además los hospedadores se alimentan activamente; al segundo

grupo se lo denominó “sin riesgo de parasitación (SRP)” porque en este período ya no hay larvas parasitoides de vida libre que puedan parasitar y las que están vivas se encuentran aferradas a los hospedadores, y además los hospedadores se encuentran aletargados (Figura 5.5).

Teniendo en cuenta la división temporal de los hospedadores, se realizaron un conjunto de análisis que se detallan a continuación. En primer lugar, a modo de control, se compararon los pesos promedio de los hospedadores sanos entre los dos momentos, utilizando una prueba de t de Welch (Ruxton 2006) (Figura 5.5 B). Luego, entre los individuos parasitados, se evaluó si la proporción de individuos superparasitados difiere entre los distintos momentos considerados, utilizando una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson para comparación de dos proporciones (Figura 5.5 C). Por último, para determinar cómo influyen el grado de parasitismo y el período de susceptibilidad sobre el peso, se construyeron modelos lineales generales (GLMs) con distribución de error normal y función de enlace identidad. La variable respuesta estudiada fue el peso corporal del hospedador, y se consideraron como predictores el grado de parasitismo (2 niveles, mono y superparasitado) y el período de susceptibilidad (2 niveles, “CRP” y “SRP”). Se construyeron dos modelos, uno con interacción y otro sin interacción entre las variables, que se compararon utilizando la función *anova* y a partir de los valores de AIC, y se escogió el modelo de mejor desempeño para evaluar los resultados.

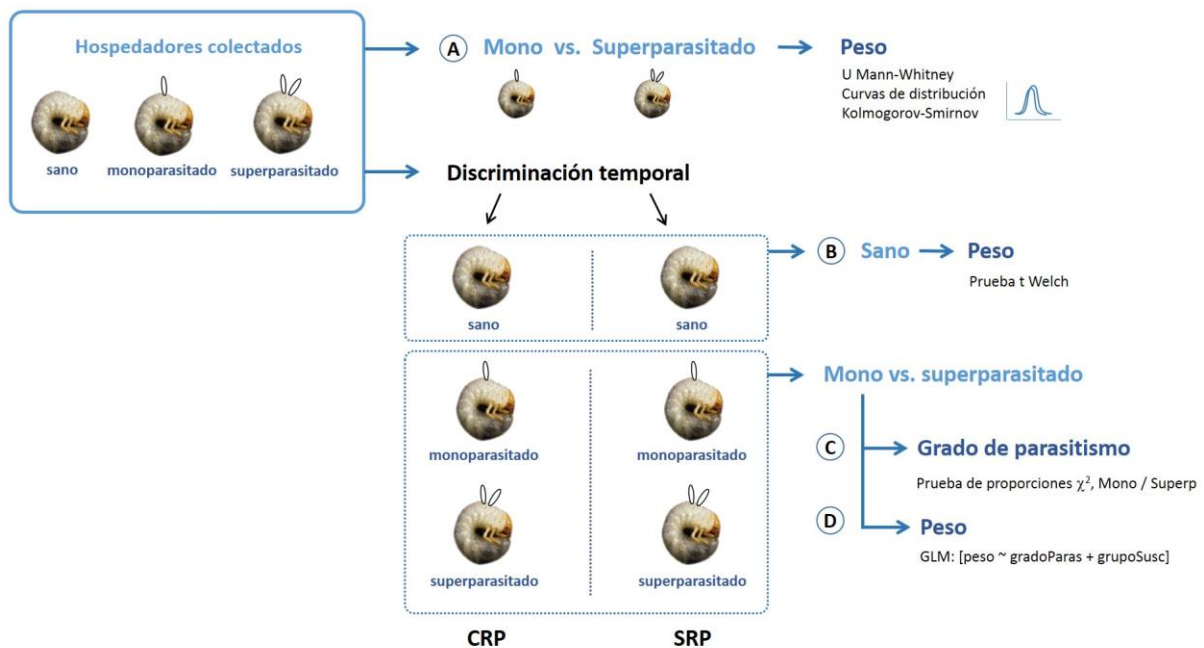


Figura 5.5. Análisis llevados a cabo para determinar los patrones de parasitismo a campo en relación a la calidad nutricional de los hospedadores de la especie *C. signaticollis*. Referencias: Superp: superparasitado; gradoParas: grado de parasitismo (mono y superparasitados); grupoSusc: grupo temporal en función del momento de colecta / susceptibilidad de parasitación (CRP: con riesgo de parasitación, y SRP: sin riesgo de parasitación).

En función de los resultados obtenidos en todos los análisis anteriores, y con el objeto de comprender cómo otros factores podrían influenciar la elección de hospedadores de distinta calidad, se llevaron a cabo algunos análisis considerando el sexo de los individuos. Se estudiaron las diferencias entre sexos en cuanto al peso corporal, tamaño y grado de parasitismo (Figura 5.6). Para determinar si existen diferencias entre hembras y machos con respecto al peso corporal y al tamaño, se consideraron todos los datos disponibles (peso: Nhembras = 953, Nmachos = 993, Ntotal = 1946; tamaño: Nhembras = 617, Nmachos = 648, Ntotal = 1265). Los pesos y tamaños de machos y hembras se compararon utilizando pruebas de t de Welch (Ruxton 2006), y se construyeron curvas de distribución de frecuencias de cada variable para ambos sexos (Figura 5.6 A y B). Las curvas de distribución de pesos y de tamaños entre ambos sexos se compararon utilizando pruebas de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar si existen diferencias entre sexos en cuanto a la ocurrencia de parasitismo, se compararon las proporciones de hembras y machos parasitados por al menos una larva utilizando una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson para comparación de dos proporciones (Nhembras parasitadas = 58, Nhembras no parasitadas = 944, Nmachos parasitados = 35, Nmachos no parasitados = 991, Figura 5.6 C). Dado que el número de individuos de distintos sexos y grados de parasitismo colectados en distintos momentos no fue suficientemente grande, no pudieron llevarse a cabo análisis temporales respecto a la variable sexo.

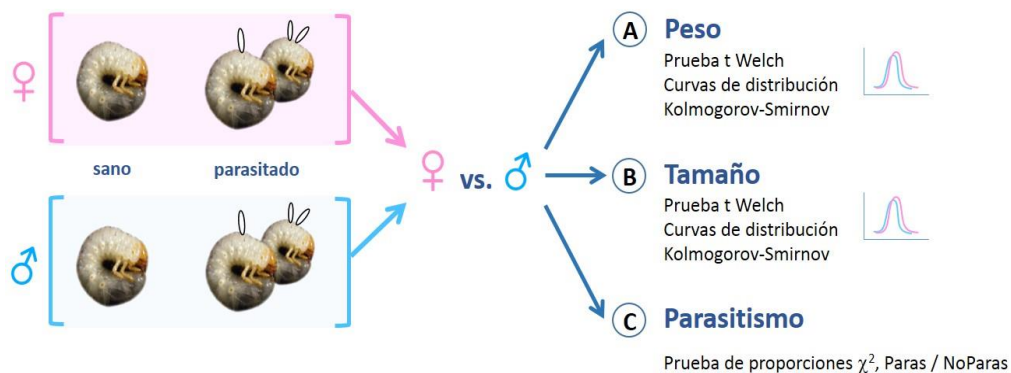


Figura 5.6. Análisis llevados a cabo para estudiar la relación entre el sexo, la calidad nutricional y el grado de parasitismo de los hospedadores a campo.

Resultados

Para el desarrollo de este estudio se colectaron en el campo un total de 3.136 larvas de *C. signaticollis* (Tabla 5.1), a partir de las cuales se realizaron una serie de análisis cuyos resultados se detallan a continuación.

Tabla 5.1. Número de larvas de estadio III de *C. signaticollis* en que se registraron las variables: sexo, peso corporal, tamaño (*estimado a partir del ancho máximo de la cápsula cefálica) y grado de parasitismo. Referencias: H: hembra; M: macho; Monop: monoparasitado; Superp: superparasitado.

		Sexo									
		H			M			indeterminado			
		Grado de parasitismo									
Peso	Tamaño*	Sano	Monop	Superp	Sano	Monop	Superp	Sano	Monop	Superp	TOTAL
con datos	con datos	617	0	0	648	0	0	0	0	0	3049
	sin datos	321	10	5	335	7	3	913	137	53	
sin datos	con datos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87
	sin datos	6	37	6	8	21	4	0	5	0	
TOTAL		944	47	11	991	28	7	913	142	53	3136

El peso promedio de los individuos colectados fue de $0,735 \pm 0,165$ g, con un rango de 0,196 - 1,289 g, mientras que el ancho de la cápsula cefálica fue de $4,712 \pm 0,199$ mm, con un rango de 3,83 - 5,31 mm.

Parasitismo sobre hospedadores sanos de acuerdo a su calidad nutricional

Para determinar si las larvas de *M. ruficauda* parasitan a los hospedadores en función de sus reservas, se realizó un experimento de elección dual entre hospedadores sanos de distinto peso. En este experimento, en 126 de las 205 réplicas uno de los hospedadores ofrecido fue parasitado, es decir, el porcentaje de aferramiento global fue del 61,46%. El porcentaje de hospedadores parasitados fue levemente mayor en el control que en el tratamiento (69,47% y 54,55% respectivamente, $\chi^2 = 4,1866$, $p = 0,0408$). En cuanto al parasitismo sobre individuos de distinto peso, se observó que las larvas parasitaron en igual proporción a hospedadores de alto y bajo peso ($N = 28$ y $N = 32$, respectivamente, $\chi^2 = 0,267$, $p = 0,6056$, Figura 5.7 A).

En un segundo experimento, se evaluó la elección de hospedadores en individuos de distinto tamaño e igual peso, y viceversa. Cuando se mantuvo el ancho de la cápsula cefálica constante y se

varió el peso (N = 55), en el 74,55% de los casos (N = 41) uno de los dos hospedadores fue parasitado. En estos casos, la proporción de individuos pesados y livianos que fueron parasitados no difirió significativamente (N = 17 y N = 24, respectivamente, $\chi^2 = 1,1951$, $p = 0,2743$, Figura 5.7 B). Por otra parte, en los ensayos donde se varió el ancho de la cápsula cefálica y se mantuvo el peso constante (N = 69), en el 71,01% de los casos (N = 49) uno de los hospedadores fue parasitado. La proporción de individuos conde mayor y menor ancho de cápsula que fueron parasitados no difirió significativamente (N = 26 y N = 23, respectivamente, $\chi^2 = 0,1837$, $p = 0,6682$, Figura 5.7 C).

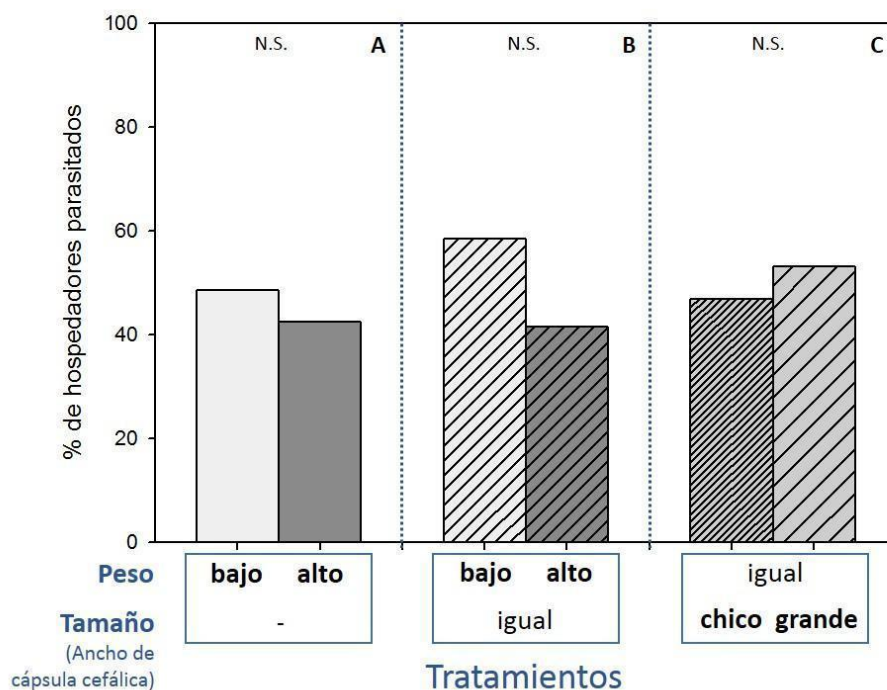


Figura 5.7. Porcentaje de hospedadores parasitados de acuerdo a sus pesos y tamaños de cápsula cefálica en experimentos de elección dual. A: hospedadores de distinto peso, tamaño de cápsula cefálica indistinto; B: hospedadores de distinto peso con igual tamaño de cápsula cefálica; C: hospedadores de igual peso con distinto tamaño de cápsula cefálica. Valores expresados sobre el total de hospedadores parasitados en cada experimento. Referencias: N.S.: diferencia no significativa.

Dados los resultados anteriores, se evaluó la relación entre peso corporal y tamaño sobre todos los individuos de campo disponibles. El análisis de correlación entre el peso y el ancho de la cápsula cefálica mostró que existe una correlación positiva entre ambas variables ($r_s = 0,5774$, $p < 0,001$, Figura 5.8).

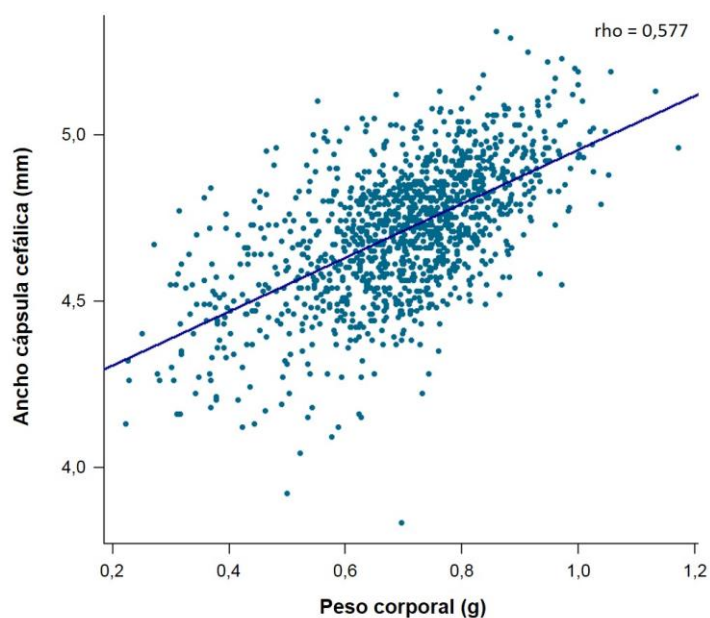


Figura 5.8. Relación entre el peso corporal y el ancho de la cápsula cefálica como estimador del tamaño corporal en larvas de estadio III de *C. signaticollis*. Rho corresponde al coeficiente de correlación de Spearman.

Sobre individuos colectados a campo de peso y sexo conocido se determinaron las concentraciones corporales de triglicéridos y glucosa, y se evaluaron modelos que relacionan la concentración de nutrientes con estas variables. Para triglicéridos se construyeron tres modelos. El primer modelo contempló como predictores el peso, el sexo y su interacción, y ninguno de los factores ni la interacción fueron significativos. El segundo modelo se construyó sin interacción, y mostró que la concentración de triglicéridos está significativamente relacionada con el peso, pero no con el sexo. Por tanto, se construyó un tercer modelo utilizando como único predictor el peso, que dio significativo. La comparación entre los dos últimos modelos a partir de los valores de AIC mostró que no existirían diferencias entre los modelos (AIC = 506,97 y AIC = 505,39). Dado que el factor sexo no resultó significativo se conservó el tercer modelo por ser el más simple. Según este modelo, la concentración de triglicéridos es mayor a mayor peso corporal del hospedador, de modo que por cada gramo de aumento peso se observa un aumento de 182 ug/ml en la concentración de triglicéridos (Tabla 5.2, Figura 5.9).

Tabla 5.2. Relación entre la concentración de triglicéridos y el peso corporal de larvas de estadio III de *C. signaticollis*. Salida del programa R: modelo lineal general (GLM).

	Estimador	Error estándar	Valor t	Valor p
Intercepto	59,08	51,50	1,147	0,258
Peso	182,32	72,61	2,511	0,016

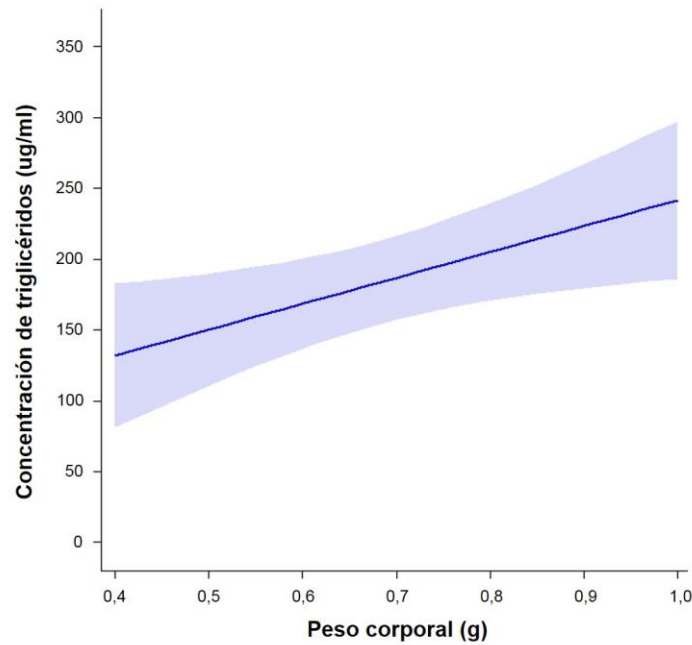


Figura 5.9. Concentración de triglicéridos en relación al peso corporal de larvas de estadio III de *C. signaticollis*.

Para glucosa se construyeron dos modelos, uno con y uno sin interacción entre los predictores peso corporal y sexo. El primer modelo con interacción mostró que la interacción entre peso y sexo es significativa para explicar la variación en la concentración de glucosa. En el modelo sin interacción, en cambio, ninguno de los factores es significativo. La comparación entre modelos para glucosa mostró que hubo diferencias significativas entre modelos ($p = 0,005$), y que, a partir de los valores de AIC (676,11 y 682,01 incluyendo y excluyendo interacción respectivamente) el modelo con interacción mostró un mejor desempeño. Por estos motivos, se conservó el modelo con interacción (Tabla 5.3, Figura 5.10). Según este modelo, el cambio en la concentración de glucosa en función del peso corporal es diferente en individuos macho y hembra. En los machos la concentración de glucosa aumenta conforme aumenta el peso; en las hembras, en cambio, la concentración de glucosa disminuye conforme aumenta el peso (Figura 5.10).

Tabla 5.3. Relación entre la concentración de glucosa y el peso corporal y sexo de larvas de estadio III de *C. signaticollis*. Salida del programa R: modelo lineal general (GLM).

	Estimador	Error estándar	Valor t	Valor p
Peso=0, sexo: hembra (intercepto)	1617,2	502,2	3,220	0,003
Peso	-1059,3	652,9	-1,622	0,113
Sexo: macho	-2165,7	874,5	-2,476	0,018
Peso: sexo:macho	3646,1	1300,0	2,805	0,008

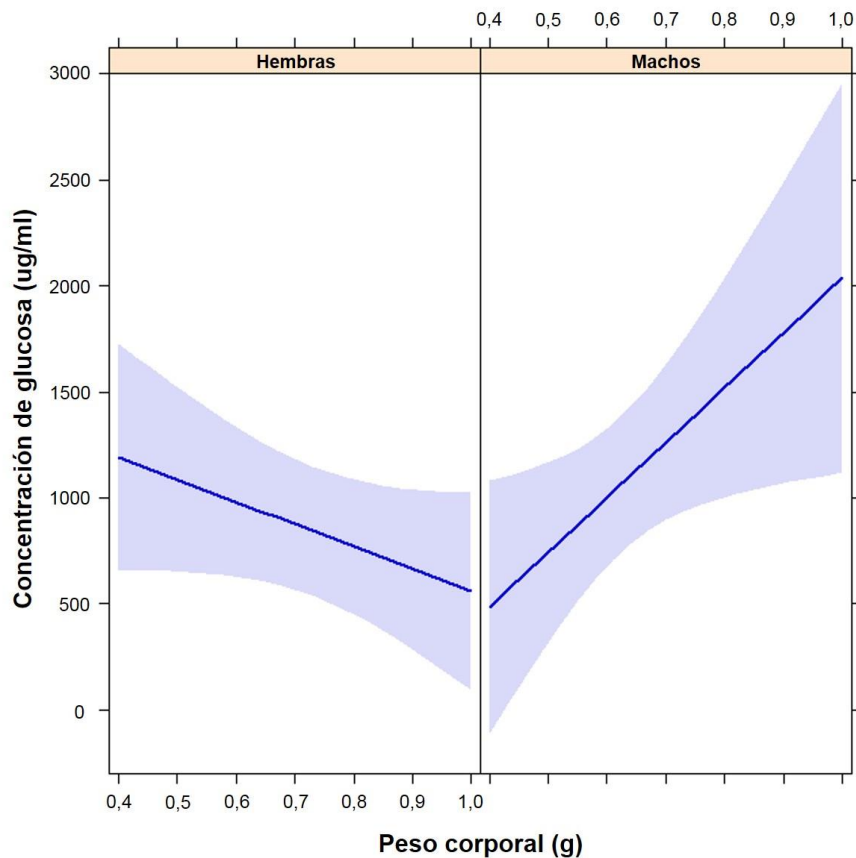


Figura 5.10. Concentración de glucosa en relación al peso corporal y al sexo de larvas de estadio III de *C. signaticollis*.

Superparasitismo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador

Con el fin de determinar si la frecuencia de superparasitismo varía de acuerdo a los nutrientes de los hospedadores, se llevó a cabo un experimento de superparasitismo artificial sobre hospedadores monoparasitados de distinto peso. Del total de 269 individuos monoparasitados utilizados, 171 (63,57%) fueron parasitados por una segunda larva parasitoide. La proporción de hospedadores que fueron superparasitados no difirió a lo largo del rango de pesos ($\chi^2 = 8,5518$, $p = 0,4796$, Figura 5.11).

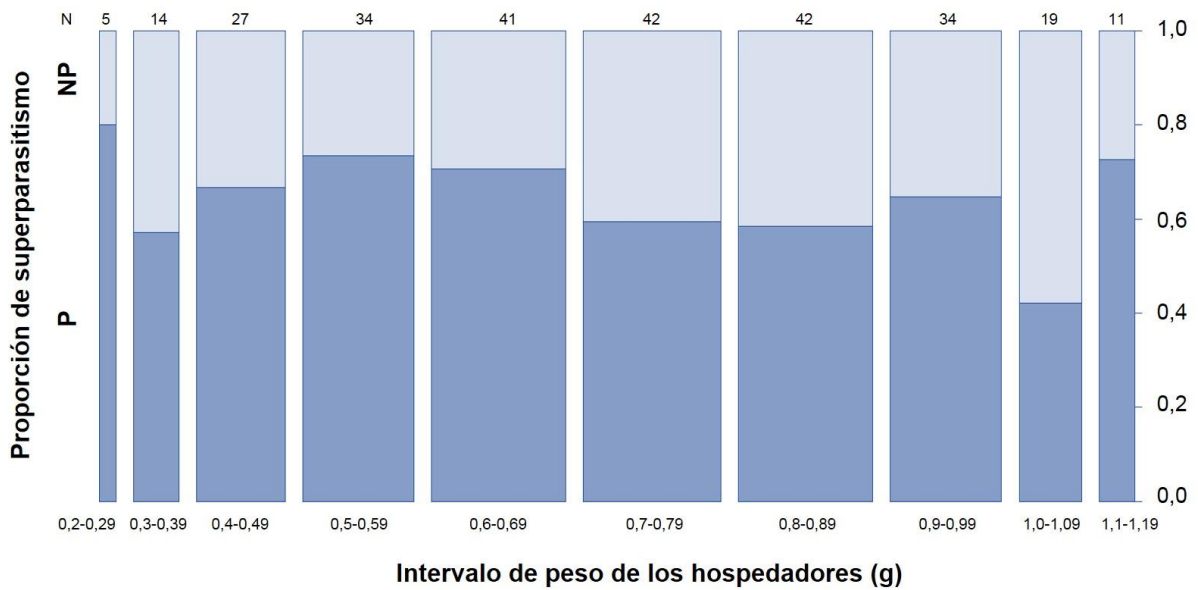


Figura 5.11. Proporción de hospedadores monoparasitados de distintos pesos que fueron superparasitados por larvas de *M. ruficauda*. El ancho de las barras es proporcional al N respectivo para cada intervalo de peso (indicado en la parte superior). Referencias: P: superparasitado, NP: no superparasitado.

Patrones de parasitismo a campo de acuerdo a la calidad nutricional del hospedador

Los patrones de parasitismo a campo fueron evaluados entre todos los individuos colectados en relación a su calidad nutricional. En cuanto al grado global de parasitismo, entre los 3136 individuos colectados, 288 estuvieron parasitados por *M. ruficauda* (9,18%). Del total de individuos parasitados, el 75,35% correspondió a individuos monoparasitados y 24,65% a individuos superparasitados. El número máximo de larvas parasitoides encontradas sobre un mismo hospedador fue cuatro, y todos estos casos fueron registrados en los individuos colectados entre junio y agosto. El peso promedio de los individuos monoparasitados fue significativamente mayor que el peso promedio de los individuos superparasitados ($0,757 \pm 0,185$ g y $0,696 \pm 0,162$ g, respectivamente, $U = 5750$, $p = 0,0105$). La comparación de las curvas de distribución de mono y superparasitismo con respecto al peso corporal mostró que existen diferencias significativas (K-S: $D = 0,2390$, $p = 0,0136$, Figura 5.12).

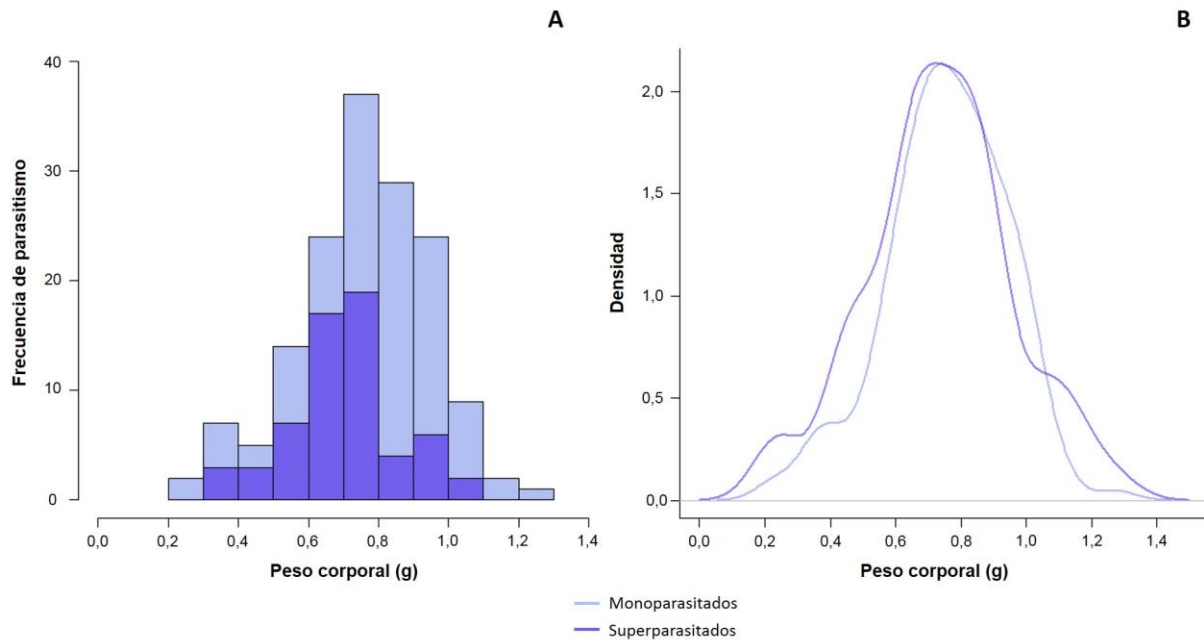


Figura 5.12. Ocurrencia a campo de mono y superparasitismo sobre *C. signaticollis* por larvas de *M. ruficauda*, en función del peso del hospedador. A: Histogramas de frecuencias, B: Funciones de densidad.

Los análisis siguientes se realizaron discriminando a los hospedadores según su susceptibilidad al parasitismo en “con riesgo de parasitación, CRP” y “sin riesgo de parasitación, SRP”, de acuerdo al momento en que fueron colectados. El peso corporal promedio de los hospedadores sanos CRP fue menor que el de los hospedadores sanos SRP ($0,700 \pm 0,162$ g, y $0,744 \pm 0,158$ g, respectivamente, $t = 6,041$, $p < 0,001$, IC 95% = [0,031 - 0,060], Figura 5.13).

Cuando se evaluó la variación en la proporción de superparasitismo, se encontró que entre los individuos parasitados el superparasitismo es menos común en los hospedadores CRP que en los SRP (20,59 % y 42,86%, respectivamente, $\chi^2 = 4,601$, $p = 0,032$). Para determinar cómo influyen el grado de parasitismo y el período de susceptibilidad al parasitismo sobre el peso de los hospedadores, se construyeron dos modelos lineales generales (GLMs), uno con y otro sin interacción. La comparación entre modelos mostró que no hubo diferencias significativas entre los mismos ($p = 0,428$) y que, a partir de los valores de AIC (AIC = -93,764 y -95,12 incluyendo y excluyendo interacción respectivamente), el modelo sin interacción muestra un mejor desempeño. Por estos motivos, se conservó el modelo sin interacción y se evaluaron los efectos principales de cada factor. Se observó que el peso corporal no es afectado por el grado de parasitismo, pero sí por el momento considerado (Tabla 5.4), siendo los hospedadores SRP más pesados que los hospedadores CRP (Figura 5.14).

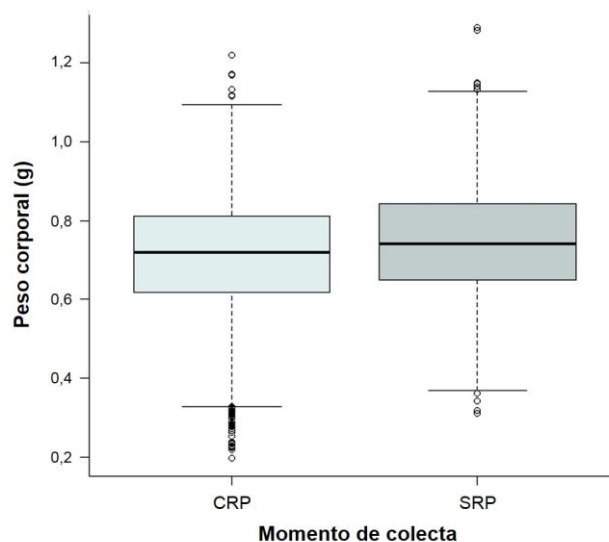


Figura 5.13. Peso corporal de hospedadores *C. signaticollis* sanos de acuerdo al momento en que fueron colectados. Referencias: CRP: con riesgo de parasitación; SRP: sin riesgo de parasitación.

Tabla 5.4. Relación entre el grado de parasitismo (mono y superparasitados) sobre los hospedadores *C. signaticollis*, su peso corporal y el momento de la temporada (susceptibles o no susceptibles al parasitismo). Salida del programa R: modelo lineal general (GLM). Referencias: CRPM: con riesgo de parasitismo monoparasitado, SRP: sin riesgo de parasitismo, S: superparasitado.

	Estimador	Error estándar	Valor t	Valor p
CRPM (intercepto)	0,624	0,030	20,724	< 0,001
SRP	-0,094	0,034	2,741	0,007
S	-0,032	0,030	-1,066	0,288

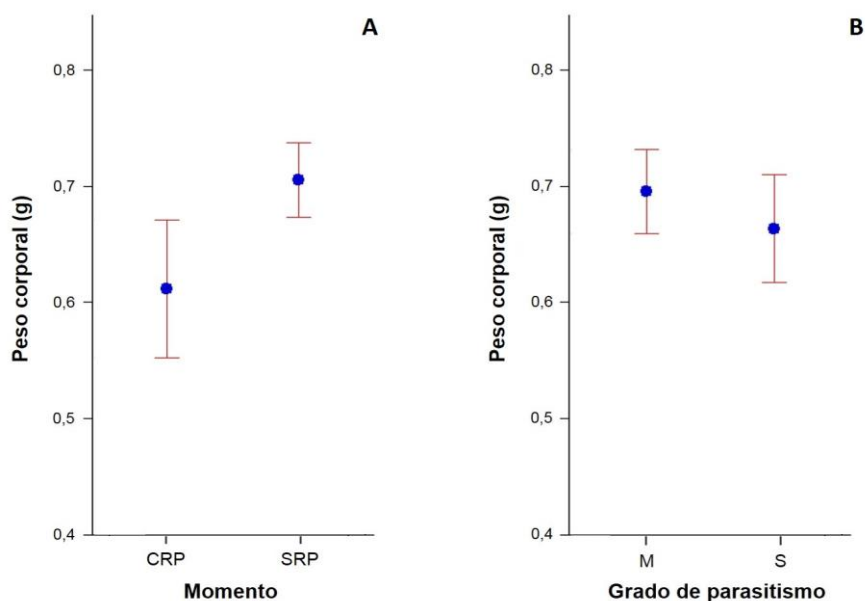


Figura 5.14. Relación entre peso corporal de los hospedadores *C. signaticollis* y A) el momento de colecta considerado (con y sin riesgo de parasitismo), y B) el grado de parasitismo (mono y superparasitados). Referencias: CRP: con riesgo de parasitismo; SRP: sin riesgo de parasitismo; M: monoparasitado; S: superparasitado.

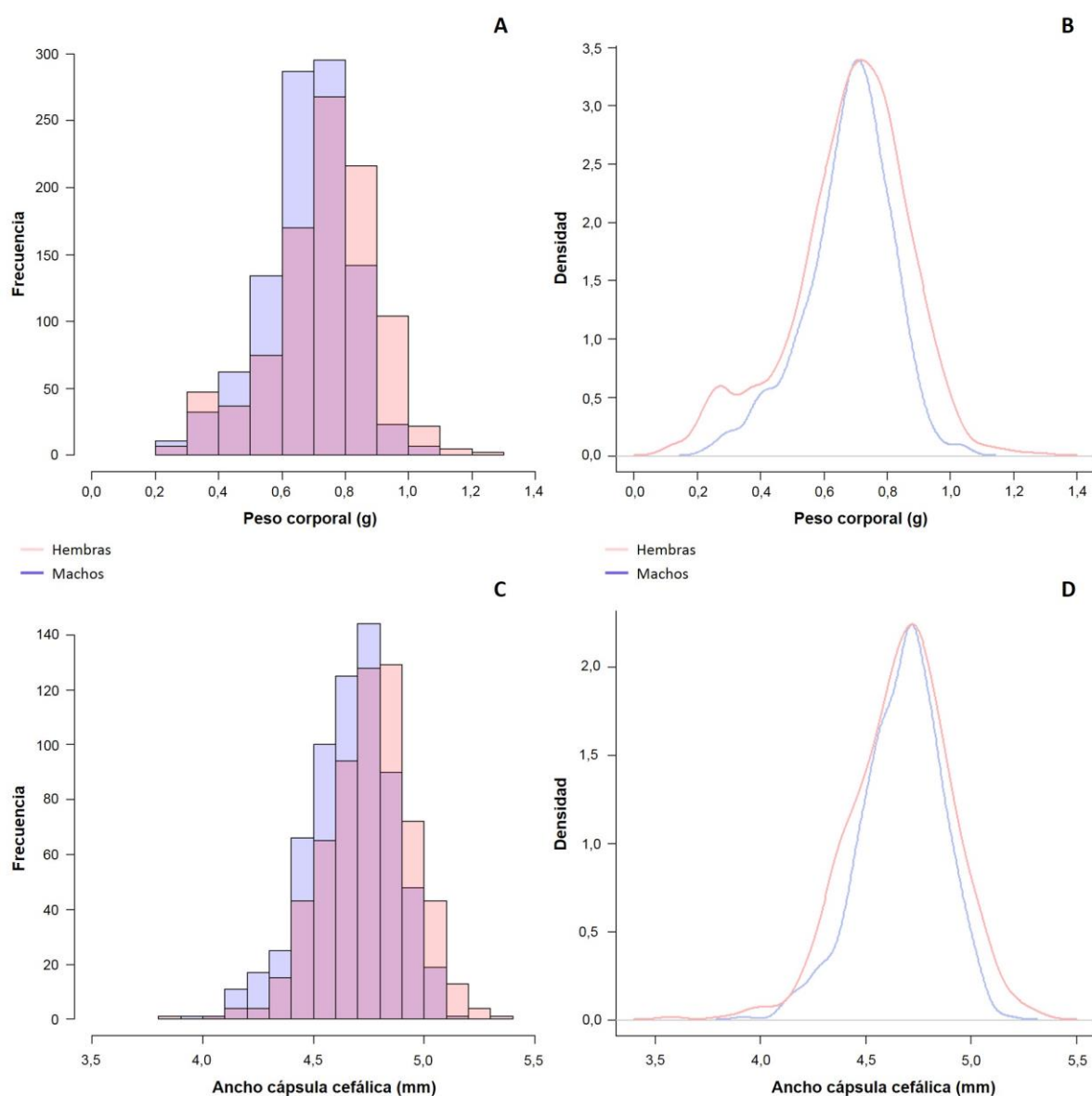


Figura 5.15. Distribución de pesos y tamaños estimados a partir del ancho de la cápsula cefálica de hembras y machos de *C. signaticollis* colectados en el campo. A y C: Histogramas de frecuencias, B y D: Funciones de densidad.

Por último, se llevaron a cabo análisis para comprender la relación entre el sexo del hospedador, su calidad nutricional y el grado de parasitismo. Entre los 3.136 individuos colectados, se encontraron 1.002 hembras, 1.026 machos, y otras 1.108 larvas cuyo sexo no fue determinado (Tabla 5.1). Las larvas hembra de tercer estadio son más pesadas y más grandes que las larvas macho. El peso corporal promedio de las hembras fue significativamente mayor que el de los machos ($0,736 \pm 0,165$ g y $0,679 \pm 0,137$ g, respectivamente, $t = 8,298$, $p < 0,001$). La comparación de las curvas de distribución de pesos mostró diferencias significativas entre machos y hembras (K-S: $D = 0,2158$, $p < 0,001$, Figura 5.15 A y B). El ancho promedio de la cápsula cefálica de las hembras fue

significativamente mayor que el de los machos ($4,756 \pm 0,199$ mm y $4,670 \pm 0,190$ mm, respectivamente, $t = 7,888$, $p < 0,001$). La comparación de las curvas de distribución de tamaños de la cabeza mostró diferencias significativas entre machos y hembras (K-S: $D = 0,2017$, $p < 0,001$, Figura 5.15 C y D). La comparación entre la ocurrencia de parasitismo de acuerdo al sexo mostró que las hembras fueron levemente más parasitadas que los machos (5,58% y 3,53% de los individuos respectivamente, $\chi^2 = 3,8671$, $p = 0,049$).

Discusión

En el presente capítulo se llevaron a cabo experimentos de laboratorio para determinar cómo afecta la calidad nutricional del hospedador a la decisión de las larvas parasitoides de parasitar y superparasitar, y se caracterizó la disponibilidad de hospedadores en el campo en cuanto a su calidad nutricional y la relación entre dicha calidad y el grado de parasitismo observado.

Para abordar el estudio de la calidad nutricional de los hospedadores, se consideraron como estimadores de calidad nutricional el peso corporal de los individuos y el tamaño corporal, estimado a partir del ancho de la cápsula cefálica. En concordancia con lo esperado, se encontró una correlación positiva entre el peso de los individuos y su tamaño. Sin embargo, el coeficiente de correlación no fue elevado, (aproximadamente 0,6). En las larvas de los insectos el tamaño de la cápsula cefálica es característico de cada estadio y permanece constante a lo largo de cada estadio. Si bien podría considerarse que individuos con mayor cápsula cefálica tendrían un mayor potencial para alcanzar mayores tamaños y pesos, es posible que el estimador de tamaño escogido no haya sido el ideal. En larvas de mosquito, por ejemplo, se ha reportado que las dimensiones del tórax son un buen parámetro para reflejar el crecimiento corporal, mientras que la medida de la cápsula cefálica es simplemente una característica de cada estadio (Timmermann y Briegel 1998). En estudios futuros podría considerarse alguna otra parte corporal dura para estimar el tamaño. Mediciones preliminares en el laboratorio indican que globalmente tanto el largo del fémur como el de la tibia no presentarían una correlación significativa con el peso corporal, pero si se discriminan machos y hembras, en las hembras se observa una correlación significativa con el peso corporal, con un coeficiente similar al hallado para la cápsula cefálica (P. Zermoglio, datos preliminares).

Los resultados experimentales de este trabajo mostraron que las larvas parasitoides parasitan en igual medida a hospedadores de distinta calidad nutricional. Este resultado puede interpretarse desde la óptica de la estrategia de vida del parasitoide. Como parasitoide koinobionte, *M. ruficauda* no detiene el desarrollo de su hospedador, quien continúa alimentándose después de

haber sido parasitado. De esta forma, la masa corporal de los hospedadores al momento del parasitismo puede no reflejar la masa corporal que los hospedadores pueden alcanzar potencialmente. Las larvas de *M. ruficauda* son parasitoides obligados, debiendo atacar a un hospedador para sobrevivir, y dada su expectativa de vida máxima (120 días, Crespo 2007), los eventos de parasitismo ocurren mayormente durante las primeras semanas posteriores a que el hospedador muda al estadio III. Los hospedadores recién mudados son más pequeños, y a medida que transcurre el tiempo, en los meses subsiguientes previos a la llegada del invierno incrementan sus reservas mediante la alimentación. Si se contemplan los datos de campo de peso de los hospedadores (Figura 9.2, Capítulo 9), pueden observarse dos características de en la variación del peso corporal. En primer lugar, durante los primeros meses del estadio III el peso promedio de los hospedadores aumenta, pero la frecuencia de pesos extremos disminuye, las curvas de distribución devienen más leptocúrticas. Es decir, los pesos de individuos que inicialmente tenían pesos extremos, convergen a valores similares. En segundo lugar, cuando se acerca el invierno, a partir del mes de julio, se observa un leve descenso del peso promedio y una estabilización en los valores de peso intermedios. Esto constituye el reflejo del comportamiento del hospedador al llegar el invierno: cuando la temperatura ambiente disminuye, se entierra a mayores profundidades y disminuye su tasa de alimentación. Resumiendo ambas consideraciones, en líneas generales los hospedadores tienden a acumular cantidades de reservas similares independientemente de su peso inicial y a converger en pesos intermedios. En consecuencia, resultaría lógico que las larvas parasitoides no seleccionen al hospedador por su calidad nutricional al momento del parasitismo, pues esta calidad no sería representativa de la disponibilidad de nutrientes cuando llega el momento de consumir al hospedador activamente, cuando éste entra en estado de prepupa. Aunque los hospedadores con mayor peso inicial tuvieran una mayor probabilidad de alcanzar pesos mayores, la estrategia más ventajosa para las larvas sería, en vez de seleccionar el recurso por su calidad nutricional inicial, asegurar la unidad de recurso, dados los riesgos que implicaría para su supervivencia el continuar la búsqueda de un hospedador de mayor calidad.

Los resultados discutidos anteriormente en referencia a que las larvas parasitan por igual a hospedadores de distinto peso, se repitieron en situaciones de superparasitismo: las larvas superparasitan independientemente del peso corporal del hospedador. Se conoce que las larvas de *M. ruficauda* son capaces de discriminar hospedadores sanos de hospedadores previamente parasitados, y que se orientan preferentemente hacia hospedadores sanos (Crespo 2011, Crespo y Castelo 2009). Es decir, las larvas son capaces de discernir hospedadores subóptimos de hospedadores de mejor calidad en cuanto al grado de parasitismo previo, y dicha discriminación resultaría adaptativa dado que *M. ruficauda* es un parasitoide solitario, en el cual sólo una larva por

hospedador puede completar el desarrollo. Sin embargo, en este trabajo se encontró que no discriminan entre hospedadores parasitados de distinta calidad nutricional. Este hecho podría estar relacionado con dos factores. El primer factor, que se ha mencionado anteriormente, es que los hospedadores continúan aumentando su masa corporal a lo largo del tiempo después del evento de parasitismo. El segundo factor a considerar está relacionado con la tasa de consumo del hospedador por parte de la larva parasitoide. *Mallophora ruficauda* es un parasitoide solitario, en el que sólo se desarrolla una larva por hospedador. Sin embargo, desde el momento en que la larva se aferra al hospedador y durante todo el invierno, se ha observado que las larvas parasitoides consumen pocos recursos del hospedador y no aumentan apreciablemente su tamaño. Por el contrario, únicamente cuando el hospedador ingresa al estado de prepupa, el parasitoide acelera su desarrollo, mudando a los siguientes estadios y consumiendo rápidamente al hospedador (Crespo 2011). Es prevalentemente en ese momento en que, si las larvas están en situación de superparasitismo, se define la competencia entre parasitoides y sólo uno completa su desarrollo (Barrantes 2015). Dadas estas particularidades, y contrariamente a lo que sucede generalmente en otros parasitoides (Godfray 1994, Harvey 2005), las larvas de *M. ruficauda* no necesitarían “repartir” los nutrientes disponibles entre todos los individuos que parasitan a un mismo hospedador. En concordancia con los resultados anteriores, lo que estaría en juego para el parasitoide en situaciones de competencia no serían las reservas disponibles en el hospedador, sino el hospedador como unidad de recurso. En este sentido, la importancia de obtener una unidad de recurso aunque esté previamente parasitada estará fuertemente influenciada por factores internos de las larvas, como su estado fisiológico, y su edad y expectativa de vida.

Una de las relaciones que se exploraron en este Capítulo fue aquella entre el peso corporal de los hospedadores y la concentración de nutrientes. Se encontró una correlación lineal positiva entre el peso de los individuos y su concentración de triglicéridos. En la literatura se encuentra que la relación entre la concentración de lípidos y la masa corporal suele ser isométrica. Lease y Wolf (2011) estudiaron esta relación en 243 especies de insectos de 15 órdenes distintos, hallando que el contenido de lípidos en adultos mantiene una relación lineal con la masa corporal. Resultados similares se han encontrado respecto al tamaño estimado a partir de las dimensiones de partes duras en algunas especies de mosquitos, en las cuales la concentración de lípidos es isométrica con el tamaño tanto en adultos como en larvas (Briegel 1990a, Timmermann y Briegel 1999, van Handel y Day 1988), mientras que en *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) la relación es alométrica positiva tanto en adultos como en larvas (Briegel 1990a, Timmermann y Briegel 1999). Los resultados hallados en larvas de *C. signaticollis* están en concordancia con la generalidad en los insectos. Debe tenerse en cuenta que el contenido de lípidos puede variar dependiendo del estado fisiológico, el estado de

vida y el sexo de los individuos (Lease y Wolf 2011). Por ejemplo, las larvas de insectos holometábolos presentan un mayor contenido lipídico que los adultos (Lease y Wolf 2011). Estos factores se discuten más abajo.

En cuanto a la concentración de glucosa, en este trabajo se encontró que la relación entre esta variable y el peso corporal depende del sexo del individuo. En particular, la concentración de glucosa aumenta con el peso en los machos pero disminuye con el peso en las hembras. Este resultado, particularmente en el caso de las hembras, es contrario a lo esperado, pues en la literatura se indica que la relación entre la masa y/o el tamaño corporal está en general relacionado positivamente con la concentración de azúcares (Briegel 1990a, b, Timmermann y Briegel 1999). Sin embargo, existen otros casos en que la concentración de azúcares (glucosa y trehalosa) no presenta una correlación con el tamaño corporal (Chen *et al.* 2011, van Handel y Day 1988). En los insectos es posible que las reservas en hidratos de carbono se acumulen en forma de trehalosa y glucógeno (Chapman 1998), siendo la trehalosa el azúcar más conspicuo en la hemolinfa y no la glucosa (Rivero y Casas 2009a). En este trabajo, sólo se cuantificó la glucosa libre, y es posible que aunque la concentración de glucosa en las hembras disminuye con el peso, la concentración de otros azúcares más representativos, como la trehalosa, no siga este mismo patrón. Las diferencias observadas entre machos y hembras en cuanto al peso y las concentraciones de nutrientes, y los efectos que podrían tener sobre el grado de parasitismo, se discuten *in extenso* más abajo considerando el contexto de las estrategias de vida de la especie.

Cuando se analizaron los datos de campo respecto al parasitismo, se encontró que la incidencia de parasitismo por parte de *M. ruficauda* sobre *C. signaticollis* fue del 9%. Este valor es muy inferior al 19% reportado por Castelo (2003), y las diferencias podrían deberse a los distintos métodos, sitios y momentos de muestreo utilizados. El trabajo de Castelo (2003) se basó en un muestreo sistemático de hospedadores durante años consecutivos en áreas donde había presencia confirmada del parasitoide. En el presente trabajo, en cambio, la colecta fue incidental en áreas en las que se espera la presencia del parasitoide a gran escala pero dicha presencia no fue regularmente confirmada. En cuanto a la diferencia temporal entre ambos trabajos, si bien durante muchos años *M. ruficauda* fue considerada una especie plaga, se conoce que la abundancia elevada del parasitoide responde a ciclos de aproximadamente cuatro años (M. Castelo comunicación personal), y en la actualidad la población se encontraría reducida. Por lo tanto, este factor también podría contribuir a las diferencias halladas respecto al trabajo de Castelo (2003). En cuanto al grado de parasitismo, del total de individuos parasitados utilizados en este trabajo, el 75% correspondió a individuos monoparitados y el 25% restante a individuos superparitados. Estos resultados son diferentes de los reportados por Castelo (2003), quien encontró que entre los gusanos parasitados,

aproximadamente el 48% estaban superparasitados. Es posible que estas diferencias estén también relacionadas, por un lado, con una menor abundancia del parasitoide al momento de la realización de esta Tesis, y por otro con la ventana temporal de colecta. En este trabajo se utilizaron individuos colectados entre febrero y agosto, mientras que Castelo (2003) realizó los muestreos entre junio y julio. Cuando se analizaron los resultados discriminando entre dos momentos de la temporada los resultados mostraron un grado de superparasitismo más similar al reportado por Castelo (2003) en los individuos colectados más tardíamente (*i.e.*, 43%). Además, se observó que en los individuos parasitados el superparasitismo fue menos común en individuos colectados entre febrero y abril (CRP) que en individuos colectados entre junio y agosto (SRP) (13% y 43%, respectivamente). Este resultado indica que a medida que pasa el tiempo, decrecería el umbral de aceptación de hospedadores por parte de las larvas parasitoides, haciéndose más frecuente el parasitismo sobre hospedadores de menor calidad en cuanto a su grado de parasitismo. La mayor aceptación de hospedadores subóptimos a medida que aumenta la edad del parasitoide, y decrece su expectativa de vida, ha sido descrita en la literatura en función de distintas características de los hospedadores, tales como su identidad en cuanto a especie y su grado de parasitismo previo (Mangel 1989, Royer *et al.* 1999, Wajnberg *et al.* 2008). Por ejemplo, en *M. ruficauda*, en condiciones de laboratorio se ha demostrado que las larvas de mayor edad, y menor expectativa de vida, aceptan hospedadores de especies distintas a la que parasitan preferentemente (Barrantes 2009, 2015, Barrantes y Castelo 2014). En otras palabras, en cuanto refiere al grado de parasitismo, a medida que pasa el tiempo, y decrece la proporción de hospedadores sanos (*i.e.*, no parasitados), resultaría más importante obtener la unidad de recurso aunque éste no presente una calidad óptima.

En cuanto al peso de los individuos parasitados a campo, se observó que el parasitismo ocurrió a pesos y tamaños intermedios dentro de los rangos correspondientes, pero se encontró que globalmente los monoparasitados tuvieron una masa corporal mayor que los superparasitados. Esto se contradice con Crespo y Castelo (2009), quienes reportaron un peso menor en los monoparasitados. La discrepancia en los resultados podría deberse a una diferencia inicial de la distribución de pesos de la población de gusanos, a una diferencia temporal en cuanto a la colecta, o a diferencias en la disponibilidad y accesibilidad de hospedadores para las larvas parasitoides en ambos escenarios muestreados. En este trabajo el peso corporal promedio de todos los individuos fue similar al reportado previamente por otros autores (0,735 g en este trabajo, 0,745 g en Castelo y Crespo 2012). Sin embargo, la ventana temporal de colecta fue diferente: mientras que en este trabajo se consideraron individuos colectados entre febrero y agosto, los resultados de Crespo y Castelo (2009) corresponden a un período de tiempo más acotado (mayo a julio). En este sentido, como se mencionó anteriormente, para evaluar la ocurrencia y el grado de parasitismo sería

importante tener en cuenta el período de tiempo considerado. Cuando se analizó la ocurrencia de parasitismo en dos momentos distintos se encontró que el peso de los hospedadores depende del momento considerado pero que no existe relación entre el peso y el grado de parasitismo. Estos resultados confirmarían la importancia de considerar el tiempo como variable de evaluación, y constituyen otro indicio de que el peso no sería un criterio de elección por parte de las larvas parasitoides. Por otra parte, estos datos concuerdan con los reportados por Barrantes (2015) y con los resultados de los experimentos de laboratorio realizados en este trabajo, en los que se halló que las larvas no parasitan ni superparasitan diferencialmente a los hospedadores según su peso. Como ha sido sugerido por Barrantes (2015), es posible que exista un peso mínimo, umbral, por encima del cual cualquier hospedador sería suficiente para satisfacer las necesidades energéticas de las larvas parasitoides. Sin embargo, se observó que hospedadores de bajo peso fueron parasitados tanto a campo como en el laboratorio, y si bien a campo la frecuencia de parasitismo es máxima a pesos intermedios, ello podría ser el resultado de la mayor disponibilidad de hospedadores de peso intermedio. Como se ha mencionado anteriormente, las diferencias de peso inicial entre hospedadores se suavizan conforme transcurre el tiempo, y las larvas parasitoides, que se aferran al comienzo de la temporada, no obtendrían una ventaja sustancial al seleccionar individuos originalmente más pesados.

El análisis de los datos de campo respecto al sexo de los hospedadores mostró un conjunto de resultados interesante y complementario con la determinación de la relación entre la concentración de nutrientes y el sexo. En primer lugar, tanto para el peso como para el tamaño corporal se hallaron diferencias entre hembras y machos, siendo las primeras más grandes y pesadas. En la literatura existen muchos ejemplos de diferencias sexo-específicas en cuanto a la masa corporal y la concentración de nutrientes en insectos adultos. Existen ejemplos en ambas direcciones, hembras con mayor masa corporal y con más reservas que los machos y viceversa (*e.g.*, Briegel 1990b, Lease y Wolf 2011). Sin embargo, la generalidad indica que las hembras son más pesadas y suelen tener mayor contenido lipídico (Chen *et al.* 2011, Lease y Wolf 2011, ver Scriber y Slansky 1981 para una lista de publicaciones con similares conclusiones). Las diferencias de peso y nutrientes entre machos y hembras se observan a menudo también en los estadios larvales. En condiciones de estrés alimentario durante la etapa larval, el mantenimiento de la masa corporal y las relaciones alométricas entre masa y tamaño dependen del sexo del individuo (Boggs y Freeman 2005, Gwynne 2004, Jannot *et al.* 2007). En este trabajo, se encontró que la concentración de triglicéridos no estaría influenciada por el sexo del individuo, pero sí por el peso de los individuos, y que la concentración de glucosa sí sería sexo-específica. Es importante notar que los nutrientes que los insectos adquieren durante las etapas larvales pueden no sólo ser utilizados durante estas

etapas, sino también para llevar a cabo procesos fisiológicos durante la vida adulta (Beenackers *et al.* 1985, Boggs 2009). Especialmente para insectos que no se alimentan durante su etapa adulta, como es el caso de *C. signaticollis*, la acumulación de recursos en la etapa larval será determinante en la asignación de reservas que hará el adulto. Las hembras y los machos adultos llevan a cabo actividades diferentes que requieren distintas cantidades de cada tipo de nutriente. En este sentido, sería lógico que las larvas acumulasen nutrientes en cantidades diferentes de acuerdo a su sexo. Las diferencias entre machos y hembras podrían reflejar el hecho de que las hembras serán las que asignen nutrientes a los huevos, y ello podría explicar una mayor acumulación de lípidos durante la vida larval (Zhou *et al.* 1995). Si bien se vio que los triglicéridos no dependerían del sexo, sí están determinados por el peso, y las hembras son más pesada. Por otro lado, las diferencias entre larvas hembras y machos podría estar influenciada por las diferentes estrategias reproductivas del adulto (Gwynne 2004, Lang 1963, Scriber y Slansky 1981). Por ejemplo, en especies en que las hembras son quienes compiten por los machos, bajo estrés alimentario las larvas hembra mantienen la masa corporal mientras que la masa decrece en los machos (Gwynne 2004). La situación inversa se ha observado cuando son los machos quienes compiten por las hembras, y mantienen su masa corporal más que las hembras (Gwynne 2004). La literatura indica que entre los escarabeidos es común que los machos compitan por las hembras (aunque se han descrito excepciones, *e.g.*, Watson y Simmons 2010), y algunas especies muestran dimorfismos físicos y comportamentales marcados (*e.g.*, cuernos, regalos nupciales tales como bolas de estiércol). En *C. signaticollis* no se conoce qué sexo compite por el otro, pero se espera que los machos sean quienes compiten por las hembras. En este sentido, la diferencia de pesos observada entre sexos no estaría relacionada con la competencia reproductiva. En cuanto a los procesos que determinan la masa corporal, los patrones de variación podrían deberse a diferencias en la adquisición o en la asignación de nutrientes entre los dos sexos (Jannot *et al.* 2007, Scriber y Slansky 1981). Por un lado, un mayor peso y cantidad de nutrientes podrían alcanzarse a través de un período de desarrollo más prolongado y por ende mayor consumo de alimento (Cull y van Emden 1977, Scriber y Slansky 1981). Alternativamente, podría estar relacionado con una mayor tasa relativa de consumo y/o con una mayor eficiencia de conversión del alimento (Kheirallah 1978, Mathavan y Bhaskaran 1975, Scriber y Slansky 1981). Sin embargo, en general se ha observado que la eficiencia de utilización del alimento no difiere sustancialmente entre sexos (ver Scriber y Slansky 1981 para lista de publicaciones con estas conclusiones). En *C. signaticollis* no se cuenta con datos cuantitativos respecto al momento de emergencia de machos y hembras adultos, pero observaciones preliminares indicarían que los machos emergen más tempranamente (entre una y dos semanas, P. Zermoglio, datos preliminares). Sin embargo, es poco probable que esta diferencia tenga algún efecto significativo en cuanto a diferencia de pesos, puesto

que la diferencia en tiempo de emergencia es muy corta comparada con el tiempo total de duración del estadio. En cambio, podría estar relacionada con la estrategia reproductiva y la posible ventaja de los machos tempranos de encontrar más hembras para reproducirse. Por otro lado, en *C. signaticollis* se especula que los machos quienes llevan a cabo los procesos dispersivos y de búsqueda de pareja. Se espera que en los procesos de cortejo y cópula los machos enfrenten un gran gasto de energía y ello podría justificar la mayor acumulación de azúcares respecto a las hembras, cuyas reservas serán principalmente destinadas en forma de lípidos a la producción de huevos. En cuanto al consumo y la eficiencia de utilización de alimento, sólo se cuenta con datos cualitativos derivados de la alimentación de los individuos en el laboratorio, que a priori no parecerían mostrar diferencias en el consumo de alimento.

Además de las diferencias de peso observadas entre machos y hembras, los resultados de este trabajo mostraron que las hembras son parasitadas más frecuentemente que los machos. Si bien los datos de campo y de laboratorio indicaron que las larvas no parasitan diferencialmente respecto al peso de los hospedadores, una posible interpretación de estos resultados es que la elección de hospedadores hembra constituyera un modo indirecto de escoger hospedadores con mayores recursos. En *M. ruficauda* los órganos sensoriales principales de las larvas son de carácter quimiorreceptor (Pueyrredon *et al.* 2017), por lo cual es probable que el reconocimiento del hospedador y sus características dependa mayormente de la detección de claves químicas. En este sentido, podría resultar beneficioso para las larvas detectar químicamente a los hospedadores hembra, pues aumentarían las chances de obtener un hospedador que acumulará proporcionalmente más reservas en los meses venideros. La explotación de sistemas de comunicación químicos de los hospedadores por parte de los parasitoides ha sido identificada y caracterizada extensamente en la literatura (Aldrich 1995, Eggleton y Belshaw 1993, Feener y Brown 1997, Godfray 1994, Hoffmeister y Gienapp 1999, Stireman III *et al.* 2006, Wertheim *et al.* 2003). En la mayoría de los casos que se han descrito las hembras parasitoides adultas utilizan las feromonas sexuales secretadas por los hospedadores adultos, o feromonas de agregación secretadas por hospedadores adultos o inmaduros, en la localización del hospedador. Se conoce que algunas larvas de escarabeidos, y en particular tres especies dentro del género *Cyclocephala*, *C. lurida* Bland 1863, *C. immaculata* Olivier 1789 y *C. borealis* Arrow 1911, pueden producir compuestos feromonales femeninos que generan atracción en los machos adultos (Haynes *et al.* 1992, Haynes y Potter 1995a, b, Potter 1980). Si este fuera el caso también en *C. signaticollis*, podría existir la posibilidad de que estas claves fueran detectadas por las larvas parasitoides, y que ello les permitiera discriminar entre hospedadores de distinto sexo. Para poner a prueba esta hipótesis haría falta realizar nuevos experimentos de orientación de las larvas a extractos de ambos sexos por separado, y aislar y

caracterizar químicamente los compuestos que forman parte de la clave olfativa que explota la larva parasitoide.

En conclusión, *M. ruficauda* es un parasitoide koinobionte que, como tal, permite el desarrollo del hospedador durante un período prolongado de tiempo antes de matarlo. La calidad nutricional del hospedador al momento del parasitismo parecería no tener relevancia en cuanto a la elección de los hospedadores. En cambio, dado que la larva muere si no logra parasitar, sería más importante asegurar la unidad de recurso. Sin embargo, las larvas podrían seleccionar hospedadores con algunos atributos, como el sexo, que serían indicadores indirectos del potencial de reservas que podría acumular el hospedador durante su desarrollo. La elección del hospedador es un proceso complejo y que involucra la evaluación por parte de la larva de diversos factores, internos y externos. Para comprender este proceso es necesario tener en cuenta no sólo la acción individual de estos factores sino también sus interacciones en el marco de las estrategias de vida de la especie.

CAPÍTULO 6

Endotermia en adultos de *Cyclocephala signaticollis*: caracterización e implicancias sobre las interacciones intra- e interespecíficas

Este Capítulo dio origen a la siguiente publicación: Zermoglio PF, Castelo MK, Lazzari CR. Endothermy in the temperate scarab *Cyclocephala signaticollis*. *Journal of Insect Physiology* 108: 10-16. doi: 10.1016/j.jinsphys.2018.04.012.

Introducción

Los insectos son, típicamente, animales poikilotermos, *i.e.*, con capacidad reducida o nula de regular su temperatura corporal, y ectotermos, es decir, su temperatura corporal depende ampliamente del intercambio de calor con el ambiente. Eso no significa, sin embargo, que los insectos carezcan de capacidad de influir sobre, o incluso regular su temperatura corporal, a través de mecanismos de termorregulación, que pueden ser de tipo comportamental, como buscar activamente y permanecer en sitios con una temperatura dada, o fisiológico, *i.e.*, generando o perdiendo calor activamente. Es así que muchas especies de insectos poseen la capacidad de elevar su temperatura corporal mediante la producción de calor endógeno por períodos a veces prolongados, siendo entonces llamados “endotermos facultativos” (Chown y Nicholson 2004, Heinrich 1993). Este aumento de temperatura se limita en general a una región particular del cuerpo (*e.g.*, tórax), por lo que dichos insectos devienen “heterotermos regionales”; si esta condición varía en el tiempo, nos referimos entonces a “heterotermos temporales”.

La producción de calor en insectos ha sido particularmente asociada al vuelo (Grodzicki y Caputa 2005, Harrison *et al.* 2012, Heinrich 1993, Lahondère y Lazzari 2015, May 1979, Verdú *et al.* 2006). Entre los coleópteros, la mayoría se mueven lentamente y sólo vuelan de manera ocasional, y ello implica que la ocurrencia de endotermia no sea probable en la mayoría de las especies (Heinrich 1993). Sin embargo, se ha mostrado que la endotermia puede jugar un rol importante en distintas actividades en taxa diversos dentro de este grupo, e incluso en reposo (Heinrich 1993, Kreuger y Potter 2001, May 1979). Se ha sugerido que la elevación de la temperatura corporal en reposo podría beneficiar la actividad aeróbica (Bartholomew y Casey 1977a). En relación con el vuelo, o la preparación para el mismo, se ha reportado endotermia en numerosas familias y existen ejemplos excepcionales en los que la temperatura corporal durante el vuelo puede alcanzar valores de 30°C por encima de la temperatura ambiente (Bartholomew y Casey 1977a, Chappell 1984, Chown y Scholtz 1993, Heinrich y McClain 1986, Merrick y Smith 2004, Morgan 1987, Oertli 1989, Seymour *et al.* 2009, Verdu *et al.* 2004, 2006). La endotermia entre los coleópteros sólo se ha observado en especies capaces de volar, dado que está mayormente asociada a la actividad de los músculos del vuelo (Heinrich 1993). Sin embargo, su ocurrencia también ha sido relacionada con actividades terrestres, *i.e.*, desacopladas del vuelo. Estas incluyen ejemplos de endotermia durante períodos estacionarios o mientras caminan (Bartholomew y Casey 1977a, b, Chappell 1984, Morgan 1987, Morgan y Bartholomew 1982), en relación con el forrajeo (Chappell 1984) y con el cuidado de pareja (Saeki *et al.* 2005). En escarabajos estercoleros y en miembros de la familia Pleocomidae, se han descrito asociaciones del aumento de temperatura con la competencia por hembras, con la

fabricación, manipulación y competencia por pelotas de estiércol y con la cópula (Bartholomew y Heinrich 1978, Heinrich 1993, Heinrich y Bartholomew 1979, Morgan 1987, Shepherd *et al.* 2008, Smolka *et al.* 2012, Ybarrondo y Heinrich 1996). En la producción de calor relacionada con el proceso reproductivo, los machos de algunas especies exhiben mayores temperaturas que las hembras (Morgan 1987).

La endotermia representa una inversión energética muy alta para el animal que la lleva a cabo. Por ejemplo, las tasas de consumo de oxígeno en miembros de la familia Pleocomidae (“escarabajos de la lluvia”) puede ser equivalente a aquellas observadas en aves en vuelo, y puede ser hasta 13 veces más alta en escarabajos que llevan a cabo endotermia respecto a individuos en reposo (Morgan 1987). En particular para insectos pequeños, que poseen relaciones superficie-volumen grandes y por ende altas tasas de pérdida de calor, han sido descritos mecanismos alternativos que les permiten alcanzar altas temperaturas corporales con costos energéticos relativamente bajos. Estos comportamientos incluyen la búsqueda de ambientes más cálidos (*i.e.*, donde la pérdida de calor es menor), o bien “*basking*” temporariamente al sol en especies diurnas, o permaneciendo en áreas calientes en especies nocturnas (*e.g.*, dentro de flores termogénicas) (Heinrich 1993, Seymour *et al.* 2009). Sin embargo, otras especies nocturnas de regiones templadas deben lidiar con los compromisos adaptativos (*trade-off*) relacionados con la generación de calor endógeno, sin depender de una asociación con fuentes externas de calor.

El “escarabajo argentino”, *C. signaticollis*, es una especie nativa de Sudamérica que habita pastizales, principalmente distribuidos en las regiones templadas de Argentina y Uruguay (Remedi de Gavotto 1964). Como se ha mencionado en el Capítulo 1, en su hábitat natural las larvas se alimentan principalmente de tubérculos y raíces de los pastos, pero también en raíces de plantas cultivadas, como la papa, el girasol y algunos cereales. Dados los hábitos alimentarios de las larvas (llamadas gusanos blancos), *C. signaticollis* es considerado una plaga de la agricultura para muchos cultivos en Argentina y otras áreas del mundo (Alvarado *et al.* 1981, Carne 1957, Potter 1998, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas 2016). Pocos estudios se han enfocado en investigar el ciclo de vida de esta especie (Alvarado 1980, Carmona *et al.* 1994, Carne 1957, López *et al.* 1994), y describen principalmente sus características morfológicas y la duración y tasas de supervivencia de los distintos estados y estadios en condiciones de laboratorio. A pesar de su importancia económica, la ecología y fisiología de esta especie ha sido escasamente estudiada (Frew *et al.* 2016, Souza *et al.* 2014), siendo esto particularmente cierto para el estado adulto. Los adultos, como aquellos de otros *Cyclocephala* (Ratcliffe 2008, Albuquerque *et al.* 2016), son nocturnos y crepusculares, y permanecen enterrados en el suelo durante el día. Sus hábitos no han sido bien documentados, pero estimaciones a partir de tasas de colecta a campo sugieren que su

pico de actividad sería entre las 7 pm y la 1 am (Alvarado 1980). La tribu Cyclocephalini es conocida por incluir polinizadores altamente especializados, que usualmente están asociados con especies de plantas termogénicas de las cuales obtienen su alimento (Bernhardt 2000, Gottsberger 1986, 1990, 1999, Gibernau *et al.* 1999, Moore y Jameson 2013, Seymour *et al.* 2003). Contrariamente a lo que ocurre en otras especies del género, en *C. signaticollis* no se ha reportado actividad de alimentación, como tampoco ninguna asociación con ninguna especie de planta en particular. Se asume frecuentemente que los adultos no se alimentan y que las actividades que desarrollan durante la noche están relacionadas con la dispersión y la reproducción por encima del sustrato (Carne 1957, López *et al.* 1994). Sin embargo, la asociación de esta especie con alguna especie de planta no puede ser descartada dadas tres razones: 1) no existen datos relativos al comportamiento de los adultos en el campo; 2) los adultos tienen piezas bucales y tracto digestivo completamente desarrollados (P. Zermoglio, observación personal); y 3) otras especies de *Cyclocephala* nocturnas, como *C. putrida* Burmeister 1847, simpátrica con *C. signaticollis*, ha sido señalada como polinizador y se alimenta de recursos florales (Moore y Jameson 2013, Wiersema 1987).

La endotermia en escarabajos de regiones meridionales templadas que no explotan fuentes de calor externas y que no se alimentan, no ha sido aún estudiada. La biología particular de esta especie, así como su distribución geográfica, la torna un buen modelo para estudiar la capacidad de generación de calor endógeno en dichas condiciones y para comprender cuáles serían los efectos de la ocurrencia de este proceso sobre su historia de vida. Dados los antecedentes descritos, en el presente capítulo de la Tesis se planteó como **Objetivo General**: Evaluar y caracterizar la ocurrencia de endotermia en los adultos de *C. signaticollis* como un proceso que representaría una ventaja adaptativa para esta especie de zonas templadas. Se plantearon como **Objetivos particulares**: 1) determinar la ocurrencia de endotermia en *C. signaticollis* y caracterizarla en términos de su amplitud, su frecuencia y su relación con los ciclos de actividad; 2) determinar la naturaleza del fenómeno en términos cronobiológicos: determinar si se trata de un proceso circadiano; 3) determinar cómo el aumento de temperatura corporal varía de acuerdo a la temperatura ambiente; y 4) determinar si la endotermia está relacionada con la reproducción de los individuos.

Materiales y métodos

Para determinar si los escarabajos adultos producen calor endógeno se realizaron mediciones en tiempo real con una cámara termográfica infrarroja. En todos los experimentos termográficos se utilizaron escarabajos adultos provenientes de larvas de estadio III colectadas a

campo y criadas hasta el estado adulto en laboratorio, como se indica en el Capítulo 2. Los individuos recién emergidos fueron sexados y mantenidos en tubos opacos (30 ml) con 2/3 de sustrato natural (tierra) para su transporte al laboratorio francés. Una vez allí, se los colocó en nuevos recipientes, tubos Falcon de 50 ml conteniendo 20 ml de tierra comercial (*Tierra Fértil*, Carrefour), que fueron recubiertos externamente hasta la marca de 35 ml con plástico negro (Figura 6.1 A). Los tubos fueron luego colocados en posición vertical dentro de una cámara iluminada por una lámpara cuyo encendido y apagado podía ser regulado mediante un temporizador, ubicada en una habitación con condiciones controladas de temperatura y humedad ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $60 \pm 10\%$ HR). El régimen de luz-oscuridad fue mantenido en 12 hs : 12 hs, salvo expresa indicación, con encendido a las 8 hs. En todos los casos, antes de realizar los experimentos los individuos fueron mantenidos en las condiciones de luz-oscuridad pertinentes por al menos 3 días previos al inicio de los ensayos. En los experimentos se utilizaron adultos entre 3 y 15 días luego de la emergencia (esperanza de vida máxima promedio: 30 días).

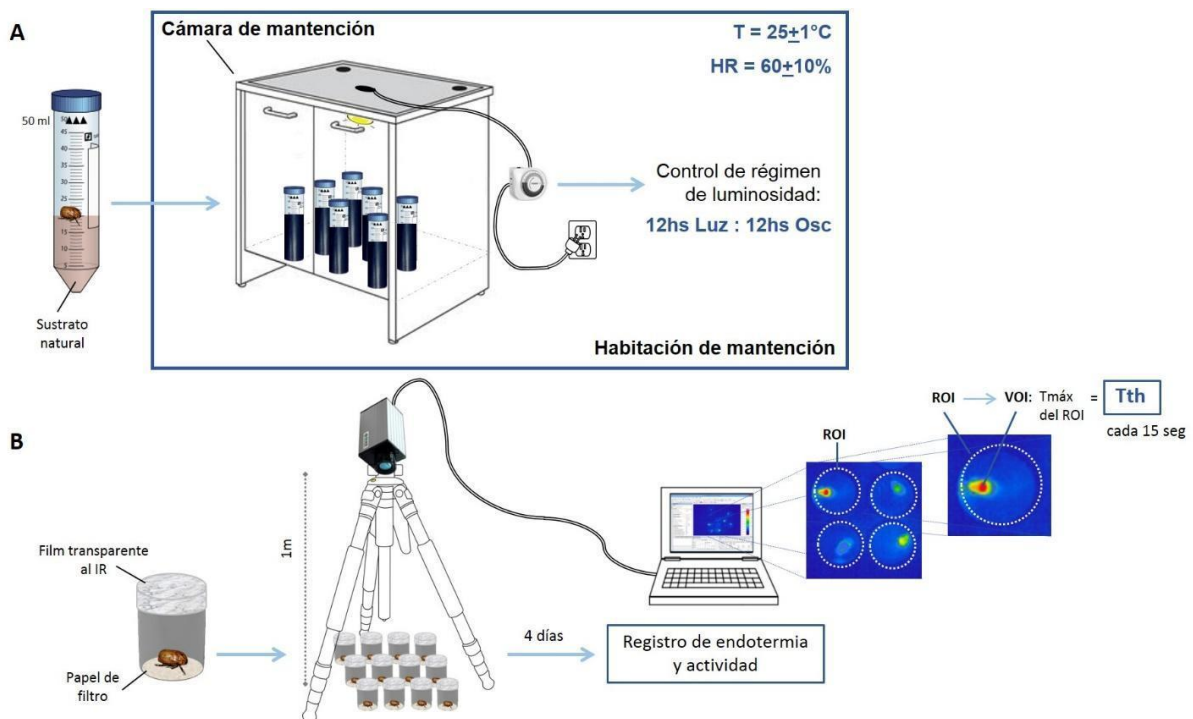


Figura 6.1. A. Condiciones de mantención de los escarabajos adultos. **B.** Diseño experimental para el registro del ciclo de termogénesis. IR: radiación infrarroja; ROI: región de interés; VOI: valor de interés; $T_{\text{máx}}$: temperatura máxima; Tth: temperatura torácica.

Producción de calor endógeno, ciclo térmico y ciclo de actividad

Para determinar si los escarabajos adultos son capaces de producir calor endógeno y, de existir, a qué hora del día ocurre y con qué frecuencia, se filmaron individuos con una cámara termográfica infrarroja (Stabentheiner y Schmaranzer 1987; PYROVIEW 380L compact, DIAS infrared GmbH, Alemania; banda espectral: 8-14 μm , detector no refrigerado 2D, 384x288 pixeles). Para ello, escarabajos hembra (N = 38) y macho (N = 26) fueron colocados individualmente en tubos de plástico negro opaco (30 ml). Cubriendo el fondo de cada recipiente se colocó un círculo de papel de filtro humedecido (aproximadamente 0,1 ml de agua destilada) para evitar la desecación de los individuos y proveer un sustrato sobre el cual los individuos pudieran caminar sin patinarse. Los recipientes fueron cerrados utilizando una película selladora de laboratorio Dura Seal™ para evitar la desecación y el escape de los insectos (Figura 6.1 B). Dicha película es un material de polietileno transparente tanto en el espectro visible como en el infrarrojo de interés. Los recipientes fueron ubicados en grupos a una distancia aproximada de 1 m de la cámara termográfica. El tamaño de los escarabajos en los registros termográficos fue en promedio de 10x6 pixeles, lo cual permitió medir la temperatura de su superficie de manera precisa. Se realizaron registros termográficos durante 4 días y 4 noches consecutivas, con una frecuencia de muestreo de 1,6 Hz. Las filmaciones fueron guardadas como videos en un disco rígido externo capturando imágenes de los registros cada 5 segundos (Figura 6.1 B). El valor de emisividad fue fijado en 0,97, aceptado como el valor de emisividad de la cutícula de los insectos (Stabentheiner y Schmaranzer 1987). Durante el experimento, las condiciones de luz y temperatura se mantuvieron constantes: 12 hs : 12 hs luz:oscuridad y $21 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente. Luego de los experimentos, los individuos fueron devueltos a la cámara de cría ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 L/D).

El análisis de los registros de temperatura de la superficie de cada individuo fue realizado utilizando el programa Pyrosoft Professional (DIAS Infrared Systems, Alemania). Los individuos se mueven dentro del recipiente de contención, y por ello no se pudo identificar un pixel o conjunto de pixeles particular para realizar el seguimiento de la variación de temperatura. En cambio, asumiendo que cualquier aumento de temperatura observado estaría posicionado sobre el individuo y no sobre el fondo, lo cual fue corroborado examinando visualmente cada registro, cada recipiente fue identificado con un área de interés (ROI, *region of interest* por sus sigla en inglés) y se obtuvieron los valores de temperatura máxima (valor de interés, VOI, *value of interest* por su sigla en inglés) para cada uno de los recipientes durante el lapso de grabación (Figura 6.1 B). Dado que se observó que la temperatura del tórax de los insectos durante los eventos de endotermia era siempre superior a la del resto del cuerpo (ver más abajo y sección resultados), los valores de temperatura máxima de

cada ROI se consideraron correspondientes a la temperatura torácica de los individuos (T_{th}). Incluso bajo condiciones de temperatura ambiente constantes y cuando los escarabajos no están llevando a cabo endotermia, su temperatura puede variar ligeramente. Por ello, se decidió utilizar el siguiente criterio para determinar la ocurrencia de endotermia: un insecto llevó a cabo un evento de endotermia cuando su temperatura torácica máxima fue al menos 3°C superior a su temperatura torácica promedio a lo largo del experimento.

Para aquellos insectos que mostraron eventos de endotermia, se obtuvieron los valores de temperatura torácica durante cada pico de endotermia y se midieron cuatro variables: la máxima temperatura alcanzada (en cualquiera de los eventos de endotermia desarrollados por un individuo), la máxima diferencia de temperatura registrada respecto a la temperatura media a lo largo del experimento, la temperatura máxima media por individuo y la duración de los eventos de endotermia. Los valores de estas cuatro variables fueron comparados entre machos y hembras por medio de pruebas de *t*. Además, para estos mismos insectos se generaron perfiles térmicos diarios en los que se identificaron los intervalos de tiempo en que ocurren los eventos de endotermia durante el día. Con el fin de analizar las diferencias de temperatura entre las distintas partes del cuerpo durante esos lapsos, se midieron también las temperaturas de la superficie de la cabeza (T_{hd}) y del abdomen (T_{abd}). Para ello, se identificaron las regiones de la cabeza y el abdomen y se computó manualmente la temperatura máxima de los píxeles correspondientes a cada región en el pico de endotermia (temperaturas de cabeza y abdomen cuando la temperatura torácica fue máxima). Las temperaturas de las diferentes partes del cuerpo fueron comparadas utilizando una prueba de Kruskal-Wallis y llevando a cabo contrastes *a posteriori* utilizando la prueba de Dunn (Dinno 2016).

En los registros termográficos, los individuos son claramente distinguibles del fondo aún cuando no generan calor endógeno, dado que las emisividades de la cutícula y del fondo son diferentes, lo cual permitió además registrar su patrón de actividad. Para ello se dividió gráficamente la base del recipiente de contención en dos zonas semicirculares contiguas y se contabilizó el número de cruces de un lado al otro del recipiente que los insectos llevaron a cabo en cada intervalo de 15 segundos durante toda la grabación. El número de cruces por unidad de tiempo se consideró como estimador de la actividad de los individuos. Se midieron únicamente los patrones de actividad en aquellos insectos que mostraron endotermia. La medición se enfocó sólo en la actividad de los animales termogénicos con el fin de estudiar la relación entre ambos procesos. Sin embargo, se conoce a partir de otros experimentos en el laboratorio y de observaciones en el campo que el ciclo de actividad de los individuos termogénicos y no termogénicos es similar. Con estos datos, se

construyeron perfiles de actividad a lo largo del tiempo, los cuales se compararon con los perfiles de generación de calor endógeno obtenidos como se explicó anteriormente.

Naturaleza del ritmo de termogénesis

Los experimentos anteriores mostraron que los escarabajos adultos presentan un ritmo diario de generación de calor endógeno (ver sección Resultados). Con el fin de determinar si el ciclo es regulado de manera endógena (*i.e.*, si constituye un verdadero ritmo circadiano), se llevó a cabo un segundo experimento en el cual los insectos fueron mantenidos en completa oscuridad durante los ensayos. Individuos previamente mantenidos en condiciones 12 hs : 12 hs luz:oscuridad fueron colocados en recipientes como los detallados anteriormente y se registró su actividad utilizando la cámara termográfica durante cuatro días y cuatro noches consecutivas en completa oscuridad (N = 52, *i.e.*, 21 machos y 31 hembras). En estos experimentos se utilizaron tanto escarabajos *naïve* como algunos escarabajos que mostraron eventos de endotermia en el experimento anterior, tal de asegurar que al menos algunos individuos fueran capaces de generar calor endógeno en condiciones normales (N = 31, 14 machos y 17 hembras). En estos casos, entre los experimentos con régimen de luminosidad 12 hs : 12 hs y los de oscuridad total se mantuvo a los individuos en sus recipientes de mantención durante al menos tres días para permitir su recuperación respecto de las condiciones experimentales anteriores.

El análisis de los datos se llevó a cabo como se indicó anteriormente, registrando la temperatura torácica máxima, determinando la ocurrencia o no de eventos de endotermia y perfilando las diferencias de temperatura a lo largo del experimento.

Endotermia a diferentes temperaturas ambiente

Habiendo caracterizado la ocurrencia de endotermia bajo condiciones constantes de temperatura, el siguiente objetivo fue determinar si los insectos invierten una cantidad fija de energía en la producción de calor o si, contrariamente, son capaces de invertir cantidades de energía variables para alcanzar una cierta temperatura corporal mínima fija. Para ello se midieron las temperaturas corporales de individuos expuestos a ambientes a temperaturas de 19°C, 25°C y 30°C. Estas temperaturas están comprendidas dentro del rango registrado en verano en la Región Pampeana. En una habitación a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, se construyó un gradiente térmico utilizando una placa de aluminio cuya temperatura fue regulada utilizando una resistencia eléctrica (Thermo, 15W)

conectada a un termostato (Voltcraft) (Figura 6.2 A). La superficie del gradiente fue cubierta con papel de filtro humedecido y luego aislada por medio de una plancha de poliestireno expandido de 2 cm de altura, en el cual se practicaron orificios de 3 cm de diámetro en las posiciones correspondientes a 30°C, 25°C y 19°C. Dichas posiciones fueron determinadas mediante la medición directa de la temperatura sobre la superficie del gradiente utilizando un termómetro de tipo termocupla. Dentro de los orificios se colocaron cilindros plásticos abiertos en ambos extremos (diámetro 3 cm, altura 2 cm) para contener a los insectos, y se cubrió el dispositivo con una lámina de material transparente a la radiación infrarroja (Edmund Optics). De esta forma, los insectos estuvieron en contacto directo con la superficie a la temperatura establecida, pero aislados del resto del ambiente, y su temperatura corporal pudo ser registrada en tiempo real utilizando la cámara termográfica como se indicó anteriormente. Los escarabajos fueron introducidos en los tubos individualmente y su temperatura fue medida durante tres días consecutivos bajo un régimen de 12:12 hs luz:oscuridad.

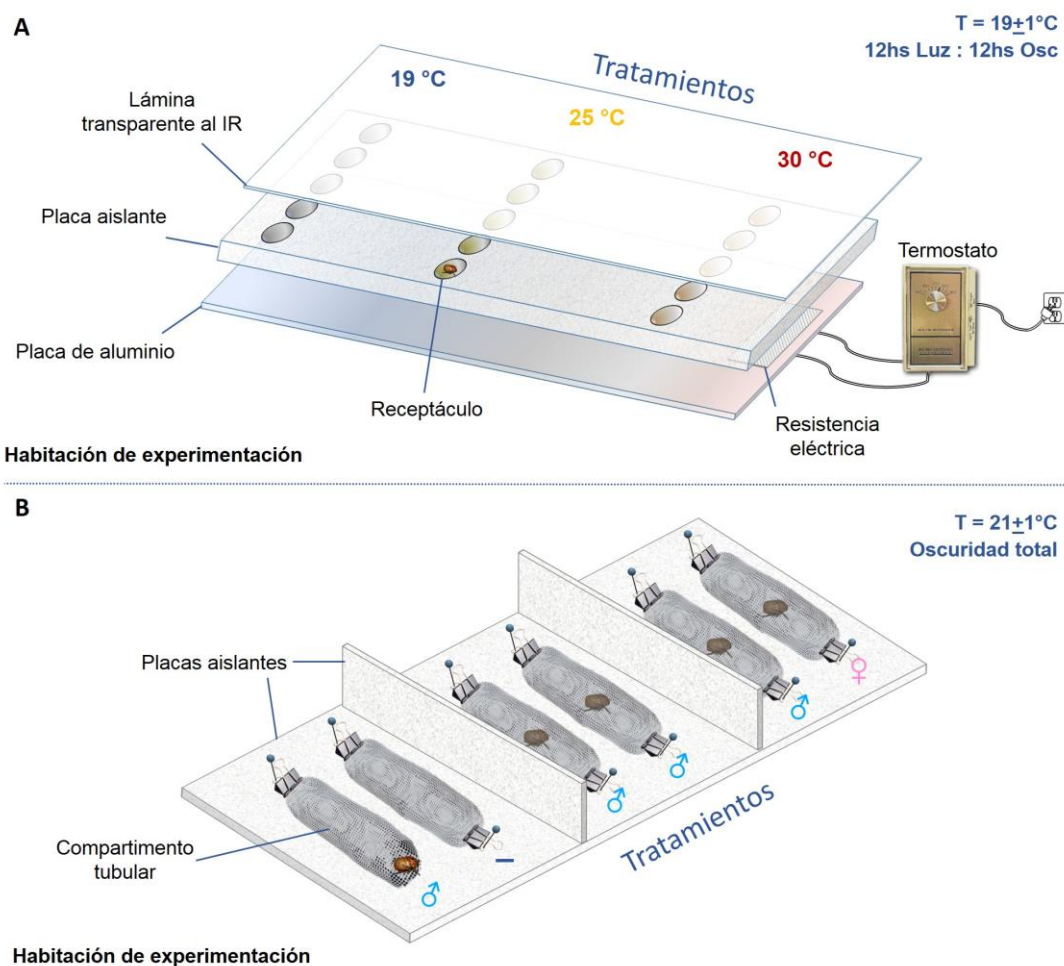


Figura 6.2. A. Dispositivo experimental utilizado para el registro de endotermia bajo diferentes condiciones de temperatura ambiente. **B.** Dispositivo experimental utilizado para el registro de endotermia en el contexto reproductivo. IR: radiación infrarroja.

En este experimento se utilizaron 22 individuos (9 hembras y 13 machos), algunos de los cuales fueron sometidos a los tres tratamientos. Para estos últimos, el orden en el cual los escarabajos fueron sometidos a cada temperatura fue asignado al azar, y ningún insecto fue utilizado en dos experimentos de manera consecutiva. En cambio, los individuos fueron mantenidos en condiciones de cría durante cinco días entre un ensayo y el siguiente. De esta manera, se pudo considerar cada medición como independiente, y se contaron por ende con $N = 4$ (todos machos) para el tratamiento a 30°C, $N = 14$ (6 hembras y 8 machos) para el tratamiento a 25°C, y $N = 12$ (6 hembras y 6 machos) para el tratamiento a 19°C. Como en los experimentos previos, se consideró que un insecto llevó a cabo endotermia cuando su temperatura torácica fue al menos 3°C superior a la temperatura máxima media durante el experimento. Para aquellos insectos que mostraron eventos de endotermia, se midió la diferencia media entre la temperatura torácica máxima y la temperatura ambiente, y la duración media de los eventos de endotermia cuando los individuos fueron expuestos a cada temperatura. Debido a que en este experimento se contó con un número de individuos reducido, y dado que no se encontraron diferencias en los parámetros de endotermia entre machos y hembras (*i.e.*, máxima temperatura alcanzada, duración de los eventos de endotermia; ver Resultados), ambos sexos fueron analizados de manera conjunta. Se utilizaron pruebas U de Mann-Whitney para comparar los distintos tratamientos de manera pareada para cada variable.

Relación entre la generación de calor endógeno y la reproducción

Con el objeto de determinar si los eventos de endotermia están relacionados con la reproducción se llevaron a cabo experimentos en los cuales se registró el aumento de temperatura corporal en machos y hembras en el contexto reproductivo. En el caso de los machos, los individuos fueron evaluados en tres situaciones: individuos en solitario, individuos en presencia de otros machos e individuos en presencia de hembras. Dado que los experimentos se llevaron a cabo durante las horas diurnas, se sometió previamente a los individuos a un régimen inverso de luz-oscuridad durante al menos tres días, tal que las horas diurnas del observador correspondieran a la noche subjetiva de los insectos. Este tiempo fue determinado a partir de experimentos accesorios en los cuales se corroboró que luego de tres días los insectos mostraban los patrones normales de actividad únicamente nocturna. Todos los ensayos fueron llevados a cabo en una habitación a oscuras para no perturbar el ciclo de los individuos. El dispositivo experimental utilizado constó de dos compartimentos tubulares paralelos (10 x 2 cm) construidos con malla de nylon-poliéster

ubicados sobre una placa de material aislante (Figura 6.2 B). La confección de los compartimentos permite el desplazamiento de los insectos y que tengan contacto visual y olfativo con el individuo ubicado en el compartimento paralelo, pero los mantiene aislados físicamente. Los individuos fueron colocados por un extremo del compartimento y ambos extremos fueron asegurados para evitar el escape de los insectos. Se registró la actividad y la ocurrencia de eventos de endotermia de los individuos durante una hora utilizando la cámara termográfica y se identificaron los individuos que presentaron aumento en la temperatura corporal. Cada individuo (N = 25) fue evaluado en las tres situaciones: solitario, en presencia de otro macho, y en presencia de una hembra. Además, se registró la ocurrencia de endotermia en hembras (N = 12) en dos situaciones: en presencia de otra hembra y en presencia de un macho.

Resultados

Producción de calor endógeno, ciclo térmico y ciclo de actividad

Se registraron eventos de endotermia (*i.e.*, aumento de la temperatura corporal debido a la generación de calor endógeno) en 37 de los 54 escarabajos examinados (20 hembras y 17 machos, en todo el rango etario), a temperatura ambiente de $21 \pm 1^\circ\text{C}$. En estos individuos, la temperatura fue siempre máxima en el tórax (T_{th}) durante los picos endotermia (ver Figura 6.3 como ejemplo). La temperatura máxima media alcanzada por los individuos durante los eventos de endotermia fue de $32,2 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (máx = $36,5^\circ\text{C}$, mín = $28,8^\circ\text{C}$), lo cual representa un incremento medio de $7,7 \pm 2,4^\circ\text{C}$ por sobre la temperatura media torácica a lo largo del experimento (máx incremento registrado = $10,9^\circ\text{C}$). Durante los eventos de endotermia la temperatura de las diferentes partes del cuerpo fue significativamente distinta ($H = 59,337$, $p < 0,001$, un ejemplo se muestra en la Figura 6.3). T_{th} fue siempre superior a T_{hd} ($Z = -5,034$, $p < 0,001$), y superior a T_{abd} ($Z = -7,567$, $p < 0,001$). Además, T_{hd} fue superior a T_{abd} ($Z = -2,533$, $p = 0,006$). En los picos de T_{th} máximos, la diferencia de temperatura promedio entre T_{th} y T_{hd} fue de $3,1 \pm 1,5^\circ\text{C}$, y la diferencia de temperatura promedio entre T_{th} y T_{abd} fue de $4,1 \pm 1,8^\circ\text{C}$. Aunque no fue medido cuantitativamente, se observó que en todos los individuos que llevaron a cabo endotermia la temperatura de las patas fue baja y usualmente similar a la del abdomen.

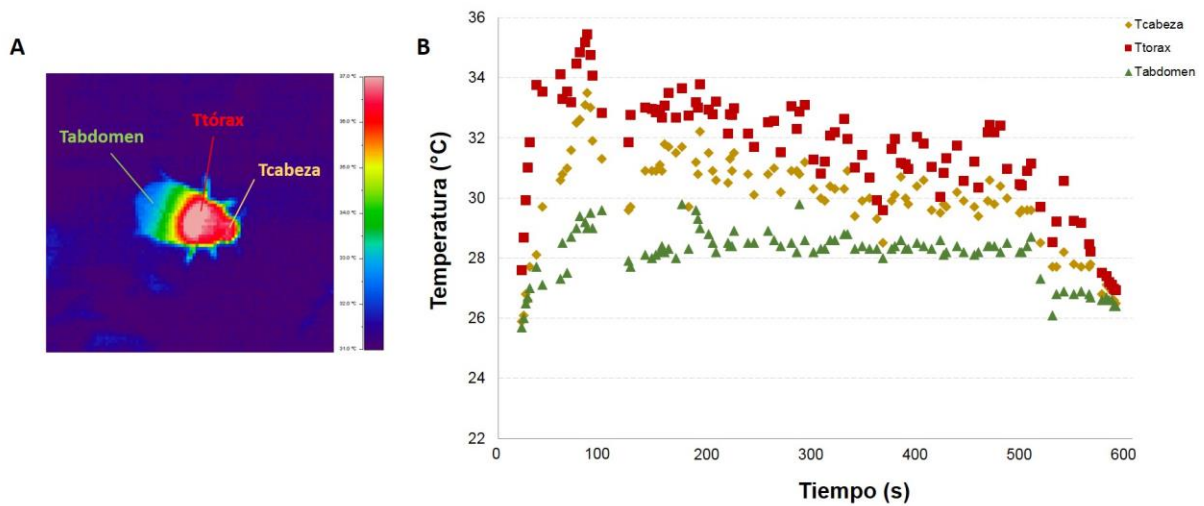


Figura 6.3. Ejemplo de un evento de endotermita en un macho de *C. signaticollis*. **A:** Imagen termográfica de un macho mostrando la temperatura de las distintas regiones corporales durante un evento de endotermita. **B:** Perfil de temperatura de las distintas regiones corporales durante un evento de endotermita. Tcabeza, Ttórax y Tabdomen representan las temperaturas máximas de la cabeza, el tórax y el abdomen, respectivamente.

De los 37 individuos que mostraron endotermita, en 11 (2 hembras y 9 machos) dichos eventos se reiteraron de manera cíclica (*i.e.*, alrededor de la misma hora en días consecutivos). En la Figura 6.4 se muestra un ejemplo de endotermita cíclica en un escarabajo macho. Los eventos de endotermita ocurrieron al principio de la noche (con ciclo de luz 12 : 12 hs, apagado a las 20 hs), y presentaron picos máximos alrededor de las 21 hs; el horario más temprano en que un individuo mostró endotermita fue 20:01 hs y el más tardío fue 3:53 hs.

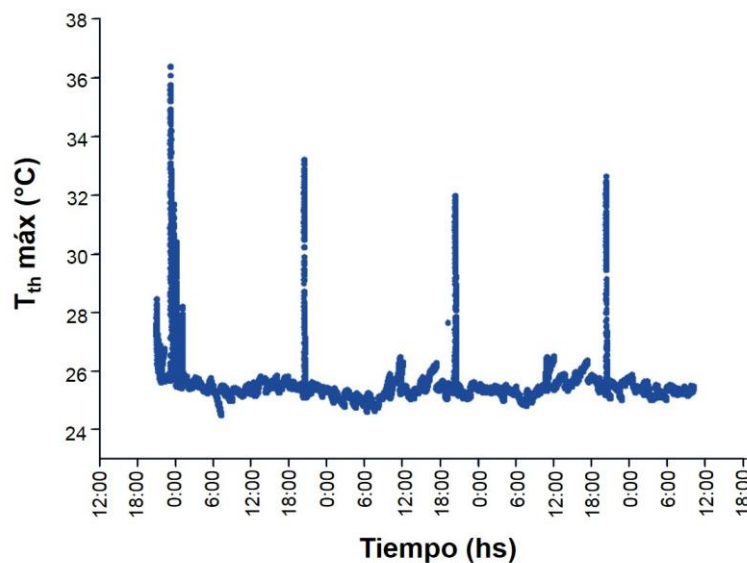


Figura 6.4. Ejemplo del ciclo de endotermita en un individuo macho de *C. signaticollis*. Los picos de endotermita (aumento en la temperatura torácica máxima, $T_{th\ máx}$) se repiten durante cuatro noches consecutivas, entre las 20 hs y las 21 hs.

El número máximo de eventos de endotermia por noche (separados entre sí por al menos un minuto) fue 7, observado en un único macho, y el número promedio de eventos fue de $1,92 \pm 1,36$, con 20 individuos (54%) desarrollando un único evento de endotermia por noche. La duración promedio de los eventos de endotermia fue de $6,80 \pm 4,40$ min (máx = 40,27 min, mín = 0,08 min). Los picos de endotermia coincidieron con el comienzo de la actividad nocturna de los individuos, pero no persistieron durante todo el período en que éstos se hallan activos. Por el contrario, la actividad se extendió desde las 20 hs hasta el prendido de las luces a la mañana siguiente (Figura 6.5). En ningún caso se registraron eventos de endotermia durante el día, aunque sí se observaron unos pocos insectos activos durante ese período.

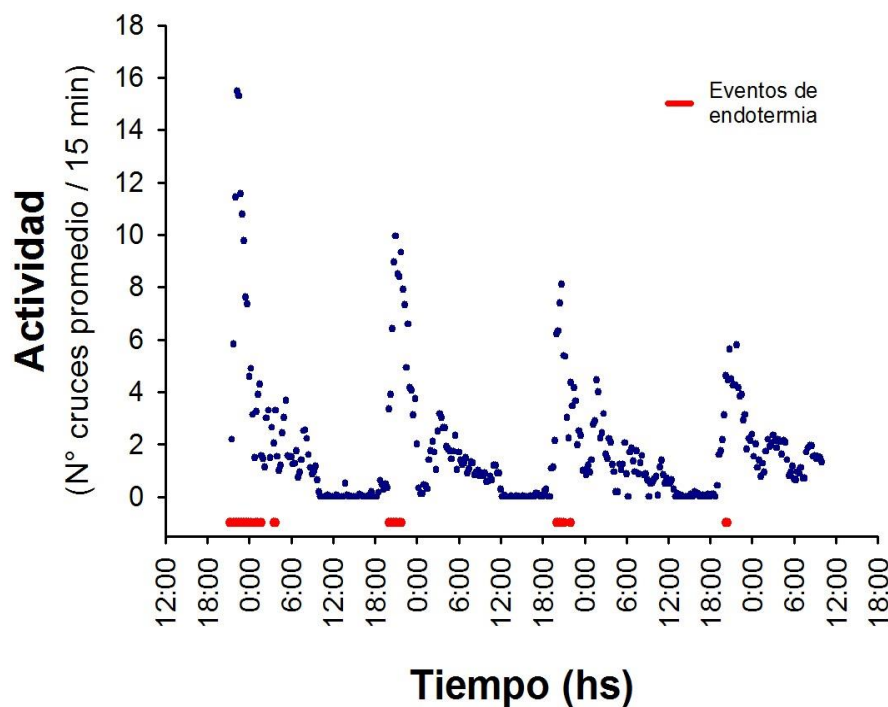


Figura 6.5. Patrones de actividad y ocurrencia de eventos de endotermia a lo largo del tiempo en adultos de *C. signaticollis*. La actividad fue estimada a partir del número de cruces de una zona a otra del recipiente donde estaban contenidos los insectos.

La comparación entre machos y hembras no mostró diferencias entre sexos en cuanto a la temperatura máxima alcanzada, la máxima diferencia de temperatura respecto a la temperatura corporal media durante el experimento, la máxima temperatura media o la duración de los eventos de endotermia (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Comparación entre machos y hembras que desarrollaron eventos de endotermia. Variables medidas: máxima temperatura alcanzada (en cualquiera de los eventos de endotermia registrados en un individuo, máx Tth alcanzada); máxima diferencia de temperatura registrada en un individuo con respecto a su temperatura media durante el experimento (máx ΔT , máx Tth- Tth promedio); temperatura máxima media por individuo (máx promedio Tth); y duración media de los eventos de endotermia. Para cada variable se presentan los valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar. La temperatura ambiente durante el experimento fue de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

Variable	Machos	Hembras	Valor t	Valor p
máx Tth alcanzada ($^\circ\text{C}$)	$34,1 \pm 2,0$	$32,7 \pm 2,6$	1,695	0,099
máx ΔT ($^\circ\text{C}$)	$8,4 \pm 2,0$	$7,1 \pm 2,7$	1,580	0,123
máx promedio Tth ($^\circ\text{C}$)	$32,3 \pm 1,4$	$32,2 \pm 2,4$	0,131	0,897
duración promedio (min)	$5,87 \pm 2,65$	$7,58 \pm 5,38$	-1,187	0,243

Con respecto a los ciclos de actividad, se confirmó que, bajo un ciclo de luz artificial 12:12 hs con apagado a las 20 hs, los individuos de ambos sexos están predominantemente activos durante la noche, desde las 20 hs y hasta las 8 hs, y que sólo ocasionalmente están activos durante el día (Figura 6.5). La máxima actividad (estimada como el máximo número de cruces promedio) fue registrada entre las 22 y las 23 hs (más de 10 cruces por cada 15 min) durante el primer día de experimentación. En días sucesivos, la máxima actividad fue registrada alrededor de la misma hora, pero con intensidad decreciente. En todos los casos los eventos de endotermia estuvieron asociados al comienzo del ciclo de actividad, pero la actividad fue registrada durante períodos mucho más prolongados.

Naturaleza del ritmo de termogénesis

Cuando los individuos fueron expuestos a un régimen de oscuridad constante durante el experimento se registraron eventos de endotermia en 29 de los 52 escarabajos ensayados, 13 machos y 16 hembras (de los cuales 11 y 9, respectivamente, habían sido utilizados en el experimento anterior, en el cual habían mostrado endotermia). Los eventos de endotermia sólo se registraron durante la primera noche excepto en dos machos, los cuales mostraron aumento de la temperatura torácica durante dos noches consecutivas. Dichos eventos ocurrieron alrededor del mismo período de tiempo que fue descrito en el experimento anterior (tiempo más temprano: 18:43 hs, tiempo más tardío: 21:25 hs). No se registró ningún intento de vuelo durante los experimentos. Todos los parámetros medidos fueron a su vez similares en magnitud a los

determinados anteriormente: promedio de número máximo de eventos de endotermia por noche = $1,83 \pm 0,93$; duración promedio de los eventos de endotermia = $6,32 \pm 7,07$ min (máx = 23,52 min, mín = 0,08 min); temperatura máxima promedio = $31,3 \pm 1,9^{\circ}\text{C}$ (máx = $35,8^{\circ}\text{C}$, mín = $28,8^{\circ}\text{C}$), representando un incremento medio de $7,3 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ por sobre la temperatura torácica media a lo largo del experimento (máximo incremento registrado = $11,1^{\circ}\text{C}$). No se registró actividad térmica durante el día. Los insectos, sin embargo, permanecieron activos de manera cíclica a lo largo de todo el experimento, mostrando actividad durante la noche, como se describió anteriormente.

Endotermia a diferentes temperaturas ambiente

Escarabajos sometidos a diferentes temperaturas mostraron diferencias en cuanto a su comportamiento térmico. En particular, ninguno de los individuos sometidos a 30°C mostraron endotermia ($N = 4$), mientras que 10 de 14 (5 hembras y 5 machos) mostraron endotermia cuando fueron expuestos a 25°C , y 10 individuos de 12 (4 hembras y 6 machos) lo hicieron cuando fueron expuestos a 19°C . La diferencia máxima promedio respecto a la temperatura ambiente fue significativamente mayor en insectos sometidos a 19°C que en insectos sometidos a 25°C ($7,0 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y $4,5 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, respectivamente, $U = 29$, $p = 0,001$, Tabla 6.2). De manera similar, la duración promedio de los eventos de endotermia fue significativamente más larga en insectos sometidos a 19°C que en aquellos sometidos a 25°C ($5,67 \pm 2,77$ min y $1,70 \pm 1,97$ min, respectivamente, $U = 29$, $p = 0,002$, Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Eventos de endotermia a diferentes temperaturas ambiente. N_{total} : número de individuos ensayados; N_{endot} : número de individuos que mostraron endotermia; DiferenciaMaxTemp : diferencia máxima de temperatura entre la temperatura torácica media y la temperatura torácica máxima promedio alcanzada (promedio calculado a partir de todos los individuos que llevaron a cabo endotermia). Dado que ninguno de los insectos sometidos a 30°C mostró eventos de endotermia, las comparaciones presentadas son aquellas entre insectos a 25°C y a 19°C .

Variable	30°C	25°C	19°C	Valor U	Valor p
N_{total}	4	14	12	-	-
N_{endot}	0	10	10	-	-
$\text{DiferenciaMaxTemp (endot, }^{\circ}\text{C)}$	-	$5,1 \pm 1,0$	$8,5 \pm 2,0$	29	0,001
$\text{duración promedio (min)}$	-	$1,70 \pm 1,97$	$5,67 \pm 2,77$	29	0,002

Relación entre la generación de calor endógeno y la reproducción

La exposición de los insectos a individuos del sexo opuesto no influyó la ocurrencia de eventos de endotermia en machos ni en hembras. Tanto para machos como para hembras, durante el tiempo de experimentación, se registraron incrementos de temperatura tanto en individuos en solitario como en individuos expuestos al mismo o a distinto sexo (Tabla 6.3). Más aún, la mayoría de los insectos que presentaron endotermia lo hicieron en las tres situaciones a las que fueron expuestos.

Tabla 6.3. Eventos de endotermia registrados en machos de *C. signaticollis* mantenidos en solitario, o expuestos a individuos del mismo sexo o del sexo opuesto. Referencias: $\uparrow T^\circ$: eventos de endotermia.

$\uparrow T^\circ$ / Exposición			N° individuos que mostraron Endotermia
Solo	M-M	M-H	
Sí	No	No	1
No	Sí	No	0
No	No	Sí	1
Sí	Sí	No	1
Sí	No	Sí	1
No	Sí	Sí	1
Sí	Sí	Sí	5
No	No	No	15

Discusión

En el presente capítulo se estudió en primer lugar si los adultos de *C. signaticollis* son capaces de generar calor de manera endógena. Los resultados obtenidos mostraron que en esta especie, que habita regiones templadas, tanto los machos como las hembras son capaces de elevar su temperatura corporal 8°C en promedio por sobre una temperatura ambiente de 21°C. Este valor es intermedio entre aquellos reportados para especies de ambientes neotropicales del género *Cyclocephala*. Por ejemplo, *C. colasi* Endrodi 1964 puede mantener su temperatura corporal entre 4

y 17°C por encima de la temperatura ambiente (con una temperatura media de 33°C cuando la temperatura ambiente se encuentra entre 16 y 29°C, Seymour *et al.* 2009), y los adultos de *C. caelestis* Delgado y Ratcliffe 1990 pueden mantener su temperatura corporal 4,7°C por encima de la temperatura ambiente (Dieringer *et al.* 1998). Estos resultados, junto con la determinación de la naturaleza cíclica de la endotermia en *C. signaticollis* que se discute más abajo, representan la primera caracterización del proceso de endotermia en una especie de *Cyclocephala* de clima templado que no presenta ninguna asociación conocida con fuentes de calor externas, tales como plantas termogénicas.

En concordancia con todos los reportes previos en coleópteros, la evidencia hallada en este trabajo parecería indicar que los músculos torácicos del vuelo serían los responsables de la producción de calor en *C. signaticollis* durante los eventos de endotermia. Esto se observa en el hecho de que la temperatura torácica fue siempre superior a la temperatura de otras regiones del cuerpo, *i.e.*, cabeza y abdomen, durante dichos eventos. Más aún, se observó que la actividad caminadora no implica un aumento de la temperatura corporal y que la temperatura de las patas siempre permanece en valores bajos. De esta manera, puede descartarse que los músculos locomotores no relacionados con el vuelo cumplan una función en el proceso de endotermia. Estos resultados son congruentes con el conocimiento teórico en el grupo, que indica que escarabajos que carecen de la habilidad para volar (*i.e.*, tienen los músculos del vuelo atrofiados), serían incapaces de generar endotermia (Heinrich 1993).

Los picos de endotermia en *C. signaticollis* fueron de duración variable, pero relativamente cortos en comparación con la duración de su período de actividad, el cual se extiende durante varias horas durante la noche. En machos, esto podría atribuirse a una relación entre la ocurrencia de endotermia y la preparación para vuelos de dispersión (Potter 1980), mientras que en las hembras, podría estar relacionado con la búsqueda de sitios de oviposición más propicios y con enterramiento post-copulatorio, que tiene lugar en las primeras horas de la noche (Carne 1957, López *et al.* 1994, P. Zermoglio observación personal). Con respecto a la corta duración de los eventos de endotermia, es posible que, como se ha observado en los escarabajos de las flores *Pachnoda sinuata* Fabricius 1775 y *P. cincta* De Geer 1778 (Heinrich y McClain 1986), los individuos estén minimizando la cantidad de energía invertida en aumentar su temperatura corporal llevando a cabo endotermia sólo cuando es estrictamente necesario, *e.g.*, en preparación para vuelos dispersivos.

En el presente capítulo, una vez que se determinó que *C. signaticollis* es capaz de generar calor de manera endógena y que lleva a cabo este proceso de manera cíclica, el siguiente objetivo fue determinar si los ciclos de endotermia en esta especie están gobernados por factores externos o internos. En cronobiología se denomina ritmo circadiano a la oscilación diaria de un determinado

proceso biológico o comportamiento, cuyos ciclos se caracterizan por su persistencia en ausencia de señales ambientales que sirvan de referencia temporal, o *Zeitgeber* (Saunders 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la mayoría de los escarabajos *C. signaticollis*, aunque desarrollan eventos de endotermia de manera cíclica, cesan la producción de calor endógeno si son mantenidos en ausencia de claves temporales, como por ejemplo, un ciclo de luz. La interrupción en la ocurrencia de eventos de endotermia se observó inmediatamente después de la supresión del estímulo al cual el ciclo está sincronizado (*i.e.*, ciclo ambiental de luz-oscuridad). Ello sugiere que, aunque la luz desencadena la ocurrencia de endotermia de modo cíclico, estos eventos no constituyen un ritmo circadiano *sensu stricto*, dado que carecen de endogenicidad. El poder encontrar evidencia de un patrón circadiano puede verse influenciado por el tiempo que los escarabajos son capaces de llevar a cabo endotermia, es decir, por ejemplo, si sólo son capaces de producir calor endógeno durante los primeros días después de la emergencia. No obstante, dado que se utilizaron escarabajos de diferentes edades hasta la mitad del rango de esperanza de vida, se considera que los resultados obtenidos son consistentes con la falta de endogenicidad.

La endotermia constituye un proceso muy costoso. Por ejemplo, en el caso extremo de los escarabajos neárticos y neotropicales de la especie *Strategus aloeus* L. 1758, el consumo de oxígeno durante los eventos de endotermia puede exceder los valores reportados en mamíferos de peso corporal equivalente (Bartholomew y Casey 1977b). En consecuencia, en términos energéticos, se ha propuesto que la endotermia sólo representaría una ventaja adaptativa en especies de tamaños corporales mayores a 1g, dado que para organismos más pequeños la elevada razón superficie-volumen implicaría una alta tasa de pérdida de calor y ello haría de la endotermia un proceso demasiado costoso (Heinrich 1993). Sin embargo, se ha reportado la ocurrencia de endotermia en especies de escarabeidos que, aunque no diminutas, son relativamente pequeñas (*C. colasi*: 0,27 g, Seymour *et al.* 2009; *C. caelestis*: 15x7 mm, Dieringer *et al.* 1998), y ha sido demostrada en *C. signaticollis* (<0,5 g) en el presente trabajo. Hoy en día no se cuenta con datos metabólicos que permitan realizar una estimación del costo energético del proceso de endotermia en esta especie. Futuros estudios que provean esta información podrán dar más indicios sobre las ventajas y desventajas que este proceso representa para esta especie. Mientras que otros escarabeidos están estrechamente asociados con flores generadoras de calor, típicamente en regiones tropicales y subtropicales, y ahorran energía obteniendo calor partir de dicha asociación (Seymour *et al.* 2003, 2009, Seymour y Schultze-Motel 1997), no se conoce que *C. signaticollis*, una especie de regiones templadas, tenga la habilidad de explotar ventajas similares.

En insectos, la temperatura puede modificar tanto el desarrollo de comportamientos particulares como la forma en que dichos comportamientos son llevados a cabo (Abram *et al.* 2016).

Ciertas actividades requieren que la temperatura del cuerpo, o de la parte del cuerpo directamente involucrada en la actividad, alcance valores particulares. Por ejemplo, en diversos taxa entre los insectos, incluyendo miembros de grupos tan diversos como Odonata e Hymenoptera, es común observar el comportamiento de “tiriteo” (“shivering” por su vocablo en inglés) previo al vuelo, un mecanismo que permite alcanzar valores de temperatura corporal que permiten la iniciación del vuelo (Heinrich 1996, Lahondère y Lazzari 2015). Dichos valores de temperatura maximizan el rendimiento muscular bajo ciertas condiciones ambientales, como por ejemplo en invierno (Krogh y Zeuthen 1941, Stevenson y Josephson 1990, Lehmann 1999). Cuando las condiciones de temperatura externa son variables (*i.e.*, la temperatura disminuye), los insectos deben ajustarse de modo de poder sobrellevar dichas variaciones y continuar el desarrollo de sus actividades. En estas situaciones, el incremento de la temperatura corporal podría ocurrir a través de dos posibles mecanismos: a) invirtiendo tanta energía como fuere necesaria para asegurarse alcanzar valores de temperatura particulares, o b) invirtiendo solamente cantidades de energía predeterminadas y alcanzar con ellas la máxima temperatura posible para dicha inversión. En insectos que se alimentan activamente y que pueden contar con fuentes de alimento constantes, dado que sus reservas energéticas pueden ser constantemente reaprovisionadas, se espera que los individuos adopten la primera estrategia. Un buen ejemplo de insectos que utilizan esta estrategia son las abejas, quienes mantienen su temperatura corporal constante independientemente de la temperatura ambiente, utilizando tantas reservas energéticas como sea necesario (Heinrich 1996). De manera similar, cuando las polillas de la especie *Deilephila nerii* L. 1758 se encuentran expuestas a menores temperaturas, invierten más tiempo y energía en el comportamiento de tiriteo previo al vuelo tal de alcanzar la temperatura corporal umbral que les permite volar (Dorsett 1962). Por el contrario, se espera que insectos cuya vida depende de alimento bajo en contenido calórico o que no se alimentan durante su estado adulto, o bien eviten llevar a cabo su actividad o bien adopten la segunda estrategia. En estos insectos el suministro de energía se encuentra limitado a las reservas energéticas que han obtenido durante estados anteriores del desarrollo, y la utilización de dichas reservas se relaciona de manera inversa con su supervivencia (Chown y Nicolson 2004). En consecuencia, cuando enfrentan temperaturas ambientales menores que requieren inversiones de energía más elevadas, estos insectos que no se alimentan se ven confrontados con el dilema de alcanzar la temperatura corporal necesaria para llevar a cabo una actividad específica siendo que ello reduciría su expectativa de vida. En este trabajo se halló que los adultos *C. signaticollis* parecen invertir más energía en la producción de calor cuando son sometidos a bajas temperaturas, aún cuando se ha indicado que aparentemente no se alimentan y sólo dependerían de las reservas adquiridas durante la etapa larval para su supervivencia (Carne 1957, López *et al.* 1994). Dado este

resultado, se hipotetiza en este trabajo que la endotermia podría constituir un proceso esencial en esta especie, que podría estar asociado con actividades que impactan el *fitness* de los individuos. Por ejemplo, si la probabilidad de apareamiento incrementara con la dispersión y si la capacidad para llevar a cabo los vuelos de dispersión depende del aumento de la temperatura corporal, la inversión de grandes cantidades de energía en elevar la temperatura corporal podrían resultar adaptativos incluso cuando implicarían reducir la esperanza de vida del insecto. Estudios previos no han encontrado evidencia de que los adultos de esta especie se alimenten. Con el fin de poner a prueba estas observaciones, se llevaron a cabo experimentos preliminares en el laboratorio (P. Zermoglio datos preliminares), ofreciendo a escarabajos adultos, hambreados desde la emergencia, diferentes elementos nutritivos (*e.g.*, polen, soluciones de sacarosa y miel). Los escarabajos nunca se alimentaron de tales dietas. No obstante, para descartar completamente la alimentación en adultos de esta especie, se requerirían estudios en los que se analice el contenido del tracto digestivo de animales silvestres.

Uno de los objetivos de este capítulo fue determinar si ocurrencia de endotermia en *C. signaticollis* juega un rol en el contexto reproductivo de esta especie. La lógica detrás los experimentos que fueron llevados a cabo fue que el incremento de la temperatura corporal previo a la cópula podría representar una ventaja para los individuos en al menos dos formas diferentes. Por un lado, como se ha visto en otros insectos, el aumento de temperatura corporal podría incrementar la tasa de volatilización de feromonas (Liu y Haynes 1994). Una mayor volatilización de feromonas podría evidenciar más fuertemente la presencia de los individuos ante aquellos del sexo opuesto, incrementando así la probabilidad de la ocurrencia de la cópula. En segundo lugar, un aumento de la temperatura corporal podría reducir la duración del evento de cópula y de la transferencia de esperma (Katsuki y Miyatake 2009). Estos acortamientos temporales del evento reproductivo podrían a su vez aumentar las probabilidades de los machos de aparearse con un número mayor de hembras. En los experimentos presentados en este trabajo se observó que individuos de ambos sexos llevaron a cabo eventos de endotermia, independientemente de la identidad sexual del individuo al cual se expusieron. Por consiguiente, estos resultados no apoyarían la hipótesis de que machos o hembras desarrollan endotermia de modo específico en el contexto de la reproducción. Sin embargo, estos resultados no permiten descartar que el proceso de endotermia pueda jugar un rol en las actividades reproductivas al menos de un modo indirecto. Por ejemplo, se conoce a partir de observaciones de campo que los adultos se reúnen en grupos de gran cantidad de individuos, dentro de los cuales ocurre la cópula. Existe por tanto la posibilidad de que la endotermia constituya un proceso promotor de dicho agrupamiento y por ende fomenta de modo indirecto la reproducción. Para poner a prueba esta hipótesis, y comprender mejor la relación entre la

endotermia y la reproducción en esta especie, sería necesario investigar si los individuos que desarrollan mayores niveles de endotermia presentan mayores tasas de éxito reproductivo.

El proceso de endotermia dentro del género *Cyclocephala* ha sido previamente demostrado sólo en especies de ambientes tropicales, en particular asociadas con plantas termogénicas (Cramer *et al.* 1975, Gottsberger 1988, Seymour y Matthews 2006). En este capítulo de la Tesis se presenta evidencia experimental que indica que la ocurrencia de endotermia es también posible en especies de ambientes templados que no presentan asociaciones evidentes con fuentes externas de calor. En este sentido, este trabajo constituye la contraparte y complemento de dichos estudios, y sugiere que la ocurrencia de endotermia podría ser un proceso general en el grupo. La termogénesis en plantas ha sido descrita en numerosas especies pertenecientes a distintas familias (*e.g.*, Araceae - lirios, Nymphaeaceae - lirios acuáticos, Magnoliaceae, entre otras; Thien *et al.* 2000). La producción de calor en estas plantas se encuentra en general limitada espacialmente a las flores, y el proceso de termogénesis ha sido asociado a estrategias reproductivas, dado que incrementa la volatilización de compuestos atractores de polinizadores y a su vez les ofrece el calor como recompensa (Seymour y Matthews 2006, Seymour *et al.* 2003). La asociación entre coleópteros polinizadores y las plantas termogénicas es bien conocida, y se estima que data del período Cretácico medio-tardío (Gottsberger 1988). En particular, muchas de las especies de coleópteros que presentan esta asociación pertenecen al género *Cyclocephala* (Moore y Jameson 2013). Algunos ejemplos de estas asociaciones son: *Victoria amazonica* (Poepp.) J.C. Sowerby (Nymphaeaceae), polinizada por *C. hardyi* Endrodi 1975 y por *C. verticalis* Burmeister 1847 (Cramer *et al.* 1975, Seymour y Matthews 2006), *Nymphaea jamesoniana* Planchon 1852 y *N. rudgeana* G. Mey. (Nymphaeaceae) polinizadas por *C. castanea* Olivier 1789 y *C. verticalis* (Cramer *et al.* 1975), así como también varias especies del género *Annona* L. (Magnoliaceae), las cuales son visitadas por *C. inpunctata*, *C. atricapilla* Mannerheim 1829 y *C. shausiana* (Gottsberger 1988). En América del Sur, la distribución de las familias de plantas termogénicas está mayormente limitada a las región septentrional, de climas tropical y subtropical. En la Región Pampeana, donde habita *C. signaticollis*, las plantas termogénicas sólo se encuentran ocasionalmente y en general asociadas con intrusiones de otros tipos de hábitat en zonas marginales (Cabrera 1971). No puede descartarse que *C. signaticollis* tuviera en el pasado una asociación con plantas termogénicas y que su distribución estuviera más restringida a las áreas en las que se encuentran dichas plantas. Sin embargo, con el avance de la agricultura en la región, la creciente disponibilidad de alimento para las larvas podría haber jugado un rol fundamental como agente selectivo, extendiendo su distribución hasta los patrones que se observan hoy en día. En este contexto, la asociación con plantas termogénicas podría constituir un carácter ancestral del linaje, que podría haberse perdido en la mayoría de las poblaciones de la especie, en favor de la obtención

de alimento más abundante para los estados inmaduros. El carácter ancestral del proceso de endotermia debe ser aún investigado. Si bien existen datos filogenéticos sobre el género *Cyclocephala* (Clark 2011, Moore y Jameson 2013), ninguno de estos estudios ha incluido a *C. signaticollis* en los análisis. Se espera que futuros estudios que incluyan a esta especie y la posicionen dentro del género puedan revelar las relaciones que presentan ciertos comportamientos dentro del grupo, tales como la producción de calor endógeno. Desde un punto de vista evolutivo, para poder comprender de modo más cabal los roles ancestral y contemporáneo de la endotermia en esta especie, deberían posiblemente considerarse tanto factores naturales como antrópicos.

Desde un punto de vista ecológico, la generación de calor endógeno podría jugar un rol no sólo en cuanto al desempeño de los organismos que la llevan a cabo y a las relaciones intraespecíficas que se establecen entre individuos, sino también en su interacción con otras especies, en particular con depredadores y parásitos. La generación de calor podría mediar interacciones interespecíficas a través de dos posibles mecanismos, uno directo y otro indirecto. El primero consiste en la detección directa de una fuente de calor. Esta capacidad es bien conocida en insectos hematófagos, los cuales utilizan el calor generado por sus hospedadores vertebrados como clave para orientarse hacia ellos y obtener alimento. Los insectos triatominos, por ejemplo, presentan la mayor sensibilidad térmica conocida hasta el momento entre los animales, son capaces de detectar radiación infrarroja, de evaluar la temperatura de fuentes distantes y de responder de manera específica a objetos cuya temperatura es similar a la de sus hospedadores si la temperatura del entorno es inferior (Fresquet y Lazzari 2011, Lazzari 2009, Lazzari y Núñez 1989, Schmitz *et al.* 2000). En estos insectos se han identificado receptores térmicos antenales (Insausti *et al.* 1999, Lazzari y Wicklein 1994, Zopf *et al.* 2014a, b) cuyas funciones se han establecido en el contexto de detección del hospedador así como también en otros comportamientos (Ferreira *et al.* 2007, Lorenzo Figueiras *et al.* 2013, Schilman y Lazzari 2004, Vinauger *et al.* 2013). Asimismo, se han reconocido en estos insectos receptores del tipo TRP ("*transient receptor potential*", por su sigla en inglés) y establecido su función como moduladores de la percepción térmica (Zermoglio *et al.* 2015). Por su parte, diversos estudios en mosquitos han mostrado que estos insectos son capaces de orientarse hacia fuentes de calor en el rango de temperaturas de sus hospedadores, tanto en contextos en los cuales el calor es la única señal disponible (Howlett 1910, Peterson y Brown 1951, Thomson 1938, Zermoglio *et al.* 2017), como en contextos de señales multimodales (Healy *et al.* 2002, Olanga *et al.* 2010, Spitzen *et al.* 2013, McMeniman *et al.* 2014, van Breugel *et al.* 2015). A su vez, se han reconocido termosensilias y receptores térmicos antenales en algunas especies (Davis y Sokolove 1975, McIver y Siemicki 1979, Boo 1980), así como también se han identificado genes TRP relacionados con la percepción térmica (Bohbot *et al.* 2014, Corfas y Vosshall 2015, Wang *et al.*

2009). Sin embargo, la capacidad de detectar fuentes de calor no es exclusiva de los hematófagos. Así como se ha reportado que algunas culebras son capaces de utilizar detección infrarroja en la búsqueda de sus presas (Bullock y Cowles 1952), entre los insectos existen también otros ejemplos de este tipo de detección en especies no hematófagas, no relacionadas con el contexto alimentario. En particular, los coleópteros bupréstidos del género *Melanophila* Eschscholtz 1829 utilizan receptores infrarrojos en la detección a grandes distancias de incendios forestales, indicadores de áreas propicias para colonizar (Evans 1964, Schmitz y Bleckmann 1997).

Además de los modos directos en que la generación de calor interviene en la relación entre diferentes especies, la endotermia podría facilitar interacciones entre especies de forma indirecta. Como se ha mencionado anteriormente, los ritmos de endotermia, acoplados a los ritmos de actividad, podrían por un lado incrementar la tasa de volatilización de señales químicas (Liu y Haynes 1994) y, por otro lado, afectar los patrones de agrupamiento de los individuos. Dichos patrones de agrupamiento podrían a su vez determinar que señales y claves de distinta naturaleza, como ser las químicas, se concentren en el ambiente, aumentando las probabilidades de ser detectadas por otros organismos, depredadores y parasitoides. Entre las señales químicas, existen numerosos estudios acerca de la producción y el efecto de feromonas sexuales y de agregación en escarabeidos, especialmente en las subfamilias que contienen miembros de importancia económica: Cetoniinae, Melolonthinae, Dynastinae y Rutelinae (Leal 2000, Rogers y Potter 2002). En particular, en seis especies del género *Cyclocephala* varios compuestos han sido descritos como feromonas (El-Sayed 2003-2016).

En el caso particular de *C. signaticollis*, y en lo que concierne a esta Tesis, la interacción de interés es aquella que se establece entre el adulto del coleóptero y el adulto de su parasitoide, *M. ruficauda*. Dado que ambos organismos no coinciden temporalmente en cuanto a sus períodos de actividad diaria (*i.e.*, los adultos de *C. signaticollis* son nocturnos, mientras que los adultos de *M. ruficauda* son de hábitos diurnos), se espera que el parasitoide no sea capaz de utilizar el calor generado por el hospedador como una clave directa de su presencia. Por el contrario, no puede descartarse que la endotermia cumpla un rol indirecto a través de la facilitación del agrupamiento de hospedadores y la concentración de claves químicas en el ambiente que pudieran ser detectadas por el parasitoide adulto. Para que este mecanismo sea plausible, deberían cumplirse dos condiciones. En primera instancia, las claves deberían persistir en el ambiente desde que son producidas, durante la noche, hasta al menos el día siguiente, momento en el cual el parasitoide adulto se encuentra activo. En los insectos muchas feromonas, en particular sexuales y de agregación, están conformadas por compuestos de bajo peso molecular y son altamente volátiles (Wyatt 2014). Sin embargo, se ha demostrado que muchas otras, incluidas algunas feromonas

sexuales, pueden permanecer en el ambiente durante períodos de tiempo prolongados (Howse *et al.* 1998). Por ejemplo, se ha observado en algunos coleópteros y dípteros que feromonas disuasorias de la oviposición pueden permanecer en el ambiente durante varios días (Hemptinne *et al.* 2001, Averill y Prokopy 1987), mientras que en lepidópteros la permanencia de compuestos equivalentes puede alcanzar varias semanas (Schoonhoven *et al.* 1981). Se ha demostrado también que feromonas de rastreo y marcado de territorio en hormigas pueden perdurar en el ambiente por períodos que abarcan desde algunos días hasta varios meses, pudiendo tener efectos no sólo sobre coespecíficos, capaces de encontrar y seguir los rastros de feromonas, sino también sobre potenciales presas que los evitan (Jackson *et al.* 2006, Offenberg *et al.* 2004). En cuanto a feromonas sexuales, se ha reportado asimismo en otros artrópodos que estos compuestos pueden persistir en el medio durante muchos días (Costa *et al.* 2015). A partir de estos antecedentes, si bien no se conoce hasta el momento la composición de las distintas feromonas en *C. signaticollis*, resultaría plausible que alguna de ellas pudiera persistir en el ambiente durante algunas horas y estar entonces disponible como clave para otros organismos. No obstante, y en segundo término, para que el mecanismo de detección del hospedador sea efectivo, el parasitoide debería contar con los receptores adecuados para detectar los compuestos emitidos por el hospedador y ser capaz de asociar dichos compuestos con la presencia del hospedador en el ambiente. Actualmente no se cuenta con la identificación de los componentes que conforman las señales químicas del hospedador, así como tampoco se han caracterizado los comportamientos asociados a su producción y detección. De esta forma, para dilucidar los mecanismos de detección del hospedador en *M. ruficauda* se requerirían estudios que exploren la producción de feromonas en *C. signaticollis* y que investiguen la capacidad de detección de las hembras del parasitoide, en particular identificando receptores antenales capaces de detectar dichas sustancias. Se ha visto que las antenas de los parasitoides adultos poseen una gran cantidad de estructuras quimiorreceptoras de dos tipos principales, sensilias basicónicas y sensilias en foqueta, que serían capaces de detectar compuestos volátiles a grandes distancias, y se ha sugerido que podrían ser utilizadas en la detección de claves químicas del hospedador (Groba *et al.* 2014). No obstante, aún resta establecer la identidad de los compuestos que son capaces de reconocer y poner a prueba experimentalmente si dichos receptores pueden ser efectivamente utilizados en el proceso de localización del hábitat del hospedador. Una vez dilucidados dichos tópicos, y estudiado el efecto de la temperatura sobre la volatilización de las claves en *C. signaticollis*, podría comprenderse si la endotermia podría intervenir en la interacción de esta especie con su especie parasitoide.

La endotermia constituye un proceso que durante muchas décadas se consideró exclusivo de los animales homeotermos. La endotermia facultativa, aunque reconocida durante algunos años,

sólo comenzó a cobrar interés entre los científicos una vez que pudieron descifrarse algunas de las ventajas adaptativas a las que está asociada. La endotermia en todas sus formas representa un alto costo energético para quien la lleva a cabo, y por ende se espera que mantener una temperatura corporal elevada tenga como consecuencia un aumento del *fitness* de los individuos. Las ventajas que presenta la endotermia en los insectos son de variada naturaleza, e incluyen desde brindar la capacidad de volar en condiciones extremas de temperatura ambiente hasta competir por recursos y parejas y, en insectos sociales, mantener la temperatura de las colonias constante asegurando el correcto desarrollo de las crías (Heinrich 1993).

En conclusión, en este capítulo de la Tesis se investigó la ocurrencia de endotermia en *C. signaticollis*, caracterizando el proceso y explorando los efectos potenciales que podría presentar tanto en un contexto intra- como interespecífico. Esta especie presenta dos características particulares: por un lado, no se encuentra asociada con fuentes externas de calor, y por otra parte, no contaría con recursos nutricionales provenientes de la alimentación durante el estado adulto. Estos dos rasgos, considerando especialmente el alto costo energético de elevar la temperatura corporal, posicionan la endotermia en esta especie como un proceso que se esperaría represente una ventaja adaptativa. Si bien los mecanismos fisiológicos subyacentes aún deben ser investigados, los resultados presentados en este trabajo indicarían que este proceso podría tener efectos en la historia de vida de la especie, así como también en sus interacciones con otros organismos.

CAPÍTULO 7

Discusión general

Para los parasitoides el hospedador es la unidad de recurso fundamental que permite su desarrollo, y como tal, su encuentro y selección será determinante en el *fitness* del parasitoide. Se espera entonces que en los parasitoides los mecanismos eficientes de búsqueda y la capacidad de discriminar entre hospedadores de distinta calidad sean positivamente seleccionados. La calidad de una unidad de recurso, sin embargo, no debe considerarse una característica estática, sino un concepto relativo. La calidad de un recurso es un atributo que es percibido por quien utiliza el recurso dependiendo de sus estrategias de vida y de factores externos e internos al individuo en un momento dado. Entre los factores externos que influyen sobre la percepción de la calidad de recurso se cuentan las condiciones ambientales, la disponibilidad de las unidades de recurso y la presencia de competidores. Los factores internos, en cambio, contemplan la condición fisiológica del individuo, su edad y su expectativa de vida.

En *M. ruficauda* la búsqueda del hospedador es compartida entre la hembra adulta, quien selecciona el hábitat donde oviponer, y las larvas de estadio II, quienes se orientan activamente y atacan al hospedador. En este sistema existe un marcado desfase temporal entre la aparición de las primeras larvas parasitoides y el hospedador. Ello implica que las larvas tempranas deben esperar al hospedador en el ambiente por un período de tiempo prolongado, a expensas de sus propias reservas energéticas. Entre los parasitoides existen algunos mecanismos que les permiten sobrellevar corrimientos temporales en los ciclos de vida, en particular, mediante asignación y uso diferencial de los recursos nutricionales. En esta Tesis se estudió en primera instancia la asignación de recursos a los huevos por parte de las hembras de *M. ruficauda*. Se encontró que las hembras destinan igual cantidad de recursos, en cuanto a número de huevos por desove y cantidades de nutrientes por huevo, a principio y al final de la temporada reproductiva. Este resultado implica que las hembras no contarían con un mecanismo de asignación diferencial que pudiese contrarrestar el desfase temporal respecto a la aparición del hospedador. Siendo que las hembras no estarían interviniendo en la regulación del desfase, se evaluó si podrían ser las larvas quienes contasen con algún mecanismo de compensación. Los resultados de este trabajo mostraron que las larvas de principio y de fin de temporada utilizan los recursos energéticos de manera similar. Ello implica que tampoco habría una regulación nutricional del desfase temporal por parte de las larvas. Este hecho significa que las larvas nacidas al comienzo de la temporada reproductiva llegarían al encuentro con el hospedador con una condición fisiológica deteriorada en comparación con la de las larvas tardías. Dicho deterioro podría afectar a las larvas en cuanto a su desplazamiento, su capacidad de detección o aferramiento al hospedador, su capacidad de respuesta ante el sistema inmune del hospedador, o en cuanto a sus chances de sobrevivir frente a la competencia con otras larvas. Dado que para una larva parasitoide nacer tempranamente tendría consecuencias negativas en su éxito de parasitismo,

evolutivamente la inversión energética de las hembras al comienzo de la temporada en producir desoves no sería la estrategia reproductiva más eficiente. Sin embargo, el parasitismo de hospedadores de segundo estadio podría contrarrestar las consecuencias negativas de nacer tempranamente en la temporada, achicando el desfase del encuentro con el hospedador y asegurando el acceso a una posición de anclaje privilegiada, con la consiguiente mayor probabilidad de ganar la competencia frente a las larvas que colonizan al hospedador durante el tercer estadio. Es posible que los patrones de desfase que se observan sean el resultado de los procesos de evolución conjunta del parasitoide y el hospedador que contribuyen a la coexistencia del sistema.

La interpretación de los resultados discutidos anteriormente estuvieron basados en una premisa fundamental derivada de la literatura: las larvas de *M. ruficauda* no se alimentan hasta que se aferran al hospedador. Sin embargo, hasta ahora este supuesto de no alimentación sólo contaba con evidencia observacional. Siendo que la inversión materna y el uso de los recursos por parte de las larvas es similar al principio y al final de la temporada, y teniendo en cuenta lo que ello representa en cuanto a la condición fisiológica de las larvas tempranas, se consideró que las larvas podrían estar obteniendo nutrientes del sustrato durante el tiempo de espera del hospedador. Se estudió cómo afectan las características del sustrato a la muda y la supervivencia de las larvas parasitoides, y se encontró que el tipo de sustrato juega un rol importante en el desarrollo del primer estadio larval. Si bien no se descarta que las larvas podrían estar obteniendo oligoelementos del suelo, se confirmó experimentalmente que las larvas no requieren alimentarse para mudar al segundo estadio. Biológicamente, esto aún resulta un hecho intrigante. Podría sugerirse que el primer estadio constituya un agente dispersivo que aumentase la chance de encuentro del hospedador. Sin embargo, varios factores parecerían no apoyar esta hipótesis. En primer lugar, la duración del primer estadio es muy corta en comparación con el tiempo que la larva debe esperar al hospedador, particularmente en larvas tempranas. En este sentido, el primer estadio no sería muy eficaz en cuanto a dispersión comparado con el segundo estadio. En segundo lugar, si bien las larvas I cuentan con estructuras receptoras asociadas con el reconocimiento del hospedador no se orientan activamente hacia él. Por último, debe tenerse en cuenta que luego de la eclosión de los huevos las larvas se encuentran desprotegidas en el ambiente. Considerando todo lo anterior, y que las hembras son sinovigénicas extremas, producir una larva I que no acumula reservas por alimentación, no se orienta al hospedador y sufre una alta mortalidad, parecería ser, energéticamente, una paradoja biológica. Evolutivamente, la existencia de una larva de primer estadio que no se alimenta sigue siendo un interrogante a develar.

Las larvas de *M. ruficauda*, una vez que se aferran al hospedador, permanecen consumiéndolo hasta completar su desarrollo. Entonces, la calidad del hospedador atacado es de

importancia fundamental, debido a que para los parasitoides es necesaria una sola unidad de recurso durante toda su vida para completar su desarrollo. Dado que la unidad de recurso es única, se espera que la composición nutricional de un hospedador sea un factor indicador de calidad. En *M. ruficauda*, se esperaba que las larvas parasitaran con mayor frecuencia a hospedadores más ricos en nutrientes. Sin embargo, en este trabajo se observó que los atributos relacionados con la calidad nutricional del hospedador, como el peso corporal y la cantidad de nutrientes, no afectan la decisión de parasitar. En otras palabras, las larvas parasitoides atacan indistintamente a hospedadores con distintas cantidades de reservas. Estos resultados pueden interpretarse considerando las estrategias de vida del parasitoide y su ecología. Como koinobionte, *M. ruficauda* no detiene el desarrollo del hospedador, quien continúa alimentándose luego del evento de parasitismo y aumentando su masa corporal. Por otro lado, las larvas que no parasitan a un hospedador mueren. El no aceptar a un hospedador y continuar la búsqueda implica un gasto energético para las larvas y conlleva el riesgo de no encontrar un hospedador de mejor calidad e incluso morir sin llegar a parasitar. Estos dos factores son particularmente importantes en larvas nacidas más tempranamente, que ya han gastado parte de sus reservas energéticas, y que tienen posiblemente un estado fisiológico deteriorado. Por lo tanto, siendo que el hospedador continuará aumentando sus reservas, carecería de sentido evaluar a un hospedador por su peso actual al momento del encuentro, y podría resultar más ventajoso para las larvas asegurar la unidad de recurso y aumentar así su probabilidad de supervivencia.

Los patrones observados en casos de superparasitismo fueron similares a aquellos observados en casos de monoparasitismo. La calidad nutricional del hospedador no tiene influencia en la elección de hospedadores previamente parasitados. Se conoce que las larvas de *M. ruficauda* son capaces de discriminar entre hospedadores sanos y parasitados, y que prefieren a los primeros. Por tanto, son capaces de elegir hospedadores de mejor calidad, en cuanto al grado de parasitismo previo. El hecho de no discriminar hospedadores parasitados de distinta calidad nutricional puede estar relacionado con dos factores. El primero, que se menciona anteriormente, es que los hospedadores continuarán ganando peso corporal a lo largo del tiempo. El segundo factor tiene que ver con la tasa de consumo del hospedador. *Mallophora ruficauda* es un parasitoide solitario, pero desde el momento del ataque y durante todo el invierno, las larvas parasitoides consumen pocos recursos del hospedador y no aumentan apreciablemente su tamaño. Por el contrario, es recién cuando el hospedador ingresa al estado de prepupa que el parasitoide ganador acelera su desarrollo y muda a los siguientes estadios consumiendo rápidamente al hospedador. En este proceso el resto de las larvas competidoras mueren. En este sentido, contrariamente a lo que sucede en otros parasitoides que deben “repartir” los nutrientes disponibles entre todas las larvas que parasitan, en

M. ruficauda lo que estaría en juego en situaciones de competencia no sería la cantidad de nutrientes disponibles en el hospedador, sino la monopolización del hospedador como unidad de alimento.

La calidad de un recurso, como se mencionó más arriba, no es un atributo estático, sino que depende de factores internos y externos al individuo que consume ese recurso. Además, en el caso en que un único recurso es explotado durante un período prolongado, como es el caso de los hospedadores para los parasitoides, la calidad de un recurso puede variar en el tiempo. Por lo tanto, las características que hacen que un recurso sea de buena calidad pueden estar relacionadas con la potencialidad del recurso, y no con sus características inmediatas. En este sentido, en los sistemas parasitoide-hospedador, resultaría ventajoso que el parasitoide pudiera elegir a los hospedadores utilizando indicadores de su calidad futura. En este trabajo se exploraron los patrones de parasitismo a campo y se encontró que son diferentes dependiendo del sexo de los hospedadores. Siendo que las hembras son más pesadas que los machos, el sexo podría constituir un indicador inmediato e indirecto de calidad, pero considerando que la acumulación de nutrientes en hembras y machos puede ser diferente, el sexo podría además ser un indicador de calidad futura. Sin duda, para comprender mejor cómo incide este tipo de atributo en la elección de los hospedadores, deberían investigarse aspectos específicos de la producción y detección de claves feromonales por parte del hospedador y el parasitoide, respectivamente.

Como se mencionó al comienzo, tanto la selección de los hospedadores como la búsqueda previa son etapas importantes en la determinación del éxito de los parasitoides. En *M. ruficauda* la hembra adulta lleva a cabo parte de la búsqueda, en particular seleccionando los sitios de oviposición. Sin embargo, las claves que utiliza para detectar el hábitat del hospedador no se conocen hasta el momento. El proceso de búsqueda de la hembra también sufre los desfases derivados de las diferencias en los ciclos de vida del parasitoide y el hospedador. En particular, las hembras son diurnas y el hospedador adulto, con quien coexiste temporalmente al comienzo de la temporada reproductiva, es nocturno. De esta forma, se espera que la detección del hábitat de los hospedadores esté basada en claves de los hospedadores que persistan en el ambiente por un tiempo suficiente como para ser detectadas. Para que ello suceda, debería observarse algún comportamiento en los hospedadores que influyera en la concentración de las claves, como ser el agrupamiento de los individuos. En esta Tesis se estudió la ocurrencia de endotermia como proceso relacionado a dicho agrupamiento. Se encontró que los hospedadores adultos de ambos sexos producen calor endógeno de manera cíclica diaria en concordancia con sus ciclos de actividad. La producción de calor podría estar relacionada con la capacidad de dispersión y con la búsqueda de pareja, y por ende se sugiere que podría contribuir al agrupamiento de los individuos. En el contexto

de la interacción entre el parasitoide y el hospedador, la producción de calor del hospedador no sería una clave directa para el parasitoide, pero facilitaría el agrupamiento de los hospedadores y podría contribuir de modo indirecto a su detección a través de la concentración de claves químicas en el ambiente.

Mallophora ruficauda es un parasitoide cuyo ciclo y estrategias de vida presentan una serie de particularidades, que resultan en que las teorías clásicas de localización y utilización de recursos en parasitoides, desarrolladas en base a himenópteros, no puedan ser aplicadas de modo directo para explicar los patrones fisiológicos y comportamentales observados en esta especie. En esta Tesis se han presentado resultados (resumidos en la Figura 7.1) que aportan elementos para comprender mejor los patrones observados en este sistema parasitoide-hospedador en particular, pero que también constituyen una importante contribución al conocimiento general de la fisiología y el comportamiento de los sistemas conformados por parasitoides dípteros y sus hospedadores.

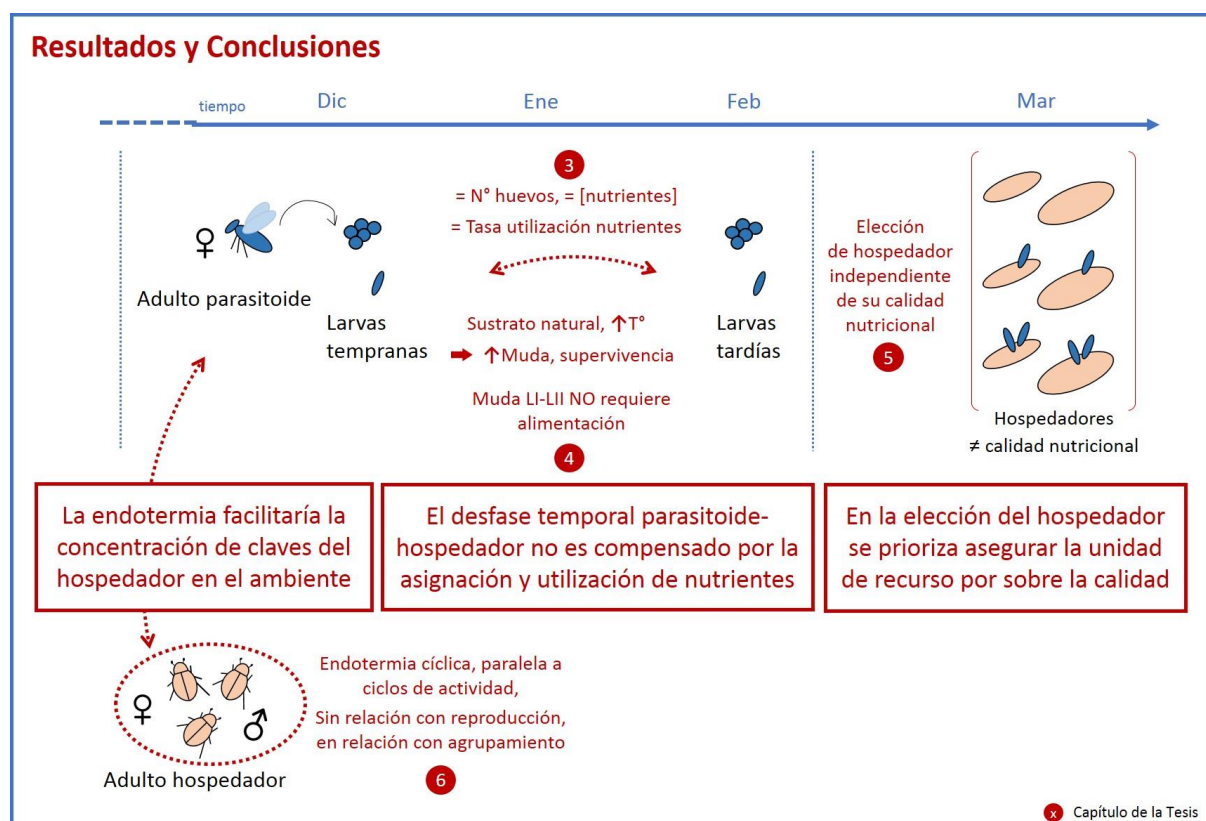


Figura 7.1. Resumen gráfico de los resultados y conclusiones derivados de este trabajo de Tesis.

CAPÍTULO 8

Bibliografía

- Abram PK, Boivin G, Moiroux J, Brodeur J. 2016. Behavioural effects of temperature on ectothermic animals: unifying thermal physiology and behavioural plasticity. *Biological Reviews*; doi: 10.1111/brv.12312.
- Albuquerque LSC, Grossi PC, Iannuzzi L. 2016. Flight patterns and sex ratio of beetles of the subfamily Dynastinae (Coleoptera, Melolonthidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 60(3): 248-254.
- Aldrich JR. 1995. Chemical communication in the true bugs and parasitoid exploitation. pp. 318-363 in Cardé RG, Bell WJ (Eds) *Chemical Ecology of Insect* 2. New York, USA, Chapman & Hall.
- Alvarado L. 1980. Sistemática y bionomía de los estados inmaduros de coleópteros Scarabaeidae que habitan en el suelo. Tesis doctoral. Universidad de La Plata, La Plata, Argentina. 199 pp.
- 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.
- Aragón R, Jobbágy EG, Viglizzo EF. 2011. Surface and groundwater dynamics in the sedimentary plains of the Western Pampas (Argentina). *Ecohydrology*, 4(3): 433-447. doi: 10.1002/eco.149.
- Arrese EL, Soulages JL. 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55(1): 207-225.
- Artigas JN, Angulo AO. 1980. Revisión del género *Mallophora* Macquart por sistemática alfa y taxonomía numérica (Diptera-Asilidae). *Gayana Zoologia* 43: 5-182.
- Artigas JN, Reyes E. 1977. Estudio por taxonomía numérica de las spermathecae en el género *Mallophora* y sus relaciones filogenéticas. *Boletín da Sociedad Biología de Concepción*, 51: 51-58.
- Askew RR, Shaw MR. 1986. Parasitoid communities. Their size, structure and development. In: Waage JK., Greathead D. Eds. *Insect Parasitoids*. Academic Press. London, UK. Pp. 225-64.
- Averill AL, Prokopy RJ. 1987. Residual activity of oviposition-detering pheromone in *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) and female response to infested fruit. *J. Chem. Ecol.* 13(1): 167-177.
- Ayres MP, MacLean SF Jr. 1987. Molt as a component of insect development: *Galerucella sagittariae* (Chrysomelidae) and *Epirrita autumnata* (Geometridae). *Oikos* 48: 273-279.
- Barbercheck ME, Kaya HK. 1991. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environ. Entomol.* 20 (2): 582-589. doi: 10.1093/ee/20.2.582.
- Bahrndorff S, Marien J, Loeschcke V, Ellers J. 2009. Dynamics of heat-induced thermal stress resistance and Hsp70 expression in the springtail, *Orchesella cincta*. *Func. Ecol.* 23: 233-239.
- Barraclough EI, Burgess EPJ, Kean AM, Malone LA. 2014. Growth and development in a lepidopteran with variable instar number, *Pseudocoremia suavis* (Geometridae), under standard rearing conditions and when parasitised by *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). *Eur. J. Entomol.* 111(4): 501-511. doi: 10.14411/eje.2014.062.
- Barrantes ME. 2009. Influencia de la especie de hospedador sobre la fisiología y comportamiento de las larvas del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 57 pp.

- Barrantes ME. 2015. Influencia de la calidad del hospedador y de la competencia por recursos energéticos durante la ontogenia sobre el estado fisiológico y el éxito reproductivo del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 159 pp.
- Barrantes ME, Castelo MK. 2014. Host specificity in the host-seeking larva of the dipteran parasitoid *Mallophora ruficauda* and the influence of age on parasitism decisions. Bull. Entomol. Res. 104: 295-306.
- Bartholomew GA, Casey TM. 1977a. Body temperature and oxygen consumption during rest and activity in relation to body size in some tropical beetles. J. Therm. Biol. 2: 173-76.
- Bartholomew GA, Casey TM. 1977b. Endothermy during terrestrial activity in large beetles. Science 195: 882-883.
- Bartholomew GA, Heinrich B. 1978. Endothermy in African dung beetles during flight, ball making, and ball rolling. J. Exp. Biol. 73: 65-83.
- Bazzocchi GG, Lanzoni A, Burgio G, Fiacconi MR. 2003. Effects of temperature and host on the pre-imaginal development of the parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae). Biological Control 26: 74-82.
- Beament JWL. 1961. The water relations of insect cuticle. Biol. Rev. 36: 281-320. doi:10.1111/j.1469-185X.1961.tb01291.x.
- Berg CO. 1964. Snail control in trematode diseases: the possible value of sciomyzid larvae, snail-killing Diptera. En Dawes, B. Eds. Advances in parasitology, vol. 2. Pp. 259-309. Academic Press. New York, United States.
- Berg CO, Foote BA, Neff SE. 1959. Evolution of the predator prey relationships in snail-killing sciomyzid larvae. Bull. Am. Malac. Un. 25: 10-11.
- Bernhardt P. 2000. Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. Plant Sys. Evol. 222: 293-320.
- Bernstein C, Jervis M. 2008. Food-searching in parasitoids: the dilemma of choosing between immediate or future fitness gains. En Wajnberg E, Bernstein C, van Alphen J. (eds). 2008. Behavioral ecology of insect parasitoids: from theoretical approaches to field applications. Blackwell Pub. Malden, Massachusetts, United States. 445 pp.
- Berrigan D, Lighton JRB. 1993. Bioenergetic and kinematic consequences of limblessness in larval Diptera. J. Exp. Biol. 179: 245-259.
- Bezemer TM, Harvey JA, Mills NJ. 2005. Influence of adult nutrition on the relationship between body size and reproductive parameters in a parasitoid wasp. Ecol. Entomol. 30(5): 571-580.
- Blengino C. 2013. Sector Apícola 2013 - Informe anual de coyuntura N° 3. Consultado a través de: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/otros/apicola/informes/2013_02Feb.pdf
- Boggs CL. 1981. Nutritional and life-history determinants of resource allocation in holometabolous insects. Am. Nat. 117(5): 692-709.

- Boggs CL. 2009. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Func. Ecol.* 23(1): 27-37.
- Boggs CL, Freeman KD. 2005. Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia.* 144: 353-361.
- Bohbot JD, Sparks JT, Dickens JC. 2014. The maxillary palp of *Aedes aegypti*, a model of multisensory integration. *Insect Biochemi. Mol. Biol.* 48: 29-39.
- Boo KS. 1980. Antennal sensory receptors of the male mosquito *Anopheles stephensi*. *Z. Parasitenkd.* 61: 249-264.
- Briegel H. 1990a. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of Malaria. *J. Med. Entomol.* 27(5): 839-850.
- Briegel H. 1990b. Metabolic relationship between female body size, reserves and fecundity of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 36(3): 165-172.
- Briggs CJ, Hoopes MF. 2004. Stabilizing effects in spatial parasitoid-host and predator-prey models: a review. *Theoretical Population Biology* 65: 299-315.
- Brobyn PJ, Clark SJ, Wilding N. 1988. The effect of fungus infection of *Metopolophium dirhodum* [Hom.: Aphididae] on the oviposition behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphii* [Hym.: Aphidiidae]. *Entomophaga* 33(3): 333-338.
- Brockhurst MA, Chapman T, King KC, Mank JE, Paterson S, Hurst GDD. 2014. Running with the Red Queen: the role of biotic conflicts in evolution. *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 281: 2014382.
- Brodeur J, Boivin G. 2004. Functional ecology of immature parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 27-49.
- Brown JS. 2000. Foraging ecology of animals in response to heterogeneous environments. In: *The Ecological Consequences of Environmental Heterogeneity*, Chapter 10. Hutchings J, Stewart A. Eds. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 181-215.
- Brown JH, West GB. Eds. 2000. *Scaling in biology*. Oxford Univ. Press.
- Brown BV, Borkent A, Cumming JM, Wood DM, Woodley NE, Zumbado M. eds. 2010. *Manual of Central American Diptera*, Volume 1. NRC Research Press. Ottawa, Canada. 714pp.
- Bullock TH, Cowles RB. 1952. Physiology of an infrared receptor-the facial pit of pit vipers. *Science*, 115: 541-543.
- Bybee SM, Taylor SD, Nelson CR, Whiting MF. 2004. A phylogeny of robber flies (Diptera: Asilidae) at the subfamilial level: molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 789-797.
- Cabrera AL. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 14 (1-2): 50 pp.
- Calder WA. 2001. Ecological consequences of body size. In *eLS*, (Ed.). doi:10.1038/npg.els.0003208.
- Carmona DM, Vincini AM, López AN, Álvarez Castillo HA, Manetti PL. 1994. Cambios estacionales en la comunidad de 'insectos del suelo' en el cultivo de papa en el sudeste bonaerense. *Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA, Estación Experimental Agropecuaria, Balcarce. Boletín Técnico*, 126, 15 pp.
- Carne PB. 1957. *Cyclocephala signaticollis* Burmeister, an introduced pasture scarab (Coleoptera). *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* 81: 217-221.

- Carrasco N, Báez A, Belmonte ML. 2005. Trigo - Manual de campo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Red de Información Agropecuaria Nacional (RIAP).
- Casas J, Driessen G, Mandon N, Wielaard S, Desouhant E, Van Alphen J, Lapchin L, Rivero A, Christides JP, Bernstein C. 2003. Energy dynamics in a parasitoid foraging in the wild. *J. Anim. Ecol.* 72: 691-607.
- Casas J, Pincebourde S, Mandon N, Vannier F, Poujol R, Giron D. 2005. Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology*, 86: 545-554.
- Castelo MK. 2002. Moscardón cazador de abejas, *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Algunas consideraciones sobre su presencia en los apiarios. *Ciencia Apícola*, 1(1): 10-18.
- Castelo MK. 2003. Comportamiento de localización y patrones de explotación de hospedadores (Coleoptera: Scarabaeidae) por el moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 169 pp.
- Castelo MK, Capurro AF. 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 MK, Corley JC. 2004a. Oviposition behaviour in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *An. Entomological Soc. of America*, 97(5): 1050-1054.
- Castelo MK, Corley JC. 2010. Spatial density dependent parasitism and specificity in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Austral Ecology* 35: 72-81.
- Castelo MK, Crespo JE. 2012. Incidence of non-immunological defenses of soil white grubs on parasitism success of *Mallophora ruficauda* larva (Diptera: Asilidae). *Insects* 3: 692-708.
- Castelo MK, Lazzari CR. 2004. Host-seeking behavior in larvae of the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *J. Insect Physiol.* 50(4): 331-336.
- Castelo MK, Ney-Nifle M, Corley JC, Bernstein C. 2006. Oviposition height increases parasitism success by the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61: 231-243.
- Chappell MA. 1984. Thermoregulation and energetics of the green fig beetle (*Cotinus texana*) during flight and foraging behavior. *Physiol. Zool.* 57: 581-589.
- Chapman RF. 1998. *The Insects: Structure and Function*, fourth ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 770 pp.
- Chen C-P, Denlinger DL, Lee RE Jr. 1987. Responses of non diapausing Flesh Flies (Diptera: Sarcophagidae) to low rearing temperatures: developmental rate, cold tolerance, and glycerol concentrations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 80(6): 790-796.
- Chen H, Li Z, Bu SH, Tian ZQ. 2011. Flight of the Chinese white pine beetle (Coleoptera: Scolytidae) in relation to sex, body weight and energy reserve. *Bull. Entomol. Res.* 101: 53-62.
- Chesson PL, Murdoch WW. 1986. Aggregation of risk: relationships among host-parasitoid models. *Am. Nat.* 127(5): 696-715.
- Chesson PL, Rosenzweig M. 1991. Behavior, heterogeneity, and the dynamics of interacting species. *Ecology* 72(4): 1187-1195.

- Chown SL, Nicolson SW. 2004. Insect physiological ecology: mechanisms and patterns. Oxford University Press. New York.
- Chown SL, Scholtz CH. 1993. Temperature regulation in the nocturnal melolonthine *Sparrmannia flava*. J. Therm. Biol. 18: 25-33.
- Cieslak A, Fresneda J, Ribera I. 2014 Life-history specialization was not an evolutionary dead-end in Pyrenean cave beetles. Proc. R. Soc. B 281: 20132978. doi: 10.1098/rspb.2013.2978.
- Clark DR. 2011. Phylogenetic Analysis of the scarab beetle tribe Cyclocephalini (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) based on adult morphological characters. Master Thesis, Wichita State University, Kansas, United States. 338 pp.
- Clark CW, Mangel M. 2000. Dynamic State Variable Models in Ecology. Oxford University Press. New York, USA.
- Clements AN, Bennett FD. 1969. The structure and biology of a new species of *Mallophora* Macq. (Diptera, Asilidae) from Trinidad, W.I. Bull. Entomol. Res. 58: 455-463.
- Colin H, Sinclair BJ, Vernon P, Renault D. 2015. Insects in fluctuating thermal environments. Annu. Rev. Entomol. 60(7): 7.1-7.18. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-021017.
- Colinet H, Sinclair BJ, Vernon P, Renault D. 2015. Insects in fluctuating thermal environments. Annu. Rev. Entomol. 60: 123-140. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-021017.
- Cook RM, Hubbard SF. 1977. Adaptive searching strategies in insect parasites. J. An. Ecol. 46: 115-125.
- Copello A. 1922. Biología del moscardón cazador de abejas (*Mallophora ruficauda* Wied.). Physis 6: 30-42.
- Copello A. 1927. Biología del moscardón cazador de abejas (*Mallophora ruficauda* Wied.). Publicación del Ministerio de Agricultura de la Nación, Sección Propagandas e Informes, Circular 699: 18 pp.
- Copello A. 1942. Moscardón cazador de abejas. Revista de Apicultura, 19(200): 13-14; (218): 4-5; (219): 10-11; (220): 13-14; (221): 14; (222): 12-13.
- Corfas RA, Vosshall LB. 2015. The cation channel TRPA1 tunes mosquito thermotaxis to host temperatures. eLife, 4:e11750.
- Costa FG, Curbelo B, Pérez-Miles F. 2015. Long-term persistence and wáter resistance of female sex cues in the tarantula *Eupalaestrus weijnberghi* (Araneae: Therphosidae). Arachnology 16(9): 311-313.
- Couret J, Dotson E, Benedict MQ. 2014. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Plos One 9(2): e87468. doi: 10.1371/journal.pone.0087468.
- Cramer JM, Meeuse ADJ, Teunissen PA. 1975. A note on the pollination of nocturnally flowering species of *Nymphaea*. Acta Bot. Neerl. 24: 489-490.
- Crawley MJ. 2007. The R Book. Wiley Publishing.
- Crespo DC, Lecuona RE. 2002. Control biológico de la "mosca doméstica" dentro de un programa de manejo integrado. En Salomón D, Comp. Actualizaciones en artropodología sanitaria Argentina. Red Argentina de Estudio de Artrópodos Vectores de Enfermedades Humanas (RAVE). Serie Enfermedades Transmisibles. Publicación monográfica 2. Pp: 61-67, 301 pp. Ed. Fundación Mundo Sano, ISBN 987-20421-0-1. Buenos Aires.

- Crespo JE. 2007. Supervivencia y duración de los estadios larvales del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae): El papel de la edad en el comportamiento de orientación hacia el hospedador. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 78 pp.
- Crespo JE. 2011. Ecología y fisiología del comportamiento de localización del hospedador en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 135 pp.
- Crespo JE, Castelo MK. 2008. The ontogeny of host-seeking behaviour in a parasitoid dipteran. *J. Insect Physiol.* 54: 842-847.
- Crespo JE, Castelo MK. 2009. Insights to host discrimination and host acceptance behavior in a parasitoid (Diptera: Asilidae): Implications for fitness. *J. Insect Physiol.* 55: 1072-1078.
- Crespo JE, Castelo MK. 2010. Life history traits in a parasitoid dipteran species with free-living and obligate parasitic immature stages. *Physiol. Entomol.* 35: 160-167.
- Crespo JE, Lazzari CR, Castelo MK. 2011. Orientation mechanisms and sensory organs involved in host location in a dipteran parasitoid larva. *J. Insect Physiol.* 57: 191-196.
- Crespo JE, Martínez GA, Castelo MK. 2015. Exposure to competitors influences parasitism decisions in ectoparasitoid fly larvae. *Animal Behaviour* 100: 38-43.
- Cui Y, Du Y, Lu M, Qiang C. 2011. Antioxidant responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae exposed to thermal stress. *J. Thermal Biol.* 36: 292-297. doi: 10.1016/j.jtherbio.2011.04.003.
- Cull DC, van Emden HF. 1977. The effect of *Aphis fabae* of diel changes in their food quality. *Physiol. Entomol.* 2: 109-115.
- Culver DC. 1982 *Cave life: evolution and ecology*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Davidowitz G, Nijhout HF. 2004. The physiological basis of reaction norms: the interaction among growth rate, the duration of growth and body size. *Integr. Comp. Biol.* 44: 443-449.
- Davis EE, Sokolove PG. 1975. Temperature responses of antennal receptors of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Comp. Physiol.* 96: 223-236.
- Dennis DE, Knutson L. 1988. Descriptions of pupae of South American Robber Flies (Diptera: Asilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 81(6): 851-864.
- Dennis DE, Barnes JK, Knutson LV. 2013. Review and analysis of information on the biology and morphology of immature stages of robber flies (Diptera: Asilidae). *Zootaxa* 3673(1): 1-64. doi: 10.11646/zootaxa.3673.1.1.
- Desouhant E, Driessen G, Amat I, Bernstein C. 2005. Host and food searching in a parasitic wasp *Venturia canescens*: a trade-off between current and future reproduction?. *An. Behav.* 70(1): 145-152.
- Dieringer G, Reyes-Castillo P, Lara M, Cabrera RL, Loya L. 1998. Endothermy and floral utilization of *Cyclocephala caelestis* (Coleoptera: Scarabaeoidea; Melolonthidae): a cloud forest endemic beetle. *Acta Zool. Mex.* 73: 145-153.
- Dikow T. 2009b. A phylogenetic hypothesis for Asilidae based on a total evidence analysis of morphological and DNA sequence data (Insecta: Diptera: Brachycera: Asiloidea). *Organisms, Diversity & Evolution* 9: 165-188.

- Dikow T. 2009a. Phylogeny of Asilidae inferred from morphological characters of imagines (Insecta: Diptera: Brachycera: Asiloidea). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 319: 1-175.
- Dinno A. 2016. Package 'dunn.test'. Versión 1.3.2. Disponible en <https://cran.r-project.org/web/packages/dunn.test/dunn.test.pdf>. Acceso Diciembre 2016.
- Dorn S, Beckage NE. 2007. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. *Physiol. Entomol.* 32: 199-211.
- Dorsett DA. 1962. Preparation for flight by hawk-moths. *J. Exp. Biol.* 39: 579-588.
- Doutt RL. 1959. The biology of parasite Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 4: 161-182.
- Edney EB. 2012. Water Balance in Land Arthropods. *Zoophysiology and Ecology Vol. 9*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin, Germany. 248 pp. doi: 10.1007/978-3-642-81105-0.
- Eggleton P, Gaston KJ. 1990. 'Parasitoid' species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises? *Oikos* 59(3): 417-421.
- Eggleton P, Belshaw R. 1992. Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 337:1-20.
- Eggleton P, Belshaw R. 1993. Comparisons of dipteran, hymenopteran and coleopteran parasitoids: provisional phylogenetic explanations. *Biol. J. Linn. Soc.* 48: 213-226.
- Ellers J, van Alphen JJM. 1997. Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *J. Evol. Biol.* 10(5): 771-785.
- El-Sayed AM. 2003-2016. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. Disponible a través de: <http://www.pherobase.com>.
- Erwin TL, Erwin JM. 1976. Relationships of predaceous beetles to tropical forest wood decay. Part II. The natural history of neotropical *Eurycoleus macularis* Chevrolat (Carabidae: Lebiini) and its implications in the evolution of ectoparasitoidism. *Biotropica* 8(4): 215-224.
- Eskafi FM, Fernández A. 1990. Larval-pupal mortality of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) from interaction of soil, moisture, and temperature. *Env. Entomol.* 19 (6), 1666-1670. doi: 10.1093/ee/19.6.1666.
- Esperk T, Tammaru T, Nylin S. 2007. Intraspecific variability in number of larval instars in insects. *J. Econ. Entomol.* 100(3): 627-645. doi: 10.1603/0022-0493(2007)100[627:IVINOL]2.0.CO;2.
- Evans WG. 1964. Infra-red receptors in *Melanophila acuminata* De Geer. *Nature*, 202: 211.
- Fabiano S. 2018. Descripción morfológica y funcional del huevo y de los estadios larvales del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de Licenciatura, FCEyN, Universidad de Buenos Aires. 58 pp.
- Feener DH Jr, Brown BV. 1997. Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 42: 73-97.
- Ferreira RA, Lazzari CR, Lorenzo MG, Pereira MH. 2007. Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? *PLoS ONE*, 2, e932.
- Fischer S, Samietz J, Wäckers FL, Dorn S. 2001. Interaction of vibrational and visual cues in parasitoid host location. *J. Comp. Physiol.* 187: 785-791.

- Flanders SE. 1950. Regulation of ovulation and egg disposal in the parasitic Hymenoptera. *Canadian Entomologist*. 82: 134-40.
- Fletcher JP, Hughes JP, Harvey IF. 1994. Life expectancy and egg load affect oviposition decisions of a solitary parasitoid. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 258: 163-167.
- Forsse E, Smith SM, Bourchier RS. 1992. Flight initiation in the egg parasitoid *Trichogramma minutum*: effects of ambient temperature, mates, food, and host eggs. *Entomol. Exp. Appl.* 62(2): 147-154.
- Forte SN, Ferrero AA, Alonso TS. 2002. Content and composition of phosphoglycerols and neutral lipids at different developmental stages of the eggs of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 50(3): 121-130.
- Frana JE. 2003. Clave para la identificación de larvas de Scarabaeidae que habitan el suelo de la región Central de Santa Fe. Consultado a través de: www.rafaela.inta.gov.ar/publicaciones/clave_gusano_blanco.pdf
- Fresquet N, Lazzari CR. 2011. Response to heat in *Rhodnius prolixus*: the role of thermal background. *J. Insect Physiol.* 57: 1446-1449.
- Frew A, Barnett K, Nielsen UN, Riegler M, Johnson SN. 2016. Belowground ecology of scarabs feeding on grass roots: current knowledge and future directions for management in Australasia. *Front. Plant Sci.* 7: 321. doi: 10.3389/fpls.2016.00321.
- Frouz J, Ali A, Lobinske RJ. 2002. Influence of temperature on developmental rate, wing length, and larval head capsule size of pestiferous midge *Chironomus crassicaudatus* (Diptera: Chironomidae). *J. Econ. Entomol.* 95(4): 699-705.
- Gibernau M, Barabé D, Cerdan P, Dejean A. 1999. Beetle pollination of *Philodendron solimoesense* (Araceae) in French Guiana. *Int. J. Plant Sci.* 160: 1135-1143.
- Giron D, Casas J. 2003. Mothers reduce egg provisioning with age. *Ecology Letters*. 6: 273-277.
- Giron D, Pincebourde S, Casas J. 2004. Lifetime gains of host-feeding in a synovigenic parasitic wasp. *Physiol. Entomol.* 29(5): 436-442.
- Godfray HCJ. 1994. *Parasitoids. Behavior and Evolutionary Ecology*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ: 473 pp.
- Godfray HCJ, Hassell MP, Holt RD. 1994. The population dynamic consequences of phenological asynchrony between parasitoids and their hosts. *Ecology* 63: 1-10.
- Godfray HCJ, Shimada M. 1999. Parasitoids as model organisms for ecologists. *Res. Popul. Ecol.* 41: 3-10.
- Gorb E, Gorb S. 2009. Effects of surface topography and chemistry of *Rumex obtusifolius* leaves on the attachment of the beetle *Gastrophysa viridula*. *Entomol. Exp. Appl.* 130(3): 222-228. doi: 10.1111/j.1570-7458.2008.00806.x.
- Gottsberger G. 1986. Some pollination strategies in Neotropical savannas and forests. *Plant Sys. Evol.* 152: 29-45.
- Gottsberger G. 1988. The reproductive biology of primitive angiosperms. *Taxon* 37(3): 630-643.
- Gottsberger G. 1990. Flowers and beetles in the South American tropics. *Botanica Acta*. 103: 360-365.
- Gottsberger G. 1999. Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Spec. Biol.* 14: 143-152.

- Gould J, Venette R, Winograd D. 2005. Effect of temperature on development and population parameters of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 34(3): 548-556. doi: 10.1603/0046-225X-34.3.548.
- Grant JA, Villani MG. 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Envir. Entomol.* 32(1): 80-87. doi: 10.1603/0046-225X-32.1.80.
- Groba HF. 2014. Caracterización morfológica de las larvas y de los receptores olfativos del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) y determinación del origen de las claves químicas en el hospedador *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 162 pp.
- Groba HF, Castelo MK. 2012. Chemical interaction between the larva of a dipteran parasitoid and its coleopteran host: A case of exploitation of the communication system during the searching behaviour? *Bull. Entomol. Res.* 102(3): 315.
- Groba HF, Castelo MK. 2016. Host gut microorganisms' cues mediate orientation behaviour in the larva of the parasitoid *Mallophora ruficauda*. *Bull. Entomol. Res.* 106: 81-90.
- Groba HF, Lauría de Cidre LS, Castelo MK. 2014. Description of antennal structures of the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) and its relationship with resources searching behaviour. *Zoomorphology* 133(2): 191-204.
- Grodzicki P, Caputa M. 2005. Social versus individual behaviour: a comparative approach to thermal behaviour of the honeybee (*Apis mellifera* L.) and the American cockroach (*Periplaneta americana* L.). *J. Insect Physiol.* 51: 315-322.
- Guppy JC, Harcourt DG. 1973. A sampling plan for studies on the population dynamics of beetle larvae, *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Can. Entomol.* 105: 479-83.
- Gwynne DT. 2004. Sexual differences in response to larval food stress in two nuptial feeding orthopterans: implications for sexual selection. *Oikos* 105(3): 619-625.
- Harrison JF, Woods HA, Roberts SP. 2012. *Ecological and Environmental Physiology of Insects*. Oxford University Press. New York.
- Harrison RD, Gardner WA, Tollner WE, Kinard DJ. 1993. X-ray computed tomography studies of the burrowing behavior of fourth-instar pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 86(6): 1714-1719.
- Harvey JA. 2000. Dynamic effects of parasitism by an endoparasitoid wasp on the development of two host species: implications for host quality and parasitoid fitness. *Ecol. Entomol.* 25: 267-278.
- Harvey JA. 2005. Factors affecting the evolution of development strategies in parasitoid wasps: the importance of functional constraints and incorporating complexity. *Entomol. Exp. Appl.* 117: 1-13.
- Harvey JA, Poelman EH, Tanaka T. 2013. Intrinsic inter- and intraspecific competition in parasitoid wasps. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 333-351.
- Hassell MP. 2000. *The spatial and temporal dynamics of host-parasitoid interactions*. Oxford Univ. Press. 199 pp.

- Hassell MP, May RM, Pacala SW, Chesson PL. 1991. The persistence of host-parasitoid associations in patchy environments. I. A general criterion. *Am. Nat.* 138 (3): 568-583.
- Hawkins BA. 1994. *Pattern & Process in Host-Parasitoid Interactions*. Cambridge Univ. Press. UK. 190 pp.
- Haynes KF, Potter DA. 1995a. Sexual response of a male scarab beetle to larvae suggests a novel evolutionary origin for a pheromone. *Am. Entomol.* 169-174.
- Haynes KF, Potter DA. 1995b. Chemically mediated sexual attraction of male *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: Scarabaeidae) and other scarabaeid beetles to immature stages. *Physiol. Chem. Ecol.* 24(5): 1302-1306.
- Haynes KF, Potter DA, Collins JT. 1992. Attraction of male beetles to grubs: evidence for evolution of a sex pheromone from larval odor. *J. Chem. Ecol.* 18(7): 1117-1124.
- Healy TP, Copland MJ, Cork A, Przyborowska A, Halket JM. 2002. Landing responses of *Anopheles gambiae* elicited by oxocarboxylic acids. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 126-132.
- Heimpel GE, Collier TR. 1996. The evolution of host-feeding behaviour in insect parasitoids. *Biological Reviews* 71: 373-400.
- Heinrich B. 1993. *The Hot-Blooded Insects. Strategies and Mechanisms of Thermoregulation*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Heinrich B. 1996. *The Thermal Warriors: strategies of insect survival*. Cambridge, MA: Harvard University Press. 217 pp.
- Heinrich B, Bartholomew GA. 1979. Roles of endothermy and size in inter and intraspecific competition for elephant dung in an African dung beetle, *Scarabaeus laevistriatus*. *Physiol. Zool.* 52: 484-496.
- Heinrich B, McClain E. 1986. 'Laziness' and hypothermia as a foraging strategy in flower scarabs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Physiol. Zool.* 59: 273-282.
- Hemptinne JL, Lognay G, Doumbia M, Dixon AFG. 2001. Chemical nature and persistence of the oviposition deterring pheromone in the tracks of the larvae of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemoecology* 11: 43-47.
- Hoffmann AA, Sorensen JG, Loeschcke V. 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Thermal Biol.* 28: 175-216.
- Hoffmeister TS, Gienapp P. 1999. Exploitation of host's chemical communication in parasitoid searching for concealed host larvae. *Ethology* 105: 223-232.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P. 2016. Package 'multcomp'. Version 1.4-6. Disponible en: <http://multcomp.r-forge.r-project.org/>. Acceso: Dec 2016.
- Howlett FM. 1910. The influence of temperature upon the biting of mosquitoes. *Parasitology*, 3, 479-484.
- Howse PE, Stevens IDR, Jones OT. (eds) 1998. *Insect pheromones and their use in pest management*. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Hubbard SF, Cook RM. 1978. Optimal foraging by parasitoid wasps. *J. Animal Ecol.* 47: 593-604.
- Insausti TC, Lazzari CR, Campanucci VA. 1999. Neurobiology of behaviour. A: morphology of the nervous system and sense organs. In: Carcavallo et al. (Eds.), *Atlas of Chagas' Disease Vectors in America*, vol. 3. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1017-1051.

- Jackson DE, Martin SJ, Holcombe M, Ratnieks FLW. 2006. Longevity and detection of persistent foraging trails in Pharaoh's ants, *Monomorium pharaonic* (L.). *An. Behav.* 71: 351-359.
- Jannot JE, Bruneau E, Wissinger SA. 2007. Effects of larval energetic resources on life history and adult allocation patterns in a caddisfly (Trichoptera: Phryganeidae). *Ecol. Entomol.* 32: 376-383.
- Jervis MA, Eilers J, Harvey JA. 2008. Resource Acquisition, allocation and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annu. Rev. Entomol.* 53:361-85.
- Jervis MA, Heimpel GE, Ferns PN, Harvey JA, Kidd NA. 2001. Life-history traits in parasitoid wasps: a comparative analysis of "ovigeny". *J. Animal Ecol.* 70: 442-458.
- Jervis MA, Kidd NAC. 1986. Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biological Reviews* 61: 395-434.
- Jervis MA, Kidd NAC, Fitton MG, Huddleston T, Dawah HA. 1993. Flower-visiting by hymenopteran parasitoids. *J. Nat. Hist.* 27(1): 67-105.
- Johnson SN, Read DB, Gregory PJ. 2004. Tracking larval insect movement within soil using high resolution X-ray microtomography. *Ecol. Entomol.* 29(1): 117-122. doi: 10.1111/j.0307-6946.2004.00567.x.
- Kant R, Minor MA, Trewick SA. 2012. Fitness gain in a koinobiont parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae) by parasitising hosts of different ages. *J. Asia-Pac. Entomol.* 15: 83-87.
- Karl I, Michalowsky C, Sorensen JG, Loeschcke V, Fischer K. 2012. Effects of rearing and induction temperature on the temporal dynamics of heat shock protein 70 expression in a butterfly. *Physiol. Entomol.* 37: 103-108.
- Karolewski P, Grzebyta J, Oleksyn J, Giertych MJ. 2007. Effects of temperature on larval survival rate and duration of development in *Lymantria monacha* (L.) on needles of *Pinus sylvestris* (L.) and in *L. dispar* (L.) on leaves of *Quercus robur* (L.). *Pol. J. Ecol.* 55(3): 595-600.
- Katsuki M, Miyatake T. 2009. Effects of temperature on mating duration, sperm transfer and remating frequency in *Callosobruchus chinensis*. *J. Insect Physiol.* 55: 113-116.
- Kheirallah AM. 1978. The consumption and utilization of two different species of leaf litter by a laboratory population of *Orthomorpha gracilis*. *Entomol. Exp. App.* 23: 14-19.
- Killham K. 1994. Soil ecology. Cambridge University Press. Cambridge, England. 274 pp.
- Kindvall O, Nordlander G, Nordenhem H. 2000. Movement behaviour of the pine weevil *Hylobius abietis* in relation to soil type: an arena experiment. *Entomol. Exp. Appl.* 95(1): 53-61
- Kingsolver JG. 2000. Feeding, growth and the thermal environment of cabbage white caterpillars, *Pieris rapae* L. *Physiol. Biochem. Zool.* 73: 621-628.
- Kingsolver JG, Higgins JK, Augustine KE. 2015. Fluctuating temperatures and ectotherm growth: distinguishing non-linear and time-dependent effects. *J. Exp. Biology* 218: 2218-2225. doi:10.1242/jeb.120733
- Kingsolver JG, Ragland GJ, Diamond SE. 2009. Evolution in the constant environment: thermal fluctuations and thermal sensitivity in laboratory and field populations of *Manduca sexta*. *Evolution* 63: 537-541. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00568.xp
- Kingsolver JG, Ragland GJ, Shlichta JG. 2004. Quantitative genetics of continuous reaction norms: thermal sensitivity of caterpillar growth rates. *Evolution* 58: 1521-1529.

- Kingsolver JG, Woods HA. 2016. Beyond thermal performance curves: Modeling time-dependent effects of thermal stress on ectotherm growth rates. *Am. Nat.* 187(3): 283-94. doi: 10.1086/684786
- Kingsolver JG, Wood HA. 1997. Thermal sensitivity of growth and feeding in *Manduca sexta* caterpillars. *Physiol. Zool.* 70: 631-638.
- Kingsolver JG, Wood HA, Buckley LB, Potter KA, MacLean HJ, Higgins JK. 2011. Complex life cycles and the responses of insects to climate change. *Integr. Comp. Biol.* 51(5): 719-732. doi:10.1093/icb/ibr015.
- Kinoshita E. 1940. Untersuchungen über die Yeso-Raubfliege *Prorhachis yesonicus* BIGOT unter Berücksichtigung des Forstschutzes. *J. Fac. Agric. Hokkaido* 40: 171-270.
- Knutson LV. 1972. Pupa of *Neomochtherus angustipennis* (Hine), with notes on feeding habits of Robber flies and a review of publications on morphology of immature stages (Diptera: Asilidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 85(13): 163-178.
- Kreuger B, Potter DA. 2001. Diel feeding activity and thermoregulation by the Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) within host plant canopies. *Environ. Entomol.* 30(2): 172-180.
- Krogh A, Zeuthen E. 1941. The mechanism of flight preparation in some insects. *J. Exp. Biol.* 18: 1-10.
- Kutty SN, Pont AC, Meier R, Pape T. 2014. Complete tribal sampling reveals basal split in Muscidae (Diptera), confirms saprophagy as ancestral feeding mode, and reveals an evolutionary correlation between instar numbers and carnivory. *Mol. Phylogenet. Evol.* 78: 349-364. doi: 10.1016/j.ympev.2014.05.027.
- Lahondère C, Lazzari CR. 2015. Thermal effect of blood feeding in the telmophagous fly *Glossina morsitans morsitans*. *J. Thermal Biol.* 48: 45-50.
- Lang CA. 1963. The effect of temperature on the growth and chemical composition of the mosquito. *J. Insect Physiol.* 9: 279-286.
- Lavelle P. 2012. Soil as a habitat. In Wall D. H., Bardgett, RD, Behan-Pelletier, V, Herrick, JE, Jones, H, Ritz, K, Six, J, Strong, DR, van der Putten, WH. (eds). 2012. *Soil ecology and ecosystem services*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Lavelle P, Spain AV. 2001. *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers. Amsterdam, Netherlands. 678 pp.
- Lazzari CR. 2009. Orientation towards hosts in haematophagous insects: an integrative perspective. *Adv. Insect Physiol.* 37: 1-58.
- Lazzari CR, Núñez JA. 1989. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* 35: 525-529.
- Lazzari CR, Wicklein M. 1994. The cave-like sense organ in the antennae of triatominae bugs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 89: 643-648.
- Leal WS. 2000. Chemical communication in scarab beetles. *Insect Physiology Online*. Disponible a través de: <http://www.faculty.ucr.edu/~insects/physiolecol/plenarywl.html>.
- Lease HM, Wolf BO. 2011. Lipid content of terrestrial arthropods in relation to body size, phylogeny, ontogeny and sex. *Physiol. Entomol.* 36: 29-38.
- Lehmann EL, D'Abbrera HJM. 2006. *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. Springer, New York, 463 pp.

- Lehmann FO. 1999. Ambient temperature affects free-flight performance in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. B.* 169(3): 165-71.
- Lewis WJ, Stapel JO, Cortesero AM, Takasu K. 1998. Understanding how parasitoids balance food and host needs: importance to biological control. *Biol. Control.* 11(2): 175-183.
- Li JM, Su YL, Gao XL, He J, Liu SS, Wang XW. 2011. Molecular characterization and oxidative stress response of an intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (CuZnSOD) of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 77: 118-33.
- Lilly JH. 1956. Soil insects and their control. *Annu. Rev. Entomol.* 1956 1: 203-222.
- Liu YB, Haynes KF. 1994. Temporal and temperature-induced changes in emission rates and blend ratios of sex pheromone components in *Trichoplusia ni*. *J. Insect Physiol.* 40(4): 341-346.
- Logan ML, Cox RM, Calsbeek R. 2014. Natural selection on thermal performance in a novel thermal environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111(39):14165-14169. doi: 10.1073/pnas.1404885111.
- López AN, Álvarez Castillo HA, Carmona D, Manetti PL, Vincini AM. 1994. Aspectos morfológicos y biológicos de *Cyclocephala signaticollis* Burm. (Coleoptera: Scarabaeidae). SAGP-INTA, CERBAS, EEA Balcarce, Informe Técnico 123: 18 pp.
- Lorenzo Figueiras AN, Flores GB, Lazzari CR. 2013. The role of antennae in the thermopreference of haematophagous bugs. *J. Insect Physiol.* 59: 1194-1198.
- Lucchetta P, Desouhant E, Wajnberg E, Bernstein C. 2007. Small but smart: the interaction between environmental cues and internal state modulates host-patch exploitation in a parasitic wasp. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61(9): 1409-1418.
- Machovsky-Capuska GE, Senior AM, Simpson SJ, Raubenheimer D. 2016. The Multidimensional Nutritional Niche. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(5): 355-365.
- Mangel M. 1989. Evolution of host selection in parasitoids: does the state of the parasitoid matter? *Am. Natur.* 133(5): 688-705.
- Martínez GA, Castelo MK, Crespo JE. 2017. Behavioural plasticity induced by intraspecific competition in host orientation in a parasitoid. *Ecol. Entomol.* 42(4): 484-491.
- Martínez MI, Lumaret JP. 2003. Dimorfismo sexual en las larvas de Scarabaeoidea. En G. Onore, P. Reyes-Castillo, e M. Zunino (Eds.), *Scarabaeidos de Latinoamérica: el estado del conocimiento*. Vol. 3. Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza, España.
- Mathavan S, Bhaskaran R. 1975. Food selection and utilization in a danaid butterfly. *Oecologia Berlin.* 18: 55-62.
- Matzkin LM, Johnson S, Paight C, Bozinovic G, Markow TA. 2011. Dietary protein and sugar differentially affect development and metabolic pools in ecologically diverse *Drosophila*. *J. Nutr.* 1127-1133.
- Matzkin LM, Mutsaka K, Johnson S, Markow TA. 2009. Metabolic pools differ among ecologically diverse *Drosophila* species. *J. Insect Physiol.* 55: 1145-1150.
- May ML. 1979. Insect thermoregulation. *Annu. Rev. Entomol.* 24: 313-49.
- Mayhew PJ, Blackburn TM. 1999. Does development mode organize life-history traits in the parasitoid Hymenoptera? *J. Animal Ecol.* 68: 906-919.

- Mayoral L. 1999. Negocios apícolas: Tendencias globales, capacidades y carencias en la empresarización del sector. Una perspectiva argentina. *Rev. Electrónica de Administración*, Agosto, 5(2), 19 pp.
- McColloch JW, Haye WP. 1922. The reciprocal relation of soil and insects. *Ecology*, 3(4): 288-301.
- McIver S, Siemicki R. 1979. Fine structure of antennal sensilla of male *Aedes aegypti* (L.). *J. Insect Physiol.* 25: 21-28.
- McMeniman CJ, Corfas RA, Matthews BJ, Ritchie SA, Vosshall LB. 2014. Multimodal integration of carbon dioxide and other sensory cues drives mosquito attraction to humans. *Cell*, 156: 1060-1071.
- Medrano JF, Gall GAE. 1976. Food consumption, feed efficiency, metabolic rate and utilization of glucose in lines of *Tribolium castaneum* selected for 21-day pupa weight. *Genetics* 83(2): 393-407.
- Merrick MJ, Smith RJ. 2004. Temperature regulation in burying beetles (*Nicrophorus* spp.: Coleoptera: Silphidae): effects of body size, morphology and environmental temperature. *J. Exp. Biol.* 207: 723-733.
- Meyhöfer R, Casas J. 1999. Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *J. Insect Physiol.* 45: 967-971.
- Mills NJ, Getz WM. 1996. Modelling the biological control of insect pests: a review of host-parasitoid models. *Ecological Modelling* 92: 121-143.
- Minkenbergh OPJM, Tatar M, Rosenheim JA. 1992. Egg load as a major source of variability in insect foraging and oviposition behavior. *Oikos* 65: 134-142.
- Mohamed SA, Wharton RA, von Mérey G, Schulthess F. 2006. Acceptance and suitability of different host stages of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) and seven other tephritid fruit fly species to *Tetrastichus giffardii* Silvestri (Hymenoptera: Eulophidae). *Biol. Control* 39 : 262-271.
- Monaghan P, Mecalfe NB, Torres R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12: 75-92. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x.
- Moore MR, Jameson ML. 2013. Floral associations of Cyclocephalinae scarab beetles. *J. Insect Sci.* 13: 100.
- Morales-Ramos JA, Rojas MG, Shapiro-Ilan DI, Tedders WL. 2010. Developmental plasticity in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): analysis of instar variation in number and development time under different diets. *J. Entomol. Sci.* 45(2): 75-90. doi: 10.18474/0749-8004-45.2.75.
- Morgan KR. 1987. Temperature regulation, energy metabolism and mate-searching in rain beetles (*Pleocomma* spp.), winter-active, endothermic scarabs (Coleoptera). *J. Exp. Biol.* 128: 107-122.
- Morgan KR, Bartholomew GA. 1982. Homeothermic response to reduced ambient temperature in a scarab beetle. *Science* 216, 1409-1410.
- Morehead SA, Feener DH Jr. 2000. Visual and chemical cues used in host location and acceptance by a dipteran parasitoid. *J. Insect Behav.* 13(4): 613-625.
- Mumford BC. 1965. List of Intercepted Plant Pests, 1964. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Plant Quarantine and Control Administration. Consultado a través de: Biodiversity Heritage Library: <http://biodiversitylibrary.org/page/32010233#page/>
- Musso JJ. 1978. Recherches sur le développement, la nutrition et l'écologie des Asilidae (Diptera: Brachycera). Thèse de Doctorat. Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille, Faculté des Sciences et Technique de Saint-Jérôme. 312 pp.

- Musso JJ. 1981. Morphology and development of the immature stages of some robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis*, 7(1): 89-104.
- Musso JJ. 1983. Nutritive and ecological requirements of robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis. Zeitschrift für Allgemeine und Angewandte Entomologie* 9: 35-50. doi:10.1127/entom.gen/9/1983/35.
- Niehaus AC, Angilletta MJ, Sears MW, Franklin CE, Wilson RS. 2012. Predicting the physiological performance of ectotherms in fluctuating thermal environments. *J. Exp. Biol.* 215: 694-701. doi:10.1242/jeb.058032.
- Nussebaum AL. 2007. Comportamiento de oviposición y estrategia de ovigenia en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de Licenciatura, FCEyN, Universidad de Buenos Aires. 86 pp.
- O'Brien DM, Boggs CL, Fogel ML. 2004. Making eggs from nectar: the role of life history and dietary carbon turnover in butterfly reproductive resource allocation. *Oikos*. 105: 279-91.
- O'Brien DM, Fogel ML, Boggs CL. 2002. Renewable and non-renewable resources: amino acid turnover and allocation to reproduction in Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 4413-18.
- Oertli JJ. 1989. Relationship of wing beat frequency and temperature during takeoff flight in temperate-zone beetles. *J. Exp. Biol.* 145: 321-338.
- Offenberg J, Nielsen MG, MacIntosh DJ, Havanon S, Aksornkoae S. 2004. Evidence that insect herbivores are deterred by ant pheromones. *Biol. Letters. Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* 271, S433-S435.
- Olanga EA, Okal MN, Mbadi PA, Kokwaro ED, Mukabana WR. 2010. Attraction of *Anopheles gambiae* to odour baits augmented with heat and moisture. *Malar. J.* 9: 6.
- Outreman Y, Le Ralec A, Plantegenest M, Chaubet B, Pierre JS. 2001. Superparasitism limitation in an aphid parasitoid: cornicle secretion avoidance and host discrimination ability. *J. Insect Physiol.* 47(4-5): 339-348.
- Papaj DR. 2000. Ovarian dynamics and host use. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 423-48.
- Peters RH. 1983. *The ecological implications of body size*. Cambridge Univ. Press.
- Peterson DG, Brown AWA. 1951. Studies of the responses of the female *Aedes* mosquito III- the response of *Aedes aegypti* (L.) to a warm body and its radiation. *Bull. Entomol. Res.* 42: 535-541.
- Pexton JJ, Mayhew PJ. 2002. Siblicide and life-history evolution in parasitoids. *Behav. Ecol.* 13(5): 690-695.
- Pompanon F, Fouillet P, Bouletreau M. 1999. Physiological and genetic factors as sources of variation in locomotion and activity rhythm in a parasitoid wasp (*Trichogramma brassicae*). *Physiol. Entomol.* 24(4): 346-357.
- Potter DA. 1980. Flight activity and sex attraction of Northern and Southern Masked Chafers in Kentucky turfgrass. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73(4): 414-417.
- Potter DA. 1998. *Destructive Turfgrass Insects: Biology, diagnosis and control*. Ann. Arbor Press, MI, 336 pp.
- Potter K, Davidowitz G, Woods HA. 2009. Insect eggs protected from high temperature by limited homeothermy of plant leaves. *J. Exp. Biol.* 212: 3448-3454. doi: 10.1242/jeb.033365.

- Park K, Kwak I-S. 2014. The effect of temperature gradients on endocrine signaling and antioxidant gene expression during *Chironomus riparius* development. *Science of the Total Environment* 470-471: 1003-1011. | doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.052.
- Pennacchio F, Strand MR. 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 233-258.
- Poulson TL, White WB. 1969. The cave environment. *Science*, 165(3897): 971-981. doi: 10.1126/science.165.3897.971.
- Prasad NG, Shakard M, Anitha D, Rajamani M, Joshi A. 2001. Correlated responses to selection for faster development and early reproduction in *Drosophila*: the evolution of larval traits. *Evolution* 55(7): 1363-1372.
- Price PW. 1973. Reproductive strategies in parasitoid wasps. *Am. Nat.* 107: 685-693.
- Price PW. 1975. Reproductive strategies of parasitoids. En: Price, P.W. (Ed.), *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites*. Plenum, New York, United States. pp. 87-111.
- Pueyrredon JM. 2016. El papel de las antenas en la aceptación y orientación hacia el hospedador en la larva del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de Licenciatura, FCEyN, Universidad de Buenos Aires. 50 pp.
- Pueyrredon JM, Crespo JE, Castelo MK. 2017. Functional sensorial complementation during host orientation in an Asilidae parasitoid larva. *Bull Entomol. Res.*, 7: 1-8.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rabaglio M, Castignani H, Sanchez C, Barberis N, Huerta G. 2015. Exportaciones apícolas de Argentina 2015. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Programa Nacional Apícola. Consultado a través de: www.inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-exportaciones_apicolas_de_argentina_junio_2015.pdf
- Rabinovich M, Corley JC. 1997. An important new predator of honey bees - the robber fly *Mallophora ruficauda* Wiedemann (Diptera: Asilidae) in Argentina. *Am. Bee J.* 137(4): 303-306.
- Ratcliffe BC. 2008. More new species of *Cyclocephala* Dejean, 1821 from South America (Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini). *Coleopt. Bull.* 62: 221-224.
- Raubenheimer D, Simpson SJ. 1999. Integrating nutrition: a geometrical approach. *Entomol. Exp. Appl.* 91: 67-82.
- Raubenheimer D, Simpson SJ, Mayntz D. 2009. Nutrition, ecology and nutritional ecology: toward an integrated framework. *Func. Ecol.* 23: 4-16.
- Régnière J, Powerll J, Bentz B, Nealis V. 2012. Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling. *J. Insect Physiol.* 58: 634-647. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.01.010
- Remedi de Gavotto AL. 1964. Ciclo Biológico de *Cyclocephala signaticollis* Burm. y caracteres específicos de su larva. *Revista de Investigaciones Agropecuarias. Serie 5 - Patología Vegetal.* 1(10): 151-161.

- Reynolds SE, Nottingham SF. 1985. Effects of temperature on growth and efficiency of food utilization in fifth-instar caterpillars of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect. Physiol.* 31(2): 129-134. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(85\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(85)90017-4).
- Rivero A, Casas J. 1999a. Incorporating physiology into parasitoid behavioural ecology: the allocation of nutritional resources. *Res. in Pop. Ecology.* 41: 39-45.
- Rivero A, Casas J. 1999b. Rate of nutrient allocation to egg production in a parasitic wasp. *Proc. Roy. Soc. Lon. B.* 266(1424): 1169-1174.
- Rivero A, West SA. 2005. The costs and benefits of host feeding in parasitoids. *An. Behav.* 69(6): 1293-1301.
- Rivero A, Giron D, Casas J. 2001. Lifetime allocation of juvenile and adult nutritional resources to egg production in a holometabolous insect. *Proc. Roy. Soc. B.* 268(1473): 1231-1237.
- Rogers ME, Potter DA. 2002. Kairomones from scarabaeid grubs and their frass as cues in below-ground host location by the parasitoids *Tiphia vernalis* and *Tiphia pygidialis*. *Entomol. Exp. Appl.* 102: 307-314.
- Royer L, Fournet S, Brunel E, Boivin G. 1999. Intra- and interspecific host discrimination by host-seeking larvae of coleopteran parasitoids. *Oecologia* 118: 59-68.
- Ruxton GD. 2006. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. *Behav. Ecol.* 17(4): 688-690.
- Saeki Y, Kruse KC, Switzer PV. 2005. Physiological costs of mate guarding in the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newman). *Ethology* 111: 863-877.
- SAGPyA. 2007. Informe de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, República Argentina (SAGPyA). Estadística de Distribución de producción de miel por provincia. Marzo 2007.
- Salt G. 1938. Experimental studies in insect parasitism. VI. Host suitability. *Bull. Entomol. Res.* 29: 223-246.
- Sánchez-Ramos I, Pascual S, Fernández CE, Marcotegui A, González-Núñez M. 2015. Effect of temperature on the survival and development of the immature stages of *Monosteira unicostata* (Hemiptera: Tingidae). *Eur. J. Entomol.* 112 (4): 664-675. doi: 10.14411/eje.2015.087.
- Saunders DS. 2002. *Insect clocks*. 3rd Ed. Steel CGH, Vafopoulou X, Lewis RD, Eds. Elsevier, Amsterdam. 576 pp.
- Schilman PE, Lazzari CR. 2004. Temperature preference in *Rhodnius prolixus*: effects and possible consequences. *Acta Tropica*, 90: 115-122.
- Schmitz H, Bleckmann H. 1997. Fine structure and physiology of the infrared receptor of beetles of the genus *Melanophila* (Coleoptera: Buprestidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 26: 205-215.
- Schmitz H, Trenner S, Hofmann MH, Bleckmann H. 2000. The ability of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) to approach a thermal source solely by its infrared radiation. *J. Insect Physiol.* 46: 745-751.
- Schoonhoven LM, Sparnaay T, Van Wissen W, Meerman J. 1981. Seven-week persistence of an oviposition-deterrent pheromone. *J. Chem. Ecol.* 7(3): 583-588.
- Schowalter TD. 2011. *Insect ecology, an ecosystem approach*. Academic Press. London, United Kingdom. 650 pp.
- Scriber JM, Slansky Jr F. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annu. Rev. Entomol.* 26: 183-211.

- Seymour RS, Matthews PGD. 2006. The role of thermogenesis in the pollination biology of the Amazon waterlily *Victoria amazonica*. *Ann. Bot.* 98: 1129-1135.
- Seymour RS, Schultze-Motel P. 1997. Heat-producing flowers. *Endeavour* 21(3): 125-129.
- Seymour RS, White CR, Gibernau M. 2003. Environmental biology: heat reward for insect pollinators. *Nature* 426: 243-244.
- Seymour RS, White CR, Gibernau M. 2009. Endothermy of dynastinae scarab beetles (*Cyclocephala colasi*) associated with pollination biology of a thermogenic arum lily (*Philodendron solimoesense*). *J. Exp. Biol.* 212: 2960-2968.
- Shepherd BL, Prange HD, Moczek AP. 2008. Some like hot: Body and weapon size affect thermoregulation in horned beetles. *J. Insect Physiol.* 54: 604-611.
- Silva-Torres CSA, Ramos Filho IT, Torres JB, Barros R. 2009. Superparasitism and host size effects in *Oomyzus sokolowskii*, a parasitoid of diamondback moth. *Entomol. Exp. Appl.* 133: 65-73.
- Simpson SJ, Raubenheimer D. 2011. The nature of nutrition: a unifying framework. *Aust. J. Zool.* 59: 350-368.
- Sinclair BJ, Marshall KE, Sewell MA, Levesque DL, Willett CS, Slotsbo S, Dong Y, Harley CDG, Marshall DJ, Helmuth BS, Huey RB. 2016. Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecology Letters* 19: 1372-1385. doi: 10.1111/ele.12686.
- Sinclair BJ, Williams CM, Terblanche JS. 2012. Variation in thermal performance among insect populations. *Physiol. Biochem. Zool.* 85(6): 594-606. doi: 10.1086/665388.
- Sirot E, Ploye H, Bernstein C. 1997. State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behav. Ecol.* 8(2): 226-232.
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. 2016. *Cyclocephala signaticollis*. Consultado en línea el 22/04/2016 a través de: <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/cyclocephala-signaticollis>
- Smith BP. 1998. Loss of larval parasitism in parasitengonine mites. *Experimental & Applied Acarology*, 22(4): 187-199. doi: 0.1023/A:1006010230247.
- Smolka J, Baird E, Byrne MJ, el Jundi B, Warrant EJ, Dacke M. 2012. Dung beetles use their dung ball as a mobile thermal refuge. *Curr. Biol.* 23; 22 (20): R863-4. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.057.
- Souza TB, Maia ACD, Schlindweing C, Albuquerque LSC, Iannuzzi L. 2014. The life of *Cyclocephala celata* Dechambre, 1980 (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) in captivity with descriptions of the immature stages. *J. Nat. Hist.* 48: 275-283.
- Spitzen J, Spoor CW, Grieco F, ter Braak C, Beeuwkes J, van Brugge SP, Kranenborg S, Noldus LP, van Leeuwen JL, Takken W. 2013. A 3D analysis of flight behavior of *Anopheles gambiae* sensu stricto malaria mosquitoes in response to human odor and heat. *PLoS ONE*, 8: e62995.
- Stabentheiner A, Schmaranzer S. 1987. Thermographic determination of body temperatures in honey bees and hornets: calibration and applications. *Thermology* 2: 563-572.
- Stamp NE. 1982. Searching Behaviour of parasitoids for web-making caterpillars: A Test of optimal searching theory. *J. Animal Ecol.* 51(2): 387-395
- Stamp NE. 1990. Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. *Oecologia*, 82: 107-113.

- Stamp NE, Bowers MD. 1994. Effect of temperature and leaf age on growth versus moulting time of a generalist caterpillar fed plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecological Entomology* 19: 199-206.
- Stevenson RD, Josephson RK. 1990. Effects of operating frequency and temperature on mechanical power output from moth flight muscle. *J. Exp. Biol.* 149: 61-78.
- Stireman III JO, O'Hara JE, Wood DM. 2006. Tachinidae: evolution, behavior and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 525-555.
- Strand MR, Casas J. 2008. Parasitoid and host nutritional physiology in behavioural ecology. En Wajnberg E, Bernstein C, Van Alphen J. Eds. *Behavioral Ecology of Insect Parasitoids: from theoretical approaches to field applications*. Blackwell Publishing. Part 1, Cap.6, pp 113-128 . 445 pp.
- Strand MR, Pech LL. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 31-56.
- Strathmann RR. 1978. The Evolution and Loss of Feeding Larval Stages of Marine Invertebrates. *Evolution* 32(4): 894-906.
- Strathmann RR. 1985. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16: 339-61.
- Telfer WH. 2009. Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect Sci.* 9(50): 1-21.
- Thien LB, Azuma H, Kawano S. 2000. New perspectives on the pollination biology of basal angiosperms. *Int. J. Plant. Sci.* 161: 225-235.
- Thompson SN. 1999. Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 44(1): 561-592.
- Thomson RCM. 1938. The reactions of mosquitoes to temperature and humidity. *Bull. Entomol. Res.* 29: 25-140.
- Timmermann SE, Briegel H. 1998. Molting and metamorphosis in mosquito larvae: a morphometric analysis. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft.* 71: 373-387.
- Timmermann SE, Briegel H. 1999. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 45: 461-470.
- Tomberlin JK, Adler PH, Myers HM. 2009. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environ. Entomol.* 38(3), 930-934.
- Tsunoda T, Kachi N, Suzuki J. 2014. Availability and temporal heterogeneity of water supply affect the vertical distribution and mortality of a belowground herbivore and consequently plant growth. *Plos One* 9(6): e100437. doi: 10.1371/journal.pone.0100437.
- Turkish AR, Sturley SL. 2009. The genetics of neutral lipid biosynthesis: an evolutionary perspective. *AJP: Endocr. Metab.* 297(1): E19-E27.
- Ueno T, Ueno K. 2007. The effects of host-feeding on synovigenic egg development in an endoparasitic wasp, *Itoplectis naranyae*. *J. Insect Sci.* 7(46): 1-13.
- van Alphen JJM, Visser ME. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 59-79.
- van Breugel F, Riffell J, Fairhall A, Dickinson MH. 2015. Mosquitoes use vision to associate odor plumes with thermal targets. *Curr. Biol.* 25: 1-7.

- van Handel E, Day JF. 1988. Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field collected *Aedes vexans*. J. Am. Mosquito Control Assoc. 4(4): 549-550.
- van Nouhuys S, Lei GC. 2004. Parasitoid-host metapopulation dynamics: the causes and consequences of phenological asynchrony. J. Animal Ecol. 73: 526-535.
- Van Valen L. 1973. A new evolutionary law. Evolutionary Theory 1: 1-30.
- Vargas RE, Walsh WA, Jang EB, Armstrong JW, Kanehisa DT. 1996. Survival and development of immature stages of four hawaiian fruit flies (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. Ann. Entomol. Soc. Am. 89(1): 64-69.
- Verdú JR, Arellano L, Numa C. 2006. Thermoregulation in endothermic dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae): Effect of body size and ecophysiological constraints in flight. J. Insect Physiol. 52: 854-860.
- Verdu JR, Diaz A, Galante E. 2004. Thermoregulatory strategies in two closely related sympatric *Scarabaeus* species (Coleoptera: Scarabaeinae). Physiol. Entomol. 29: 32-38.
- Vet LEM, Dicke M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. Annu. Rev. Entomol. 37: 141-172.
- Vet LEM, Hemerik L, Visser ME, Wäckers FE. 2002. Flexibility in host-search and patch-use strategies in insect parasitoids. In: Lewis EE, Campbell JF, Sukhdeo MVK (Eds.). The Behavioural Ecology of Parasites. CAB International, 3: 39-64.
- Vet LEM, Wäckers FE, Dicke M. 1991. How to hunt for hiding hosts: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. Neth. J. Zool. 41:202-213.
- Vinauger C, Lallement H, Lazzari CR. 2013. Learning and memory in *Rhodnius prolixus*: habituation and aversive operant conditioning of the proboscis extension response. J. Exp. Biol. 216: 892-900.
- Vinson SB. 1976. Host selection by insect parasitoids. Annu. Rev. Entomol. 21: 109-133.
- Vinson SB. 1984. The parasitoid-host relationship. En Bell WJ y Cardé RT Eds. Chemical Ecology of Insects. Chapman and Hall, Londres. pp. 205-233.
- Vinson SB. 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. Biological Control 11: 79-96.
- Vinson SB, Iwantsch GF. 1980. Host suitability for insect parasitoids. Annu. Rev. Entomol. 25: 397-419.
- Visser B. 2015. The evolutionary loss of lipogenesis in parasitoids. Entom. Berichten. 75(3): 114-121.
- Visser B, Ellers J. 2008. Lack of lipogenesis in parasitoids: A review of physiological mechanisms and evolutionary implications. J. Insect Physiol. 54(9): 1315-1322.
- Visser B, Le Lann C, den Blanken FJ, Harvey JA, van Alphen JJM, Ellers J. 2010. Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. Proc. Nat. Acad. Sci. 107(19): 8677-8682.
- Wajnberg E, Bernstein C, van Alphen J. 2008. Behavioral ecology of insect parasitoids: from theoretical approaches to field applications. Blackwell Pub. Malden, Massachusetts, United States. 445 pp.
- Wajnberg E, Ris N. 2009. Parasitism and biological control. En Thomas F, Guégan J-F, Renaud F, Eds. Ecology & evolution of parasitism. Oxford University Press. 224 pp.

- Wang G, Qiu YT, Lu T, Kwon HW, Jason Pitts R, Van Loon JJA, Takken W, Zwiebel LJ. 2009. *Anopheles gambiae* TRPA1 is a heat-activated channel expressed in thermosensitive sensilla of female antennae. *Eur. J. Neurosci.* 30: 967-974.
- Warren JT, Steiner B, Dorn A, Pak M, Gilbert LI. 1986. Metabolism of ecdysteroids during the embryogenesis of *Manduca sexta*. *J. Liq. Chromat.* 9(8): 1759-1782.
- Watson NL, Simmons LW. 2010. Reproductive competition promotes the evolution of female weaponry. *Proc. R. Soc. B.* 277: 2035-2040.
- Wertheim B, Vet LEM, 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, Argentina. 238 pp.
- Wiersema JH. 1987. A monograph of the Nymphaea subgenus *Hydrocallis* (Nymphaeaceae). *Systematic Botany Monographs* 16: 1-112.
- Wigglesworth, V.B. 1945. Transpiration through the cuticle of insects. *J. Exp. Biol.* 21: 97-114.
- Wurst S, De Deyn GB, Orwin K. 2012. Soil biodiversity and functions. En Wall DH, Bardgett RD, Behan-Pelletier V, Herrick JE, Jones H, Ritz K, Six J, Strong DR, van der Putten WH. (eds). 2012. *Soil Ecology and Ecosystem Services*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Wyatt TD. 2014. *Pheromones and animal behavior. Chemical signals and signatures*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 419 pp.
- Ybarrondo BA, Heinrich B. 1996. Thermoregulation and response to competition in the African dung beetle *Kheper nigroaeneus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Physiol. Zool.* 69: 35-48.
- Young IM, Blanchart E, Chenu C, Dangerfield M, Fragoso C, Grimaldi M, Ingram J, Monrozier LJ. 1998. The interaction of soil biota and soil structure under global change. *Global Change Biology* 4: 703-712.
- Zanek C, Delprino MR, Francescangeli N, Uviedo R. 2015. 50 años de estadísticas agroclimáticas en la Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro (1965-2014). Ediciones INTA, 1era Ed: E-book. San Pedro, Argentina. ISBN 978-987-521-604-4.
- Zar JH. 2010. *Biostatistical analysis*. 5th Ed. Prentice-Hall/Pearson. New Jersey, United States. 944 pp.
- Zermoglio PF, Latorre-Estivalis JM, Crespo JE, Lorenzo MG, Lazzari CR. 2015. Thermosensation and the TRPV channel in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 81: 145-156.
- Zermoglio PF, Robuchon E, Leonardi MS, Chandre F, Lazzari CR. 2017. What does heat tell a mosquito? Characterization of the orientation behaviour of *Aedes aegypti* towards heat sources. *J. Insect Physiol.* 100: 9-14.
- Zhang S, Fu W, Li N, Zhang F, Liu T-X. 2015. Antioxidant responses of *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) exposed to high temperature stress. *J. Insect Physiol.* 73: 47-52.
- Zhang W, Rudolf VHW, Ma C-S. 2015. Stage-specific heat effects: timing and duration of heat waves alter demographic rates of a global insect pest. *Oecologia* 179: 947-957. doi: 10.1007/s00442-015-3409-0.
- Zhou Y, Robinson A, Steiner U, Federle W. 2014. Insect adhesion on rough surfaces: analysis of adhesive contact of smooth and hairy pads on transparent microstructured substrates. *J. R. Soc. Interface* 11: 20140499. doi: 10.1098/rsif.2014.0499.

- Zhou X, Honek A, Powell W, Carter N. 1995. Variations in body length, weight, fat content and survival in *Coccinella septempunctata* at different hibernation sites. *Entomol. Exp. Appl.* 75: 99-107.
- Zopf LM, Lazzari CR, Tichy H. 2014a. Differential effects of ambient temperature on warm cell responses to infrared radiation in the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Neurophysiol.* 111: 1341-1349.
- Zopf LM, Lazzari CR, Tichy H. 2014b. Infrared detection without specialized infrared receptors in the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Neurophysiol.* 112: 1606-1615.

CAPÍTULO 9

Apéndice

Tablas

Tabla 9.1. Cuantificación de nutrientes en larvas de *M. ruficauda*. Número de larvas por grupo por tratamiento. Referencias: LI: larvas estadio I recién nacidas; LII: larvas de estadio II recién mudadas; LII+: larvas de estadio II que han esperado al hospedador por 30 días.

Tratamiento	Grupos	N de larvas / grupo
L I, principio de temporada	1 a 6	63
	7	60
L I, final de temporada	1 a 3	60
	4	59
	5	58
L II, principio de temporada	1 y 2	62
	3 a 8	61
	9	60
L II, final de temporada	1 a 4	64
	5 y 6	63
L II+, principio de temporada	1 a 7	60
	8	42
L II+, final de temporada	1 a 5	60
	6	53

Hipótesis explicativas de la disponibilidad de nutrientes en los huevos de *M. ruficauda* observada en distintos momentos de la temporada reproductiva

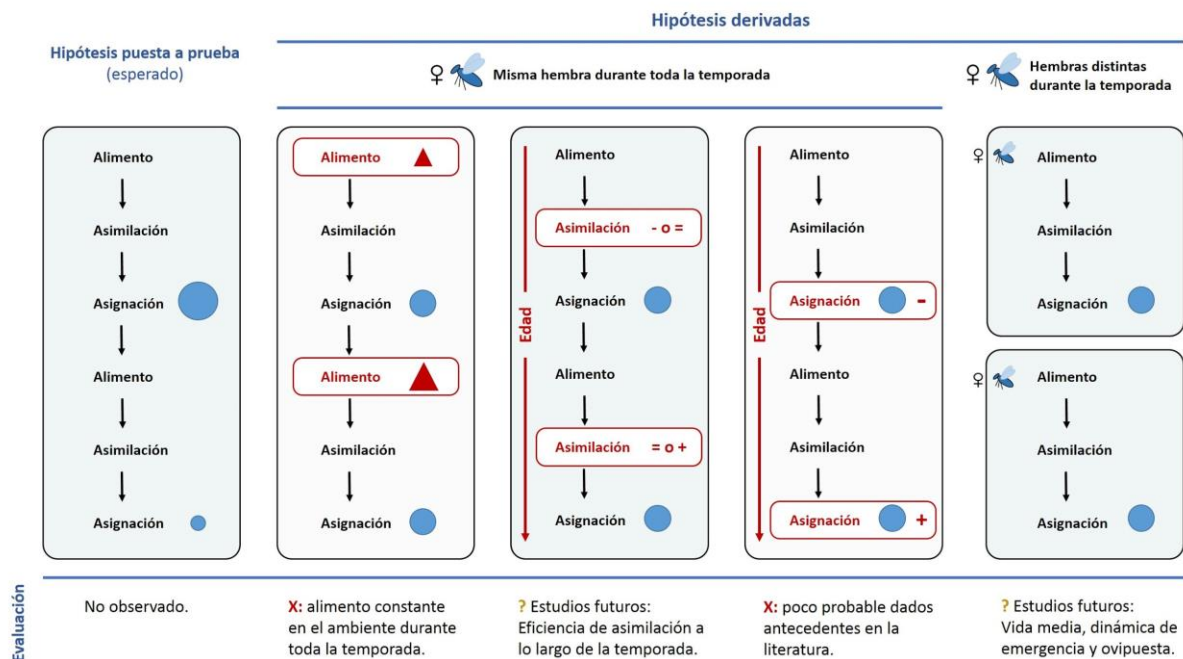


Figura 9.1. Resumen gráfico de las hipótesis derivadas a partir de los experimentos realizados en el Capítulo 3. Referencias: círculos: nutrientes asignados; triángulos: alimento ingerido por la hembra. Los distintos tamaños implican más nutrientes o más alimento, respectivamente.

Aspectos evolutivos relacionados con la existencia de una larva de primer estadio que no se alimenta

En el Capítulo 4 de esta Tesis se investigó si la larva de primer estadio de *M. ruficauda* es capaz de mudar sin alimentarse. En trabajos previos de otros autores se ha sugerido que la larva I de esta especie no se alimenta (Copello 1922, 1927, 1942, Musso 1983), pero hasta el momento ello no había sido puesto a prueba experimentalmente. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que, si bien la tasa de muda es menor, las larvas son capaces de mudar al segundo estadio en ausencia de alimento. La corroboración de la hipótesis de no alimentación implica que los recursos energéticos provenientes únicamente de la asignación de nutrientes a los huevos por parte de la hembra adulta serían suficientes para la supervivencia y muda de las larvas al estadio II.

Los estudios sobre la inversión energética de las hembras en su prole en especies con larvas que no se alimentan son muy limitados en insectos terrestres. No obstante, estos factores han sido ampliamente estudiados en organismos acuáticos de taxa muy diversos, y las conclusiones a las que arriban distintos autores parecen tener un alto grado de generalidad en distintos phyla. La alimentación de las larvas afecta la contribución parental requerida por cada descendiente (Strathmann 1978), de modo que la alimentación de las larvas y la inversión parental en los huevos pueden ser vistas como medios de nutrición alternativos (Strathmann 1985). En especies en las cuales las larvas de primer estadio se alimentan el tamaño de los huevos es menor, el esfuerzo reproductivo de las hembras es menor, y su fecundidad y longevidad son mayores que en especies lecitotróficas (*i.e.*, que sólo se alimentan de las reservas provenientes del huevo) (Strathmann 1978, 1985). Por ejemplo, en ácaros acuáticos se ha visto que los adultos de linajes con larvas que no se alimentan producen un menor número de huevos y tienen tamaños corporales más pequeños que aquellos provenientes de linajes con larvas que sí se alimentan (Smith 1998). Estas diferencias se observan también al comparar especies estrechamente relacionadas e incluso se han reportado entre poblaciones de la misma especie (Smith 1998). En insectos, si bien no existe bibliografía sobre especies cuyas larvas no se alimenten, experimentos en *Drosophila melanogaster* Meigen 1830 han mostrado que, en poblaciones seleccionadas para presentar desarrollo acelerado, una reducción de la tasa de alimentación de larvas del primer estadio está asociada con una menor inversión energética y una reducción en la duración del estadio (Prasad *et al.* 2001).

En *M. ruficauda* la hembra adulta se alimenta durante la temporada reproductiva (Castelo 2003, Copello 1927, Nussembaum 2007), y los recursos con que dispone deben repartirse entre su propio mantenimiento corporal y la producción de huevos (Boggs 1981). Dado que la hembra de *M. ruficauda* tiene una estrategia sinovigénica extrema (Nussembaum 2007), se esperaría que el costo de producir larvas que no se alimentan tuviera un efecto sobre sus parámetros reproductivos y

sobre su supervivencia, dado que debería asignar gran cantidad de recursos a la maduración de huevos que contengan suficientes nutrientes, recursos que no utilizará en su propio mantenimiento corporal. Siendo que la formación de larvas I sería costosa energéticamente y afectaría directamente el *fitness* del individuo, se esperaría que la persistencia evolutiva de este estadio estuviera ligada a ventajas adaptativas propias del estadio, o que constituyese un resabio de una condición ancestral. Aspectos particulares de la ecología de *M. ruficauda* posiblemente tengan influencia sobre el número de huevos que pone la hembra. Los insectos en general son considerados como “estrategas R”, organismos que priorizan el número de huevos por sobre su inversión individual en cada huevo (Schowalter 2011). Esta estrategia minimiza los efectos poblacionales de la alta mortalidad de los estadios inmaduros, aumentando la probabilidad de éxito reproductivo de la especie. Si bien no se han cuantificado, muchos factores en la ecología de *M. ruficauda* contribuirían a una alta mortalidad en los primeros estadios del desarrollo. Entre estos factores pueden contarse la dispersión de las larvas I al nacer por acción del viento (Castelo 2003, Castelo y Capurro 2000, Castelo y Corley 2004a, Castelo *et al.* 2006), la baja probabilidad de encuentro del hospedador (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a, Castelo y Lazzari 2004) y la existencia de competencia intraespecífica por superparasitismo (Barrantes 2015, Castelo 2003, Crespo 2011, Crespo y Castelo 2009). Teniendo todos estos factores en cuenta, se esperaría que la estrategia de las hembras sea poner un gran número de huevos y aumentar así su probabilidad de éxito reproductivo. En efecto, se ha reportado que el número medio de huevos por desove es de 328 (Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a), un valor alto entre los asílidos (Dennis *et al.* 2013). Las hembras adultas se enfrentarían entonces a una gran inversión energética a la hora de poner huevos, pues éstos deben ser numerosos pero contener nutrientes suficientes para permitir la existencia de un primer estadio larval que no se alimente. A continuación se discuten los posibles escenarios que podrían explicar esta aparente paradoja.

La existencia de un primer estadio larval que no se alimenta, como el de *M. ruficauda*, y su persistencia en el tiempo son evaluadas a continuación en el marco de la historia evolutiva del grupo. Por un lado, se discuten las características de la historia de vida de *M. ruficauda* que podrían considerarse resabios evolutivos de ancestros con características diferentes a las que se observan hoy en día. Por otro lado, se identifican las posibles ventajas adaptativas que podría ofrecer la existencia del estadio larval I que no se alimenta, que compensen el costo que representa su producción para las hembras. Ambas perspectivas podrían considerarse independientemente o de forma complementaria.

El hábito parasitoide en los dípteros ha aparecido numerosas veces a lo largo de la historia evolutiva del grupo, particularmente asociado a especies cuya vida se desarrolla en estrecha relación con el sustrato (Eggleton y Belshaw 1992, 1993, Feener y Brown 1997). Entre los dípteros, los

asílicos son un grupo monofilético (Bybee *et al.* 2004, Dikow 2009a, b) en el que se estima que un 20% de las especies tienen hábito parasitoide, y se postula que el hábito parasitoide ha aparecido independientemente en muchas ocasiones dentro de la familia a partir de ancestros depredadores (Eggleton y Belshaw 1992, Feener y Brown 1997).

Para explicar la evolución del parasitoidismo en dípteros a partir de ancestros depredadores se han propuesto diferentes mecanismos (Eggleton y Belshaw 1992). Por un lado, Erwin y Erwin (1976) propusieron, inicialmente para coleópteros carábidos, un modelo evolutivo en el que el ancestro sería un depredador polífago, con ovipuesta alejada del hospedador pero dentro de su hábitat, y con larvas activas en todos sus estadios. Como consecuencia del agrupamiento espacial de alguna de sus presas, el depredador habría adoptado primeramente la monofagia, reduciendo la movilidad en sus estadios tardíos pero conservando un primer estadio larval con capacidad de búsqueda activa. Posteriormente, por un cambio en el grado de dispersión de las presas y un consecuente aumento del gasto de locomoción entre presas, el depredador habría disminuido su tamaño y la asociación con una única presa hubiera dado lugar a la aparición del parasitoidismo. Por otro lado, un segundo mecanismo fue propuesto por Berg y colaboradores (Berg 1964, Berg *et al.* 1959) para dípteros de la familia Sciomyzidae, depredadores y parasitoides de caracoles. En este modelo, las larvas jóvenes ingresan dentro de la concha del caracol, inicialmente causando poco daño sobre la presa, daño que aumenta a medida que la larva crece, pero que permite que el caracol sobreviva más tiempo luego del ataque. Luego sucedería una reducción del rango de presas que consume el depredador y la aparición de la pupa tendría lugar dentro de la última presa consumida. En este modelo, la hembra adulta pondría los huevos directamente sobre la presa, en vez de contar con una larva de primer estadio buscadora. Por último, la reducción del número de presas a una única presa daría paso a la aparición del parasitoidismo. Se ha indicado que muchos asílicos podrían haber seguido el camino evolutivo descrito para Sciomyzidae (Eggleton y Belshaw 1992). No obstante, en el género *Mallophora* las especies identificadas como parasitoides (*M. ruficauda*, Copello 1922 y 1927; y *M. media*, Clements y Bennett 1969) poseen una serie de rasgos distintivos que las alejan de este modelo: tienen ovipuestas alejadas del hospedador, conservan larvas de estadios tempranos móviles y las larvas se aferran al hospedador de manera externa (*i.e.*, son ectoparasitoides). En la mayoría de los parasitoides dípteros que dependen de los estadios inmaduros para encontrar al hospedador se producen larvas que buscan activamente, y éstas han evolucionado independientemente en numerosas familias (Feener y Brown 1997). De esta forma, no podría descartarse que la prevalencia en *Mallophora* de larvas tempranas buscadoras hubiera seguido un camino evolutivo diferente al propuesto para otros asílicos parasitoides y que un escenario más parecido al descrito para carábidos pueda ser el indicado para entender los procesos

y mecanismos que llevaron a la aparición del parasitoidismo en este grupo.

Aceptando como válida la hipótesis de un ancestro depredador, aún no quedaría claro en qué estadio larval habría surgido la capacidad de ataque al hospedador en *M. ruficauda*. Por un lado, en la mayoría de los parasitoides dípteros son las larvas móviles de primer estadio quienes hacen contacto con el hospedador (Eggleton y Belshaw 1993), por lo que cual podría especularse que el primer estadio larval haya adoptado evolutivamente el hábito parasitoide por alguno de los mecanismos antes descritos. Por otro lado, los estudios más completos sobre la morfología y alimentación de larvas de asílidos (Musso 1978, 1981, 1983) indican que las larvas de primer estadio no se alimentan. Estos resultados, aunque están basados mayormente en el estudio de dos especies depredadoras (*M. rusticus* y *M. pilipes*) y no incluyen ningún ejemplo de especies con hábito parasitoide, han sido considerados como generales para la familia. Teniendo en cuenta que el hábito parasitoide surgió independientemente en numerosas familias dentro de los dípteros y que los asílidos son un grupo monofilético, una posibilidad sería que el parasitoidismo en esta familia hubiera surgido a partir de ancestros depredadores cuya larva I no se alimenta. En este contexto, el surgimiento en el segundo estadio larval de la capacidad de detectar y atacar al hospedador, dada su asociación estrecha con las presas que consumía activamente, sería el mecanismo más parsimonioso de aparición del parasitoidismo. Este escenario sería coherente con las observaciones biológicas hechas en *M. ruficauda*: la larva de primer estadio no se orienta al hospedador ni requiere alimentarse (Crespo y Castelo 2008; el presente trabajo). A su vez, estaría en concordancia con que la larva II es quien tiene la capacidad de orientarse al hospedador y lo hace activamente, para lo cual utilizan los palpos maxilares y las antenas (Crespo *et al.* 2011, Pueyrredon 2016, Pueyrredon *et al.* 2017), estructuras poco desarrolladas en la larva I (Crespo *et al.* 2011, Fabiano 2018).

Una aparente contradicción podría plantearse al examinar la única otra especie del género *Mallophora* en la que se ha descrito parasitoidismo, *M. media*, en la que la larva del primer estadio sí se alimenta del hospedador (Clements y Bennett 1969). Las diferencias en los hábitos alimenticios entre esta especie y el resto de los asílidos fueron comentadas por Musso (1983) en su trabajo sobre los requerimientos nutricionales de esta familia, quien apunta que un estudio más detallado de *M. media* posiblemente descarte tales diferencias. Es importante mencionar que Clements y Bennett (1969) reportaron que *M. media* posee únicamente cuatro estadios larvales (frente a los cinco estadios de *M. ruficauda*). Los caracteres morfológicos utilizados para distinguir las larvas de estadio I de las de estadio II en asílidos fueron ampliamente descritos por Musso (1978, 1981). En Clements y Bennett (1969), las descripciones no proporcionan la profundidad necesaria para poder comparar las larvas del primer estadio de *M. media* con las de primer y segundo estadio del resto de los asílidos, y existe la posibilidad de que la larva de primer estadio descrita para *M. media*

corresponda en verdad a un segundo estadio larval. Por ejemplo, la presencia de un diente apical, o *ruptor ovi*, una estructura conspicua, fuertemente esclerotizada, presente en larvas de primer estadio de varias especies de asílidos (incluida *M. ruficauda*) y que tendría la función de ruptura del corion del huevo al nacimiento (Musso 1978 y 1981), no fue descrita por Clements y Bennett (1969) en el primer estadio de *M. media*. De la misma manera, la duración del primer estadio larval (“seis semanas o más” según Clements y Bennett, 1969) parece asemejarse más a la del segundo estadio de *M. ruficauda* (6 a 22 semanas, Crespo 2007, Crespo y Castelo 2010). Casos similares en que un estadio no ha sido advertido en la primera descripción de los estados y estadios de desarrollo de una especie no son infrecuentes, y entre los ejemplos se encuentra la misma *M. ruficauda*, para la cual Copello (1927, 1942) describió inicialmente cuatro estadios larvales, el primero de duración de nueve meses, y en la que luego se corroboró la existencia de un primer y segundo estadios separados (Crespo y Castelo 2008, 2010). De esta manera, la aparente contradicción planteada por *M. media* podría ser el fruto de una descripción incompleta de los estadios larvales de esta especie, y se requieren más estudios para corroborar los hábitos alimenticios de sus distintos estadios larvales. En conclusión, no se cuenta con información suficiente para establecer el origen del parasitoidismo en el género *Mallophora*, ni en ninguna de sus especies. Para dilucidar el camino evolutivo, se requiere de información morfológica básica detallada de más especies, estudios ecológicos y comportamentales, y es necesario realizar estudios filogenéticos que incluyan especies del género, tanto depredadoras como parasitoides, desde una perspectiva amplia (Dikow 2009b).

Cualquiera sea el camino evolutivo que ha derivado en que *M. ruficauda* sea un parasitoide con larva I que no se alimenta ni busca al hospedador, el interrogante sobre la permanencia evolutiva de este estadio, dado el costo que representa para las hembras su producción, permanece abierto. Desde una perspectiva evolutiva, podrían plantearse dos hipótesis: a) que el estadio I sufriera un acortamiento en su duración y terminase desapareciendo y, b) que la persistencia del estadio I proporcionase ventajas adaptativas que compensen el gasto en su producción (quizás aplicables también a asílidos depredadores). Ambos escenarios son discutidos a continuación.

Reducción en el número de estadios larvales o en su duración

La variabilidad en el número de estadios larvales en los insectos se ha estudiado en numerosos grupos, particularmente desde la perspectiva de la plasticidad fenotípica (Esperk *et al.* 2007). Diversos grupos de insectos reaccionan a las condiciones ambientales y de disponibilidad de alimento alterando el número de estadios larvales por los que transcurren antes de alcanzar el estado adulto (Barraclough *et al.* 2014, Esperk *et al.* 2007, Gould *et al.* 2005, Morales-Ramos *et al.* 2010). Esta plasticidad en el número de estadios larvales ha sido sugerida como mecanismo para asegurar que el estadio capaz de sobrevivir en condiciones desfavorables aparezca en el momento

correcto del año (Esperk *et al.* 2007). Los estudios acerca del número de estadios larvales en los insectos en un marco evolutivo, sin embargo, son más escasos. En especies de coleópteros subterráneos se ha reportado la reducción del número de estadios larvales desde estados ancestrales con mayor número de estadios, interpretándola como una estrategia de escape a la depredación en los estadios más vulnerables del desarrollo (Culver 1982, Cieslak *et al.* 2014). Por otra parte, estudios filogenéticos en dípteros han reportado una disminución del número de estadios larvales asociado con la aparición del hábito carnívoro (Kutty *et al.* 2014). El número de estadios larvales en los asílidos varía entre cuatro y siete (Dennis *et al.* 2013), pero sólo se ha descrito en profundidad para unas pocas especies: *Promachus yesonicus* Bigot 1887 (5 estadios, Kinoshita 1940), *Mac. rusticus* (7 estadios, Musso 1978, 1981), *M. ruficauda* (5 estadios, Crespo y Castelo 2010) y *M. media* (4 estadios, Clements y Bennett 1969, ver discusión más arriba). La plasticidad en el número de estadios para este grupo no ha sido reportada, aunque Musso (1978, 1981) indica que en *Mac. rusticus* el último estadio larval es capaz de mudar varias veces sin incrementar su tamaño y que la duración de los dos últimos estadios es dependiente de la temperatura. Como se ha mencionado anteriormente, no se cuenta con información detallada de suficientes especies de asílidos que apoye o refute la hipótesis de reducción del primer estadio larval asociado al hábito parasitoide en esta familia. En el género *Mallophora* se han llevado a cabo estudios filogenéticos basados en caracteres morfológicos de los adultos (Artigas y Angulo 1980, Artigas y Reyes 1977), con resultados contradictorios (*i.e.*, grupos emparentados según ciertos caracteres están alejados si se toman en cuenta otros). No obstante, estos estudios no contemplan ni concluyen sobre los hábitos alimentarios ni el número de estadios larvales de los distintos *clusters*, y serían necesarios más estudios sobre las relaciones filogenéticas entre las especies del género y respecto al resto de la familia. Para tener una idea más cabal de la historia evolutiva de los asílidos parasitoides se requeriría el estudio de la ontología de más especies, la identificación definitiva del número de estadios larvales y de la ocurrencia o no de verdadero parasitoidismo.

Posibles ventajas adaptativas de la persistencia de un primer estadio larval que no se alimenta

Entre los dípteros parasitoides, la existencia de larvas móviles (*triungulina* y *planidium*) está asociada a una estrategia de búsqueda compartida del hospedador, donde las hembras por lo general ubican el hábitat del hospedador y son los estadios inmaduros quienes completan la búsqueda y llevan a cabo el aferramiento (Eggleton y Belshaw 1992, 1993). El desarrollo en este grupo de larvas móviles que buscan al hospedador activamente ha evolucionado independientemente en numerosas familias (Feener y Brown 1997) y, dado su pequeño tamaño, ha permitido a los dípteros parasitoides la explotación de hospedadores ocultos en el sustrato, que

serían de otro modo inaccesibles para muchas especies (Eggleton y Belshaw 1993, Feener y Brown 1997, Price 1975). En los asílidos las larvas móviles de tipo *planidium* son comunes y han sido descritas para varias especies (Musso 1978, 1981). En *M. ruficauda* tanto el estadio I como el II son móviles, pero sólo la larva de estadio II presenta orientación activa hacia el hospedador (Crespo y Castelo 2008). Podría especularse, sin embargo, que el primer estadio juegue algún rol en la búsqueda y encuentro del microhábitat de los hospedadores. De hecho, si bien no se orientan activamente, se ha visto que las larvas I aumentan su motivación a iniciar movimientos cuando son expuestas a claves provenientes del hospedador (Crespo y Castelo 2008). No obstante, siendo que las larvas de estadio II son buscadoras activas, el encontrarse posicionado en el microhábitat de los hospedadores desde un estadio anterior sería ventajoso únicamente en el caso de que la primera larva que se aferrase al hospedador tuviese mayores probabilidades de supervivencia frente al superparasitismo. Este no sería el caso para *M. ruficauda*, ya que se ha visto que en los casos de superparasitismo el orden de llegada de las larvas al hospedador no define cuál de ellas prevalece (Barrantes 2015).

En los parasitoides, el comportamiento de búsqueda del hospedador depende de la disponibilidad de hospedadores y de la densidad del parasitoide (Cook y Hubbard 1977, Hubbard y Cook 1978, Stamp 1982). La disponibilidad de hospedadores para *M. ruficauda* está signada por la agregación de los mismos en parches, de modo que ciertas áreas proveen altas densidades de hospedadores mientras que zonas adyacentes carecen de hospedadores por completo (Castelo 2003, Castelo y Capurro 2000). A su vez, la densidad de las larvas parasitoides en el suelo se ve afectada en gran medida por el factor inicial de dispersión al momento del nacimiento, el viento (Castelo 2003, Castelo y Capurro 2000, Castelo y Corley 2004a, Castelo *et al.* 2006). Poseer mecanismos de dispersión una vez que las larvas se encuentran en el suelo, y antes de ser funcionalmente capaces de orientarse al hospedador (estadio II), podrían beneficiar al parasitoide al disminuir los efectos denso-dependientes de la competencia intraespecífica por superparasitismo. En este sentido, si bien la producción de la larva de estadio I representa una inversión energética importante, podría considerarse un factor de dispersión adicional que incrementaría las probabilidades de éxito del parasitoide.

Las dos alternativas discutidas previamente (*i.e.*, el posible rol de la larva de primer estadio como buscadora de microhábitat del hospedador o como factor de dispersión) deben ser relativizadas a la ontología de la especie. Por un lado, la duración del estadio I es muy corta: 4 a 7 días, dependiendo de las condiciones del sustrato y la temperatura (Crespo y Castelo 2010; el presente trabajo). Por otro lado, sólo las larvas nacidas hacia finales de la temporada reproductiva presentan algún grado de superposición temporal con el estadio del hospedador que es

preferentemente atacado. Las larvas que nacen a principios de la temporada deben esperar al hospedador en el ambiente por un tiempo prolongado, más de ocho veces superior al tiempo que tarda la larva I en mudar (desde fines de diciembre hasta fines de febrero, Crespo 2007, Crespo y Castelo 2010). Este desfase temporal implicaría que cualquier efecto antes descrito sólo podría tener alguna influencia parcial en las larvas nacidas a finales de la temporada, pero escasa en las de principios de temporada. No podría descartarse que durante la historia evolutiva de la especie el estadio I haya cumplido alguna de estas funciones en alguna medida y que, ante un desfase de los ciclos del parasitoides y el hospedador, haya dejado de representar una ventaja adaptativa para la larva temprana en el presente. Sin embargo, dado que las escalas temporales de muda y espera del hospedador son muy disímiles, esto parecería poco probable.

Por último, una tercera alternativa a considerar sería que, si el adulto puede forrajear en un área grande y proveer suficientes recursos para completar el desarrollo, la posesión de una larva que no requiera alimentarse pero que sea móvil y tenga la capacidad de encontrar un refugio permitiera que la especie subsista en ambientes más extremos (Poulson y White 1969). La distribución geográfica de *M. ruficauda*, aunque amplia (Artigas y Angulo 1980), y las anotaciones sobre la biología de la especie (Copello 1922, 1927, 1942, Castelo 2003), no parecen mostrar sin embargo que habite en ambientes con condiciones extremas. De esta manera, la hipótesis de la ventaja ante condiciones desfavorables no contaría con apoyo para *M. ruficauda*. Debe mencionarse, no obstante, que al menos en parte de su rango de distribución podría estar sujeta a variaciones temporales y espaciales pronunciadas. En la Región Pampeana, por ejemplo, son comunes tanto las sequías como las inundaciones (Aragón *et al.* 2011). Sin embargo, dado que tanto el estadio I como el II se ven sometidos a tales condiciones, la hipótesis aún no explicaría la persistencia del primer estadio larval.

El ciclo de vida de *M. ruficauda* presenta una serie de particularidades que hacen de esta especie un modelo interesante para estudiar aspectos fisiológicos, comportamentales y evolutivos de los parasitoides, y en particular de los parasitoides dípteros. Entre estos aspectos, se encuentra el hecho de que las larvas de primer estadio no se alimentan. Hasta el momento, los diversos mecanismos evolutivos posibles, postulados para otras especies y grupos, sólo podrían explicar parcialmente los comportamientos observados. Se espera que en los años venideros nuevos descubrimientos en esta y otras especies de parasitoides aporten más elementos para dilucidar el camino evolutivo que derivó en los patrones observados en el presente.

Peso de hospedadores en el campo

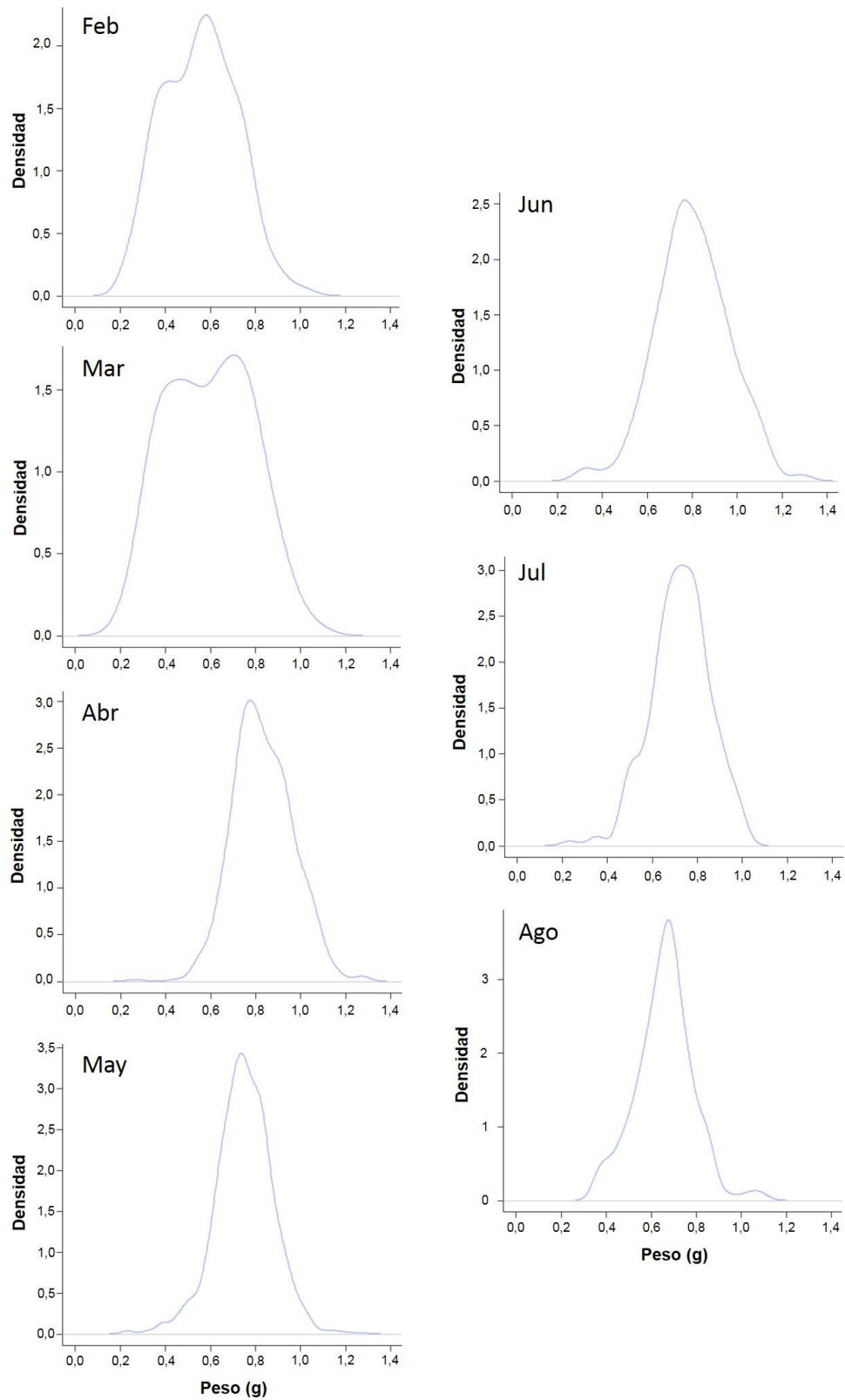


Figura 9.2. Funciones de densidad de los pesos corporales de las larvas de *C. signaticollis* de campo discriminados por mes.