Naturalis
Repositorio Institucional
http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Biología reproductiva del ectoparasitoide Dineulophus phtorimaeae De Santis y su interacción con el endoparasitoide Pseudapanteles dignus (Muesebeck). Implicancias para el control biológico de la polilla del tomate Tuta absoluta (Meyrick)

Savino, Viviana
Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Coviella, Carlos Eduardo
Co-dirección: Luna, María Gabriela

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2014

Acceso en:
http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20150223001378

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

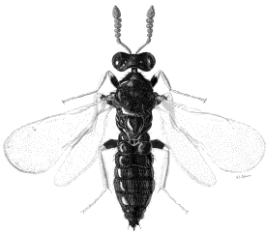
Naturalis Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Universidad Nacional de La Plata

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales

Biología reproductiva del ectoparasitoide *Dineulophus phthorimaeae* De Santis y su interacción con el endoparasitoide *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck). Implicancias para el control biológico de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick)



Lic. Vivina Savino

Directores

Dr. Carlos Eduardo Coviella y Dra. María Gabriela Luna

Jurados

Dra. Silvia Adriana Salvo, Dr. Eduardo Gabriel Virla

y Dr. Diego Fernando Segura

2014

A mi familia

Agradecimientos

Al *Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva* y a la *Universidad Nacional de Luján* por la financiación recibida través del Programa de Formación de Doctores en Áreas Tecnológicas Prioritarias (PFDT - PRH Nº19) para la realización de este proyecto de tesis, así como también al Proyecto Nº 585 correspondiente al Programa de Incentivos a Docentes-Investigadores del Ministerio de Cultura y Educación de La Nación.

A mis directores *Carlos* y *Gaby*, por sus enseñanzas, su profesionalismo y su trabajo codo a codo. Por sus contemplaciones y por respetar mis tiempos. Gracias por sus exigencias, porque me han enseñado a trabajar con excelencia.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes ya que han enriquecido la versión final de esta tesis doctoral.

A la *Dirección del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), Dras. Alda González y Graciela Navone* y todo su personal, por permitirme llevar a cabo las tareas de investigación de laboratorio y campo en dicho Instituto.

Al grupo de *Ecología de Plagas*, especialmente a las *Norma Sánchez, Patricia Pereyra, Nancy Greco, Claudia Cédola, Martha Roggiero y Gerardo Liljesthröm*, por permitirme formar parte de su grupo durante estos años. Ha sido un honor inmenso haber trabajado a su lado.

Muy especialmente a una persona maravillosa, *la Dra. Fernanda Cingolani*, que siempre ha estado a mi lado, en las buenas y sobre todo en las malas. No voy a olvidar nunca todo lo que me has ayudado.

A los *compañeros del laboratorio del CEPAVE*, las *Dras. Eliana Nieves, Fernanda Gugole, Margarita Rocca* y a *Nicolás Cluigt* por los almuerzos, mates y otros momentos compartidos. A dos personas con las que he compartido mi laboratorio y que he aprendido muchas cosas de ambos, a *Mariano Lattari* y *Nadia Salas*.

A mi compañera de muestreos *Julia Rouaux* por esas salidas al campo en pleno verano, por su ayuda, pero por sobre todas las cosas por su amistad.

A todos los pasantes que han colaborado en mis tareas, a *Cristian De Battista, María Zubillaga, Denise Paoletti, Sofía Capasso, Consuelo Vallina* y *Yamila Vaio*.

A *Guillermo Reboredo* por su ayuda incondicional en cada uno de los muestreos de campo.

A *Luis Giambelucca* por su asesoramiento y asistencia.

A *Marcela Schneider, Naty Francesena, Luciana Mirande* y *Marina Haramboure* por compartir momentos de charlas y haberme hecho sentir con su compañía parte de su laboratorio

A todo el Laboratorio de Ecología de la Universidad Nacional de Luján: *Leonardo Malacalza, Liliana Falco, Patricia Gantes, Anibal Sanchez Caro, María Eugenia García, María Andrea Casset, Fernando Momo, César Di Ciocco, Andrés Duhour, Marina Santadino, Rosana Sandler, María Riquelme, Ricardo Castro Huerta, Mónica Díaz Porres, Karina Aguilar, Constanza Ranieri, Nadia Codugnello y Laura Rigacci.*

Al *Laboratorio de Control Biológico del PROIMI*, entre ellos a. *Eduardo Virla*, a *Erica Luft*, a *Eduardo Frías*, *Martín Espinosa*, *Alvaro Foieri* y *Victoria Coll*, por su buena predisposición y generosidad en los muestreos llevados a cabo en la provincia de Tucumán.

A mis amigas del alma *Solange Faura* y *Yamila Vaio*, por toda su contención, consejos y ayuda de siempre y más especialmente durante esta etapa.

A mi *familia* por toda su ayuda y amor, muy especialmente a mi *mamá*, por su compañía y amor, y a mis hermanos *Toia, Juan, Mono y Dolly*, a *Maga, Laura y Pablo* y a mis *sobrinos*.

A *mi papá* que me enseñó que no hay edad para terminar ciertas cosas y empezar otras. Y a mis *ángeles guardianes*…

A lo más importante que tengo en la vida, a mis amores, a *Edu* por estos 20 años de puro amor, por su inmensa generosidad para apoyarme y contenerme en toda mi carrera, por hacerme volver a mi centro cuando me sentía desorientada; a mis hijos: a *Pedro y Nico* porque no me conocen sin estar estudiando algo y me han aguantado tanta locura,

pero me han enseñado a ordenar mis prioridades cada vez que me sentía abrumada y a *Manu*, mi regalito del cielo, que fue el que terminó de ordenar y poner las cosas en su lugar en mi vida. Los amo profundamente!

Índice

Resumen.....i

Abstract.....v

Capítulo 1. Introducción General y Sistema de Estudio**…….1**

El control biológico como estrategia del manejo integrado de plagas.....2

El uso de parasitoides para el control biológico de plagas.....7

El papel de la competencia entre enemigos naturales para el control biológico, con énfasis en especies de parasitoides.....10

Sistema de estudio: El cultivo de tomate, su manejo sanitario y posibilidades para la implementación de un MIP..... 11

Control biológico de Tuta absoluta.....17

Biología del ectoparasitoide Dineulophus phthorimaeae**.** 20

Biología del endoparasitoide Pseudapanteles dignus.....22

Objetivos e hipótesis del trabajo de tesis.....23

Capítulo 2. Ecología reproductiva del ectoparasitoide **D. phthorimaeae……26**

Estrategias reproductivas y comportamiento de alimentación de los parasitoides.....27

La respuesta funcional de insectos parasitoides.....33

Objetivos, hipótesis y predicciones.....36

Materiales y Métodos.....38

Colonias de insectos.....38

Determinación de la estrategia de ovigenia de D. phthorimaeae……..41

Experimento 1: tipo de maduración de huevos y reabsorción.....41

Experimento 2: tipo de estrategia de ovigenia.....42

Evaluación de diferentes fuentes de alimento sobre el éxito reproductivo de la hembra de D. phthorimaeae.....43

Análisis de la respuesta funcional de D. phthorimaeae.....46

Resultados.....49

Determinación de la estrategia de ovigenia.....49

Experimento 1: Tipo de maduración de huevos de D. phthorimaeae *reabsorción*.....49

Experimento 2: Tipo de estrategia de ovigenia de D. phthorimaeae.....51
Evaluación de diferentes fuentes de alimento sobre el éxito reproductivo de D. phthorimaeae.....52
Analisis de la respuesta funcional.....53
Discusión.....57

***Capítulo 3. Competencia interespecífica entre el ectoparasitoide* D. phthorimaeae *y el endoparasitoide* P. dignus.....63**
Ecología de comunidades de insectos parasitoides.....64
Competencia entre insectos parasitoides.....66
Objetivo, hipótesis y predicciones.....71
Materiales y Métodos.....72
Evidencia de multiparasitismo a campo.....72
Ensayo de competencia interespecífica en el laboratorio.....74
Resultados.....76
Evidencia de multiparasitismo a campo.....76
Competencia interespecífica en el laboratorio.....77
Discusión.....81

***Capítulo 4. Interacción a campo de los parasitoides larvales* D. phthorimaeae *y* P. dignus.....87**
Interacción interpecífica entre enemigos naturales y su implicancia en el control biológico.....87
Antecedentes de estudios del parasitismo de T. absoluta *a campo*.....89
Objetivo, hipótesis y predicciones.....91
Materiales y Métodos.....92
Descripción de los sitios de muestreo.....92
Procesamiento de las muestras.....97
Tasas de parasitismo.....98
Análisis de la densodependencia del parasitismo a campo.....99
Resultados.....100

Parasitismo de D. phthorimaeae, P. dignus *y de larvas de* T. absoluta *multiparasitadas*……100
Análisis de la densodependencia de ambas especies de parasitoides a campo…...….107
Discusión……...115

***Capítulo 5. Consideraciones finales*……119**

***Bibliografía*……...125**

Resumen

El *control biológico* consiste en la utilización de una o varias especies de enemigos naturales para reducir la densidad poblacional de una plaga. Estos enemigos naturales o agentes de control biológico pueden ser manipulados, ya sea introduciéndolos, aumentando su número, o conservándolos en el agroecosistema. Los *insectos parasitoides*, en especial los pertenecientes al orden Hymenoptera, son considerados importantes agentes de control biológico por su ubicuidad, eficiencia de búsqueda y ataque de hospedadores y por su especialización en una o unas pocas especies hospedadoras. Su particularidad se centra en su ciclo de vida, en el cual el estado larval es parásito de otras especies de artrópodos, alimentándose a expensas de su hospedador. Como producto de la interacción, éste último invariablemente muere. A su vez en su estado adulto son de vida libre y se alimentan de néctar, polen, *honeydew* y algunos de ellos de fluidos y/o tejidos de sus hospedadores, comportamiento denominado *host-feeding*.

Los parasitoides pueden ser clasificados de muchas maneras, *koinobiontes* e *idiobiontes*, *ecto* o *endoparasitoides*, *pro-* o *sinovigenicos,* etc. Evolutivamente, la idiobiosis condujo al desarrollo de aspectos distintivos de la historia de vida de estos insectos. De esta forma es posible predecir la capacidad competitiva de los parasitoides en base a sus historias de vida, donde la teoría menciona que los koinobiontes, que permiten el desarrollo de su hospedador después de ser parasitados, son casi siempre competitivamente inferiores a los idiobiontes que paralizan permanentemente a su hospedador.

La gran mayoría de los insectos son atacados por más de una especie de parasitoides. En general estos complejos de especies están conformados por entidades taxonómicamente diversas. El complejo de parasitoides que ataca a una especie hospedadora particular es considerada una *comunidad de parasitoides*. Como unidad ecológica menor se distingue el *gremio de parasitoides,* clasificación ésta de relevancia para el estudio de las interacciones interespecíficas, como por ejemplo la competencia. Si bien la teoría ecológica predice que dos especies animales no pueden existir y desarrollarse explotando un mismo recurso en un medio ambiente constante, en la naturaleza se observa que numerosas especies coexisten.

En este sentido, un fenómeno importante del comportamiento de los parasitoides es el *multiparasitismo,* que ocurre cuando un mismo hospedador es parasitado por dos o

más hembras pertenecientes a diferentes especies de insectos. Este evento implica el desarrollo de mecanismos de competencia interespecífica entre las especies de parasitoides.

Numerosos autores reconocen dos tipos principales de competencia: por *explotación*, y por *interferencia*. La competencia entre especies de parasitoides por un mismo hospedador puede ser de gran importancia para la estabilidad del sistema, y ha conducido a la evolución de un amplio rango de características fisiológicas y de comportamiento de estos insectos, como resultado de la diversificación del uso de los recursos. Otros aspectos, como por ejemplo, los demográficos también influyen en la competencia entre especies de parasitoides. La *coexistencia* de las especies de parasitoides puede ser promovida por la variabilidad espacial y temporal del uso del recurso, o cuando la especie más eficaz en la competencia se ve limitada por otras condiciones ambientales.

La polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), es una plaga importante en Sudamérica y desde hace una década aproximadamente ha aumentado su relevancia a nivel mundial debido a su introducción accidental en Europa, dispersándose rápidamente hacia el norte de África y el este de Asia. El estadio larval de esta plaga causa daños a las plantas alimentándose del mesófilo de las hojas y tallos, causándole deficiencias fisiológicas, y cuando su densidad poblacional es abundante, pueden a su vez dejar marcas sobre los frutos, restándole valor comercial. Dado que las estrategias de control de *T. absoluta* en la actualidad parecen limitadas, basadas principalmente en el control químico, el control biológico resulta ser una herramienta importante para desarrollar. En Sudamérica se ha reportado un rico complejo de enemigos naturales, entre los cuales se encuentran depredadores y parasitoides que atacan a esta especie en sus diferentes estadios. Dentro del conjunto de parasitoides larvales, son importantes el ectoparasitoide *Dineulophus phthorimaeae* De Santis (Hymenoptera: Eulophidae) y el endoparasitoide *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae).

Los objetivos de esta tesis doctoral fueron, en primer lugar, completar el conocimiento sobre algunos parámetros de la *ecología reproductiva* del ectoparasitoide *D. phthorimaeae*, a saber: 1- determinar la estrategia de ovigenia; 2- conocer la respuesta funcional de esta especie, y 3- evaluar si diferentes fuentes alternativas de

alimento influyen en su éxito reproductivo. Estos parámetros son abordados en el Capítulo 2. En segundo lugar, resulta importante evaluar aspectos de la *competencia* entre estas dos especies de parasitoides larvales de *T. absoluta*, mediante ensayos de laboratorio, estudiados en el Capítulo 3. Finalmente, determinar la *interacción* de ambas especies cuando co-ocurren en el cultivo de tomate, a escala de planta, que son tratados en el Capítulo 4.

Los resultados obtenidos indican que *D. phthorimaeae* presenta una estrategia reproductiva extremadamente *sinovigénica*, es decir, que la hembra al momento de la emergencia carece del complemento de oocitos maduros, los cuales va madurando durante su vida adulta. Con respecto al análisis de la respuesta funcional, por medio de regresiones logísticas se determinó una *respuesta denso-independiente* de la curva de parasitismo para las densidades testeadas (Tipo I). La evaluación experimental del efecto de alimentos alternativos y hospedadores (*host-feeding)* mostró que este último comportamiento no sólo mejora el fitness de las hembras del parasitoide, sino que reveló la importancia que el mecanismo de *host-feeding* de *D. phthorimaeae,* tiene sobre su hospedador, causando una mortalidad significativa.

Los ensayos de competencia entre ambos parasitoides bajo condiciones de laboratorio evidenciaron que las hembras de *D. phthorimaeae*, dependiendo de su edad utilizaron a los hospedadores de forma diferente, evitando atacar a aquellas larvas que se encontraban previamente parasitadas. Sin embargo, a los 5 y 7 días de vida adulta, las hembras no evitan utilizar larvas previamente parasitadas. Este resultado sugiere que el ectoparasitoide podría reconocer y discriminar larvas previamente parasitadas por la otra especie.

Con respecto al análisis de la densodependencia y la interacción de *D. phthorimaeae* y *P. dignus* en condiciones de campo en el Cinturón Hortícola Platense (campañas 2010, 2011 y 2012) y en la provincia de Tucumán (campañas 2009, 2011y 2012), se encontró por primera vez evidencia de larvas de *T. absoluta* multiparasitadas; no obstante su co-ocurrencia fue muy baja (~ 10 % del parasitismo total de larvas, en todos los sitios). Por otra parte, se registró que ambos parasitoides actuando conjuntamente pueden causar hasta 80% de mortalidad de larvas hospedadoras. Los resultados indicaron también que ambos parasitoides presentan una relación denso-independiente respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta*, hecho que concuerda con

una respuesta funcional de tipo I hallada experimentalmente en esta tesis para *D. phthorimaeae* y aquella ya reportada para *P. dignus*.

Como consideración final, se puede concluir que el ectoparasitoide idiobionte *D. phthorimaeae* es un agente de biocontrol de *T. absoluta* potencialmente efectivo, y que su uso podría realizarse por medio de estrategias de control biológico aumentantivas o por conservación en programas de MIP. Además, los resultados indican que ambos parasitoides larvales no solo son capaces de coexistir, sino que actuando en conjunto ejercerán un muy buen control de la plaga.

Abstract

Biological control consists in the use of one or several natural enemy species to reduce the population density of a given pest. These natural enemies or biocontrol agents can be manipulated by either introducing them into the agroecosystem by means of increasing their numbers, or by conserving them through habitat manipulation. Parasitoid insects, especially those belonging to the Order Hymenoptera, are considered important biocontrol agents because of their ubiquity, search efficiency and host attack rates, and also for their host specificity. Their uniqueness relays in their life cycle, in which the larval stage is a parasite of other arthropod species that act as hosts. As a result of this interaction, the host invariably dies. Besides, in their adult stage they are free-living organisms, feeding on nectar, pollen, honeydew and, some of them feed also on the fluids and/or tissues of their hosts. This behavior is termed host-feeding.

Parasitoids can be classified in several different modes, such as koinobionts *and* idiobionts*,* ecto *or* endoparasites*,* pro *or* sinovigenic*, among others. From an evolutionary point of view, idiobiosis led to the development of distinctive life-history traits in these insects. In this way, it is possible to predict the parasitoid´s competetitive capacity, based on their life-histories. In this regard, theory states that koinobionts, by allowing further development of their hosts upon parasitizing, are almost always competitively inferior to idiobionts that permanently paralyze their hosts.*

Most insects are attacked by more than one parasitoid species. In general, these species complexes are formed for taxonomically diverse entities. A parasitoid complex attacking a particular host species is considered to be a parasitoid community*. As a minor ecological organizational unit, it can be distinguished a parasitoid guild, being useful for the study of interspecific interactions, such as competition. Even though ecological theory predicts that two species cannot exist and develop while using the same resource in a constant environment, several species are known to coexist in nature.*

An important aspect of parasitoid behavior is called multiparasitism*. This occurs when the same host is parasitized by two or more females belonging to different insect species. This behavior implies the development of interspecific competition mechanisms among the parasitoid species.*

Several authors recognize two main competition types: exploitation *and* interference *competition. Competition among parasitoid species for the same host can be of great importance towards stabilization of the system. It has led to a wide range of physiological and behavioral traits of these insects as a result of their diversification in their use of resources. Other aspects, such as demographic ones, also have an influence on parasitoid species competition. Parasitoid species coexistence can be promoted by spatial and temporal variability in the use of the resource or when the most efficient species in the competition is limited by other environmental conditions.*

The tomato moth, Tuta absoluta *(Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), is an important pest in South America. During the last decade, it has increased its worldwide relevance due to its accidental introduction into Europe. Since then, it has dispersed rapidly towards Northern Africa and the East of Asia. The larval stage of this pest damages the plants, by feeding on the leaves´ mesophyll and stems, causing physiological deficiencies and, when its population density is high, it can leave marks on the fruit, thus causing economic loss, by lowering its commercial value. Because* T. absoluta *control strategies are currently quite limited, mainly based on chemical control, biocontrol seems to be an important tool to be developed. In South America, a rich natural enemy complex has been reported. Among them, predators and parasitoids can be found, that attack different stadia of this species. Among the parasitoid complex, the ectoparasitoid* Dineulophus phthorimaeae *De Santis (Hymenoptera: Eulophidae) and the endoparasitoid* Pseudapanteles dignus *(Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae) are relevant.*

The objectives of this doctoral thesis were, firstly, to extend the knowledge on some parameters of the reproductive ecology of the ectoparasitoid D. phthorimaeae *as follows: 1- to determine the ovigeny strategy; 2- to study the functional response of this species; and 3- to assess if different food sources have an influence in its reproductive success. These parameters are presented in Chapter 2. Secondly, to assess some aspects of the competition between these two larval parasitoid species on* T. absoluta *through laboratory assays, presented in Chapter 3. Finally, to determine the interaction between these both species when they co-occur in the tomato orchards at the plant scale, which are presented in Chapter 4.*

The results obtained indicate that D. phthorimaeae *has an extremely sinovigenic reproductive strategy, meaning that the females lack any mature oocytes at adult hatching, which matures during their adult lives. Regarding the functional response analysis, it was determined through logistic regressions that it has a density independent parasitism curve for all the tested host densities (Type I). Experimental testing of the effects of alternative food sources and host-feeding showed that this last behavior not only improves female parasitoid fitness, but also showed the importance that this parasitoid mechanism has on its host, by causing a significant mortality.*

The competition assays between both parasitoids under laboratory conditions showed that D. phthorimaeae *females used the hosts in different ways depending on their age, i.e. younger wasps avoided attacking those larvae that were previously parasitized by* P. dignus. *However, at 5 to 7 days of adult age, females did not avoid these larvae. This result suggests that the ectoparasitoid could be able to recognize and to discriminate larvae previously parasitized by* P. dignus.

Regarding the density dependence analysis and the interaction between D. phthorimaeae *and* P. dignus *under field conditions in the La Plata Horticultural Belt (2010, 2011 and 2012 cropping seasons) and in the Tucumán Province (2009, 2011, and 2012 cropping seasons), the first evidence of multiparasitized* T. absoluta *larvae was found, even though its rate was quite low (~ 10 % total larvae parasitism in all the field sites). On the other hand, it was found that, when acting together, both parasitoids can cause up to 80% of host larvae mortality. The results also indicated that both parasitoid species have a density independent relationship with* T. absoluta *larvae density. This outcome is in agreement with the functional response type I found in this thesis for* D. phthorimaeae *and that already reported for* P. dignus.

To conclude, the idiobiont ectoparasitoid D. phthorimaeae *is a potentially effective biocontrol agent for* T. absoluta, *and its use could be carried out in augmentative as well as conservative biological control strategies in IPM programs. Furthermore, the results indicate that both larvae parasitoids are not only capable to coexist but also that, when acting together, they can exert an important control of this pest.*

Capítulo 1

Introducción General y Sistema de Estudio

El control biológico como estrategia del manejo integrado de plagas

La agricultura actual requiere de un uso sustentable de los recursos naturales, basado en una visión ecológica, filosófica y holística del agroecosistema. En particular, para el control de plagas, se propone como alternativa al uso exclusivo de pesticidas el manejo integrado de plagas (MIP**)** (Kogan 1986, Radcliffe *et al.* 2009). El MIP constituye una metodología multidisciplinaria que consiste en la combinación de diferentes técnicas, compatibles entre sí, para disminuir la densidad poblacional de una plaga hasta un número de individuos inferior al nivel de daño económico (NDE) de la misma. El desarrollo y aplicación de esta metodología conlleva el conocimiento profundo de la biología y ecología de las especies plaga presentes en un cultivo, como así también de las relaciones que éstas establecen con los otros componentes del agroecosistema (otras especies de herbívoros, de enemigos naturales y de especies vegetales coexistentes), para comprender el funcionamiento del sistema y tomar medidas de acción tendientes a la sustentabilidad de los recursos naturales. En este contexto, el MIP se basa en la combinación de tácticas de control con el menor impacto posible en el ecosistema, donde las plagas son consideradas parte integrante de una red trófica, prestando particular atención a la presencia de sus enemigos naturales, principales elementos del sistema para controlarlas. Un agroecosistema bajo MIP promoverá a su vez varios de los servicios ecosistémicos que ofrece la naturaleza, tales como la provisión de aire y agua limpios, el mantenimiento de la biodiversidad, el control biológico de plagas, malezas y enfermedades, entre otros (Fiedler *et al.* 2008).

Brevemente, las estrategias de control que contempla el MIP son: el *control biológico*, (uso de enemigos naturales, ver más adelante) el *uso de técnicas culturales* (cultivos o franjas trampa, rotaciones y mezcla de cultivos, etc.), la utilización de *variedades resistentes* (mejoramiento de cultivos y plantas genéticamente modificadas), el *control químico* usando insecticidas racionales, selectivos y biodegradables, y *otras técnicas* basadas en principios biológicos como por ejemplo el uso de feromonas y la técnica de macho estéril (Radcliffe *et al*. 2009).

Este trabajo de tesis se enmarcará en una de las estrategias del MIP, el ***control biológico***. En contraposición al uso de insecticidas, éste comenzó a tomar importancia comercial en los últimos 120 años, (van Lenteren 2012). Consiste en la utilización de

enemigos naturales para mantener a las plagas en lo posible reguladas, es decir sin variaciones importantes en las densidades poblacionales, o controladas, o sea, con dichas densidades poblacionales por debajo de los niveles de daño económico (De Bach y Rosen 1991, Bellows y Fisher 1999). El control biológico se basa en principios ecológicos, como lo son las interacciones inter-específicas del tipo depredador-presa y/o parasitoide- hospedador, de competencia, de depredación intragremio y últimamente se ha enriquecido con el enfoque de las interacciones tritróficas (planta hospedera - herbívoro plaga - enemigos naturales) y el estudio de la estructura de comunidades (riqueza, diversidad específica, diferenciación de nichos y gremios). Esta visión ecológica holística permite seleccionar candidatos con un mayor conocimiento sobre su capacidad potencial de biocontrol (Briggs 1993, Hawkins y Sheehan 1994, Lewis *et al.* 1997, Murdoch *et al.* 1998, Brodeur y Boivin 2006).

El control biológico es ejercido por especies de depredadores, parasitoides y patógenos de las plagas, los cuales son considerados "agentes" de biocontrol o "biocontroladores". El modo de acción entre ellos es diferente, a saber: los ***depredadores***, artrópodos, tanto estadios inmaduros como los adultos de ambos sexos, que cazan y consumen diferentes tipos de presas, que son considerados como más generalistas, pudiendo consumir más de una presa durante su vida; los ***parasitoides***, insectos cuyos estados inmaduros son parásitos que completan su desarrollo sobre un único individuo hospedador el cual muere en la interacción, siendo los adultos de vida libre. Solo la hembra adulta busca al hospedador y en general se especializan en una o pocas especies de huéspedes relacionados por lo cual son considerados como más especialistas; y los ***patógeno***s, mayormente microorganismos que inducen a la enfermedad a su hospedador, desarrollándose un gran número de individuos por huésped y presentan especificidad por grupos o estados de desarrollo de insectos. Los principales grupos de artrópodos depredadores son: Coleoptera, Heteroptera, Diptera, Hymenoptera, Neuroptera, Araneae y Acari. Los órdenes de insectos parasitoides más importantes son Hymenoptera y Diptera. Dentro de los patógenos de artrópodos se mencionan virus (principalmente los Baculoviridae), bacterias (siendo *Bacillus thuringiensis*, con más de 65 subespecies y aislamientos, la más investigada), hongos (más de 400 especies, entre las que se encuentran representantes de los gén. *Beauveria*, *Entomophaga*, *Metarhizium*, *Nomurea*, *Paecilomyces*, entre otros) y nematodos

(familias Heterorhabditidae, Phaenopsitylenchidae y Steinermatidae) (van Driesche *et al.* 2007).

El control biológico puede ser aplicado siguiendo tres estrategias principales: 1. El ***control biológico clásico***, que implica la importación de enemigos naturales relacionados evolutivamente con una plaga invasora no nativa; 2. el ***control biológico neoclásico o de nueva asociación,*** también involucra la importación de enemigos naturales pero éstos no están relacionados directamente con la plaga sino seleccionados teniendo en cuenta similitudes taxonómicas, ecológicas, morfológicas, etc; 3. el ***control biológico aumentativo***, que consiste en el aumento del número de individuos de especies de enemigos ya presentes en el cultivo, pudiendo utilizarse una a varias sueltas de individuos para suprimir una plaga durante el transcurso de una temporada o ciclo de producción de un cultivo, a través de sueltas *inundativas* de un elevado número de agentes para lograr un control a corto plazo o *inoculativas estacionales* de unos pocos individuos que desarrollarán poblaciones cuyas próximas generaciones lograrán el control; y 4. el ***control biológico por conservación***, entendido como la manipulación o modificación del ambiente para mejorar la eficacia de los enemigos naturales ya establecidos, a través del suministro de hospedadores o presas alternativos, la provisión de refugios, y por la eliminación o mitigación de riesgos o factores ambientales adversos, tales como prácticas culturales de desmalezado y poda de vegetación circundante a los cultivos, el uso indiscriminado de insecticidas, como tácticas más importantes (van Driesche *et al.* 2007).

Cuando se comparan aspectos económicos implicados en las industrias del control biológico y químico de plagas de la agricultura, son notables los beneficios en términos monetarios por unidad de inversión, a favor la primera (van Lenteren 2012). Por lo tanto, el desarrollo del control biológico es una forma ambientalmente segura para el control de plagas, y que resulta además una actividad redituable a nivel económico. Bueno (2000) señala también el gran número de casos exitosos del uso de enemigos naturales, demostrando que el control biológico es un método práctico, económico y sustentable en el control de plagas.

Para seleccionar candidatos como agentes de biocontrol, dado que una especie de plaga es en general atacada por un complejo de enemigos naturales, se debe comenzar por estudiar atributos de la historia de los mismos. van Lenteren (1986, 2003)

propone, para insectos parasitoides, criterios de selección para evaluar potenciales especies, a saber: 1- la sincronización estacional con su hospedador (i.e. la plaga) , 2- la compatibilidad fisiológica con el hospedador, 3- la adaptabilidad climática, 4- la capacidad de ser criados en masa con relativa facilidad, 5- la especificidad con su hospedador, 6- su potencial reproductivo, con un r_0 mayor al del hospedador, 7- una buena respuesta a la densidad del hospedador, y 8- no tener efectos adversos, como por ejemplo, tener una baja compatibilidad con otras técnicas de control. Así este autor sugiere para el proceso de selección de candidatos como agentes de control biológico seguir un recorrido de varias fases, como el que se muestra en el siguiente diagrama de flujos (Fig. 1.1).

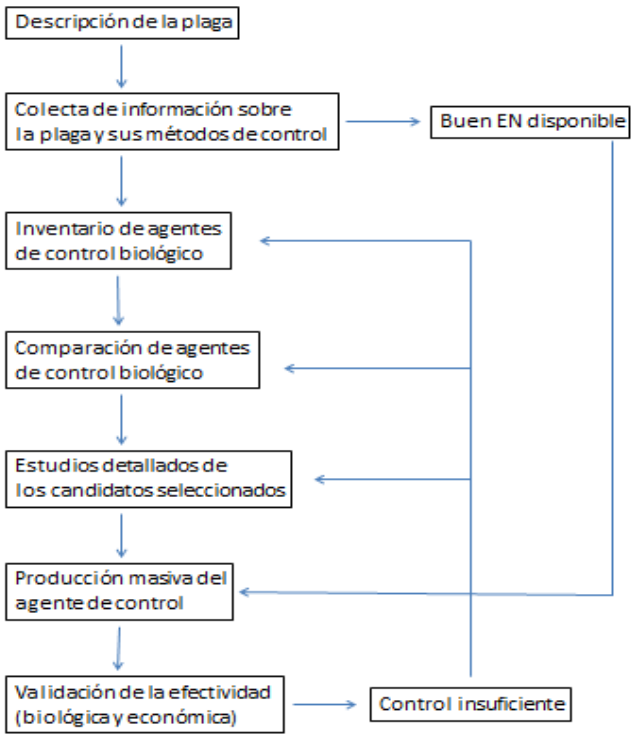


Figura 1.1: Fases para la elección de enemigos naturales como candidatos para agentes de control biológico (van Lenteren 2003).

En este diagrama se propone desde la búsqueda de estudios previos sobre la plaga en cuestión para una primera selección de candidatos como agentes de biocontrol, posteriormente se plantea el estudio pormenorizado de las especies seleccionadas para elegir aquella que muestre mejores atributos como controlador. La producción en masa

y la validación del control efectivo en el campo permitirán conocer si resulta finalmente un candidato adecuado o si se debe seguir evaluando la potencialidad de nuevas especies.

El control biológico tiene un gran desarrollo principalmente países de Norteamérica, Europa y en Japón. Se estima que cerca del 25 % de los cultivos están bajo este tipo de control sanitario (Bale *et al*. 2008, van Lenteren 2000, 2006, 2012, van Lenteren y Bueno 2003).

Particularmente el control biológico aumentativo, integrado en un MIP, se viene llevando a cabo en muchos países europeos desde finales de 1950, como medida fitosanitaria en cultivos bajo cubierta, en especial en invernáculos. Esto resultó posible gracias a la vinculación en esta región del sector productivo agrícola con universidades y otras instituciones académicas, para mejorar la producción de alimentos con una sólida base científico-tecnológica. No menos importante, el control biológico se vio impulsado por el surgimiento del interés de políticas gubernamentales acordes al crecimiento de este sector productivo, que priorizó además la sustentabilidad de los ecosistemas. Finalmente, la aparición en el mercado de los agronegocios, que reconoció esta herramienta como una posibilidad de innovar tecnologías existentes para desarrollar biofábricas. También en esta etapa, se crearon organizaciones no gubernamentales, las cuales trabajan activamente en el desarrollo y la divulgación científica del control biológico, como por ejemplo la International Organization for Biological Control (IOBC www.iobc.org), con ramas en las distintas regiones del mundo, la Association of Natural Biocontrol Producers (ANBP www.anbp.org) y la International Biocontrol Manufacturer´s Associations (IBMA www.ibma.ch) (Coulson *et al.* 2000, Jacas y Urbaneja 2008, van Lenteren 2012).

En Latinoamérica, estas tecnologías comenzaron a desarrollarse durante los últimos 20 años, primero con la utilización de entomopatógenos (virus y hongos principalmente), y más recientemente con el uso de depredadores y parasitoides, mayormente en cultivos bajo cubierta en Brasil, Colombia, Méjico y Perú (van Lenteren y Bueno 2002).

En la Argentina, la aplicación del control biológico data del 1908 (Crouzel 1983, Zapater 1996, Greco 2011, Cabrera Walsh *et al.* 2012), principalmente basado en la introducción de especies exóticas o control biológico clásico. Históricamente, fue

utilizado mayormente en el manejo sanitario en cultivos extensivos y frutales, basado fundamentalmente en el uso de parasitoides como agentes de control. En la actualidad, otros cultivos hortícolas y forestales están siendo considerados para su implementación, para lo cual existen numerosos grupos de investigación en todo el país (INTA, Universidades, CONICET, etc.) dedicados a la búsqueda y prueba de especies nativas de enemigos naturales y a su conservación en los agroecosistemas. Sin embargo, la estrategia del control biológico aumentativo no tiene todavía un desarrollo comercial y por lo tanto los productores no disponen aún de este tipo de bioinsumos para el control de plagas agrícolas. Por otra parte, esta herramienta comienza a ser considerada como una alternativa de gran interés (van Lenteren y Bueno 2003, Greco 2011, Cabrera Walsh *et al.* 2012).

En este trabajo de tesis se espera aportar al control biológico de una plaga clave del cultivo del tomate de la Argentina, como lo es la "polilla del tomate", *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), por medio de la manipulación de dos enemigos naturales de presencia espontánea en este cultivo, los parasitoides larvales *Dineulophus phthorimaeae* De Santis (Hymenoptera: Eulophidae) y *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae).

El uso de parasitoides para el control biológico de plagas

Los parasitoides son un numeroso grupo de insectos endopterigotas -en su mayoría himenópteros- con un particular ciclo de vida. El estado larval es parásito de otras especies de artrópodos, se alimenta a expensas de su hospedador, y como producto de la interacción, éste último invariablemente muere. Un único individuo hospedador sostiene el desarrollo de uno o más parasitoides. El estado adulto por otra parte, es de vida libre, se alimenta generalmente de productos vegetales, tales como néctar, polen, y a veces, al momento de la oviposición, de los fluidos del hospedador (hemolinfa o/y tejidos corporales), por un mecanismo conocido como *host-feeding* (ver más adelante en este apartado). Desde el punto de vista de su biología, diversidad de estilos de vida, del número de grupos taxonómicos que representan y los hábitats que frecuentan, los parasitoides conforman un grupo funcional significativo de la fauna terrestre (Askew

1971, Clausen 1940, Waage y Greathead 1987, De Bach y Rosen 1991, Godfray 1994, Hawkins 1994, Quicke 1997).

Los parasitoides pueden ser clasificados de muchas maneras. Una de las clasificaciones más comunes los distingue según (1) el modo de parasitismo, entre ***endoparasitoide*** y ***ectoparasitoide***, ya sea que se desarrolle interna o externamente al hospedador, respectivamente; (2) el estado del hospedador al momento de ser atacado, como parasitoides de ***huevos*** u ***oófagos***, de ***larvas***, de ***pupas*** y de ***adultos***. Haeselbarth (1979), y luego retomado por Askew y Shaw (1986), sintetizaron los aspectos anteriores en una nueva clasificación, (3) que tiene en cuenta también si el parasitoide permite o no continuar con el desarrollo del hospedador después de haber sido parasitado, como ***koinobionte***, a aquel que permite el desarrollo posteriormente a la oviposición, e ***idiobionte***, al que no lo permite y detienen su crecimiento al momento de la oviposición. En este último caso, inmoviliza permanentemente al hospedador por medio de la inyección de veneno con ayuda del ovipositor, mediante el cual lo paraliza pero no lo mata, y de esa manera le facilita su manipulación para la oviposición.

Evolutivamente, la *idiobiosis* condujo al desarrollo de características distintivas de la historia de vida de los parasitoides, entre las cuales se pueden mencionar: a) el ectoparasitismo, b) que en general atacan hospedadores de vida oculta (minadores, barrenadores, etc.), c) que son más generalistas, es decir, atacan un amplio rango de especies hospedadoras, d) la hembra adulta emerge con una baja proporción de oocitos maduros, de gran tamaño y continúa produciéndolos a lo largo de su vida adulta, un fenómeno conocido como *sinovigenia* (Quicke 1997, Jervis et al. 2008, ver más adelante capítulo 2), para lo cual e) necesita fuentes de alimentación extra a la obtenida en el estado larval (*host-feeding*, derivados vegetales y agua, para su mantenimiento y reproducción (Quicke 1997, Mayhew y Blackburn 1999, Jervis *et al.* 2001). Por otra parte, la *koinobiosis* está más relacionada al endoparasitismo, por lo general atacan hospedadores de mayor tamaño corporal y que se encuentran expuestos, son individuos especialistas, es decir que atacan a unas pocas especies asociadas, y en cuanto a la estrategia de ovigenia se los relaciona con la *pro-ovigenia*, es decir, la hembra al momento de la emergencia posee el complemento maduro de huevos para su oviposición (Quicke 1997, Waage y Greathead 1986, Godfray 1994).

Los insectos parasitoides, en especial los pertenecientes al orden Hymenoptera, son importantes agentes de control biológico, especialmente por su ubicuidad, eficiencia de búsqueda y ataque del hospedador y por su especialización en unas relativamente pocas especies hospedadoras. Los parasitoides registran las tasas de establecimiento y éxito de control comparativamente más altas en los programas de control biológico con respecto a otros agentes biológicos (Bellows y Van Driesche 1999, van Lenteren 2005, 2012).

Aunque no existen inventarios completos, en 2010, se registraron aproximadamente 230 especies de invertebrados de diferentes grupos taxonómicos como enemigos naturales utilizados en programas de control biológico de plagas en todo el mundo. La mayoría de las especies son artrópodos (95,2%), entre los cuales en primer lugar se encuentran los himenópteros parasitoides (52,2%) (van Lenteren 2012).

La gran mayoría de los insectos son atacados en la naturaleza por más de una especie de parasitoide (Bellows y Van Driesche 1999 y Van Driesche *et al*. 2007); en general estos complejos de especies están conformados por entidades taxonómicamente diversas. El complejo de parasitoides que ataca a una especie hospedadora particular es considerada una comunidad de parasitoides (Mills 1992). Como unidad ecológica menor, se distingue el gremio de parasitoides, de relevancia para el estudio de interacciones interespecíficas, como por ejemplo la competencia y la depredación intra-gremio (Hawkins 2000, Brodeur y Boivin 2006). Un gremio de parasitoides se define como un conjunto de especies que utilizan de manera similar el recurso disponible, en este caso, al hospedador (Mills 1992). La utilización del enfoque de los gremios de parasitoides de (Mills 1992,1994) brinda información sobre la ecología funcional de las especies, es decir, como usan el recurso y el nicho que ocupan. Cuando se trata de un complejo de enemigos naturales atacando a una especie plaga, este enfoque permite conocer las posibles interacciones competitivas interespecíficas entre los individuos y proporciona fundamentos para la manipulación de las especies utilizadas en los programas de control biológico.

En este trabajo de tesis se aplicará el análisis de gremios propuesto por Mills (1994) para estudiar la interacción competitiva entre los dos parasitoides larvales de *T. absoluta*, quienes presentan diferentes estilos de vida, i.e. pertenecen a distintos

gremios, a saber: *D. phthorimaeae* es un ectoparasitoide idiobionte mientras que *P. dignus* tiene un hábito endoparásito koinobionte.

El papel de la competencia entre enemigos naturales para el control biológico, con énfasis en especies de parasitoides

La teoría ecológica predice que dos especies no pueden existir y desarrollarse explotando un mismo recurso en un medio ambiente constante (Volterra 1926, Gause 1934), y de esta forma el mejor competidor debería desplazar competitivamente a otras especies antagonistas. Sin embargo, en la naturaleza se observa que en general las especies pueden coexistir, debido fundamentalmente a las diferentes formas en que puede ser aprovechado un recurso (diferenciación de nichos).

La competencia en parasitoides ha sido extensamente estudiada reconociéndose dos tipos básicos de competencia: *por explotación*, que ocurre cuando un individuo al usar los recursos priva a otro/s del mismo, y *por interferencia*, que se verifica cuando un individuo le causa a la/las otra/s especie/s competidora/s un daño físico por ataque directo o fisiológico, mediado por la secreción de toxinas (Park *et al.* 1962).

En estos insectos, la interacción competitiva puede tener lugar durante varias etapas de su ciclo de vida. Una de las más importantes ocurre cuando hembras de distintas especies deben competir al momento de parasitar. Este fenómeno es conocido como ***multiparasitismo***. El grado de ocurrencia del multiparasitismo en una especie de hospedador particular está determinado además por diferencias en la eficiencia de búsqueda entre parches de hospedadores de las distintas especies competidoras, por la coincidencia espacial y/o temporal por la especie hospedadora, etc. (Zwölfer 1963, Pschorn-Walcher 1985, Mackauer 1990).

Existen evidencias que muestran que la competencia entre especies de parasitoides por un mismo hospedador ha conducido a la evolución de un amplio rango de características fisiológicas y de comportamiento de estos insectos, como resultado de la diversificación del uso de los recursos. De esta forma es posible predecir la capacidad intrínseca competitiva de los parasitoides en base a sus biologías. Los parasitoides koinobiontes son casi siempre competitivamente inferiores a los idiobiontes (Hawkins 1994, 2000). Si bien esta categorización de los parasitoides resulta una indicación

práctica para analizar su capacidad como competidores, Godfray (1994) propone corroborar esta superioridad de los idiobiontes con estudios de laboratorio y de campo.

La dinámica de poblaciones hospedador-parasitoide, así como la capacidad de aprovechar los parches de hospedadores por los parasitoides está afectada por diferentes factores, como ser los mecanismos de defensa del hospedador al ser atacado, la estrategia de ovigenia del parasitoide, el modo de parasitismo y el estado nutricional de las hembras (Strand y Casas 2008), regulando de esta manera la intensidad de la competencia entre ellos.

Para las especies de parasitoides consideradas en esta tesis se tendrá en cuenta tanto algunos aspectos de la competencia interespecífica en el laboratorio, analizados en una unidad experimental, como así también la resultante en el cultivo de tomate, a escala de planta.

Con respecto a este último, es necesario describir las características del cultivo en la Argentina, y algunas particularidades regionales, tanto de su producción como en términos de la problemática sanitaria.

Sistema de estudio: El cultivo de tomate, su manejo sanitario y posibilidades para la implementación de un MIP

La producción del cultivo de tomate, *Lycopersicum esculentum* Miller (Solanaceae), alcanza actualmente unas 160 millones de toneladas por año a nivel mundial, siendo unas 37 millones destinadas a su industrialización. Este cultivo ocupa unas 4,4 millones de hectáreas. Los principales países productores son, en orden de importancia, China, Estados Unidos de América (EUA), India, Turquía, Egipto, Italia, Irán, España, Brasil y México. Otro dato importante de destacar es que la producción mundial se ha incrementado en los últimos 10 años en un 40 % (Desneux *et al.* 2011). Las principales naciones exportadoras tanto como hortaliza (o "tomate fresco") e industrializado son México y China, respectivamente, mientras que el principal importador de tomate fresco es Estados Unidos de América.

En la República Argentina, el cultivo de tomate es llevado a cabo prácticamente en todo el territorio del país, a distintas escalas. Si bien en este país la producción hortícola ocupa una pequeña fracción (540.000 ha) de la superficie de terrenos

dedicados a la agricultura, unas 17.000 ha corresponden al cultivo de tomate. Cabe mencionar que el 90% de la producción es destinada al mercado interno, el cual asciende a unos 2.000 millones de pesos anuales de facturación final. Según Argerich (2011), se trata de una de las actividades productivas más importantes del país, siendo la segunda hortaliza más consumida por los argentinos, después de la papa. En la Fig. 1.2 se observan las principales zonas productivas de tomate del país y los valores de producción anuales (Argerich 2011).

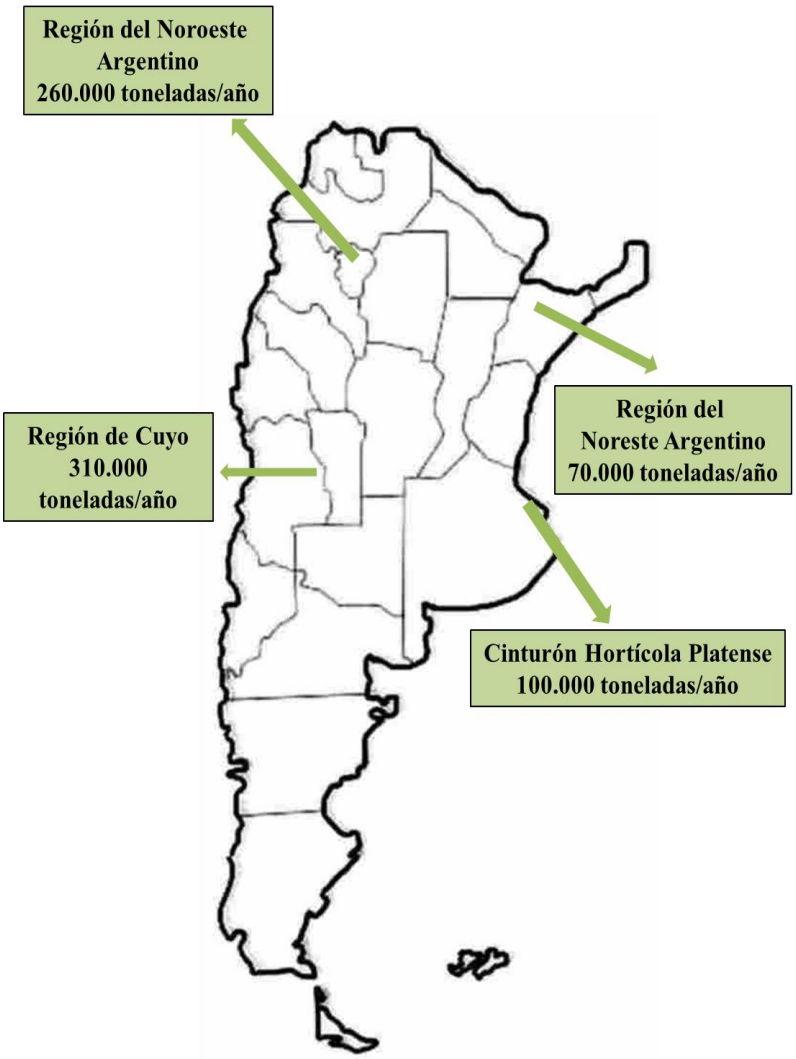


Figura 1.2: Mapa de la República Argentina donde se detallan las principales zonas de producción del cultivo de tomate con los valores de producción correspondientes en toneladas por año (Argerich 2011).

El presente estudio se focalizará en dos importantes regiones productoras de tomate en el país: el Cinturón Hortícola Platense (CHP), emplazado en el noreste de la Provincia de Buenos Aires y las provincias del Noroeste argentino (NOA) (Ver Capítulo 4). El cultivo se realiza en ambas regiones bajo dos modalidades: a cielo abierto, con tutorado, y bajo cubierta, en invernáculos de distinta infraestructura. En el CHP, el cultivo tradicionalmente se realiza a cielo abierto aunque la producción bajo cubierta se ha incrementado en los últimos años (aproximadamente 600 ha. entre ambas modalidades) (Carluccio *et al.* 2002, Strassera 2009). El manejo sanitario de plagas se realiza convencionalmente con la utilización de una amplia gama de insecticidas comerciales (ver más adelante), y un menor grupo de productores aplica un manejo orgánico, es decir, basado en la conservación de enemigos naturales espontáneos o el uso de insecticidas de base biológica. La producción en el NOA, el cultivo se realiza mayormente a cielo abierto, y en menor proporción bajo cubierta (3000 y 350 ha, respectivamente), produciéndose los mismos tipos de tomate. El manejo sanitario en esta región se realiza casi exclusivamente de modo convencional, con aplicaciones preventivas de insecticidas de síntesis hasta tres veces por semana. La producción es continua entre los meses de agosto a diciembre. Por otra parte en el CHP se extiende entre los meses de octubre a mayo, con dos ciclos de cultivo: uno temprano (octubre a enero) y otro tardío (febrero a mayo). Se producen diversas variedades, del tipo de fruto redondo, "cherry" y perita.

Son varias las especies plagas que afectan económicamente al cultivo de tomate en la Argentina, entre ellas una de las más importantes en cuanto al daño y las pérdidas económicas es la polilla del tomate *T. absoluta* (Botto *et al.* 1999, Polack *et al.* 1999) (Figs. 1.3 y 1.4). Esta especie pertenece a la familia Gelechiidae y fue descripta originalmente por Meyrick en el año 1917 como *Phthorimaea absoluta*, sobre la base de especímenes colectados en Perú. Su estatus taxonómico fue varias veces revisado, cambiando a los géneros *Gnorismoschema (*Clarke, 1962), *Scrobipalpula* y *Scrobipalpuloides* (Povolny 1994), hasta que finalmente fue renombrada con un nuevo género *Tuta,* como *T. absoluta,* por Povolny en 1998.

Este microlepidóptero endémico de América del Sur ha adquirido actualmente una mayor relevancia como plaga clave del cultivo del tomate en otras regiones del mundo, desde su introducción accidental en España en 2006 (Urbaneja 2007), y

posterior dispersión por toda la cuenca mediterránea europea, y ulteriormente sucediéndose una rápida invasión en África hacia el sur y hacia los países del este de Europa y Asia (Desneux *et al.* 2011).

Figura 1.3: Daño provocado por la polilla del tomate *Tuta absoluta*. Se observan las galerías formadas por la plaga sobre hojas y frutos de tomate.

Con respecto a su ciclo de vida (Fig. 1.4), la hembra de *T. absoluta* deposita huevos de 0,4 mm de largo por 0,2 mm de diámetro, de color blanco crema a amarillo- en el envés de las hojas y también suele hacerlo sobre los tallos. El estado larval comprende cuatro estadíos; al eclosionar el primer estadío larval (L1), ésta penetra activamente en el mesófilo de las hojas y en los tallos, formando minas o galerías construidas por ellas mismas mientras se alimentan de los tejidos vegetales (Fig. 1.3). Las larvas miden entre 1 y 8 mm de longitud. Con excepción de la L1, los restantes estadíos se desarrollan protegidos dentro de las minas. Al completarse el estado larval, la L4 emerge de la galería y comienza a tejer un capullo sedoso, iniciándose el proceso de pupación, el que ocurre mayormente en el suelo, aunque también puede hacerlo en el follaje. Las pupas son libres o exarales y décticas, miden entre 5 y 6 mm, de forma

cilíndrica y color verdoso, y a medida que se aproximan a la emergencia del adulto se tornan de color marrón oscuro. Los adultos miden entre 6 y 7 mm de largo, son de coloración gris plateado y presentan antenas filiformes (Fig. 1.4 c-d).

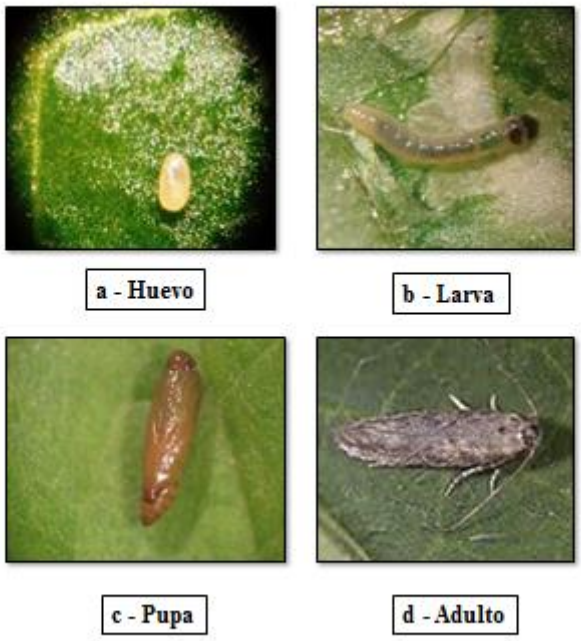


Figura 1.4: Estadios de desarrollo de la polilla del tomate *Tuta absoluta*.

El tiempo de desarrollo generacional depende mayormente de las condiciones ambientales, siendo de 76,3 días a 14° C, 39,8 días a 19,7° C y 28,8 días a 21,1° C (Barrientos *et al.* 1998).

Se comporta como una especie multivoltina y puede alcanzar hasta 12 generaciones al año. El adulto es de hábito nocturno, y durante el día permanece generalmente oculto.

La polilla del tomate es considerada una plaga oligófaga, se alimenta y desarrolla mayormente sobre plantas hospederas de la familia de las solanáceas. Si bien los parámetros poblacionales de supervivencia y fecundidad son superiores sobre tomate, en la literatura se mencionan otras especies cultivadas como por ejemplo la papa *Solanum tuberosum* L., la berenjena *S. melongena* L. y el tabaco *Nicotiana*

tabacum L. (Vargas 1970, García y Espul 1982, Pereyra y Sánchez 2006), como así también solanáceas y de otras familias presentes en la vegetación silvestre común en los predios hortícolas como adventicias o espontáneas, tales como *Datura ferox* (chamico), *Malva sp*., *Salpichroa origanifolia* (huevito de gallo), *S. sisymbriifolium* (tutiá), *S. nigrum* (tomatillo) y *Nicotiana glauca* L. (palán-palán), entre otras (Galarza 1984, Cordo *et al.* 2004, Desneux *et al.* 2010, USDA 2011).. Sin embargo, el rango completo de especies vegetales hospederas de *T. absoluta* en la Argentina resta aún por definirse.

Con respecto al perjuicio que causan, las larvas de esta plaga se encuentran principalmente en las hojas, pero también puede atacar frutos, flores, brotes y tallos. El daño es producido tanto por la reducción de mesófilo en el proceso de alimentación, restándole capacidad fotosintética a la planta y por ende, afectando el rendimiento del cultivo, como por las marcas indeseables que dejan en el fruto, las que disminuyen su valor de venta o impiden su comercialización, cuando alcanzan densidades poblacionales elevadas (Fig. 1.3). Según Polack (2003, 2011) se ha podido determinar el umbral de daño para esta plaga mediante la aplicación de un modelo fenológico. Dicho modelo tiene en cuenta tanto conteos directos de larvas en el cultivo como también las estimaciones de eventuales "picos" en la densidad poblacional, por medio de capturas de adultos con trampas de feromonas a lo largo de varias generaciones de *T. absoluta* por temporada de cultivo. El umbral de acción determinado sobre la base de dichos registros se estableció en 2 folíolos con daño fresco por planta, y es el que actualmente considera el INTA para el manejo de esta plaga.

El control químico es casi explusivo para el manejo sanitario de la plaga en el cultivo de tomate. Para ellos se utilizan diversos plaguicidas amplio espectro. Un estudio realizado sobre el manejo fitosanitario en invernáculos de tomate del CHP, reportó la aplicación en forma preventiva de más de 16 tipos distintos de productos por temporada de cultivo (García *et al.* 2005, Strassera 2009). En menor medida se utilizan también los insecticidas "biorracionales" o bioplaguicidas. Éstos están indicados para programas de MIP en Europa, ya que muchos se combinan con el uso de enemigos naturales, como las chinches depredadoras (Hemiptera, varias familias) y parasitoides oófagos (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

Es importante destacar que el umbral de acción de 2 larvas por planta estimado para *T. absoluta* puede ser una posible causa del alto consumo de insecticidas por parte

de los productores, debido a que bajo determinadas condiciones del cultivo de tomate (en invernáculos, ciclo estival), los niveles de densidad poblacional de la plaga lo exceden rápidamente. Esta situación, no cuantificada aún, genera residuos que ocasionan contaminación ambiental y pérdida de la biodiversidad, y no menos importante, es extremadamente perjudicial para la salud de los trabajadores rurales y los consumidores.

Otros métodos para el monitoreo y control de *T. absoluta* están comenzando ser probados experimentalmente en el país, como por ejemplo: 1- técnicas de confusión sexual, particularmente las trampas de feromonas y la técnica del macho estéril, 2- uso de genotipos de tomate resistentes a plagas, y 3- utilización de trampas UV y cromotrópicas (Broglia *et al.* 2011, Cagnotti *et al*. 2011, Lobos *et al.* 2011).

En suma, la situación descrita sobre el manejo de *T. absoluta* en nuestro país, basada casi exclusivamente en el uso de pesticidas, hace necesario que otras estrategias de control –como el control biológico- sean exploradas, para poder definir su potencialidad.

Control biológico de Tuta absoluta

De lo tratado anteriormente, se desprende que el control biológico de *T. absoluta* es uno de los principales componentes a desarrollar para el manejo integrado de plagas de este cultivo en Argentina. Del complejo de enemigos naturales registrados para esta plaga (Fig. 1.5), dos especies son depredadoras: la chinches *Tupiocoris cucurbitaceus* (Spinola) (Hemiptera: Miridae), que ataca principalmente huevos y larvas pequeñas, predando también moscas blancas de las especies *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Zelus obscuridorsis* (Stal) (Hemiptera: Reduviidae) que caza larvas y adultos de la polilla (López *et al.* 2011, 2012, Speranza *et al.* 2014). No obstante, son los parasitoides el grupo de enemigos más numeroso de *T. absoluta* conocidos (Fig. 1.5) (Colomo *et al.* 2002, Berta y Pérez 2011, Cáceres 2011).

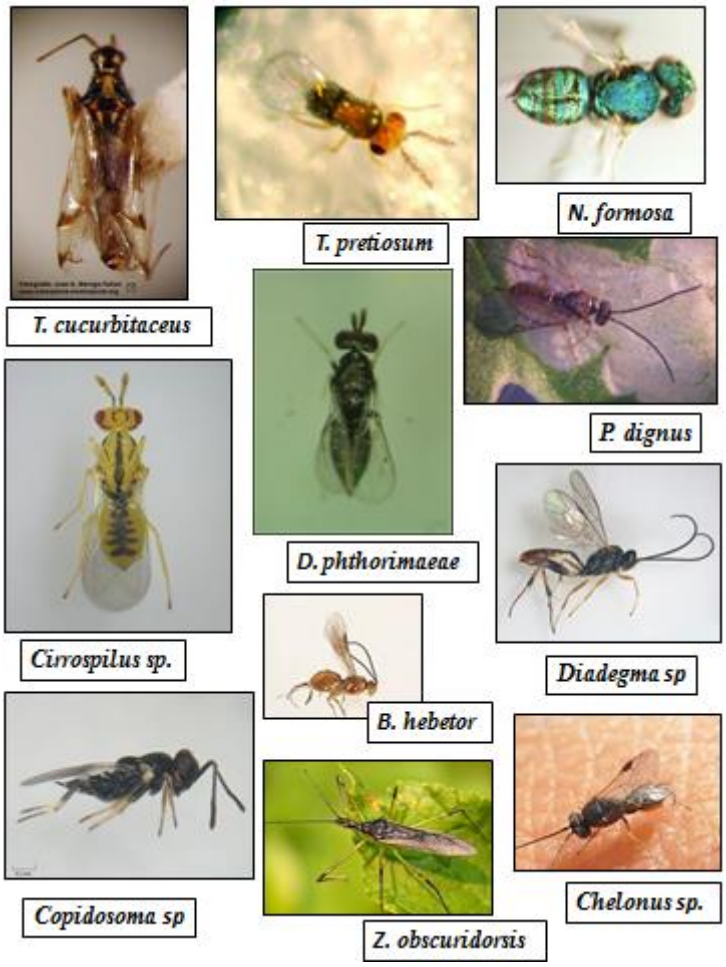


Figura 1.5: Algunas especies de enemigos naturales que atacan a la polilla del tomate *T. absoluta* registrados en cultivos de tomate en la Argentina.

En el caso de los parasitoides, estas especies atacan diferentes estadios de la plaga i.e., conforman cinco gremios según Mills 1994 (Fig. 1.6) : 1) Parasitoides de huevos: *Trichogramma fasciatum* (Perkins), *T. pretiosum* (Ripley), *T. rojasi* (Nagaraja y Nagarkatti) y *Trichogrammatoidea bactrae* (Nagaraja); 2) Endoparasitoides larvales: *Agathis* sp, *Bracon lucileae* (Marsh), *Bracon* spp, *Earinus* sp, *Diadegma* sp, *Orgilus* sp, *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck), *Temelucha* sp, *Neochrysocharis formosa* (Westwood), 3) Ectoparasitoides larvales: *Cirrospilus* sp y *Dineulophus phthorimaeae* (De Santis), 4) Parasitoides huevo - prepupa: *Chelonus* sp y *Copidosoma* sp, y 5) Parasitoide de larva-pupa: *Campoplex haywardi* (Blanchard).

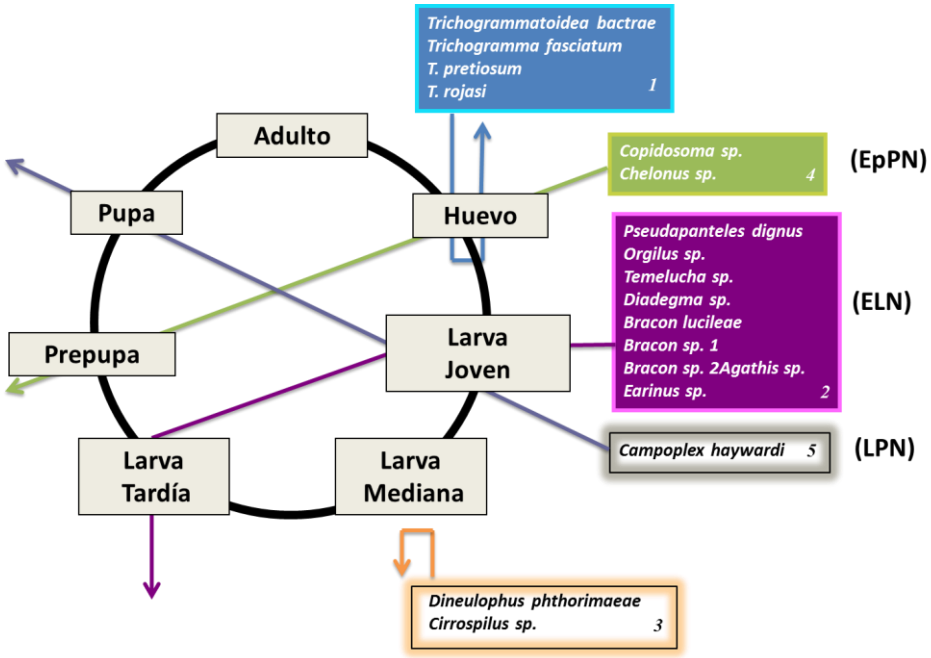


Figura 1.6: Gráfico que muestra los diferentes gremios del complejo de parasitoides que atacan a la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Colomo *et al.* 2002). La *Larva Joven* corresponde a los estadios L1 y L2, la *Larva Mediana* al estadio L3 y la *Larva Tardía* al estadio L4. (EpPN: endoparasitoide de huevo a prepupa, ELN: endoparasitoide de larvas tempranas y LPN: endoparasitoide de larva a pupa).

Es importante destacar que, luego de la invasión de *T. absoluta* en nuevas regiones hortícolas del mundo, se ha suscitado un creciente interés en la prospección y estudio de enemigos naturales que la atacan en su nueva área de distribución. Una revisión no exhaustiva de tales investigaciones realizadas en Europa revela un interesante complejo de enemigos naturales conformado por hemípteros predadores de la familia Miridae, como por ejemplo *Nesidiocoris tenuis* (Reuter), *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) y *Dicyphus errans* (Wolff), y de la familia Nabidae *Nabis pseudoferus* (Remane), pero fundamentalmente se destaca el complejo de más de 25 especies de parasitoides, con himenópteros tales como los eulófidos *Necremnus near artynes* (Walker), *N. near tidius* (Walker), *Stenomesius japonicus* (Ashmead) y *Neochrysocharys formosa* (Westwood), el bracónido *Bracon nigricans* (Szépligeti) y los tricogrammátidos *Trichogramma urquijoi* (Cabello García) y *T. achaeae* (Nagaraja y Nagarkatte) (Desneux *et al.* 2010, 2011; Mollá *et al.* 2011, Cabello *et al.* 2012, Nannini *et al.* 2012, Ferracini *et al.* 2012, Zappala *et al.* 2012, Belda *et al.* 2013, Biondi *et al.* 2013, Chailleux *et al.* 2013, Ingegno *et al.* 2013).

En Sudamérica, investigaciones recientes han descubierto nuevos enemigos naturales para *T. absoluta*. En Brasil, por ejemplo, se encontraron los depredadores *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Lygaeidae), *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) y los míridos *Campyloneuropsis infumatus* (Carvalho), *Engytatus varians* (Distant) y *Macrolophus basicornis* (Stal) (Bueno *et al.* 2012, 2013). En Colombia se ha reportado el parasitoide *Apanteles gelechiidivoris* (Hymenoptera: Braconidae) (Cantor y Rodriguez 2013).

Dentro del complejo de parasitoides que atacan a *T. absoluta* en Argentina, se comenzó a evaluar la potencialidad de dos especies de parasitoides larvales, el ectoparasitoide *D. phthorimaeae* y el endoparasitoide *P. dignus* (Sanchez *et al.* 2009, Luna *et al.* 2007, Luna *et al.* 2010, Luna *et al.* 2012, Savino *et al.* 2012). Ambos se hallan presentes de forma espontánea en los cultivos de este país (Botto 1999, Colomo *et al.* 2002, Polack *et al.* 2002), y si bien corresponden a gremios distintos, las dos especies atacan el estado larval del huésped, por lo que existe una superposición parcial del nicho.

A continuación se presentan los antecedentes en el conocimiento de aspectos bio-ecológicos más relevantes para ambas especies, necesario para el planteamiento de las hipótesis y objetivos de esta tesis.

Biología del ectoparasitoide Dineulophus phthorimaeae

Pertenece al gremio de los ectoparasitoides larvales. Tiene hábito solitario, la hembra coloca un único huevo sobre el hospedador, y una vez emergida la larva, ésta crece y se alimenta desde el exterior, aunque protegida dentro de la mina en la que también se halla la larva de *T. absoluta*, donde luego formará la pupa (Fig. 1.7). Prefiere el estadío L3 de *T. absoluta* para oviponer. Su fecundidad es muy baja (< 5 huevos por hembra) (De Santis 1983, Luna *et al.* 2010). Al momento de la oviposición, la hembra inyecta un veneno que paraliza al hospedador, deteniendo su posterior desarrollo. Se trata, por lo tanto, de un parasitoide idiobionte.

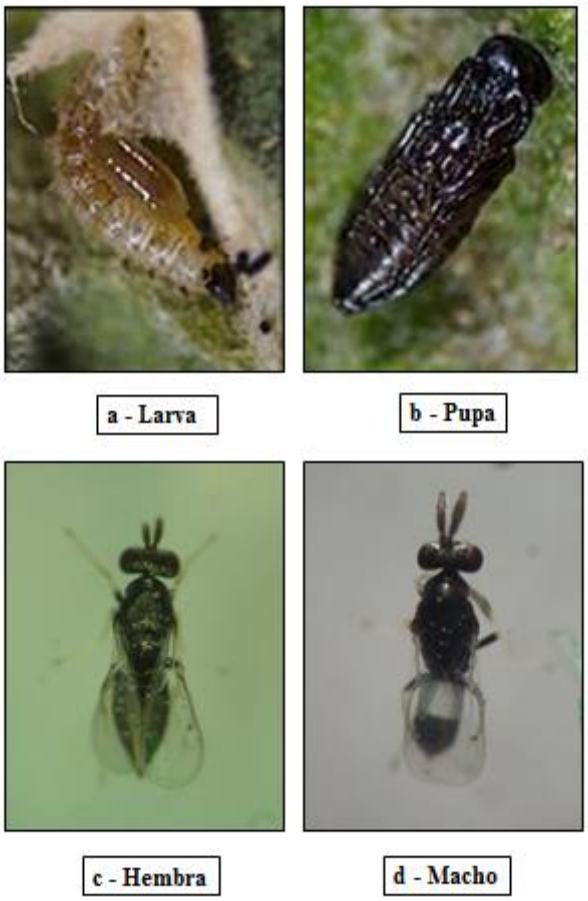


Figura 1.7: Estadios de desarrollo del ectoparasitoide *Dineulophus phthorimaeae.*

Esta especie ha sido poco estudiada hasta el momento, desconociéndose otras especies hospedadoras y/o hábitats donde se desarrolla. En Argentina, Ceriani *et al.* (1995) y Luna *et al.* (2010) la mencionan como un enemigo importante de la polilla en cultivos de tomate del Gran La Plata y del NE de la provincia de Buenos Aires, y Colomo *et al.* (2002) en cultivos en Tucumán. Larrain (1986) en Chile, también ha registrado su presencia, y encontró que es afectado negativamente con el uso de insecticidas, pudiendo hacerse dificultoso el desarrollo natural de sus poblaciones, fundamentalmente en invernáculos donde generalmente se utilizan altas dosis de agroquímicos de manera preventiva. Luna *et al.* (2010) estudiaron parámetros ecológicos en el laboratorio como por ejemplo, el tiempo de desarrollo pre-imaginal, la longevidad del adulto, la fecundidad, la proporción de sexos; y mediante monitoreos en el campo, analizaron también la abundancia y fenología en el cultivo. En ese trabajo,

encontraron que en un cultivo orgánico se registró una mayor tasa de parasitismo de *D. phthorimaeae*, en comparación con el otro parasitoide larval *P. dignus*, lo que sustentaría la hipótesis de una mayor superioridad competitiva del parasitoide idiobionte.

Biología del endoparasitoide **Pseudapanteles dignus**

Pertenece al gremio de los endoparasitoides larvales. Es de hábito solitario, se desarrolla internamente en el hospedador y, al momento de empupar, la larva emerge y forma un cocón blanquecino perlado, generalmente cerca de la mina de *T. absoluta* (Fig. 1.8) (Cardona y Oatman 1971). Ataca larvas del hospedador entre el segundo y cuarto estadio larval (L2 a L4), aunque Nieves (2013) demostró que tiene mejor desempeño cuando utiliza el segundo y tercer estadio de larva de *T. absoluta*.

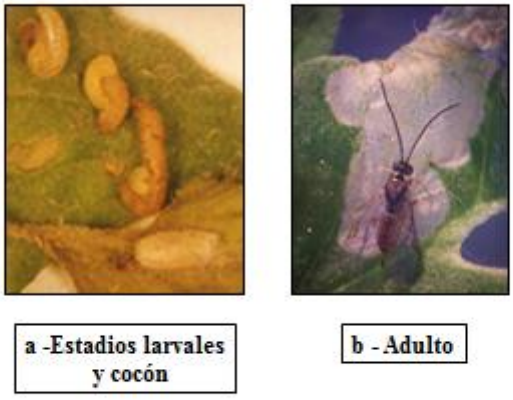


Figura 1.8: Estadios de desarrollo del endoparasitoide *Pseudapanteles dignus*.

El área de distribución reportada para *P. dignus* incluye América del Norte y del Sur, y fue introducida también en Hawaii (Luna *et al.* 2007). Colomo *et al.* (2002) citan a este parasitoide como el más abundante para *T. absoluta* en el cultivo de tomate desde 1995 en la provincia de Tucumán y Botto (1999) y Luna *et al.* 2007 lo mencionan como una especie común en la provincia de Buenos Aires. Además se cuenta con registros de su presencia en otras regiones productoras de tomate de nuestro país, como Mendoza y Corrientes (Cáceres 2011, María Noel Ferraris E.E.A. La Consulta INTA, comunicación

personal). *P. dignus* ha sido más intensamente estudiada, no sólo parasitando a *T. absoluta* sino también a otros hospedadores geléquidos: *Keiferia lycopersicella* (Walshingham), *Phthorimaea operculella* (Zeller), *Symetrischema capsica* (Bradley y Polovny) (Cardona y Oatman 1971, Oatman y Platner 1989, Bennett 1995). Estudios en el laboratorio Luna *et al.* (2007), Nieves (2013) sobre algunos atributos de la historia de vida y de la respuesta funcional, mostraron que tiene un ciclo de vida de ca. 36 días, una fecundidad en promedio de cocones por hembra durante su vida adulta de 100 ± 12,35, es decir un promedio de 4,54 cocones por hembra por día, con una R_0 (Tasa Reproductiva Neta) de 60,77 ± 0,845 y una tasa intrínseca de incremento natural (r_m) de 0,15 ± 0,0005. La respuesta funcional resultó de tipo I, es decir, la proporción de larvas de *T. absoluta* que una hembra parasita es independiente de la densidad de las mismas. Sánchez *et al.* (2009) y Nieves (2013) por su parte analizaron el parasitismo a campo y los patrones de parasitismo a distintas escalas espaciales del cultivo, encontrando valores de porcentajes de parasitismo de hasta 69,69 al quinto día de vida adulta y que además este bracónido exhibe respuesta de agregación a la densidad del hospedador a escala de hoja, aunque las tasas de parasitismo son independientes de la densidad de larvas de *T. absoluta*.

Objetivos e hipótesis del trabajo de tesis

En este proyecto de investigación de tesis doctoral se profundiza en el conocimiento sobre la biología y ecología de *D. phthorimaeae*, de modo de ampliar la información disponible, como así también se progresa en el entendimiento de la interacción parasitoide–hospedador, circunscritas al ectoparasitoide y la plaga *T. absoluta*, y considerando su interacción con el endoparasitoide *P. dignus*. Esta información contribuirá al desarrollo de programas de control biológico, en el marco de un MIP en cultivos de tomate en Argentina. Como tácticas de control se podrían considerar tanto el aumento de las poblaciones de estos enemigos, por medio de sueltas inoculativas y/o a partir de su conservación, por medio de la implementación de prácticas agrícolas que promuevan su establecimiento y acción.

El ***objetivo general*** de este trabajo de tesis doctoral es conocer la biología reproductiva de *D. phthorimaeae* y su interacción con *P. dignus*, dos parasitoides larvales de *T. absoluta*, en el marco del control biológico de esta plaga del cultivo de tomate para la Argentina.

Los antecedentes mencionados anteriormente indican que estas dos especies de parasitoides, con biologías contrastantes (un ectoparasitoide idiobionte y un endoparasitoide koinobionte), tienen potencialidad como biocontroladores. Es de especial interés para este trabajo de tesis, completar el conocimiento sobre algunos de los parámetros ecológicos de *D. phthorimaeae*, más específicamente relacionados a su estrategia reproductiva. En segundo lugar resulta importante dilucidar algunos aspectos de la competencia entre las especies de parasitoides mencionadas, una temática de la ecología de gran implicancia para el control biológico (Hawkins 2000, Boivin y Brodeur 2006, Mills 2006, Messing *et al*. 2006).

Como ***objetivos específicos*** se proponen:

1. Conocer la ecología reproductiva de ectoparasitoide *D. phthorimaeae.*
2. Evaluar la competencia interespecífica entre los parasitoides larvales *D. phthorimaeae* y *P. dignus* en condiciones de laboratorio.
3. Determinar la interacción a campo de ambas especies para el cultivo de tomate de dos regiones de la Argentina.

Como **hipótesis de trabajo** se postulan:

Para el objetivo 1, que por tratarse de una especie idiobionte, *D. phthorimaeae* es una especie sinovigénica.

Para el objetivo 2, que las especies de parasitoides mostrarán competencia por su hospedador, la larva de *T. absoluta,* debido a la superposición parcial del nicho, y al ser *D. phthorimaeae* un parasitoide idiobionte mostrará mayor habilidad competitiva que *P. dignus.*

Para el objetivo 3, que las poblaciones de ambas especies pueden coexistir bajo determinadas condiciones de manejo del cultivo, en las cuales *D. phthorimaeae* (el mejor competidor) se ve afectado negativamente por el uso de insecticidas.

Las **predicciones** formuladas son:

1. Las hembras de *D. phthorimaeae* emergerán con un complemento incompleto de huevos maduros, y practicarán *host-feeding* para su maduración.
2. Las dos especies de parasitoides larvales exhibirán algún tipo de competencia por la larva de *T. absoluta*. El efecto competitivo de *D. phthorimaeae* sobre *P. dignus*. será mayor que el de *P. dignus* sobre *D. phthorimaeae*, medido como la proporción de hospedadores endoparasitados atacada por el ectoparasitoide.
3. En cultivos de tomate con uso de plaguicidas, *P. dignus* desarrollará poblaciones más abundantes que las de *D. phthorimaeae*.

Capítulo 2

Ecología reproductiva del ectoparasitoide **Dineulophus phthorimaeae**

Estrategias reproductivas y comportamiento de alimentación de los parasitoides

El estudio de la biología reproductiva y del comportamiento de los insectos parasitoides respecto a cómo utilizan los hospedadores para criar la descendencia son clave para conocer sus estrategias reproductivas (Jervis *et al*. 2008, Strand 2000). Características tales como el modo de parasitismo (ecto o endoparasitismo) y si le permite al hospedador continuar desarrollándose o no (koino o idiobionte, respectivamente) (*sensu* Mills 1994, Capítulo 1), determinarán aspectos de la reproducción del parasitoide íntimamente ligados a la búsqueda de hospedadores por parte de la hembra.

Otro factor determinante de la biología reproductiva para un gran número de especies de parasitoides es el comportamiento de alimentación de la hembra adulta. Si bien los parasitoides adquieren durante su alimentación larval recursos denominados "tenerales", ricos en lípidos y azúcares, en su estado adulto necesitan consumir otras fuentes de alimento tanto de origen vegetal como animal (Godfray 1994, Quicke 1997, Bernstein y Jervis 2008). Los alimentos de origen vegetal provienen de néctar floral y extra floral, polen, frutas en descomposición, excreciones del hospedador (*honeydew* de los homópteros), mientras que los de origen animal son obtenidos a partir de fluidos corporales de los hospedadores. Este último caso es conocido como *host-feeding* (Jervis y Kidd 1986, Strand 1986, Heimpel y Collier 1996, Quicke 1997, Lundgren 2009), o como su traducción en castellano "picaduras alimenticias" (*sensu* Jacas y Urbaneja 2008). El mecanismo de *host-feeding* ha sido intensamente estudiado. Es realizado ya sea para el propio mantenimiento de la hembra o para la oogénesis. Ha sido reportado principalmente para parasitoides himenópteros, y de manera menos frecuente para algunos dípteros (Clausen 1940, Nettles 1987). A través del *host-feeding*, las hembras adultas consumen en forma facultativa u obligada la hemolinfa y/o tejidos del hospedador. Para ello, practican orificios con el ovipositor o con el aparato bucal, o también pueden construir un tubo de alimentación. Muchas especies no dejan marcas en el hospedador. El *host-feeding* generalmente causa la muerte del hospedador; cuando es realizado durante el acto de oviposición, es denominado ***concurrente*** y cuando sólo es practicado como alimentación, sin oviponer en el mismo acto, se denomina ***no concurrente*** (Jervis y Kidd 1986, Quicke 1997). Este comportamiento se puede

distinguir también como ***no destructivo*** y ***destructivo***, que se refiere a si el hospedador sobrevive al acto de alimentación o no, respectivamente. Finalmente, Jervis y Kidd (1986) observaron que el *host-feeding* no destructivo puede ser tanto concurrente como no concurrente, en cambio la alimentación destructiva solo puede ser no concurrente, ya que el hospedador muerto no estará apto para el desarrollo de la larva del parasitoide.

La muerte del hospedador puede ser causada por la propia actividad de sondeo ejercida por la hembra y/o debida a la inyección de venenos compuestos por toxinas muy complejas (alcanos, alcoholes, aldehídos, ácidos orgánicos, enzimas y aminas, entre otras sustancias). Los venenos sirven para muchas funciones diferentes, dependiendo de si se trata de endo o ectoparasitoides, pudiendo ser de acción sólo paralizante o letal. En este trabajo de tesis resulta relevante principalmente su papel ligado a la alimentación y al parasitismo en ectoparasitoides idiobiontes, ya que la inmovilidad del hospedador incrementa el éxito de la oviposición. También dependiendo de la composición química del veneno la supervivencia de la descendencia mejorará al detener los procesos de lisis y descomposición del hospedador (Wang y Yang 2008).

El estudio de las relaciones nutricionales entre las fuentes de alimento de origen vegetal y animal utilizadas por los parasitoides ha despertado interés recientemente. En principio se reconoce que no serían nutricionalmente equivalentes (Agrawal *et al.* 1999, Eubanks y Denno 2000, Janssen *et al.* 2003). Si bien el énfasis en la literatura está puesto en la calidad nutricional del *host-feeding*, se sabe que los materiales vegetales proporcionan algunos nutrientes esenciales. También, su importancia ecológica ha sido reconocida, a través de intentos de manipular la disponibilidad de néctar y polen en los campos de cultivo con el fin de mejorar los niveles de control biológico de plagas por parasitoides, práctica utilizada de manera exitosa. Esta manipulación puede ser particularmente importante en un programa de conservación de enemigos naturales (Gardiner *et al.* 2009).

El tipo y la calidad del alimento son determinantes en la longevidad y fecundidad de las avispas. En la literatura pueden encontrarse indicios sobre de distintas fuentes de alimento de origen natural comúnmente usadas por los parasitoides, entre ellas se mencionan la miel, el néctar (floral o extrafloral), la fruta fermentada, el polen y el *honeydew*. Todos ellos son fuentes ricas en azúcares, siendo algunos de ellos de más

fácil acceso que otros en la naturaleza, por lo que la energía empleada en su búsqueda podría reducir sustancialmente el encuentro de hospedadores, lo cual es un costo importante para aquellos parasitoides *time – limited*. (Sirot y Bernstein 1996). Los alimentos proveniente de fuentes vegetales descriptos anteriormente, ricos en azúcares y aminoácidos, aporta energía, mientras que el *host-feeding*, contribuye a la captación de grandes cantidades de proteínas (Quicke 1997, Thompson 1999). Jervis *et al.* (1993) mostraron mayores tasas de parasitismo en ciertas especies de parasitoide que tuvieron acceso a néctar, por ejemplo en Ichneumónidos y Chalcidoideos. Leius (1963) demostró experimentalmente que para la cría del ichneumónido *Scambus buolianae* (Htg.) el agregado de polen a una solución de miel prolongó la longevidad y/o incrementó la fecundidad. Para muchos parasitoides himenópteros, las observaciones a campo sugieren que usar polen y néctar como fuentes de alimento es determinante para extender el tiempo máximo de vida y el parasitismo efectivo total.

El comportamiento de alimentación que presentan los parasitoides puede ser abordado desde el punto de vista de su contribución al éxito reproductivo total y al comportamiento más general de forrajeo (van Baalen y Hemerick 2008). Se sabe que el consumo de distintas fuentes de alimento, ligadas o no a los hospedadores, generalmente resulta en un incremento en la expectativa de vida, la capacidad de dispersión y la fecundidad total realizada de las hembras. Por otra parte, la presencia y dispersión de los recursos alimenticios vegetales y animales no son eventos que ocurren simultáneamente y esto determinará una heterogeneidad en el acceso a los mismos, por lo que la hembra adulta desplegará diferentes estrategias de forrajeo. Por lo tanto, y según lo postulado por Bernstein y Jervis (2008), cuando una hembra encuentra un hospedador debe enfrentarse al dilema de optar entre una ganancia de *fitness* ***inmediata*** i.e. oviponer, o una ***futura***, al elegir posponer tal evento y alimentarse, lo que le asegurará una ganancia en la expectativa de vida y estado nutricional, para futuras oviposiciones. Esta situación se ilustra en la Figura 2.1.

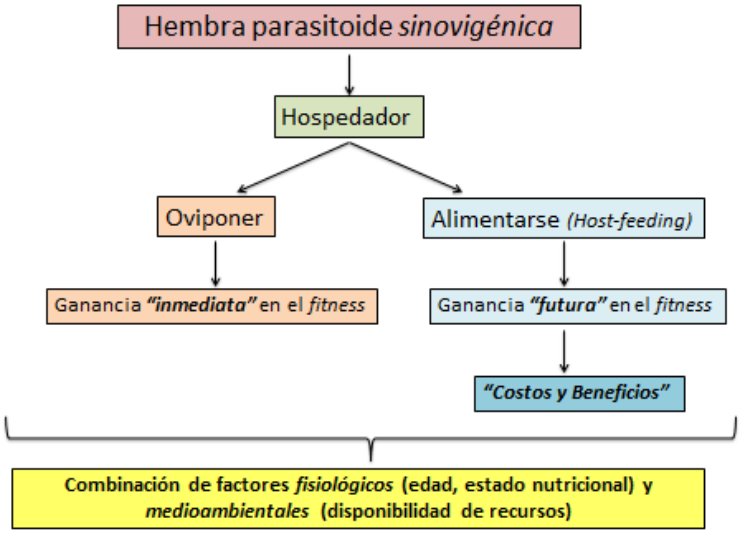


Figura 2.1: Esquema teórico del comportamiento de decisión de una hembra parasitoide adulta la presencia del recurso.

Por otra parte, la interrupción de la oviposición en ese acto constituirá un costo reproductivo. Esta decisión estará relacionada no sólo con el estado nutricional actual de la hembra del parasitoide, sino también con el tipo de estrategia reproductiva u ovigenia entendida como la estrategia de producción de huevos (Capítulo 1, Flanders 1950).

En el caso de las especies sinovigénicas, que maduran los oocitos durante toda la vida adulta y donde su éxito reproductivo dependerá de la cantidad de huevos que pueda madurar, resultará trascendental esta decisión para un balance entre una oviposición inmediata *versus* futura. Sin embargo, la probabilidad con la que una hembra opte por predar u oviponer, dependerá cuali y cuantitativamente de los costos y beneficios del *host-feeding* (Figura 2.1, Rivero y West 2005). El principal beneficio que plantea el *host-feeding* es el incremento tanto en la longevidad como en la producción de huevos, lo cual dependerá del estado nutricional y de la experiencia previa de las hembras (Jervis y Kidd 1986, Heimpel y Collier 1996, Bernstein y Jervis 2008).

La complejidad de estrategias de alimentación que exhiben las hembras parasitoides adultas descritas anteriormente está íntimamente ligada al comportamiento de oviposición, y que determina en última instancia la ovigenia. En estos insectos, la misma está primeramente definida por aspectos anatómicos y fisiológicos del sistema

reproductivo de la hembra, tales como el número de ovariolas presentes, la capacidad de almacenamiento de los oocitos, la proporción del complemento de huevos que están maduros al comienzo de la vida adulta y el tamaño de los huevos (Flanders 1935, 1942, 1950). Según el contenido de vitelo se pueden reconocer ***huevos anhidrópicos*** o ***lecíticos***, como aquellos que poseen un corion rígido y con grandes cantidades de vitelo, e ***hidrópicos*** o ***alecíticos***, que poseen un corion delgado y son pobres en vitelo. Otra característica anátomo-fisiológica importante de la ovigenia es la capacidad de reabsorción de huevos que tiene a hembra. Éstas reabsorben huevos maduros cuando hay una escasez de hospedadores o de alimento, y aprovechan los materiales presentes en vitelo para el mantenimiento somático y también para utilizarlos en la futura ovogénesis. En otras palabras, la reabsorción ayuda a redistribuir recursos energéticos en períodos desfavorables, para prolongar la longevidad y aumentar su éxito reproductivo (Bernstein y Jervis 2008).

Aparte de las razones morfológicas que determinan la ovigenia, los hábitos de alimentación de las hembras adultas influyen directamente sobre la producción de huevos en insectos parasitoides. Iwata (1960) encontró que el número de huevos maduros que presenta una hembra está inversamente relacionado con el número de ovariolas y el tamaño de los oocitos, siendo los anhidrópicos energéticamente más costosos de producir que los del tipo hidrópico. Así, la fecundidad potencial para las especies que producen huevos hidrópicos debería ser mayor que las que producen huevos anhidrópicos (Heimpel 2000). El *host-feeding* destructivo permite a las hembras sostener una producción de huevos anhidrópicos de alta calidad y probablemente fuentes naturales alternativas de alimento colaboren para la oogénesis (Burger *et al*. 2004).

Jervis *et al.* (2001) desarrollaron un ***índice de ovigenia*** (*IO*), que mide el grado de producción de huevos en el comienzo de la vida de la hembra adulta. Cuando el *IO* toma un valor igual a 1, significa que todo el complemento de huevos está maduro en el inicio, y se relaciona con una estrategia reproductiva pro-ovigénica estricta, mientras que un valor igual a 0 revela la ausencia total de huevos maduros al momento de la formación del estado adulto, equivalente a una estrategia sinovigénica extrema. En el caso de los parasitoides idiobiontes, estos autores relacionan la estrategia reproductiva sinovigénica con una alta expectativa de vida, a la habilidad de hacer *host-feeding*, y a

la producción de pocos huevos de tipo anhidrópicos. Además, destacan la relación inversa que existe entre esa estrategia con la capacidad de reabsorción.

En trabajos posteriores de revisión y síntesis (Jervis & Kidd 1986, Jervis and Copland 1996, Jervis *et al*. 2008) se demostró que existen cuatro estrategias reproductivas para himenópteros parasitoides (Fig. 2.2) , basándose en el modo de parasitismo, la koino/idiobiosis y el comportamiento de alimentación –principalmente por *host-feeding*, todos aspectos tratados precedentemente.

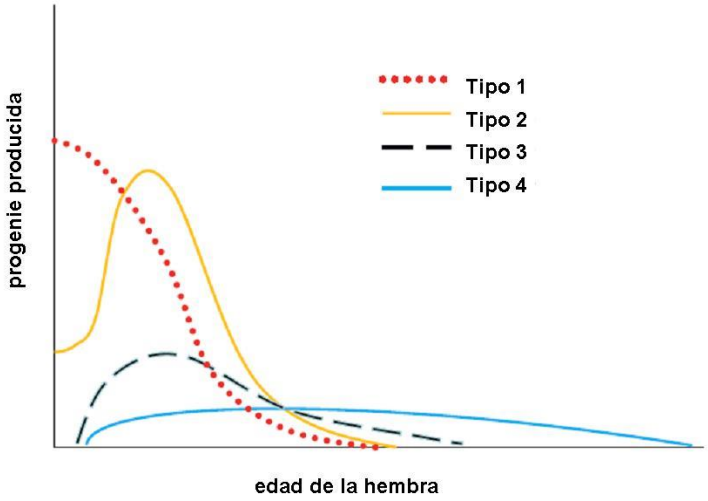


Figura 2.2: Patrones de fecundidad específica por edad para diferentes especies de parasitoides idiobiontes y koinobiontes (tomado de Jervis *et al.* (2008), *Annual Review of Entomology* 53: 361-385).

En la Figura 2.2 se ilustran las cuatro estrategias reproductivas, como la variación de la curva de fecundidad efectiva en función de la edad de la hembra. Las curvas de tipo 1 y 4 describen dos estrategias extremas: la Tipo 1, exhibida por especies pro-ovigénicas, cuyas hembras no realizan *host-feeding* y disponen de una gran cantidad de huevos pequeños e hidrópicos (> 1000 huevos, entre 0,1 - 0,3 mm de largo) todos maduros al momento de la emergencia de la hembra adulta; y la de Tipo 4, característica de especies sinovigénicas, donde las hembras adultas realizan *host-feeding* obligatoriamente, tienen pocas ovariolas con huevos de gran tamaño y de tipo anhidrópico (entre 50 a 100 huevos de ≈ 0.5 mm de largo), los cuales son madurados a lo largo de toda la vida adulta de la hembra. Las otras dos categorías de estrategias se

refieren a situaciones intermedias; en la de Tipo 2 las hembras experimentan un pico de producción de huevos a los pocos días de emerger y en la Tipo 3 tienen también un periodo de pre-oviposicion corto pero la curva de fecundidad y la fecundidad realizada son más bajas. En el trabajo de Jervis *et al.* (2008) se muestra además una tabla con ejemplos exhaustivos de las estrategias reproductivas de especies de parasitoides, según cada categoría.

Otro aspecto importante de la biología reproductiva en los parasitoides es su clasificación entre hembras "limitadas en el número de huevos maduros para oviponer" (***egg - limited***) y aquellas que están "limitadas en el tiempo que disponen para oviponer" (***time - limited***). Se considera que un parasitoide es egg - limited cuando el número de oportunidades de oviposición reales excede el número de óvulos maduros disponibles para oviponer, mientras que un parasitoide es time - limited cuando el número de huevos maduros disponibles para oviponer excede el número de oportunidades reales de oviposición. Esta característica es sumamente influyente sobre su estrategia reproductiva y la tasa de parasitismo (Lesells 1985, Hassel 2000, Jervis *et al*. 2008).

La respuesta funcional de insectos parasitoides

Otro punto relevante en la biología de los parasitoides es la respuesta de la tasa de ataque en función a la densidad de hospedadores, es decir, la ***respuesta funcional*** (Holling 1969). Propuesto originalmente por Solomon (1949), este término describe la relación entre el número de presas u hospedadores consumidos por un depredador o parasitoide, en función a la densidad de presas u hospedadores, en un espacio e intervalo de tiempo fijo. La respuesta funcional compone uno de los parámetros de los modelos que explican la dinámica de interacción predador-presa y parasitoide-hospedador. Se han descrito tres tipos principales de respuesta funcional (Holling 1959, Hassell 2000) (Fig. 2.3):

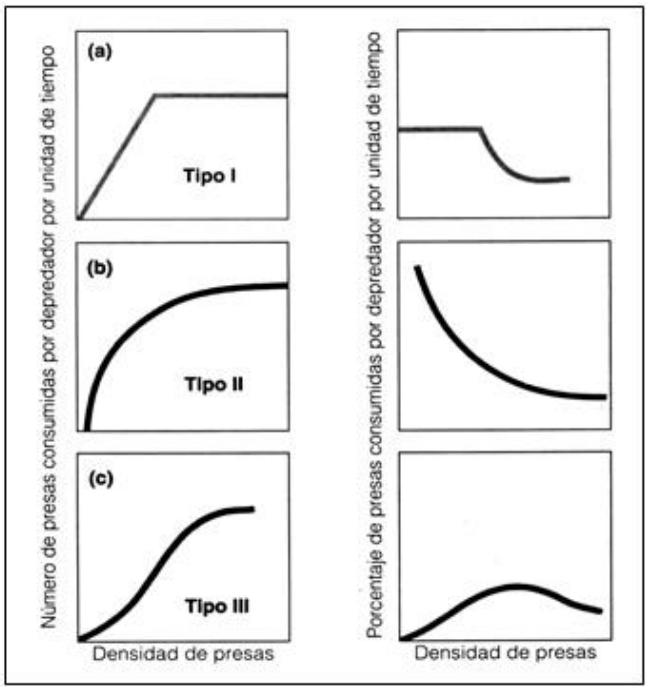


Figura 2.3: Tipos de respuesta funcional según Holling (1959) (tomado de Smith, R. L. y Smith, T. M. (2001), *Ecología*. Pearson Education. 4ta Edición en castellano.

La respuesta funcional de ***tipo I*** o ***densoindependiente*** (Figura 2.3 a) describe un aumento lineal de la tasa de ataque de un depredador o parasitoide respecto a la densidad de sus presas u hospedadores, hasta un punto máximo donde se estabiliza. La pendiente determina la ***tasa de ataque*** también conocida como ***eficiencia de búsqueda*** (***a'***), definida como la proporción de hospedadores consumidos por unidad de tiempo. La literatura propone que este tipo de respuesta es más frecuente en ambientes estacionales. La respuesta funcional de ***tipo II*** o ***densodependiente indirecta*** (Figura 2.3 b) muestra un aumento desacelerado del consumo de presas u hospedadores, hasta llegar a una asíntota que expresa la máxima tasa de ataque. En este tipo de respuesta funcional aparece otro parámetro que es el ***tiempo de manipuleo*** (***Th***), definido como el tiempo que necesita un depredador o parasitoide para buscar, dominar y consumir a su presa u hospedador, y prepararse para la siguiente búsqueda. Por consiguiente un *Th* prolongado conduce a una baja tasa de ataque y viceversa. También esta densodependencia inversa permite que a altas densidades poblacionales de la presa, éstas tendrán menor probabilidad de ser atacadas que cuando se encuentran a bajas densidades. Para los parasitoides, tanto un *Th* constante como la insuficiencia de huevos conducen a este tipo

de respuesta funcional (Fernandez Arhex y Corley 2003). Este tipo de respuesta se ejemplifica por depredadores invertebrados depredadores y parasitoides, quienes van saciándose a medida que consumen sus presas. La respuesta funcional de ***tipo III*** o ***densodependiente directa*** (Fig. 2.3 c) describe una curva sigmoide, donde el número de presas u hospedadores consumidos por unidad de tiempo se acelera con el aumento de la densidad de los mismos, hasta un punto donde el *Th* comienza a limitar su consumo. Este tipo de respuesta produce una mortalidad densodependiente directa a bajas densidades, pero a partir de ese punto de inflexión describe una densodependencia inversa y la curva se parece a una respuesta funcional de tipo II. Depredadores vertebrados, depredadores invertebrados y parasitoides han sido reportados como ejemplos de este tipo de respuesta, y se la atribuye al que desarrollo de aprendizajes para la alimentación, y al cambio de ítems de presas u hospedadores.

Para determinar el tipo de respuesta funcional de un depredador o parasitoide se han propuesto varias metodologías; sin embargo el enfoque logístico que examina la relación funcional entre una variable dependiente binomial (hospedador parasitado y no parasitado) y una variable independiente (número de hospedadores) es actualmente el más aceptado (Juliano 2001; Fernandez Arhex y Corley 2003; Luna *et al.* 2007, Romero Sueldo *et al.* 2010).

La respuesta funcional describe un aspecto relevante de la reproducción de una especie de enemigo natural, y su estimación ha sido propuesta como un rasgo importante a la hora de evaluar su potencialidad como agente de control biológico de plagas. Para un programa de control biológico, es particularmente importante conocer la forma general que presenta la curva de consumo para el depredador o parasitoide en estudio, para poder predecir su efecto potencial sobre la estabilidad del sistema. Tradicionalmente, la persistencia de la interacción parasitoide- hospedador se había atribuido solo a aquellos enemigos que presenten una respuesta funcional de tipo III (Hassell y May 1974, Berryman 1999). No obstante, estudios recientes han demostrado que los otros dos tipos de respuesta funcional pueden conducir a la estabilidad de la interacción en el campo, entre otras cosas a causa de la heterogeneidad en el riesgo de parasitismo entre los individuos de la población de hospedadores (Walde y Murdoch 1988, Hassell 2000). A su vez, el análisis del tipo de respuesta funcional es crucial para evaluar candidatos a través de la estimación de *a'* y *Th*, cuyos valores permiten

posteriormente realizar comparaciones entre varias especies disponibles acerca del posible éxito del control (van Lenteren 2012). Cabe mencionar que el *Th* puede ser calculado sólo para las respuestas funcionales tipo II y III, ya que existe una densodependencia en el consumo, tanto sea esta inversa (tipo II), o directa (tipo III).

Un aspecto importante a tener en cuenta cuando se analiza la mortalidad que puede infligir una especie de parasitoide a un hospedador cuando lo parasita, es que también lo puede hacer cuando practica *host-feeding* letal. A los efectos de evaluar candidatos potenciales como agentes de biocontrol, muchos programas asumen que un ataque exitoso del parasitoide resulta en la parasitación. Sin embargo, si la especie a evaluar tiene la capacidad también de hacer *host-feeding* no concurrente y destructivo, esto aumentará la mortalidad de la población de la plaga a controlar (Kidd y Jervis 1989, Jervis *et al.* 1996).

Varios estudios han evaluado atributos biológicos de los enemigos naturales de *T. absoluta* en Argentina (Riquelme Virgala 2009, López *et al*. 2012, Nieves 2013). Luna *et al.* 2007 determinaron la respuesta funcional de *P. dignus*, la otra especie de parasitoide larval estudiada en esta tesis, la cual resultó ser de tipo I o independiente de la densidad del hospedador, con una tasa de ataque = 0,22.

La teoría predice que el estado nutricional de la hembra y la densidad del hospedador afectan su respuesta funcional (Collins *et al.* 1981; Bai y Mackauer 1990). En hembras de especies sinovigénicas que realizan *host-feeding* destructivo, la respuesta funcional será el resultado tanto de la alimentación como de la oviposición sobre el hospedador, que como ya se explicó anteriormente, esta decisión será realizada en función de la disponibilidad de hospedadores y fuentes de alimento (ver también Fig. 2.1). Jervis *et al*. (1996) indicaron que los parasitoides que poseen esta estrategia reproductiva son probablemente mejores agentes de control biológico.

Objetivos, hipótesis y predicciones

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos previamente, este capítulo del trabajo de tesis profundiza el conocimiento de aspectos de la ecología reproductiva de un ectoparasitoide larval, el himenóptero eulófido *D. phthorimaeae*, cuando parasita larvas del lepidóptero geléquido *T. absoluta*, experimentalmente en condiciones de

laboratorio. Como ya se indicó en el Capítulo 1, el ectoparasitoide tiene una serie de atributos positivos como agente de biocontrol de *T. absoluta* en cultivos de tomate de la Argentina, tales como la sincronización estacional con el hospedador, la adaptabilidad climática, la especificidad con su hospedador, una buena respuesta a la densidad de hospedadores y no poseer efectos adversos (Colomo *et al.* 2002, Luna *et al.* 2010). La hembra de este ectoparasitoide practica *host-feeding* destructivo, tanto concurrente como no-concurrente, tiene una baja fecundidad (< 5 huevos por hembra) y comienza a oviponer a partir del quinto día de vida adulta. Así, se prevé que *D. phtorimaeae* exhibirá una estrategia de ovigenia de tipo sinovigénica, según Jervis *et al*. (2008). Con respecto a su comportamiento alimenticio, se ignora cuáles otras fuentes de origen vegetal podría usar la hembra adulta. Finalmente, se desconoce la respuesta funcional del parasitoide y su potencial como factor de mortalidad sobre la plaga. Estos conocimientos son de relevancia para la evaluación de esta especie como agente de control biológico para el manejo de *T. absoluta.*

El ***objetivo general*** de este capítulo es conocer la ecología reproductiva del ectoparasitoide *D. phthorimaeae* (Hymenoptera: Eulophidae). Como ***objetivos específicos*** se proponen:

1- Determinar la estrategia de ovigenia del parasitoide.

2- Evaluar cómo distintas fuentes de alimento ofrecido a la hembra adulta influyen en el desempeño y parasitismo de *T. absoluta*.

3- Analizar el tipo de respuesta funcional del parasitoide.

La **hipótesis general** es que por tratarse de una especie idiobionte y de baja fecundidad, *D. phthorimaeae* tendrá una estrategia reproductiva de tipo sinovigénica y necesitará adquirir nutrientes de alta calidad para su reproducción.

Por lo tanto, para los objetivos 1 y 2 se **predice** que:

a- Las hembras emergerán con un complemento incompleto de huevos maduros.

b- Distintas fuentes de alimento tendrán efectos diferenciales en el éxito reproductivo de las hembras.

Materiales y Métodos

Colonias de insectos

La colonia de *T. absoluta* se estableció a partir de la colecta de plantas de tomate realizada en cultivos comerciales de tomate orgánico del CHP (La Plata, Buenos Aires, Argentina), con evidencias de daño fresco de la plaga (Fig. 2.4).

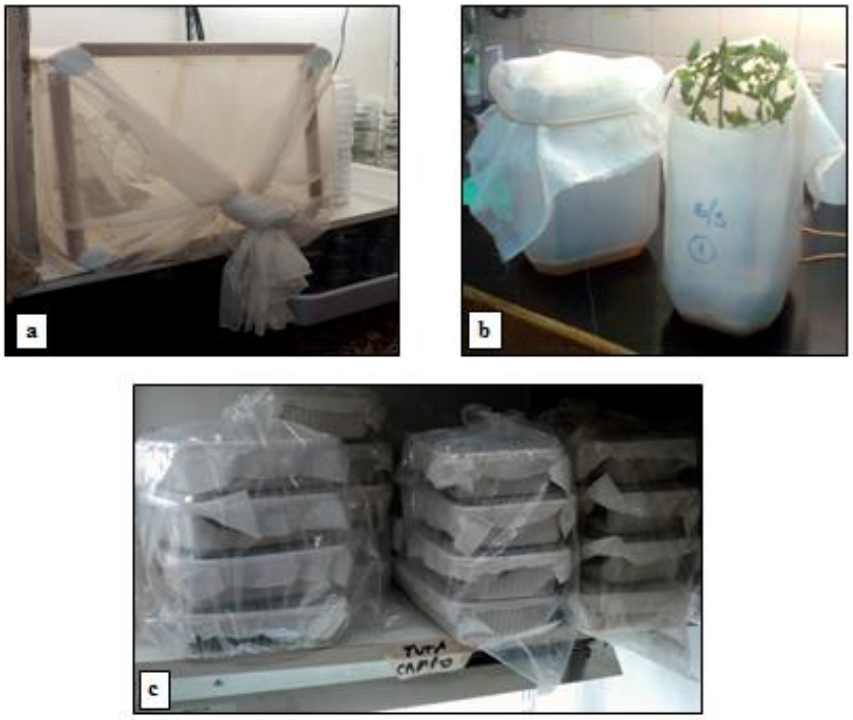


Figura 2.4: Cría experimental de la polilla del tomate *Tuta absoluta* bajo condiciones ambientales controladas en el bioterio: (a) jaula de oviposición; (b) cajas de crías de larvas conteniendo plantines de tomate con los primeros estadios larvales de la polilla (L1, L2 y L3) y (c) bandejas de pupación albergando el último estadio larval (L4) y el estadio de pupa de la polilla del tomate.

El protocolo de cría de la polilla usado fue descripto por Luna *et al*. (2007). El material colectado se seccionó primeramente en hojas y se lo colocó en bandejas plásticas con tapa (500 ml). Las larvas de *T. absoluta* presentes fueron alimentadas con

hojas de tomate provenientes de plantas cultivadas en un invernáculo experimental en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, CCT La Plata CONICET y UNLP). Una vez obtenidas las pupas, se colocaron en jaulas de voile (40 x 40 x 40 cm), donde emergieron las polillas (Fig. 2.4 a). Éstas fueron alimentadas con solución de miel *ad libitum* y provistas con plantines de tomate como sustrato de oviposición. Las jaulas fueron revisadas cada 48 h, reemplazando las plantas con huevos por nuevas. Los plantines con huevos fueron ubicados individualmente en cajas plásticas (20 x 20 x 30 cm) (Fig. 2.4.b) hasta la eclosión de los mismos y la instalación de las larvas del primer estadio en minas en las hojas, donde mudaron al segundo estadío larval. Posteriormente, las hojas infestadas fueron cortadas y ubicadas en recipientes plásticos (500 ml) (Fig. 2.4. c). Las cajas se revisaron cada 48 h para aportar follaje fresco de tomate para alimentación de las larvas, mantener la limpieza general y extraer las pupas formadas.

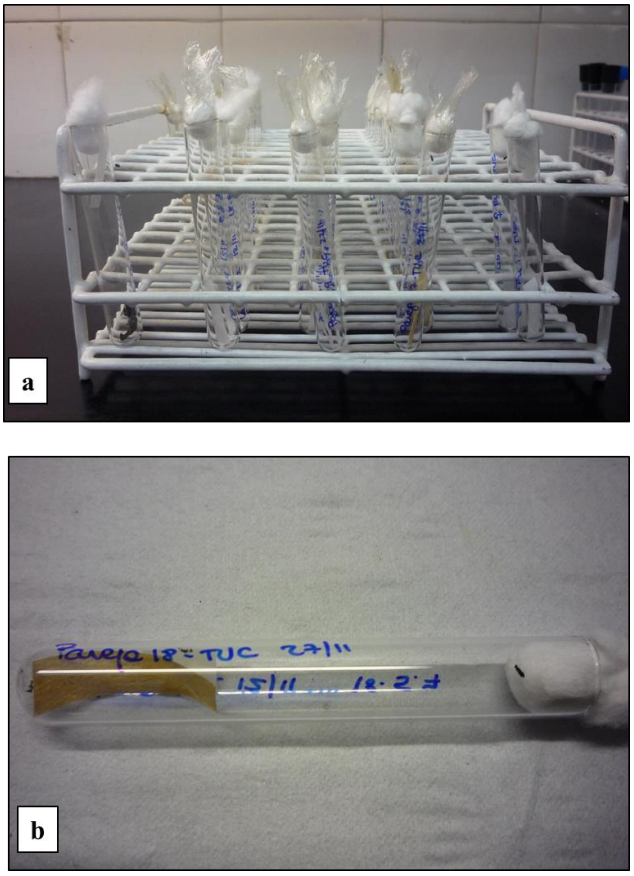


Figura 2.5: Colonia del ectoparasitoide *D. phthorimaeae* bajo condiciones ambientales controladas en el bioterio: (a) grilla conteniendo los tubos con los individuos de diferentes estadios, (b) tubo conteniendo macho y hembra de la avispa.

Los ejemplares de *D. phthorimaeae* fueron colectados también en campos comerciales cultivados de manera orgánica, en el CHP. Para ello, hojas con daño aparente de la polilla, i.e. minas, fueron abiertas cuidadosamente y observadas bajo lupa binocular (KYOWA SDZ PL Tokio, Japón), con iluminación incidente y trasmitida, para buscar la presencia de las larvas de *T. absoluta* inmóviles, señal de la posible presencia del ectoparasitoide. Una vez encontradas, se revisaban minuciosamente para detectar los especimenes de *D. phthorimaeae* que podían encontrarse en estado de larva o pupa. Una vez hallados, se retiraron de las minas con un pincel de un pelo, junto con el hospedador paralizado, y colocados individualmente en tubos de vidrio tipo Kahn (5 ml). Los tubos fueron tapados herméticamente y provistos en su interior de un pedazo de papel de filtro humedecido para suministrar una atmósfera húmeda. Los tubos se etiquetaron con información sobre la fecha de colecta y lugar, y acondicionados en

soportes o grillas donde se los observó diariamente hasta la emergencia del adulto (Fig. 2.5 a). Una vez emergidas, las avispas fueron sexadas, siguiendo la descripción de De Santis (1983), y re-ubicadas en parejas para permitir el apareamiento. Los adultos fueron provistos con miel como alimento y agua (Fig. 2.5 b).

Las colonias de *T. absoluta* y *D. phthorimaeae* fueron mantenidas en un bioterio bajo condiciones controladas ubicado en el CEPAVE, a una temperatura de 25 ± 2 ° C, un fotoperíodo de 14:10 luz/oscuridad y una humedad relativa de 70 ± 10 %.

Determinación de la estrategia de ovigenia de D. phthorimaeae

Experimento 1: tipo de maduración de huevos y reabsorción

Se realizó un primer ensayo para determinar el tipo de maduración de huevos al momento de la emergencia de la hembra adulta y la evolución de los mismos, según avanza la edad de la hembra. Para ello se llevó a cabo un estudio anatómico, que consistió en analizar microscópicamente el número de oocitos maduros e inmaduros en ovarios de hembras vírgenes, de cuatro edades conocidas: recién emergida de la pupa (0 día), 3, 5 y 7 días (n=10 hembras por edad). Para este análisis se seleccionaron y sacrificaron hembras de la colonia alimentadas solo con miel y que no han tenido contacto con larvas de *T. absoluta*. Bajo una lupa binocular (Nikon, modelo SMZ 800, Tokio, Japón) se las montó en una gota de solución fisiológica para diseccionar el abdomen. Se realizaron preparados de las ovariolas en portaobjetos y con la ayuda de un microscopio (Olympus BX51), equipado con una cámara digital (Olympus DP71), se registraron imágenes, las cuales fueron luego procesadas con el software DP Manager Imaging System (v. 3.1.1.208, Olympus Corporation,http://www.olympus-global.com/). Se procedió a contar y registrar el grado de maduración de los oocitos según el número de oocitos presentes, su tamaño (longitud del eje mayor, en μm) y la coloración del corion de los mismos como característica indicadora del grado de maduración.

Otro atributo indicativo de la estrategia reproductiva de parasitoides es la capacidad de reabsorber oocitos, que tienen las hembras sinovigénicas. Para determinar si las hembras de *D. phthorimaea*e son capaces de reabsorber oocitos, a qué edad y en qué cantidad lo realizan, se llevó a cabo el análisis morfológico comparativo de las microfotografías de los oocitos obtenidos en las disecciones, para las cuatro edades (0,

3, 5 y 7 días) de las hembras. La información registrada para cada hembra y edad del parasitoide fue el número de huevos maduros o inmaduros reconocidos por la presencia de masas de trofocitos a su alrededor.

Experimento 2: tipo de estrategia de ovigenia

Para evaluar si se trata de una especie pro- o sinovigénica, se siguió el criterio descripto por Jervis *et al.* (2001), que se basa en la producción de huevos durante toda la vida de la hembra adulta, como un valor indicativo del número relativo de oocitos maduros e inmaduros en los ovarios. El experimento consistió en estimar la carga de huevos en tres edades de la hembra adulta de *D. phthorimaeae* y su progresión en la maduración. La carga de huevos consiste en la suma de huevos ovipuestos más los oocitos remanentes en las ovariolas. Para ello se seleccionaron de la colonia hembras adultas de edad conocida del ectoparasitoide y se las colocó individualmente en un tubo de Kahn (5 ml) junto a un individuo macho para permitirles el apareamiento por 24 h. Transcurrido ese tiempo, se les ofreció un número fijo de hospedadores en un único evento por otras 48 h. Las avispas fueron provistas con miel y agua *ad libitum.* El número de larvas de *T. absoluta* ofrecidas varió entre 6 y 8 del tercer estadio, una densidad de larvas reportada por Luna *et al*. (2010) como óptima para el desempeño de la hembra del parasitoide. Las edades de la hembra de *D. phthorimaeae* consideradas para este estudio fueron 3, 5 y 7 días de vida, contados a partir de la emergencia de la pupa (n=10 avispas por edad). Este estudio se realizó en un bioterio bajo condiciones controladas. Una vez finalizado el experimento, se procedió a revisar cuidadosamente el estado de los hospedadores, los cuales fueron clasificados como “paralizados” (es decir, larvas que fueron usadas como alimento) o “parasitados” (larvas que presentaban externamente un huevo del parasitoide). El comportamiento de *host-feeding* de *D. phthorimaeae* no pudo ser observado directamente, sin embargo se usó el criterio descrito por Luna *et al.* (2010), quienes habían detectado que la parálisis permanente de las larvas de *T. absoluta* y su coloración amarillenta es una indicación que éstas fueron usadas como alimento. Por otra parte, las hembras del ensayo fueron disecadas en una gota de glicerina bajo lupa para estimar el número de oocitos remanentes.

Los datos registrados fueron: a) la carga de huevos y b) el tamaño de los oocitos (longitud del eje mayor, en µm).

Para evaluar posibles diferencias significativas en el grado de maduración de oocitos en las tres edades de las hembras adultas de *D. phthorimaeae*, se consideraron las variables número de huevos (carga de oocitos) y el tamaño de los mismos producidos en cada edad como variables de respuesta y con ellas se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un $\alpha = 0{,}05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software STATISTICA 6.0; (StatSoft 2004). Como H_0 se planteó que no existirían diferencias en la ovigenia experimentada por hembras de *D. phthorimaeae* de distinta edad. Como H_1 se propuso que existirían diferencias, y que la edad de la hembra influencia en el número y tamaño de los huevos producidos. En el caso de encontrarse diferencias significativas de los promedios entre tratamientos, éstos fueron separados mediante la prueba de Tukey (HSD), con $\alpha = 0{,}05$.

Evaluación de diferentes fuentes de alimento sobre el éxito reproductivo de la hembra de D. phthorimaeae

El efecto de diferentes alimentos sobre el *fitness* o éxito reproductivo de *D. phthorimaeae* se evaluó experimentalmente. El ensayo consistió en estimar como cuatros tipos de fuentes alimenticias (tratamientos) influían sobre las siguientes variables de respuesta: a- proporción de hospedadores paralizadas o "picados", b- proporción de hospedadores parasitados, c- la fertilidad total de las hembras, calculada como el número de huevos ovipuestos más el remanente en el abdomen, y d- la longevidad, estimada como el número de días de vida. Los tipos de alimento se seleccionaron en función de información previa reportada sobre alimentos que los parasitoides buscan en el campo. Así, se seleccionaron miel, polen y fruta fermentada (origen vegetal) y fluidos del hospedador (origen animal), para reproducir el *host-feeding*. La miel es una fuente rica en azúcares y muy utilizada, además, en estudios de laboratorio. El polen posee un alto valor nutritivo (Burger *et al*. 2004) aunque sus granos son resistentes y su contenido solo puede ser consumido por algunos parasitoides (Gilbert y Jervis 1998). Las frutas fermentadas fueron seleccionadas debido a que son consideradas otra alternativa a la cual los parasitoides pueden tener acceso esporádico en la naturaleza, no obstante la energía empleada en su búsqueda podría reducir

sustancialmente el encuentro de hospedadores, lo cual es un costo importante para aquellos parasitoides *time-limited* (Sirot y Bernstein 1996). Los tratamientos fueron: 1) pasas de uva (*Vitis vinifera* L.) remojadas + agua; 2) polen + miel + agua; 3) homogenato de larvas de *T. absoluta* + pasas de uva remojadas + agua; y también se consideró un tratamiento control a la provisión de 4) miel + agua. Los alimentos fueron ofrecidos a hembras adultas (n=10 por tratamiento), desde el momento de la emergencia del imago hasta su muerte. Todas las hembras utilizadas en el experimento fueron obtenidas de la colonia, colocadas individualmente en tubos de Kahn (5 ml), y apareadas durante las siguientes 24 h de la emergencia. Transcurrido ese tiempo, se extrajeron los machos y se mantuvieron las hembras con cada tipo de alimento *ad libitum*. A partir del quinto día de la vida adulta y hasta su muerte se les ofrecieron cada 48 h grupos de 8 larvas del tercer estadío de *T. absoluta*, instaladas en folíolos de tomate frescos (Fig. 2.6). De cada hembra tratada y en cada recambio de larvas del hospedador se registró: a) el número de hospedadores vivos, es decir que no fueron atacados por el parasitoide; b) el número de larvas paralizadas por el parasitoide, considerando que sobre ellas solo realizó *host-feeding*; y c) el número de hospedadores parasitados, i.e. con presencia del huevo del parasitoide.

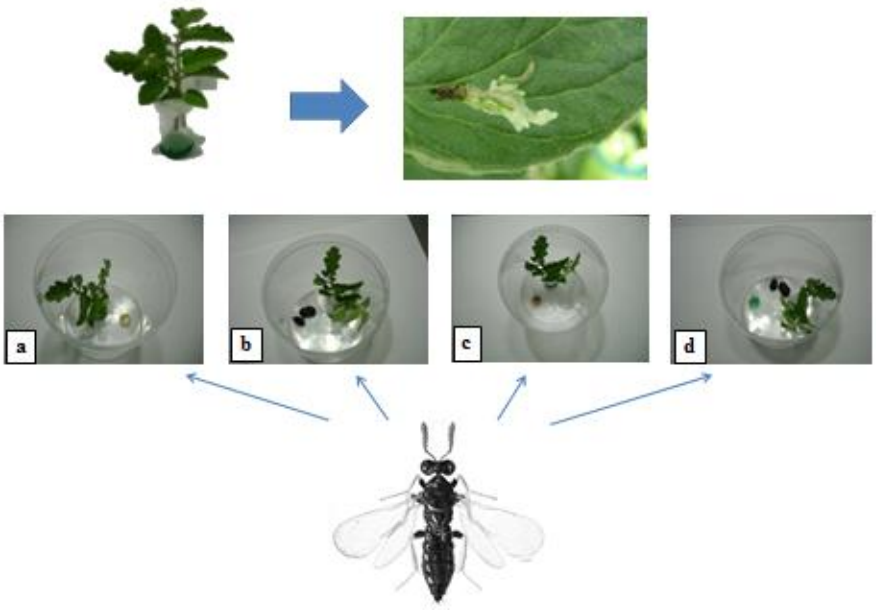


Figura 2.6: Esquema del ensayo de evaluación de diferentes alimentos sobre el éxito reproductivo de las hembras adultas de *D. phthorimaeae*: (a) miel + agua; (b) pasas de uva remojadas + agua; (c) polen y miel + agua; (d) homogenato de larvas de *T. absoluta* y pasas de uva remojadas + agua.

Para estimar la fertilidad, además del conteo de huevos ovipuestos, se evaluó bajo lupa la presencia de oocitos en el abdomen de las hembras de *D. phthorimaeae* muertas por medio de su disección. Para calcular la longevidad se registró el tiempo total de vida de las hembras adultas (en días).

Las posibles diferencias de los tipos de alimento ofrecidos sobre las variables consideradas del éxito reproductivo de la especie se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un $\alpha = 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software STATISTICA 6.0 (StatSoft 2004). Como H_0 se plantea que no existirán diferencias entre tratamientos sobre las variables testeadas; para la H_1 se postula que el alimento rico en proteínas y azúcares (homogenato de larvas de *T. absoluta* más pasas de uvas remojadas) promoverá fundamentalmente un aumento en las variables del *fitness* medidas. En caso de encontrarse diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos, éstos se separaron mediante la prueba de LSD con $\alpha = 0,05$. Previamente a realizar los ANOVA, se les aplicó a los datos de proporciones la

transformación de arcoseno y se verificó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. En caso de no cumplirse los supuestos del ANOVA los datos fueron analizados con su correspondiente no paramétrico (Kruskal – Wallis, $\alpha = 0,05$).

Análisis de la respuesta funcional de D. phthorimaeae

Para evaluar la respuesta funcional del ectoparasitoide, se siguió la metodología experimental propuesta por Bezemer y Mills (2001), Fernández-Arhex y Corley (2004), y Luna *et al.* (2007). Para ello, se realizó un experimento que consistió en exponer individualmente a hembras adultas de *D. phthorimaeae*, en una arena donde se les ofreció en un único evento una densidad determinada de larvas de *T. absoluta*. En todos los casos se utilizaron hembras adultas recientemente emergidas (24 h de vida), las que se colocaron individualmente en contenedores plásticos de 500 ml (10 cm diámetro x 12 cm de alto) como unidad experimental, y provistas con miel y agua (*ad libitum*) como alimento. Se colocó un macho y se permitió el apareamiento por 24 h, luego de lo cual los machos fueron removidos. De acuerdo a Luna *et al.* (2010) y también a resultados previos de esta tesis, que demostraron que *D. phthorimaeae* comienza a oviponer a partir del quinto día de vida, se les permitió a las hembras un período de reposo similar, luego de lo cual se les ofrecieron los hospedadores por un tiempo fijo de 48 h (Fig. 2.7).

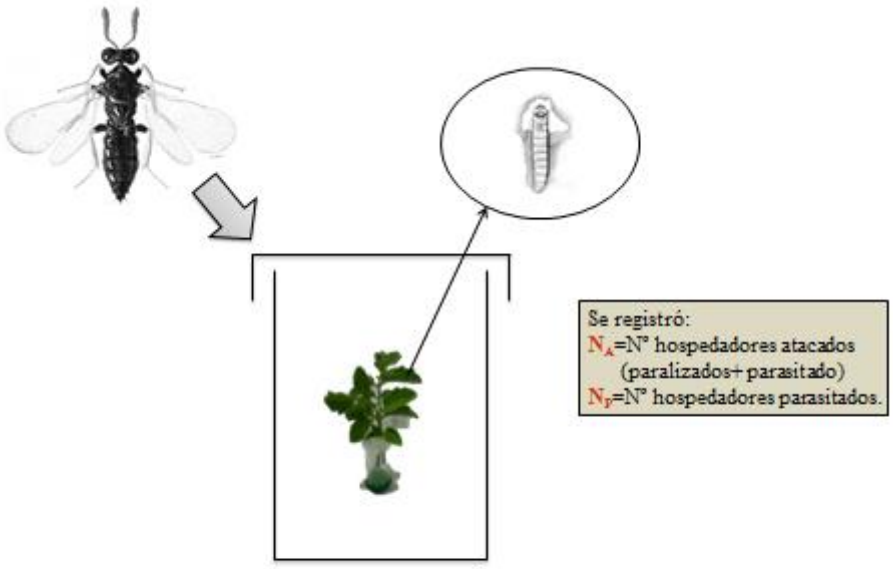


Figura 2.7: Esquema gráfico del ensayo de respuesta funcional realizado bajo condiciones controladas.

Las densidades del hospedador consideradas fueron 2, 3, 4, 6, 8, 10, y 15 larvas del tercer estadio. El valor máximo de densidad fue determinado también a partir de la información de los experimentos anteriores, que evidenciaron el número límite de huevos disponibles por una hembra del ectoparasitoide para oviponer en toda su vida. Se realizaron 10 réplicas para cada densidad del hospedador.

Transcurridas las 48 h, se removieron las larvas de *T. absoluta* de la unidad y se revisaron inmediatamente con ayuda de una lupa binocular (Nikon, modelo SMZ 800, Tokio, Japón), para registrar el número de hospedadores con síntomas de parálisis o "picados" (Na) y los parasitados (Np), es decir con presencia del huevo de *D. phthtorimaeae*.

Con estos datos se calcularon las siguientes proporciones: hospedadores atacados (Na + Np), solo picados (Na) y solo parasitados (Np) por *D. phthorimaeae* para cada densidad de *T. absoluta* ofrecida (N0). Se analizó por medio del ajuste a una regresión logística la forma de la curva entre las proporciones Na+Np /N0 y Na/N0 (Juliano 2001, Fernández-Arhex y Corley 2004, Romero Sueldo *et al.* 2010). Se tomó la decisión de analizar la respuesta funcional de *D. phthorimaeae* para los

comportamientos de *host-feeding* y de oviposición, ya que en ambos casos causan la muerte del hospedador. En otras palabras, ambos tipos de respuesta del parasitoide frente a la densidad del hospedador (parasitar o alimentarse) tienen un efecto similar en la población de la plaga, la que muere a causa del ataque.

Las ecuaciones que se ajustan el modelo logístico son las siguientes:

$$(Na+Np)/N_0 \text{ o } Na/N_0 = \exp (P_0 + P_1N_0 + P_2N_0^{\,2} + P_3N_0^{\,3})/1 + \exp (P_0 + P_1N_0 + P_2N_0^{\,2} + P_3N_0^{\,3})$$

donde P_0, P_1, P_2 y P_3 son los coeficientes de intercepción, lineal, cuadrático y cúbico, respectivamente.

Las estimaciones de los parámetros P_0 a P_3 fueron obtenidas aplicando modelos de estimación no lineales (regresión por medio de cuadrados mínimos) usando el programa Statistica (Statsoft 2007). Se consideraron como variables dicotómicas: 0: larvas vivas, y 1: las larvas con signos de ataque de *D. phthorimaeae*. Debido a que al aplicar el método la expresión cúbica arrojó predictores redundantes, el modelo fue reducido a una nueva ecuación cuadrática, la cual de acuerdo a Romero Sueldo *et al.* (2010), pueden obtenerse tres resultados posibles: 1) si ninguno de los parámetros, P_0, P_1, P_2, o sólo P_0 es significativo, se concluye que los datos se ajustan a una respuesta funcional de Tipo I (denso-independencia del ataque de *D. phthorimaeae* frente a diferentes densidades del hospedador); 2) si P_1 es significativo y negativo, la respuesta funcional es de Tipo II (densodependencia inversa del ataque del parasitoide frente a distintas densidades de *T. absoluta*); y 3) si P_1 y P_2 son significativamente positivos y negativos, respectivamente, se determina una respuesta funcional de Tipo III (existe una densodependencia directa entre el ataque del parasitoide en respuesta a las distintas densidades de larvas de la polilla).

Una vez conocido el tipo de respuesta funcional, se procedió a determinar el parámetro ***a'*** o coeficiente instantáneo de ataque de *D. phthorimaeae*, (proporción de hospedadores consumidos por unidad de tiempo) (Holling 1966). Este parámetro fue estimado mediante regresión lineal (Fernández-Arhex y Corley 2004), y se lo calculó para ambos tipos de comportamiento, tanto de oviposición como de alimentación (*host-feeding*).

La ecuación utilizada fue la siguiente:

(Na+Np)/N0 o **Na/N0 = *a'* T N0**

donde Na, Np y N0 son el número de larvas de *T. absoluta* sólo usadas para alimentación, parasitadas y total ofrecidas, respectivamente, y T es el tiempo de exposición de los hospedadores al parasitoide en este estudio (48 h). Para estimar la tasa de ataque ***a'*** se procedió a realizar una regresión lineal basada en el Método de Levenberg-Marquardt (Statistica Statsoft 2007).

Resultados

Determinación de la estrategia de ovigenia

Experimento 1: Tipo de maduración de huevos de D. phthorimaeae *y reabsorción*

El diagnóstico microscópico de la producción de huevos a lo largo de la vida adulta de las hembras de *D. phthorimaeae* mostró que las recién emergidas (día 0) carecen de oocitos maduros en sus ovariolas, presentando sólo masas inmaduras de trofocitos (Fig. 2.8 a). Para las otras tres edades testeadas (3, 5 y 7 días de vida), se observaron masas de huevos de tipo himenopteriforme en distinto grado de maduración, corroborado por la longitud del oocito y la difereciación en el color del corion. Así, se reconocieron como oocitos maduros a aquellos de forma alargada y de coloración del corion más oscura (Fig. 2.8 b, c y d). La ausencia de oocitos maduros al momento de la emergencia de la hembra adulta de *D. phthorimaeae* prueba que se trata de una especie extremadamente sinovigénica, con un *IO* = 0.

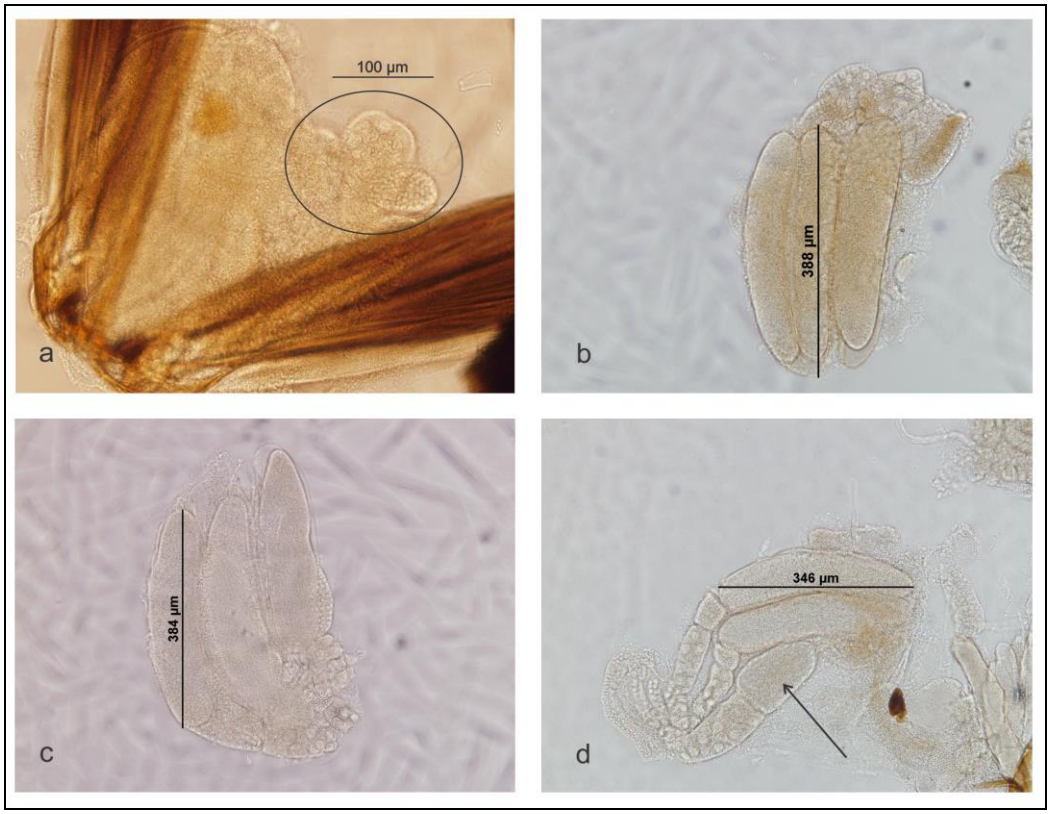


Figura 2.8: Fotografías de disección de ovarios de hembras de *D. phthorimaeae* de edades diferentes: (a) recién emergidas; (b) 3 días; (c) 5 días; (d) 7 días de edad. En (a) el círculo muestra masas de trofocitos, i.e., huevos inmaduros, y en (d), la flecha señala huevos inmaduros en formación.

De este estudio se concluyó que el 20% de las hembras de 3 días de vida no poseían oocitos maduros, y que a los 7 días, éstas son capaces todavía de formar oocitos inmaduros, coexistiendo con masas de huevos maduros, tal como fue observado con la inspección microscópica (Fig. 2.8 d).

El promedio de huevos que produce una hembras de *D. phthorimaeae* estimado para las tres edades testeadas fue de 4,15 ± 0,4 (media ± ESM, n= 29). Se registró una disminución significativa en la producción a lo largo de la vida de las hembras (ANOVA F = 4,20; gl = 2, 24; p = 0,03) (Tabla 2.1), registrándose una promedio de ≈ 6 huevos al tercer día de vida y ≈ 3 huevos al séptmo día. Además, la evidencia de un menor número de oocitos y la presencia de huevos en formación en hembras de siete días de vida privadas de hospedadores (Fig 2.8 d) con respecto a hembras de edades más jóvenes en la misma condición (Fig. 2.8 b y c), resultó una indicación del proceso de

reabsorción de huevos en esta especie. En este estudio se estimó la reabsorción de un oocito cada 48 horas.

Tabla 2.1: Número y tamaño (media ± ESM) de la producción de huevos a lo largo de la vida de la hembra de *D. phthorimaeae*.

Edad Hembra (d)	*n*	No. Huevos	*n*	Tamaño Huevos (µm)
3	10	5,50 ± 0,65 a	8	346,38 ± 14,87
5	10	4,20 ± 0,39 a	9	354,44 ± 8,70
7	9	2,89 ± 0,45 b	9	356,81 ± 5,14
ANOVA		F = 4,2		F = 0,29
		df = 2, 24		df = 2, 23
		p = 0,03 *		p = 0,7515 *ns*

El tamaño promedio de los huevos fue de 352,79 ± 5,58 µm (media ± ESM, n = 26). No se hallaron diferencias en la longitud de los huevos maduros a lo largo del rango de edades de las hembras en estudio (Tabla 2.1).

Experimento 2: Tipo de estrategia de ovigenia de D. phthorimaeae

Este experimento mostró, en primer lugar, que las hembras mataron, ya sea por *host-feeding* o parasitismo, aproximadamente el 30 % de las larvas de *T. absoluta* en las tres edades consideradas (Fig. 2.7). También se detectó que las avispas de 3 y 7 días de vida sólo practicaron *host-feeding*, matando a un 32 % de los hospedadores, sin oviponer, mientras que las hembras de 5 días de vida lograron parasitar el 5% de las larvas de *T. absoluta*, además de producir la muerte de otro 27 % por picaduras (Fig. 2.9).

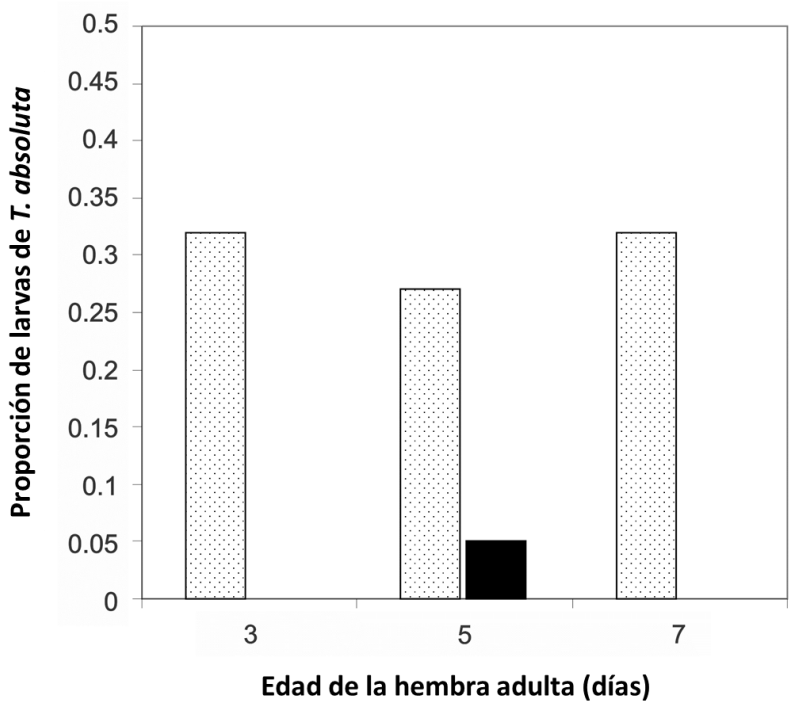


Figura 2.9: Proporción de larvas de *T. absoluta* paralizadas (barras punteadas) y parasitadas (barra negra), para tres diferentes edades de hembras adultas de *D. phthorimaeae* (n = 29).

Las observaciones con el microscopio para dilucidar el mecanismo de *host-feeding* de *D. phthorimaeae*, no mostraron evidencias físicas del ataque, tales como presencia de marcas, orificios o lastimaduras dejadas por la hembra del ectoparasitoide en la larva de *T. absoluta*. Por lo tanto, se corroboró que este mecanismo sólo puede ser revelado por el aspecto externo amarillento y consistencia flácida de la larva de *T. absoluta*, con el interior de su cuerpo necrosado.

También se constató que la hembra de 5 días de edad está en situación óptima para oviponer. Sin embargo, las tasas de parasitismo registradas en los experimentos fueron muy bajas, tema que se discutirá más profundamente en secciones posteriores.

Evaluación de diferentes fuentes de alimento sobre el éxito reproductivo de D. phthorimaeae

En este experimento se observó que el tipo de alimentación de las hembras de *D. phthorimaeae* afectó significativamente la proporción de hospedadores paralizados (*host-feeding*) y atacados (*hostfed* más parasitados) mientras que no tuvo efecto sobre

las otras variables testeadas (proporción de hospedadores parasitados, longevidad y fecundidad de la hembra) (Tabla 2.2). El suministro de pasas de uva condujo a una menor proporción de hospedadores paralizados y atacados respecto al control (miel). No obstante, los otros dos tipos de alimento tuvieron una influencia intermedia.

Tabla 2.2: Resumen de los parámetros del análisis de la varianza para evaluar el efecto de distintas fuentes de alimento sobre el desempeño de hembras adultas de *D. phthorimaeae* (* ANOVA; *ns*: no significativo; letras diferentes indican diferencias significativas al 5%, LSD; **Kruskal – Wallis, *ns*: no significativo).

Alimentos	Proporción de hospedadores paralizados (*Host-fed*)*	Proporción de hospedadores parasitados**	Proporción de hospedadores atacados (*Host-fed* + Parasitados)*	Longevidad de la hembra de *D. phthorimaeae* (días)*	Fecundidad de la hembra de *D. phthorimaeae* (número de huevos)**
Pasas de uva	0,213 a	0,035 *ns*	0,25 a	12,3 *ns*	3,3 *ns*
Miel + Polen	0,265 ab	0,010 *ns*	0,276 a	11,4 *ns*	1,2 *ns*
Pasas de uva + Homogenato de larvas de *T. absoluta*	0,271 ab	0,026 *ns*	0,298 ab	13,2 *ns*	3,5 *ns*
Control (miel)	0,37 b	0,035 *ns*	0,411 b	15,6 *ns*	3,0 *ns*
	F = 4,80	*F* = 4,107	*F* = 4,66	*F* = 0,61	*F* = 5,948
	df =39	df = 39	df = 39	df = 39	df = 39
	p =0,0065	*p =0,250*	*p =0,0075*	*p = 0,612*	*p =0,114*

Análisis de la respuesta funcional de D. phthorimaeae

El número promedio de larvas de *T. absoluta* parasitadas por *D. phthorimaeae* varió entre 1 y 3, para el rango de densidades del hospedador testeadas (Fig. 2.11). Se observó un ligero aumento en la media de hospederos parasitados a altas densidades de *T. absoluta*; sin embargo la pendiente de la regresión lineal no fue distinta de 0 (p=0,87). El número máximo de hospederos parasitados fue de 3, para una densidad = 10 larvas de *T. absoluta*. En total, el promedio del número de larvas parasitadas fue de 0,18 (± 0,06 ESM, n = 72).

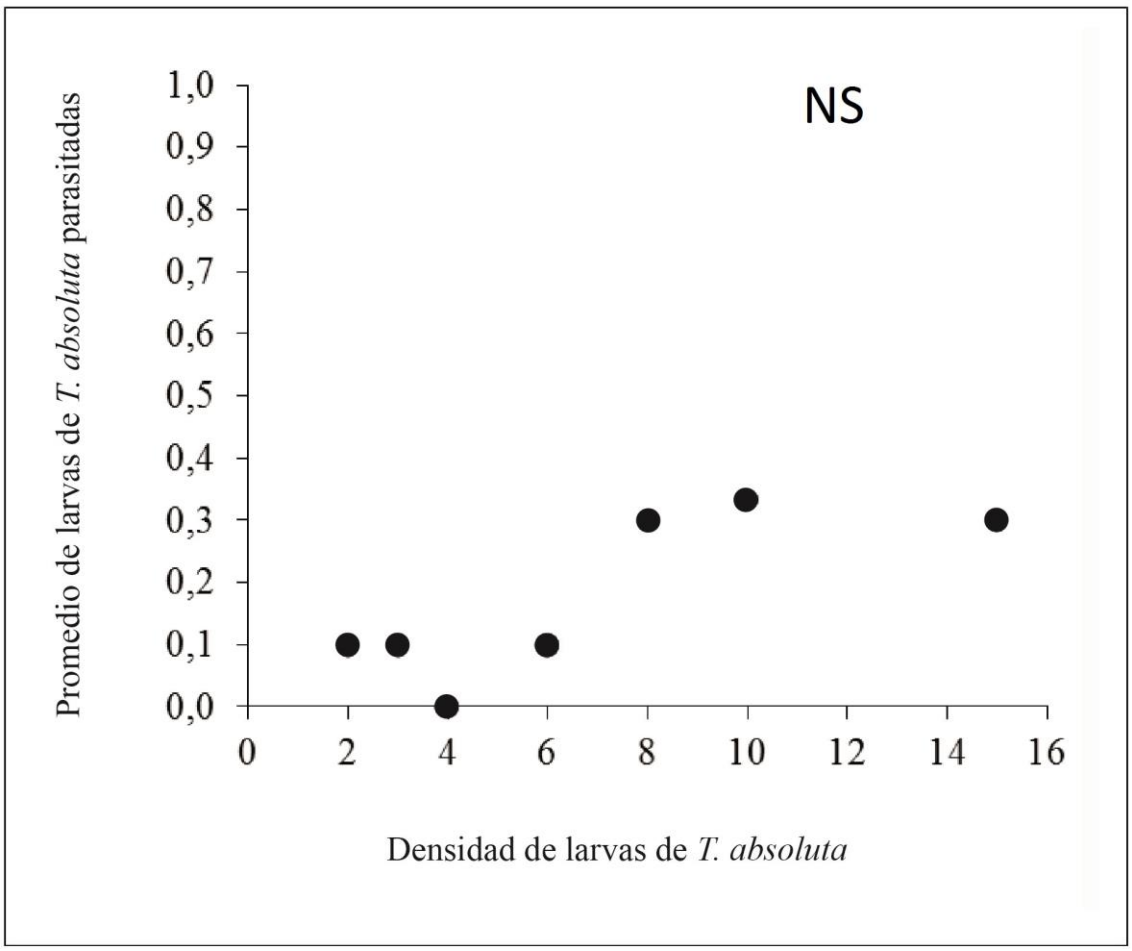


Figura 2.11: Número de larvas de *T. absoluta* parasitadas por *D. phthorimaeae* en relación a la densidad de hospedadores (n = 72). Regresión lineal: y = 0,017 + 0,023 x. NS, pendiente no significativo, (p > 0,05).

La proporción de larvas de *T. absoluta* atacadas, y las sólo picadas también resultaron ser independientes de las densidades del hospedador consideradas en este estudio. Así, se determinó que el tipo de curva de respuesta funcional para ambas variables es de Tipo I, ya que los parámetros P_1 y P_2 de la regresión logística no fueron significativamente diferentes de 0 (Tablas 2.3 y 2.4).

Tabla 2.3: Análisis de la regresión logística de la proporción de larvas de *T. absoluta* atacadas por *D. phthorimaeae* (n = 144; * nivel de significancia para *p* = 0,05; *ns* = no significativo).

Parámetros	Estimación (SE)	*P*
$\mathbf{P_0}$	- 2,04 (0,92)	0,02 *
$\mathbf{P_1}$	0,44 (0,26)	0,09 *ns*
$\mathbf{P_2}$	-0,02 (0,01)	0,15 *ns*

Tabla 2.4: Análisis de la regresión logística de la proporción de larvas de *T. absoluta* picadas por *D. phthorimaeae* (n = 144; *ns* = no significativo).

Parámetros	Estimación (SE)	*P*
$\mathbf{P_0}$	-1,22 (0,93)	0,19 *ns*
$\mathbf{P_1}$	0,05 (0,26)	0,85 *ns*
$\mathbf{P_2}$	0,0002 (0,01)	0,90 *ns*

Cabe mencionar que se registró una variabilidad importante de los valores de la proporción de hospedadores atacados para cada densidad. Para la densidad de 6 larvas de *T. absoluta* el parasitoide atacó hasta un 80 % de los hospedadores ofrecidos (Fig. 2.12 a y b).

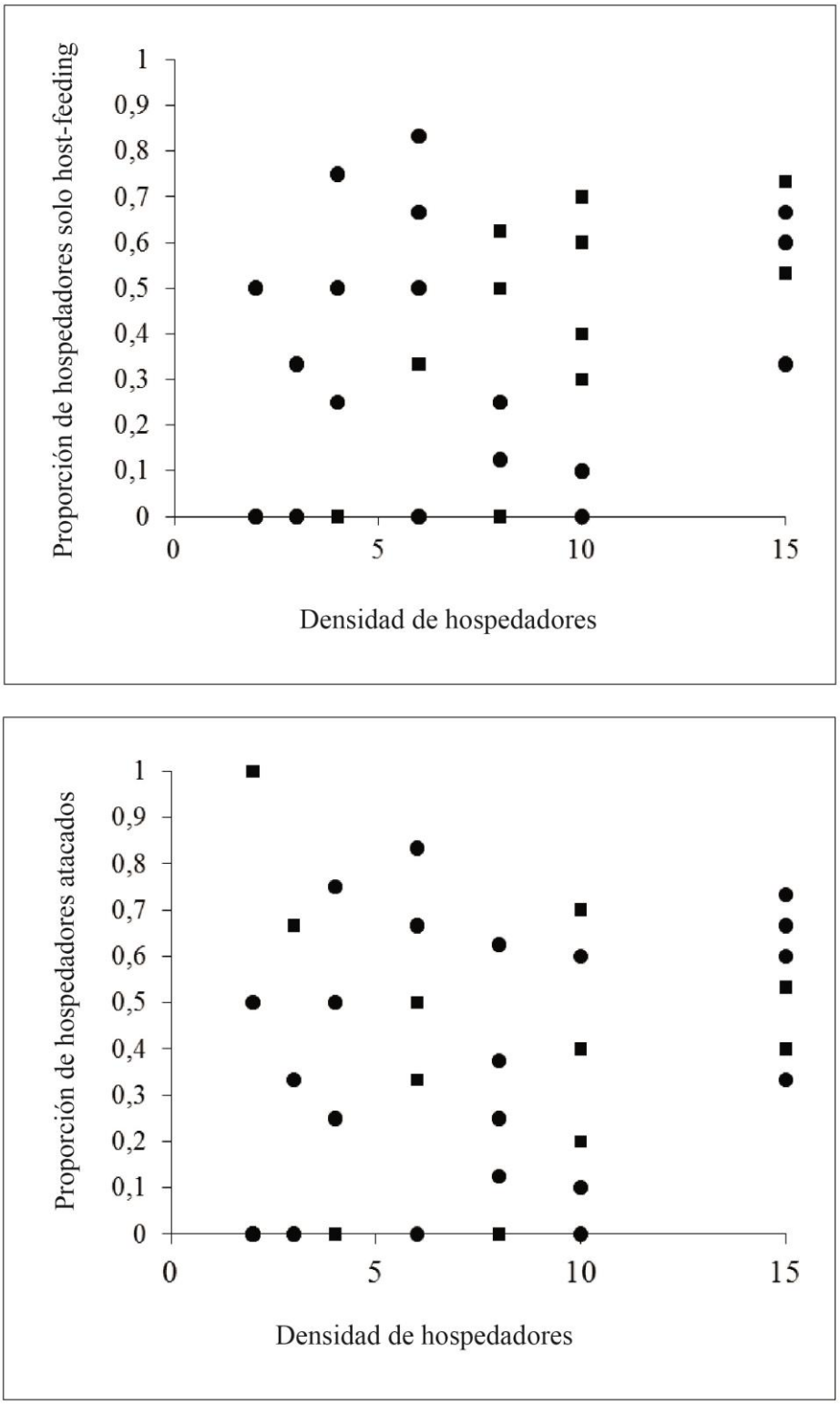


Figura 2.12: Proporción de larvas de *T. absoluta* (a) solo *host fed*, y (b) atacadas (*host fed* y/o parasitadas) por *D. phthorimaeae*, con respecto a la densidad de hospedadores. Respuesta funcional Tipo I: (a) y = 0,202 + 0,02 x; (b) y = 0,233 + 0,02 x (●, indica un mismo valor para varias réplicas; ■, única réplica con ese valor).

La ecuación del modelo de respuesta funcional Tipo I para estimar la tasa instantánea de ataque (*a'*) se ajusta significativamente a los datos observados para las larvas de *T. absoluta* atacadas y solo picadas por *D. phthorimaeae* (Tabla 2.5). En ambos casos, la tasa de ataque es del 20 % de las larvas del hospedador, independientemente de la densidad de hospedadores ofrecida.

Tabla 2.5: Coeficiente de ataque (*a'*) del número de larvas de *T. absoluta* atacadas (*host fed* y/o parasitadas), y solo *host-fed* por *D. phthorimaeae*, en un período de 48 horas (n = 72; * significativo en α = 0.05).

	a'	**Error estándar de la media**	***p***	**Límite de confianza inferior**	**Límite de confianza superior**
Sólo *host fed*	0,20	0,01	0.00*	0,17	0,23
Atacadas	0,21	0,01	0.00 *	0,18	0,24

Discusión

Los estudios llevados a cabo para conocer la biología reproductiva de *D. phthorimaeae*, un agente potencial de biocontrol de la plaga *T. absoluta*, permitieron confirmar en primer lugar que se trata de una especie extremadamente sinovigénica (*IO* = 0), tal como lo predice la teoría (Jervis *et al.* 2001, 2008). El estudio anatómico completó la información previa que se tenía sobre esta especie, donde Luna *et al.* (2010) habían sugerido la sinovigenia sobre la base de la curva de oviposición de las hembras. Así, la hembra emerge con su complemento de oocitos en estado inmaduro y alcanza al tercer día de vida la carga máxima, que es de ≈ 6 huevos/hembra.

También se confirmó que las hembras, una vez emergidas, necesitarían ingerir para el oviponer, nutrientes extra a la reserva teneral (Casas *et al.* 2003). Los nutrientes extra son obtenidos fundamentalmente a partir del *host-feeding*, aunque también es posible que aproveche otras fuentes de azúcares del ambiente. Este hallazgo sugiere que *D. phthorimaeae* puede ser referido como parasitoide de tipo anautógeno u obligado, es

decir que las hembras oviponen sólo si previamente han realizado *host-feeding* (Jervis y Kidd 1986).

Basándose en una síntesis de datos empíricos sobre la biología reproductiva de un variado grupo de parasitoides, Jervis *et al*. (2008) relacionaron la reproducción de éstos con los patrones de reasignación, utilización y adquisición de nutrientes, y propusieron que las especies se ajustan a una de cuatro posibles tipos de curvas de fecundidad (tipos 1 a 4, desde pro-ovigénica a extremadamente sinovigénica) (Fig. 2.2 y apartado "Estrategias reproductivas y de comportamiento de alimentación en parasitoides", de este Capítulo). Sobre la base de la información obtenida en este estudio de tesis y la fecundidad potencial reportada anteriormente (ca. 9 huevos por hembra, Luna *et al.* 2010), se concluye que la hembra de *D. phthorimaeae* cuando utiliza como hospedador a la especie *T. absoluta* exhibe una curva tipo 4, es decir, es extremadamente sinovigénica, produce huevos grandes ricos en vitelo (anhidrópicos) y tiene una fecundidad potencial menor a 50 huevos durante su vida adulta. Las especies con curva tipo 4 son de las menos fecundas entre los parasitoides himenópteros. Otras especies de parasitoides idiobiontes solitarios que presentan este tipo de curva y rasgos reproductivos similares a *D. phthorimaeae* (máxima fecundidad =10) fueron reportadas previamente para la familia Chalcididae, las especies *Brachymeria intermedia* (Nees), endoparasitoide de pupas de lepidópteros, y *B. lasus* (Walker) que ataca pupas de lepidópteros, dípteros e himenópteros, e Ichneumonidae, la especie *Diapetimorpha introita* (Cresson), parasitoide de *Spodoptera frugiperda*. Estas especies han sido empleadas para el control biológico, indicando que aún con fecundidades tan bajas, algunos parasitoides pueden ser agentes de biocontrol adecuados. La efectividad de éstos dependerá de otros atributos positivos, tales como el *host-feeding* no concurrente destructivo y la tolerancia a la deprivación de hospedadores en parte subsidiada por la reabsorción de huevos.

La teoría del comportamiento de forrajeo indica que una hembra de una especie de parasitoide con una estrategia reproductiva, extremadamente sinovigénica, que practica *host-feedin*g no concurrente para obtener nutrición extra para oviponer, puede verse forzada frente a la presencia de un hospedador, a decidir entre alimentarse u oviponer (Bernstein y Jervis 2008, Fig. 2.1). Para especies *egg-limited*, este comportamiento será una importante restricción para el éxito reproductivo si el número

de hospedadores disponibles excede el número de huevos maduros en ese momento (Heimpel *et al*. 1998; Jervis *et al*. 2001). Este estudio reveló que *D. phthorimaeae* es una especie *egg-limited*, siendo esta información relevante para conocer su manipulación como agente de biocontrol de *T. absoluta*.

Así, varios autores afirman que la estrategia evolutiva de la sinovigenia es, en teoría, superior a la pro-ovigenia estricta, en cuanto a la aptitud de las hembras, ya que la maduración gradual del complemento de huevos durante toda la vida les permite sobrellevar transitoriamente la falta de hospedadores (Heimpel y Rosenheim 1998, Heimpel *et al.* 1998, Casas *et al.* 2000, Rosenheim *et al.* 2000). La demostración de que las hembras de *D. phthorimaeae* privadas de hospedadores son capaces de reabsorber huevos, indica que es posible que éstas puedan mantenerse vivas por más tiempo gracias a la energía extra ganada, y continuar con la búsqueda de hospedadores. Esto ha sido observado en otros parasitoides sinovigénicos, donde el aporte de fuentes de alimento ricas en carbohidratos no pueden por si solo asegurar la producción de huevos, y si éstos son privados de realizar *host-feeding*, por lo que la reabsorción de huevos maduros es la respuesta a esta falta de nutrientes (Jervis y Kidd 1986; Jacas *et al.* 2009).

El *host-feeding* observado en *D. phthorimaeae* es entonces imprescindible para lograr la oviposición y asegurar la descendencia. A su vez, la redistribución de recursos por la reabsorción de huevos en ausencia de hospedadores para realizar posibles futuras oviposiciones, es un importante rasgo evolutivo modulado por el comportamiento reproductivo. Este mecanismo también fue reportada por Collier (1995) para el parasitoide *Aphytis melinus* De Bach. En este caso, la carga de huevos máxima fue registrada a los dos días de vida de la hembra, aunque la misma emerge ya con algunos oocitos maduros.

La emergencia de hembras adultas con una proporción muy baja de huevos maduros tiene la desventaja que sólo una pequeña fracción de la vida útil potencial de su propio complemento de huevos está disponible para oviponer en un momento dado. No obstante, le confiere la ventaja de una mayor plasticidad reproductiva, sobre la longevidad de la hembra, en respuesta a la variación en la disponibilidad de hospedadores. Por lo tanto, el tipo de maduración de oocitos, el comportamiento de *host-feeding* y el mecanismo de reabsorción son aspectos distintos de la misma

estrategia de sacrificar un inseguro éxito reproductivo actual para aumentar las oportunidades de éxito reproductivo a futuro (Jervis y Ferns 2004).

Según Bernstein y Jervis (2008) varios autores han sido pioneros en el estudio de la alimentación de los parasitoides adultos. Sin embargo, las implicancias que representa este aspecto sobre sus historias de vida, como por ejemplo, sobre el comportamiento de búsqueda de alimentos y la decisión que deben enfrentar las hembras cuando se encuentran ante los hospedadores, fueron exploradas hace relativamente poco tiempo. Las investigaciones sobre la ecología del comportamiento de parasitoides comenzaron a concentrarse en este tema, en primer lugar porque en muchas especies los eventos de alimentación y oviposición no ocurren simultáneamente y por consiguiente constituyen una oportunidad y/o pérdida en términos de ganancia de *fitness* "inmediata" (Heimpel y Collier 1996).

En este estudio se mostró que la provisión de fuentes extra de alimento (pasas de uva, miel y polen) no proveniente de hospedadores (*host-feeding*) no mejoraron el comportamiento de ataque de *D. phthorimaeae*, es decir, las hembras no infligen más mortalidad a los hospedadores, sino más bien posee un efecto inverso. Esto puede deberse a que las mismas probablemente se sacien con esta fuente adicional de alimento y evite mayores niveles de ataque sobre *T. absoluta*. Tampoco se mejoran ni la proporción de parasitismo, ni la longevidad, ni la fertilidad, con esta oferta de alimentos.

En cuanto a los nutrientes que aporta la hemolinfa, es bien conocida la función que tienen los azúcares (principalmente trehalosa y sucrosa) para la supervivencia y los lípidos para la reproducción de los parasitoides. Por otra parte, no se conoce con claridad el valor que poseen las proteínas. Si bien numerosos estudios asumen que para los parasitoides sinovigénicos las demandas de proteínas está asociada con la producción de huevos (Jervis y Kidd 1986, Heimpel y Collier 1996). Otros resultados indican que su adquisición estaría ligada además al mantenimiento somático (Flanders 1950, Giron *et al*. 2004).

La posibilidad de proveer con fuentes de alimento alternativos a los parasitoides adultos ha atraído considerable atención (Thompson 1976, Stapel *et al.* 1997, Jacobs y Evans 2000, Azzouz *et al.* 2004, Burger *et al*. 2004, Costamagna y Landis 2004), fundamentalmente para suplantar el *host-feeding* – un mecanismo que insume una gran

cantidad de hospedadores en una cría masiva por ejemplo - y propiciar una reproducción actual sobre la que podría realizarse en un futuro, según lo predice la teoría del forrajeo. Aunque se ha demostrado que la adición de alimentos puede ser utilizada por parasitoides adultos en el campo y lograr de esta manera aumentar la tasa de parasitismo, existe poca evidencia experimental que esto se haya traducido en una reducción de las densidades de las plagas, lo que indica la necesidad de pruebas de campo adicionales.

Con respecto al estudio de la respuesta funcional de *D. phthorimaeae*, los resultados obtenidos mostraron que la hembra tiene un comportamiento de mortalidad densoindependiente producida tanto por *host-feeding* como por el parasitismo, a medida que se incrementa la densidad de larvas de *T. absoluta.* Este resultado sugiere que en aquellas condiciones en las que la hembra se encuentra forzada a usar hospedadores para alimentarse (debido a la escasez de energía acumulada o por la edad que tiene la hembra), *D. phthorimaeae* podría infligir similares tasas de mortalidad a la ocasionada por el parasitismo, aunque con implicancias en su éxito reproductivo. Es necesario llamar la atención en este caso, sobre el hecho que a pesar de la relevancia de esta causa de mortalidad, resulta sin embargo muy frecuentemente subestimada, en parte al menos debido a la dificultad para medirla en el campo. Jervis *et al.* (1996) señalan que éste es un rasgo biológico importante a considerar como otro criterio positivo a la hora de seleccionar los agentes de control biológico.

La respuesta funcional es ampliamente usada en la evaluación de enemigos naturales como potenciales candidatos como agentes de biocontrol, y junto con el análisis del patrón de parasitismo a campo, brinda información para su manejo (Bellows y Fisher 1999). En la Argentina, *T. absoluta* es atacada principalmente por el endoparasitoide koinobionte larval *P. dignus,* y en ocasiones pueden co-existir con el ectoparasitoide *D. phthorimaeae* (Capítulo 1, Luna *et al*. 2007, 2010, Sánchez *et al*. 2009). Estas especies, si bien presentan biologías claramente contrastantes, tienen respuestas funcionales densoindependientes de la densidad de la polilla y una alta variabilidad en la proporción de hospedadores atacados cuando se incrementa la densidad de larvas de su hospedador. En comparación, *P. dignus* posee una mayor tasa de ataque y se trata de un parasitoide *time-limited* mientras que *D. phthorimaeae* es un parasitoide *egg-limited.* Estas características reproductivas diferenciales podrían estar

contribuyendo a que las especies coexistan en condiciones naturales. Tal como Jervis *et al*. (2008) indicaran, la extraordinaria variación en la biología reproductiva y la plasticidad adaptativa exhibidas por las especies de parasitoides en relación con sus limitaciones, les permite conformar comunidades naturales muy diversas. Este tema será retomado en los siguientes capítulos.

Por el momento, los rasgos estudiados en el laboratorio, sobre el comportamiento de alimentación, el tipo de respuesta funcional y las características vinculadas al tipo de estrategia de ovigenia que presenta *D. phthorimaeae* le proporcionan atributos deseables como agente de control. Estos aspectos deben ser contemplados, además, en el contexto de su desempeño en el campo, de modo de lograr su uso sin interferir su coexistencia con otros enemigos, y fundamentalmente con el endoparasitoide *P. dignus*, otro buen candidato para el biocontrol de *T. absoluta* (Nieves 2013), en el marco de un MIP para el cultivo de tomate en Argentina.

Capítulo 3

Competencia interespecífica entre el ectoparasitoide Dineulophus phthorimaeae y *el endoparasitoide* Pseudapanteles dignus

Ecología de comunidades de parasitoides

Dos o más especies diferentes de parasitoides pueden coincidir en el ataque a un mismo hospedador; esto es conocido como ***multiparasitismo*** y el resultado por lo general es la muerte de la larva de una de las especies (Zwölfer 1971). No obstante, en la naturaleza es común encontrar la coexistencia de especies de parasitoides atacando a la población local de una especie hospedadora en particular, lo que culmina conformando una comunidad o ensamblaje de especies (Mills 1992, 1994). Esta coexistencia se establece gracias a que las especies parasitoides se especializan por explotar un estado/estadío de desarrollo del hospedador en particular, es decir tienen sus propios nichos (Waage y Hassell 1982). Mills (1992) definió el concepto de ***nicho del parasitoide***, como las diferentes formas en las que el hospedador puede ser aprovechado como recurso. El nicho de los parasitoides está conformado por una amplia variedad de taxa de insectos hospedadores e incluye todos sus estados de desarrollo. Las especies de parasitoides ocupantes de un mismo nicho conforman un ***gremio de parasitoides***. Según Mills (1994), dichos gremios forman unidades ecológicas naturales y pueden estar compuestos desde unas pocas a cientos de especies de diferentes grupos taxonómicos (entre los más representativos Hymenoptera, Diptera y Coleoptera). A su vez, una misma especie hospedadora puede ser explotada por más de un gremio de parasitoides. Para analizar la composición de gremios de parasitoides de una especie hospedadora, se utilizan varios criterios, a saber: a- el estado en que el hospedador es atacado por el parasitoide; b- el estado en que el hospedador muere y c- el modo de parasitismo (endo o ectoparasitismo). Basándose en un estudio de meta-análisis, Mills (1994) definió la existencia de 12 gremios diferentes de parasitoides en la naturaleza, según los criterios antes mencionados (Fig. 3.1):

a) los que usan el estado de huevo del hospedador: ***Gremio 1***- los endoparasitoides de huevos;

b) los que usan el estado de larva del hospedador: ***Gremio 2***- los endoparasitoides de larvas tempranas, ***Gremio 3***- los endoparasitoides de larvas tardías, ***Gremio 4***- los ectoparasitoides larvales;

c) los que utilizan como recurso a la prepupa del hospedador: ***Gremio 5***- los endoparasitoides de huevo a prepupa, ***Gremio 6***- los endoparasitoides de larva a prepupa, ***Gremio 7***- los ectoparasitoides de larva a prepupa, ***Gremio 8***- los ectoparasitoides de prepupa a pupa;

d) los que utilizan el estado de pupa del hospedador: ***Gremio 9***- los endoparasitoides de larva a pupa, ***Gremio 10***- los endoparasitoides de pupas; y

e) los que usan el estado de adulto del hospedador: ***Gremio 11***- los endoparasitoides de larva a adulto y ***Gremio 12***- los endoparasitoides de adultos.

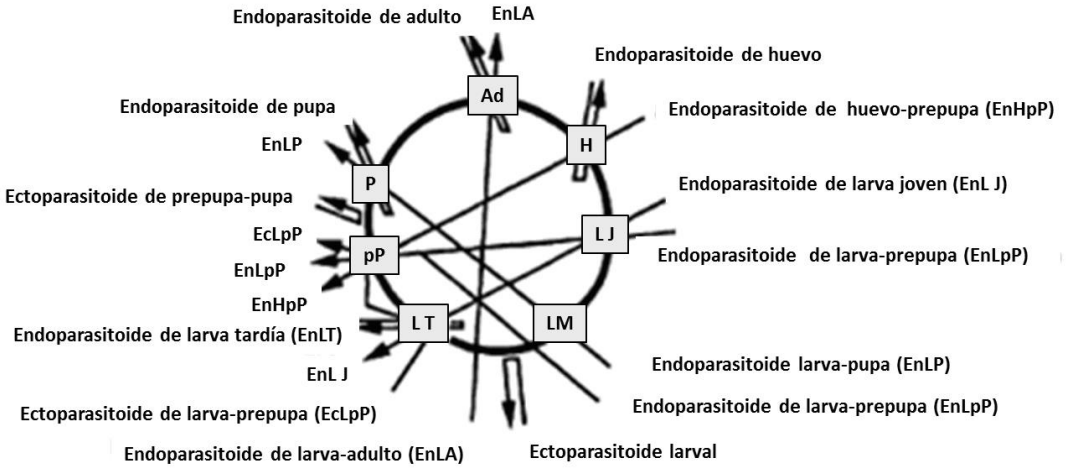


Figura 3.1: Gremios de parasitoides definido por el modo de utilización del hospedador. El círculo representa el ciclo de vida de un hospedador holometábolo: H: huevo; LJ: estadío larval temprano; LM: estadío larval medio; LT: estadío larval tardío; pP: prepupa; P: pupa y Ad: adulto (adaptado de Mills 1994).

El análisis de gremios que forman una comunidad de parasitoides brinda perspectivas útiles en términos de la información de la ecología funcional de las especies que la componen, de cómo usan el recurso y del nicho que ocupan, entre otras. Cuando se trata de un complejo de enemigos naturales atacando a una especie plaga, permite también conocer posibles interacciones competitivas interespecíficas (intra- e intergremio). Finalmente, brinda fundamentos para la manipulación de estas especies en programas de control biológico (Mills 1994).

En el presente y siguiente capítulo de este trabajo de tesis se tratará la interacción competitiva de *D. phthorimaeae* y *P. dignus*, dos especies de parasitoides larvales de la "polilla del tomate", que si bien poseen el mismo nicho (ambos explotan el estadio larval), utilizan el hospedador de manera diferente: el primero es un *ectoparasitoide* idiobionte y el segundo un *endoparasitoide* koinobionte. Por lo tanto existe entre ambas especies una superposición parcial de sus nichos (Figs. 1. 6 y 3.2).

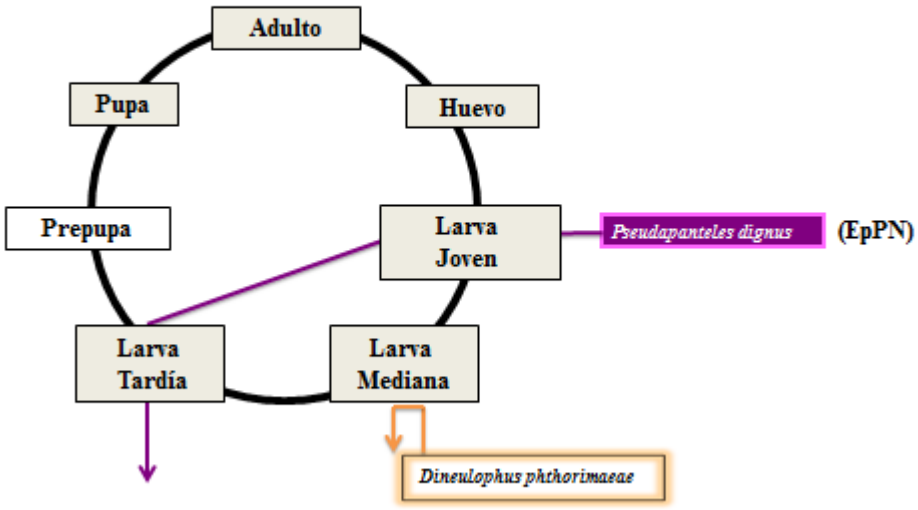


Figura 3.2: Representación de los gremios al los que pertenecen *D. phthorimaeae* y *P. dignus*, parasitoides larvales de *T. absoluta*, dentro de su ciclo de vida (Larva joven (estadíos L1 y L2); Larva mediana (estadio L3) y Larva tardía estadio L4); **ELN**: endoparasitoide de larvas tempranas).

Competencia entre insectos parasitoides

La teoría ecológica predice que en un ambiente constante dos especies no pueden existir y desarrollarse explotando un mismo recurso (Volterra 1926, Gause 1934), y que como consecuencia, el mejor competidor desplaza competitivamente a la otra especie. Otra definición considera a la competencia interespecífica como el efecto

negativo que una especie tiene sobre otra, a través del acceso o el control de un recurso limitado.

Sin embargo, en la naturaleza se observa que numerosas especies pueden coexistir, debido fundamentalmente a las diferentes formas en las que se han especializado para aprovechar los recursos. Los modelos matemáticos sugieren que esta coexistencia de especies puede ocurrir en presencia de factores que permitan aumentar el número de recursos disponibles o bien le impida a una de las especies ser siempre competitivamente superior. Entre estos factores se mencionan: la diferenciación de los nichos de las especies competidoras, la fuerte competencia intraespecífica y también condiciones del medio ambiente que varían en el espacio o en el tiempo. Una consecuencia de la coexistencia es que las especies involucradas no alcanzarán sus parámetros óptimos poblacionales, pero podrán sobrevivir y tener un buen desempeño (Dean y Ricklefs 1980, Briggs 1993, Hassell 2000, Hawkins 2000).

Usualmente en parasitoides, la competencia por ganarse el hospedador o recurso, puede darse tanto a nivel de individuos inmaduros, es decir, las larvas de distintas especies que luchan por su alimento, o bien entre las hembras adultas heterospecíficas que rivalizan para oviponer.

Los mecanismos de la competencia se dividen fundamentalmente en dos categorías: ***competencia por explotación***, en la que los competidores interactúan en forma directa a través del consumo de un recurso esencial reduciendo uno de ellos la disponibilidad del mismo al otro competidor, y la ***competencia por interferencia***, en la que la actividad de una especie reduce el acceso a un recurso esencial a su competidor, en general provocado por daños físicos (peleas) o por supresión química (a través de toxinas) (Mills 2006, Park 1962). Por otra parte, Mackauer (1990) define a estos mecanismos de competencia interespecífica entre parasitoides, como ***directa***, cuando ocurre entre las larvas de dos o más especies sobre el hospedador, e ***indirecta***, por medio de la supresión de la abundancia del recurso. Smith (1929) distinguió para las interacciones entre parasitoides, entre la ***competencia extrínseca*** como aquella que sucede entre los adultos durante la búsqueda por el hospedador, y la ***competencia intrínseca*** como la que ocurre entre las larvas de los parasitoides al adquirir los recursos de un solo hospedador individual.

La competencia por interferencia entre especies puede ser altamente asimétrica cuando los competidores poseen diferentes tiempos de desarrollo, favoreciendo siempre a una especie en detrimento de su antagonista. Por ejemplo, en el caso de los parasitoides, los ectoparasitoides larvales son generalmente competitivamente superiores frente a los endoparasitoides, por desarrollarse más rápidamente (Mills 2006).

En estos insectos, la competencia puede ser indagada experimentalmente, por manipulación de sus densidades, o bien buscando evidencia en el campo (Godfray 1994). Es posible determinar *a priori* las habilidades competitivas de los parasitoides basándose en sus características biológicas (Mills 2006). La categorización de los parasitoides en koinobiontes (que permiten un período prolongado de crecimiento y desarrollo del huésped después de la parasitación) e idiobiontes (que matan o paralizan al huésped inmediatamente) resulta una indicación práctica para analizar su capacidad como competidores (Haeselbarth 1979, Askew y Shaw 1986, Capítulo 1). La ecología de parasitoides predice que los ectoparasitoides idiobiontes, son capaces de matar o paralizar hospedadores previamente parasitados resultando competitivamente superiores a los koinobiontes (Hawkins 1994). Además, la biología reproductiva influye en las posibles interacciones competitivas de los parasitoides; por ejemplo, es esperable que frente a la disponibilidad de hospedadores aptos, una hembra adulta de una especie que muestre una estrategia de reabsorción de huevos sea capaz de eludir la confrontación con especies antagonistas y postergar su reproducción para el futuro (Jervis y Kidd 1986, Bernstein y Jervis 2008, Capítulo 2).

Los aspectos demográficos también influyen en la competencia entre especies de parasitoides. Así, es más probable que ésta ocurra cuando las tasas de parasitismo son altas y si todos los individuos de la población del hospedador tienen la misma probabilidad de ser parasitados. Sin embargo, cuando una alta proporción de la plaga es inmune al ataque, los parasitoides pueden tener una gran competencia por los relativamente pocos hospedadores vulnerables, a pesar que las tasas de parasitismo sean bajas (Dean y Ricklefs 1980, Hawkins 2000).

La competencia interespecífica influye en la coexistencia de las especies, y en la estructura y la dinámica de la comunidad (Godfray 1994), promovida en gran parte como ya se ha dicho por la variablidad espacial y temporal. Como mecanismo se ha

propuesto que en un ambiente donde aparecen continuamente parches nuevos de hospedadores, especies más débiles en términos competitivos, pero mejores en cuanto a su capacidad de búsqueda y colonización de esos nuevos parches, promoverán la coexistencia. Este tema será tratado en mayor profundidad en el Capítulo 4; no obstante, se desea enfatizar aquí la necesidad de emprender estudios detallados sobre las interacciones competitivas de algunos enemigos naturales de las plagas, como condición para poder discernir las relaciones que establecen en el cultivo y eventualmente manipularlos en un programa de control biológico (Hawkins 2000).

Además de la noción clásica de la interacción de competencia en ecología, ha surgido recientemente el concepto de la depredación intragremio (Polis *et al.* 1989, Brodeur y Boivin 2006). Este tipo de interacción interespecífica se define como aquella en la cual existe depredación entre especies que pertenecen a un mismo gremio, es decir son especies potencialmente competidoras. En la depredación intragremio una de las especies actuará como depredadora intragremio y otra como presa intragremio. Para parasitoides, se la ha descrito en casos donde la larva de una especie mata a otra de una especie antagonista, cuando coinciden en mismo hospedador (i.e. multiparasitismo). Por lo tanto, la depredación intragremio puede ser considerada como un caso especial de competencia por interferencia o intrínseca, donde el resultado más importante es la ganancia energética inmediata del depredador intragremio (Borer 2000). Las interacciones intragremio son muy habituales en las comunidades de agentes de control biológico de artrópodos plaga, y pueden influenciar la eficacia del control biológico (Rosenheim *et al.* 1995). En este estudio, *D. phthorimaeae* se comportaría como el depredador intragremio y *P. dignus,* como su presa intragremio. Si bien se reconoce la importancia de la depredación intragremio como interacción interespecífica, en este trabajo de tesis se enfatizará en la competencia interespecífica para conocer los efectos que puede tener la acción de ambas especies de parasitoides larvales sobre su hospedador, *T. absoluta*.

Por lo tanto, en este estudio se planteó el analizar aspectos de las interacciones competitivas entre dos parasitoides larvales de *T. absoluta*, una importante plaga del cultivo de tomate. Ambas especies presentan biologías contrastantes, siendo *P. dignus* un endoparasitoide koinobionte y *D. phthorimaeae* un ectoparasitoide idiobionte. En este sistema, las interacciones competitivas pueden ocurrir por competencia extrínseca,

cuando la hembra de *D. phthorimaeae* al realizar *host-feeding* obligatorio para alimentarse y/o reproducirse sobre larvas de *T. absoluta* (Capítulo 2) le quita recursos a la hembra de *P. dignus*, siendo que ésta necesita hospedadores "vivos" para oviponer. A su vez, la competencia intrínseca sucederá cuando las larvas de *T. absoluta* que estaban primeramente parasitadas por *P. dignus* serán atacadas posteriormente por *D. phthorimaeae*. Cabe destacar que no existen antecedentes de este tipo de estudios de competencia con respecto a estos dos parasitoides de *T. absoluta*, como así también la evdencia de multiparasitismo a campo.

En ambos casos, se prevé que la competencia será asimétrica y a favor de *D. phthorimaeae*. Dado que *D. phthorimaeae* ataca larvas del tercer estadío de *T. absoluta*, la competencia tendrá su efecto sólo en esa parte de la población larval del hospedador. Es necesario tener presente que *D. phthorimaeae* es un parasitoide sinovigénico, capaz de reabsorber huevos a una tasa de un oocito cada 48 horas a partir del quinto día de vida adulta (Savino *et al.* 2012) (Capítulo 2), y que esto le conferiría un atributo positivo extra sobre su antagonista *P. dignus*.

El sistema de estudio y las posibles interacciones competitivas se muestran en la Fig. 3.3.

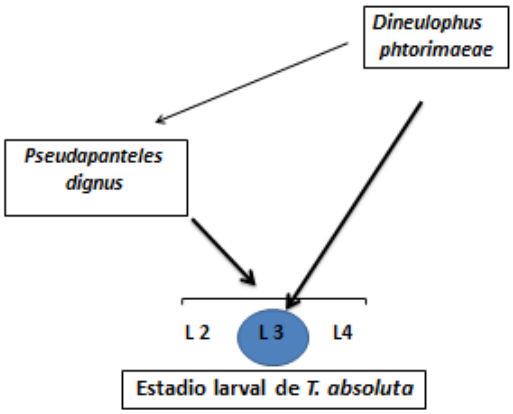


Figura 3.3: Sistema de estudio. Hembras adultas y larvas de *D. phthorimaeae* y *P. dignus* en competencia por las larvas de *T. absoluta*. Las líneas gruesas simbolizan el parasitismo de ambas especies de parasitoides. La línea fina representa la interacción esperada de competencia entre *D. phthorimaeae* y *P. dignus* cuando la primera utiliza a las larvas del hospedador previamente endoparasitada. Más detalles en el texto.

El interés por las interacciones interespecíficas abordadas en este trabajo de tesis se centra, por un lado, en dilucidar algunos aspectos de la competencia entre especies de parasitoides (Hawkins 2000). Por el otro, teniendo en cuenta que se trata de enemigos naturales de una plaga, el conocimiento que se obtenga será de utilidad para aplicar en posibles programas de control biológico de la "polilla de tomate".

Objetivos, hipótesis y predicciones

El ***objetivo general*** de este capítulo es analizar el multiparasitismo de larvas de *T. absoluta*, ocasionado por *D. phthorimaeae* y *P. dignus.* Para ello, se proponen como ***objetivos específicos***:

1- Estimar la ocurrencia del multiparasitismo de larvas de la polilla a campo.

2- Estudiar en el laboratorio la interacción competitiva de *D. phthorimaeae* sobre *P. dignus*, teniendo en cuenta el comportamiento de oviposición de la hembra del

ectoparasitoide, según la edad de la misma –información obtenida en el capítulo 2- en presencia de larvas previamente endoparasitadas.

La **hipótesis general** es que las dos especies de parasitoides de *T. absoluta* mostrarán algún grado de competencia por su hospedador, debido a la superposición parcial del nicho.

Por lo tanto se **predice**:

a- Se hallarán en el cultivo larvas de *T. absoluta* multiparasitadas.

b- Debido al comportamiento de *host-feeding*, la competencia entre ambos parasitoides será a favor del idiobionte *D. phthorimaeae*, ya sea por la eliminación del recurso o por muerte directa de la especie antagonista.

c- La intensidad de la competencia dependerá de la edad de la hembra de *D. phthorimaeae*.

Materiales y Métodos

Evidencia de multiparasitismo a campo

Para conocer la existencia de multiparasitismo en el campo se tomaron en las siguientes fechas: 17 de febrero de 2009, 21 de febrero de 2012 y 15 de febrero de 2013 (Fig. 3.4). Estas fechas de muestreo fueron elegidas luego de un monitoreo previo donde se constató la presencia de ambos parasitoides en el campo.

Figura 3.4: Cultivos de tomate orgánico del Cinturón Hortícola Platense (CHP).

Cada muestreo consistió en colectar. Las muestras se llevaron al laboratorio donde fueron revisadas bajo lupa binocular (Nikon, modelo SMZ 800, Tokio, Japón), para identificar larvas vivas, paralizadas y/o parasitadas, es decir, que presentaban externamente huevos o larvas del ectoparasitoide *D. phthorimaeae*. Los hospedadores parasitados por *D.phthorimaeae* fueron disecados para determinar la presencia de estadios inmaduros del endoparasitoide *P. dignus* (Cardona y Oatman 1971). La técnica de disección fue descrita en el Capítulo 2.

Para estimar la frecuencia de ocurrencia del multiparasitismo en los cultivos muestreados, se calculó: 1) el porcentaje de larvas parasitadas por *D. phthorimaeae* y *P. dignus* individualmente, y 2) el porcentaje de larvas multiparasitadas, es decir aquellas ectoparasitadas y que poseían internamente estadíos inmaduros del endoparasitoide, respecto del total de larvas colectadas.

Ensayo de competencia interespecífica en el laboratorio

Para investigar experimentalmente la frecuencia y magnitud de la competencia entre hembras adultas de las dos especies de parasitoides, se tuvo en cuenta sólo la interacción *D. phthorimaeae* → *P. dignus* debido a que la situación inversa no es posible en la naturaleza. En otras palabras, hospedadores previamente atacados por *D. phthorimaeae* no constituyen un recurso para *P. dignus*, ya que esta última necesita hospedadores sanos para oviponer.

Con este ensayo se trató de comprobar además si las hembras de *D. phthorimaeae* eran capaces de discriminar hospedadores previamente parasitados por su antagonista.

Tanto las larvas de *T. absoluta* como las hembras de *P. dignus* provinieron de colonias establecidas en el CEPAVE bajo las condiciones controladas previamente reportadas. Los especímenes de *D. phthorimaeae* procedieron de colectas de individuos en estadios preimaginales provenientes de invernáculos orgánicos de Cinturón Hortícola Platense. Las hembras de ambos parasitoides fueron alimentadas *ad libitum* con miel y apareadas a partir del primer día de emergencia durante 24 h.

El ensayo se preparó de la siguiente manera (Fig. 3.5). En una arena conformada por un vaso plástico de 10,5 cm de altura y 8,5 cm de diámetro (600 ml) se colocó un grupo de hospedadores (entre 6 y 8 larvas del geléquido de tercer estadío) instalados en minas de hojas de tomate y se liberó una hembra de *P. dignus* de 48 h de edad–previamente apareada- para que parasitara por 24 h, siguiendo el protocolo de cría de Luna *et al.* (2007). Al día siguiente se extrajo la avispa del bracónido y se soltó una hembra de *D. phthorimaeae*, por otras 48 h para permitir el ataque de estas larvas ofrecidas previamente a *P. dignus*, pudiendo estar endoparasitadas o no. El tiempo de exposición del ectoparasitoide se determinó en base a bibliografía existente sobre la especie (Luna *et al.* 2010, Savino *et al.* 2012) y a la información obtenida en el Capítulo 2 de esta tesis. Por las condiciones fijadas en este experimento, *P. dignus* se encontraba en estado de huevo o L1 dentro de su hospedador.

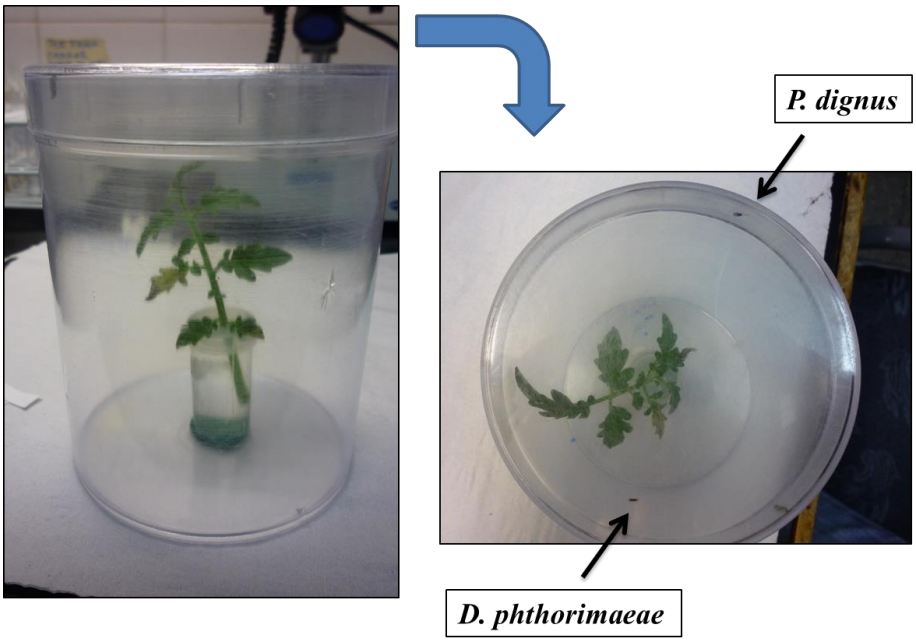


Figura 3.5: Ensayo de competencia entre las hembras de *D. phthorimaeae* y *P. dignus* bajo condiciones de laboratorio.

En este experimento se tuvieron en cuenta tres edades de la hembra del ectoparasitoide, 1, 5 y 7 días, elegidas sobre la base de la información obtenida en esta tesis sobre la biología reproductiva de *D. phthorimaeae* (Capítulo 2). Las mismas fueron alimentadas con miel *ad libitum* durante el ensayo. Se realizaron 15 réplicas para cada edad.

Dado que al igual que *D. phthorimaeae*, las hembras de *P. dignus* no dejan marcas visibles al hospedador cuando lo parasitan, no se pudo reconocer inicialmente el número de larvas de *T. absoluta* parasitadas por el endoparasitoide de aquellas "sanas", en el stock ofrecido en el ensayo. Por ello, una vez terminado el mismo, se revisaron todas las larvas hospedadoras ofrecidas, para evaluar: 1) el número de larvas de *T. absoluta* previamente parasitadas por *P. dignus* sin evidencias del ataque del ectoparasitoide, 2) larvas de *T. absoluta* multiparasitadas (estados inmaduros de ambos parasitoides) o endoparasitadas y picadas por *D. phthorimaeae*, 3) larvas de *T. absoluta* sin endoparasitar pero con síntomas de ataque del ectoparasitoide, y 4) larvas de *T. absoluta* "sanas" o vivas.

Para determinar el ataque del ectoparasitoide, se buscó en las larvas hospedadoras alguna evidencia de *host-feeding* (larvas paralizadas, de color amarillento

crema, necrosadas) o que presentaran huevos o larvas himenopteriformes sobre el tegumento de las mismas, con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, modelo SMZ 800, Tokio, Japón). La presencia del endoparasitoide en las larvas de *T. absoluta*, se corroboró mediante la disección de las mismas (Cardona y Oatman 1971).

El tratamiento estadístico del ensayo fue realizado por medio de un ANOVA de dos vías para comprobar si existió algún efecto de las dos variables testeadas, a saber: 1- la edad de la hembra de *D. phthorimaeae* y 2- la condición de las larvas de *T. absoluta* ofrecidas (parasitadas por *P. dignus* o "sanas") sobre la proporción de larvas del hospedador, y la posible interacción entre estas dos variables. En caso de observar significancia para alguna de las variables se realizó un ANOVA de una vía para analizar el factor por separado. Los datos se analizaron usando el software Statistica (Statsoft 2007), con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Los valores de las proporciones fueron previamente transformados como arcoseno. Previamente a ejecutar los ANOVA, se verificó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene.

Resultados

Evidencia de multiparasitismo a campo

En el estudio llevado a cabo en cultivos de tomate orgánico del Cinturón Hortícola Platense (CHP) se colectaron 241, 161 y 153 larvas de *T. absoluta* durante las campañas 2009, 2012 y 2013, respectivamente. De este total de individuos, el número de larvas parasitadas por *D. phthorimaeae* fue del 34,85 %, 21,12% y 17,65% y por *P. dignus* fue del 39%, 35,40% y 32,02% en los tres años muestreados. Por otro lado, del porcentaje total de hospedadores donde se registró la presencia del ectoparasitoide *D. phthorimaeae*, fueron encontrados multiparasitados, es decir, conteniendo internamente estadios inmaduros del endoparasitoide *P. dignus* un 36%, 35% y 52%, respectivamente para las tres campañas (Figs. 3.6 a, b y c). Por lo tanto, teniendo en cuenta el número total de larvas de *T. absoluta* colectadas (n= 555), el porcentaje de multiparasitismo natural promedio representó un 10,09 %.

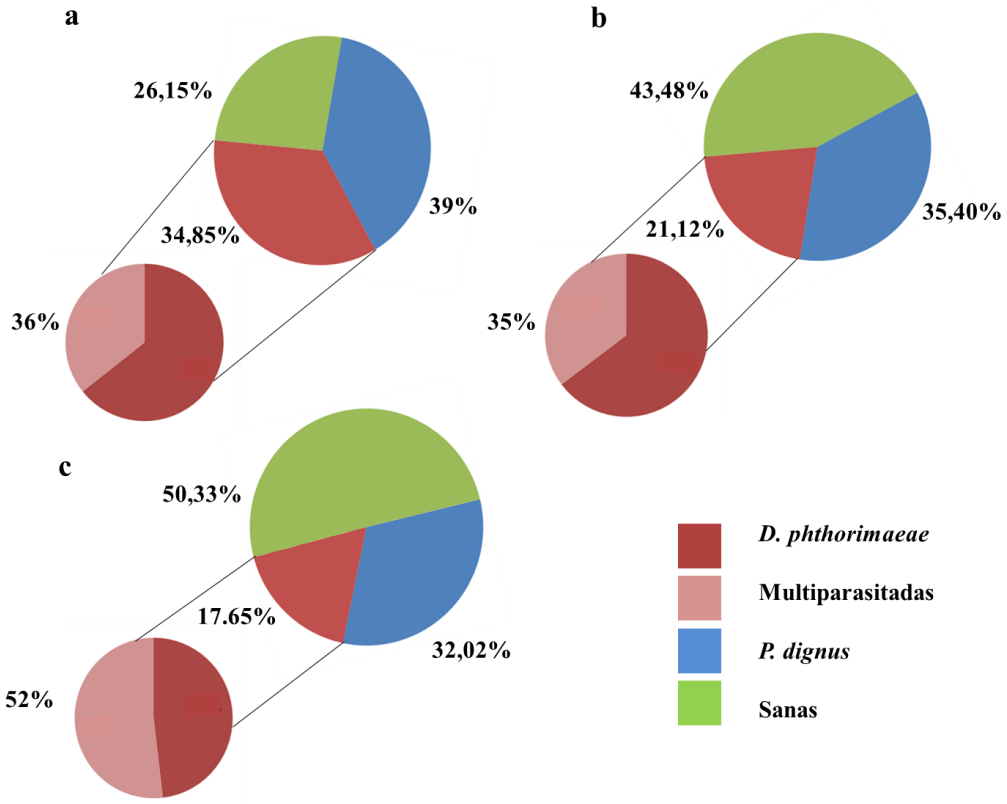


Figura 3.6: Porcentaje de larvas de *T. absoluta* multiparasitadas del total de folíolos con daño fresco colectados a campo durante las tres campaña de muestreo en el CHP (a- año 2009, b- año 2012 y c- año 2013). En rosa oscuro el porcentaje de hospedadores parasitados por *D. phthorimaeae*, en azul se indica el porcentaje de larvas prasitadas por *P. dignus*; en verde se indica el porcentaje de larvas sanas; y en rosa claro el porcentaje de hospedadores multiparasitados por año (a: n=241 y 30; b: n=161 y 12; c: n=153).

Ensayo de competencia interespecífica en el laboratorio

La figura 3.7 muestra los resultados del ensayo de competencia interespecífica entre hembras de *D. phthorimaeae* expuestas a larvas de *T. absoluta* previamente endoparasitadas por *P. dignus* o "sanas".

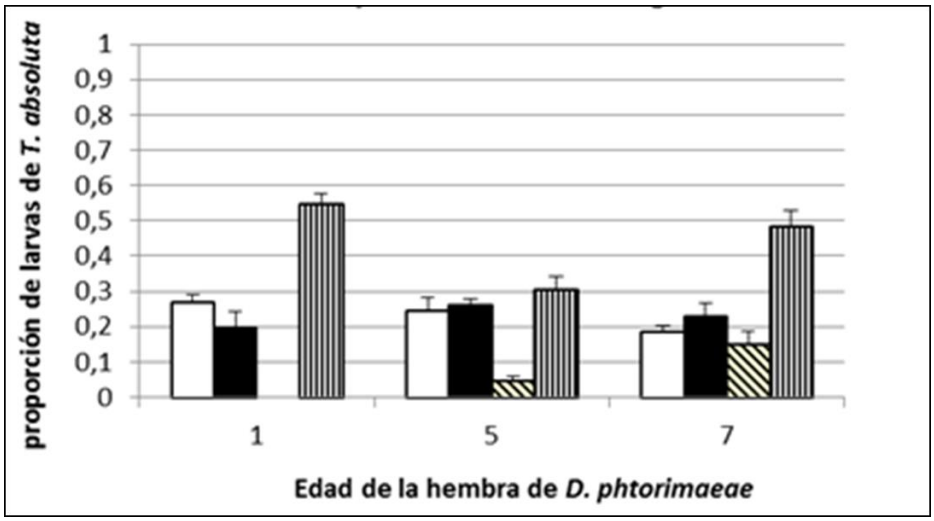


Figura 3.7: Proporción de larvas del tercer estadio de *T. absoluta* (+ESM) previamente expuestas a *P. dignus* ofrecidas a hembras de *D. phthorimaeae* de 1, 5 y 7 días de vida adulta. El gráfico muestra la proporción de larvas parasitadas por *P. dignus* (barras en blanco); la proporción de larvas atacadas para *host-feeding* por *D. phthorimaeae* (barras en negro); la proporción de larvas parasitadas por *P. dignus* y consumidas por *host-feeding* por *D. phthorimaeae* (barras en rayado oblicuo) y la proporción de larvas sanas (barras en rayado vertical).

En primer lugar, es necesario aclarar que no se verificó oviposición de *D. phthorimaeae* en el ensayo, es decir, no fueron capaces de dejar huevos sobre las larvas de *T. absoluta*, estuvieran éstas previamente endoparasitados o sanas. Por otra parte, la interacción tuvo lugar por medio del *host-feeding*, observándose un efecto significativo de la edad de la hembra de *D. phthorimaeae.* Así, avispas de un día de vida picaron sólo hospedadores que no se encontraban endoparasitados. Ya en edades más avanzadas (5 y 7 días), la hembra adulta del ectoparasitoide realizó *host-feeding* sobre larvas de *T. absoluta* previamente endoparasitadas, aunque fue en menor proporción en hembras de 5 días respecto a las de 7 días de edad. Dicho en otras palabras, a medida que avanzó la edad de la hembra del ectoparasitoide, ésta discriminó menos entre hospedadores previamente parasitados o no.

El análisis de ANOVA de dos vías realizado para detectar si existió un efecto combinado de la edad de la hembra de *D. phthorimaeae* y del estado de las larvas de *T. absoluta* (parasitadas o no por *P. dignus*) sobre la proporción de larvas del hospedador picadas, mostró diferencias significativas a favor del ataque de larvas sanas por hembras jóvenes (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Resultados de la prueba de ANOVA de 2 vías para evaluar conjuntamente el efecto de la edad de *D. phthorimaeae* y el estado de las larvas de *T. absoluta* (parasitadas / no parasitadas por *P. dignus*) sobre la proporción de larvas del hospedador ofrecidas (* diferencias significativas).

EFECTO	SS	df	MS	F	*P*
Edad de la hembra de *D. phthorimaeae*	248	2	124	1,3	0,274
Estado de la larva de *T. absoluta*	30050,70	3	10016,90	105,3	0.000*
Edad*Estado de la larva de *T. absoluta*	3837	6	640	6,7	0.000*

Además, se encontraron diferencias significativas en la discriminación por parte de la hembra de *D. phthorimaeae* hacia el estado del hospedador ofrecido (parasitado por *P. dignus* o sano), con una mayor frecuencia de ataques hacia los individuos sanos (ANOVA de una vía, $F(3,168) = 105,32$; $p < 0,000$) (Fig. 3.8).

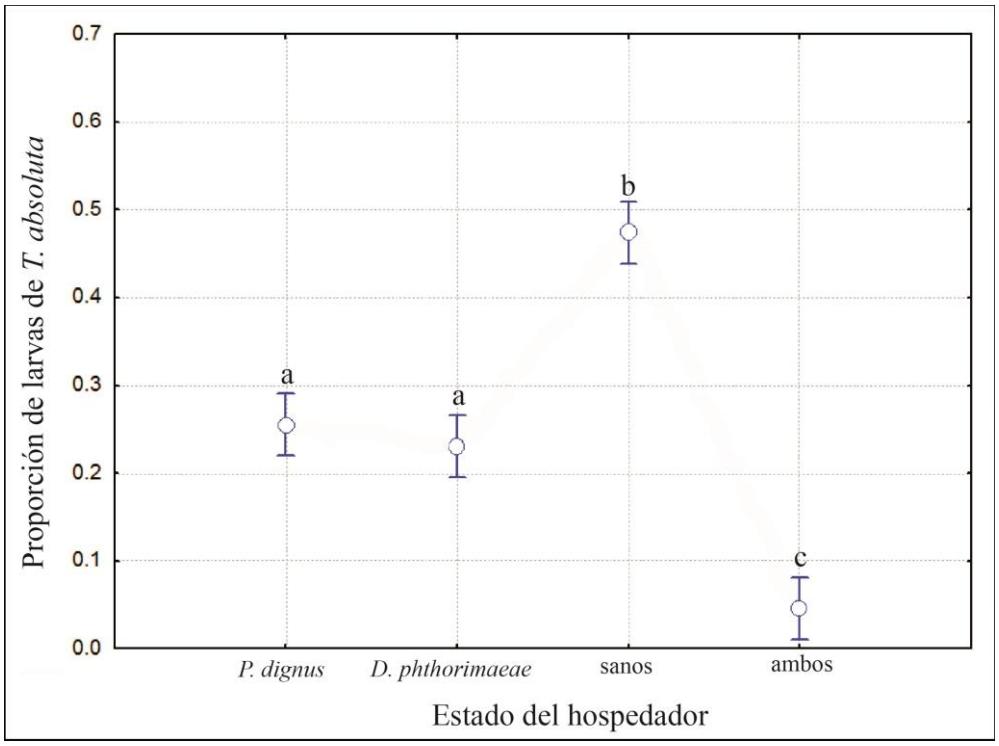


Figura 3.8: Proporciones promedio de larvas de *T. absoluta* (±ESM) ofrecidas a *D. phthorimaeae* según su estado previo (atacadas por *P. dignus* o sanas); (letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas).

Cuando se evaluó estadísticamente la interacción entre ambos parasitoides en función de la edad de la hembra del ectoparasitoide, no se obtuvieron diferencias significativas en la proporción de larvas de *T. absoluta* utilizadas (ANOVA de una vía, $F(2, 168) = 1.30$; $p > 0.05$ (Fig. 3.9).

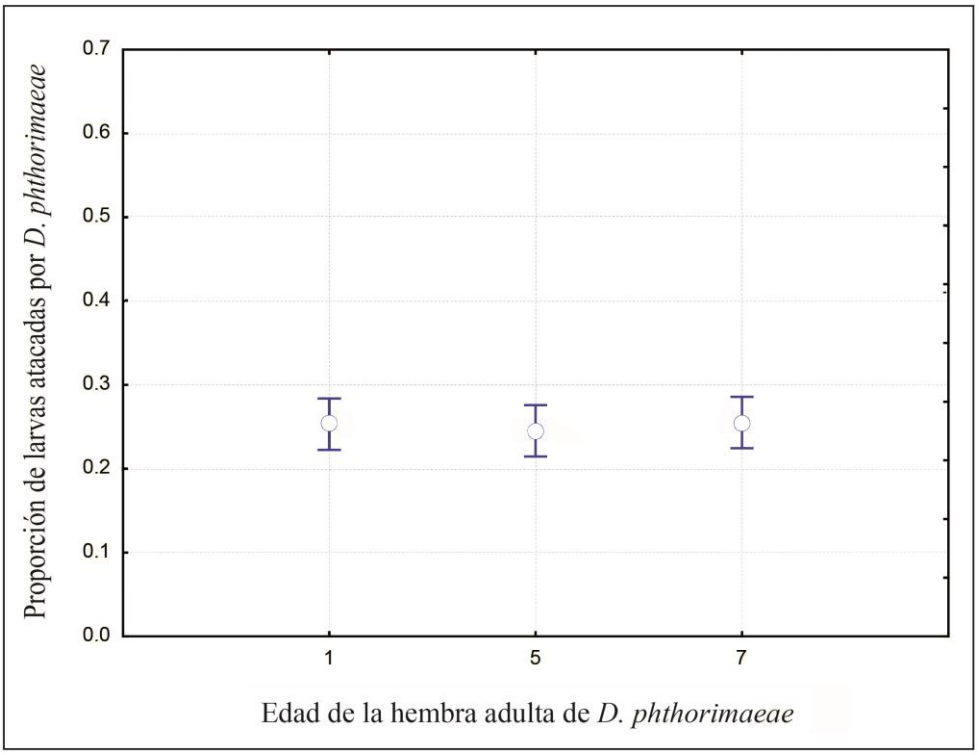


Figura 3.9: Proporciones promedio de larvas de *T. absoluta* (±ESM), atacadas para *host-feeding* por hembras de *D. phthorimaeae* de distintas edades, indistintamente de su estado previo (parasitadas por *P. dignus* o sanas).

Discusión

En este estudio se obtuvo la primera evidencia de multiparasitismo a campo entre ambas especies de parasitoides larvales de *T. absoluta*. Este descubrimiento confirmó la predicción que *D. phthorimaeae* y *P. dignus* pueden atacar simultáneamente a larvas de la polilla en cultivos de tomate. Sin embargo, este multiparasitismo ocurre en una baja proporción de la población de hospedadores en el campo (10 %) (Fig. 3.6). También brindó pruebas sobre los mecanismos de competencia por interferencia o intrínseca entre larvas de estas especies en el campo. Si bien este tema será retomado en el capítulo 4, en este punto es importante mencionar que los mecanismos de competencia (por explotación o interferencia) entre especies de parasitoides se ven influenciados por la densidad del hospedador en el campo (Amarasekare 2000).

En relación al ensayo de laboratorio, las hembras de *D. phthorimaeae* evitaron realizar *host-feeding* sobre aquellas larvas endoparasitadas al momento de la emergencia

mostrando un mayor interés por las larvas sanas de la polilla. Sin embargo, a medida que avanza la edad se observó la utilización de hospedadores parasitados como fuente de alimento. Esta afirmación es respaldada además teniendo en cuenta la información obtenida en el ensayo de repuesta funcional (Capítulo 2), donde se registró que hembras del ectoparasitoide, bajo las mismas condiciones de experimentación, llegaron a parasitar hasta un 30% de hospedadores para una densidad similar de *T. absoluta* (6 - 8 larvas). La literatura brinda diversas evidencias a este respecto. Infante *et al.* (2001), por ejemplo, encontraron que los betílidos *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem) y *Prorops nasuta* (Waterstone) evadieron oviponer sobre hospedadores parasitados; Cancino *et al.* (2012) obtuvieron un resultado similar entre *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapridiidae) y *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae); Persad y Hoy (2003) mostraron que *Lipolexis scutellaris* Mackauer y *Lysiphlebus testaceipes* Cresson (Hymenoptera: Aphiididae) evitan competir al aumentar el tiempo de oviposición frente hospedadores multiparasitados. Contrariamente, Leveque *et al*. (1993) hallaron que las avispas de *Eupelmus vuilleti* (Craw) (Eupelmidae) son capaces de detectar hospedadores previamente parasitados por su antagonista *Dinarmus basalis* (Rond) (Pteromalidae) ocasionando ovicidios y/o larvicidios del parasitoide; Shi *et al.* (2004) demostraron que tanto *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hym., Braconidae) como *Diadegma semiclausum* Hellen (Hym., Ichneumonidae) atacan hospedadores previamente parasitados por su antagonista y que esto causa una mayor mortalidad de ambos parasitoides; un resultado similar fue reportado por Xu *et al.* (2013) para *Encarsia sophia* (Girault & Dodd) y *Eretmocerus hayati* (Zolnerowich & Rose) (Hymenoptera: Aphelinidae); y Ulyshen *et a.l* (2009) encontraron que el ectoparasitoide larval *Spathius agrili* Yang (Braconidae), parasitó larvas previamente parasitadas por el endoparasitoide larval *Tetrastichus planipennisi* Yang (Eulophidae), eliminando completamente a éste último en pruebas de laboratorio.

Otro resultado importante de este estudio es la confirmación que hembras del ectoparasitoide de mayor edad, que enfrentan una situación apremiante para buscar y usar hospedadores, no discriminaron entre larvas de *T. absoluta* parasitadas y sanas, para realizar *host-feeding*. Probablemente en esta etapa el consumo de hospedadores haya sido realizado para ganar energía y asegurar futuras oviposiciones, ya que a los 7 días de vida la hembra de *D. phthorimaeae* continúa madurando oocitos (Capítulo 2,

Bernstein y Jervis 2008). Ueno (1999) encontró un resultado similar para los himenópteros icneumónidos *Pimpla nipponica* Uchida e *Itoplectis naranyae* Ashmead, ambos parasitoides idiobiontes de pupas de lepidópteros, y que practican *host-feeding*. Por lo tanto la predicción que la intensidad de la competencia dependerá de la edad de la hembra de *D. phthorimaeae* y de la disponibilidad de hospadadores pudo ser confirmada.

Sobre la base de las evidencias de los estudios de campo y laboratorio se propone entonces a la competencia por interferencia como uno de los mecanismos por el cual la hembra de *D. phthorimaeae* compite con *P. dignus* eliminando a individuos inmaduros de su antagonista por medio de la parálisis o inyección de veneno al hospedador. Sin embargo, la competencia por explotación sería otro mecanismo importante en la interacción entre ambas especies de parasitoides, la cual se verificó por el mayor ataque de *D. phthorimaeae* hacia los hospedadores sanos, lo cual le restaría recursos al *P. dignus*. Collier y Hunter (2001) encontraron pruebas de competencia por interferencia entre *Eretmocerus eremicus* (Rose & Zolnerowich) y *Encarsia sophia* (Girault), parasitoides de moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae), por medio de dos mecanismos: la usurpación de hospedadores en casos de multiparasitismo y por *host feeding* letal.

Un aspecto a indagar en estudios posteriores sería elucidar la base eco-fisiológica de la discriminación por parte de las hembras jóvenes de *D. phthorimaeae* a favor de hospedadores sanos, un resultado no esperado en esta investigación. Una gran variedad de himenópteros parasitoides marca a los hospedadores una vez parasitados, por medio de secreciones químicas o raspaduras con el ovipositor, para evitar el superparasitismo o el multiparasitismo (Quicke 1997). Sin embargo, se presume que un ectoparasitoide no posee adaptaciones para decidir si parasitar o no a hospedadores previamente endoparasitados, ya que esto implicaría un costo innecesario ante posibilidades de oviposición que garanticen una descendencia segura (Godfray 1994, van Alphen y Bernstein 2008) La exhaustiva revisión de larvas de *T. absoluta* expuestas a *P. dignus* no halló ningún signo dejado por la hembra (Capítulo 2), por lo que se presume que se debe tratar de otro tipo de marcado que sería reconocido por hembras heteroespecíficas. A su vez, los posibles movimientos que produce la larva del

endoparasitoide dentro del hospedador durante su desarrollo podrían haber sido detectados por la hembra de *D. phthorimaeae* (Quicke 1997).

La predicción que postulaba que el idiobionte *D. phthorimaeae* produciría detrimento a su competidora koinobionte *P. dignus* también pudo ser validada. Ejemplos de esta superioridad dada porque el idiobionte mata al hospadador parasitado por el koinobionte han sido reportados. Varley (1947) encontró que aproximadamente el 25% de las larvas del parasitoide koinobionte *Eurytoma curta* (Walker) (Eurytomidae) murieron por la acción de varias especies de parastoides idiobiontes, de biología similar a *D. phthorimaeae*. También Zaviezo y Mills (2001) mostraron el predominio del ectoparasitoide larval *Hyssopus pallidus* (Askew) (Eulophidae) por sobre el endoparasitoide de huevo - prepupa *Ascogaster quadridentata* (Wesmael) (Braconidae) y Ulyshen *et al.* (2009) para el ectoparasitoide idiobionte *S. agrili* sobre el endoparasitoide koinobionte *T. planipennis*.

Otra derivación que surge de este estudio es que cuando se contrastan los resultados del ensayo de competencia en el laboratorio, en el cual se observó hasta un 15 % de larvas de *T. absoluta* endoparasitadas y picadas -sin parasitar- por *D. phthorimaeae*, con los obtenidos con la evaluación del multiparasitismo a campo, donde se registró la presencia de ca. 10 % de hospedadores multiparasitados. Dicho en otras palabras, en este estudio no se pudo mensurar a campo la mortalidad de *P. dignus* por el efecto del *host-feeding* del ectoparasitoide. Collier y Hunter (2001) sugirieron que el *host-feeding* sobre hospedadores previamente parasitados puede ser un importante mecanismo en las interacciones que ocurren en una comunidad de parasitoides, y particularmente para el control biológico, donde su efecto destructivo puede ser desproporcionado y llevar al control exitoso a aquellas especies que realizan este tipo de alimentación, en relación a las especies que no lo practican. Investigaciones futuras tendientes a determinar la presencia de venenos o trazas de material genético de *D. phthorimaeae* en larvas de *T. absoluta* provenientes del campo deberían ser consideradas para obtener una información completa de la interacción de ambos parasitoides.

De este estudio se puede deducir también que el efecto combinado de la edad de la hembra adulta de *D. phthorimaeae* y la disponibilidad de hospedadores en un parche donde se encuentran larvas parasitadas y no parasitadas previamente es importante en la

dinámica de las poblaciones del mismo. El multiparasitismo a campo puede ser el resultante también de la biología reproductiva del ectoparasitoide respecto a la estrategia de ovigenia, producto de la acción de hembras jóvenes que realizan *host-feeding* para adquirir nutrientes para la maduración de sus oocitos y que también son capaces de parasitar, tal como se observó en el Capítulo 2. Las hembras ya en edad más avanzada que deben realizar *host-feeding* para madurar nuevos oocitos debido a que sufrieron el proceso de reabsorción (Capítulo 2) podrán también tener su efecto letal sobre larvas de la especie antagonista *P. dignus* sólo por alimentación de larvas de *T. absoluta*.

La depredacion intra-gremio podría tener baja incidencia en este sistema, ya que como se comprobó, la hembra de *D. phthorimaeae* evita atacar hospedadores previamente parasitados por *P. dignus*, por lo que se asume que la ganancia energética sera ínfima (Borer 2002, Polis *et al.* 1989).

Dado que un solo individuo hospedador representa todo el recurso que un parasitoide necesita para su desarrollo preimaginal, la competencia entre especies puede ser intensa a este nivel (Hochberg y Lawton 1990). A pesar de eso, en la naturaleza las diferentes comunidades proveen evidencia suficiente de coexistencia de enemigos naturales por medio de diversos mecanismos, como por ejemplo la compartimentación de nichos, el comportamiento de segregación a través de la agregación espacial o también cuando la densidad de hospedadores es intermedia (Godfray 1994, Mills 2006). Heinz y Nelson (1996) demostraron para un complejo de enemigos naturales de la mosca blanca *B. tabaci* que éstos proveyeron niveles significativos de supresión de la plaga y que las interacciones interespecíficas no fueron desventajosas para el control biológico. También resaltaron que la *composición* de especies utilizadas, más que el *número* de especies, es más importante para lograr el biocontrol. Esta evidencia resulta substancial para contribuir al entendimiento del sistema estudiado, y su potencialidad de su uso conjunto para el control de *T. absoluta*. Un punto de vista más acorde con la complementariedad de las especies de parasitoides se podría aplicar para la interacción entre ambos. Su presencia espontánea en los cultivos de tomate de la Argentina sería indicativa de la co-evolución que llevó a la diversificación de nichos basada en los patrones del uso de un hospedador común (*T. absoluta*), y producto de las propias características fisiológicas y de comportamiento y de las respuestas individuales de *D.*

phthorimaeae y *P. dignus* frente a la distribución heterogénea del hospedador (Hawkins 2000, Tscharntke y Kruess 2000). Como ya se adelantó, la naturaleza y los mecanismos de la interacción y coexistencia en el campo entre estos himenópteros serán analizados en el próximo Capítulo.

Capítulo 4

Interacción a campo de los parasitoides larvales Dineulophus phthorimaeae *y* Pseudapanteles dignus

Interacción interespecífica entre enemigos naturales y su implicancia en el control biológico

La evaluación de agentes de biocontrol incluye la investigación no sólo de aquellos atributos biológicos propios de las especies de enemigos naturales sino también analizar la interacción entre ellos en el agroecosistema (van Lenteren 1986, 2003, Capítulo 1). En particular las relaciones interespecíficas brindan información sobre los principios ecológicos inherentes a las interacciones de depredador-presa/parasitoide-hospedador y de competencia en un contexto realístico. Dicho en otras palabras: mientras que los estudios de laboratorio explican lo que una especie de enemigo natural es capaz de hacer, los realizados en el campo nos muestran lo que realmente hace (Heimpel y Casas 2008). Esta perspectiva más amplia permite seleccionar candidatos con un mayor conocimiento de su capacidad de control (Briggs 1993, Hawkins y Sheehan 1994, Lewis y Sheehan 1997, Murdoch *et al.*, 1998).

Los aspectos demográficos particulares de cada una de las especies de enemigos naturales intervinientes son relevantes para el control biológico debido a su influencia en la competencia entre las mismas. En relación a los parasitoides, existen evidencias que es más probable que la competencia se establezca cuando las tasas de parasitismo de especies co-ocurrentes son altas, y si todos los individuos de la población del hospedador tienen la misma probabilidad de ser parasitados. Por otra parte, cuando una alta proporción de la plaga es inmune al ataque (por un estado o tamaño inadecuado para alguna de las especies de parasitoides presentes o por refugios parciales promovidos por manchones de baja densidad), los parasitoides pueden exhibir una gran competencia por los relativamente pocos huéspedes vulnerables (Dean y Ricklefs 1980, Hawkins 2000). Por el contrario, la coexistencia de los mismos puede ser promovida por la variabilidad espacial y temporal del uso del recurso, o cuando la especie más eficaz en la competencia se ve limitada por otras condiciones ambientales. Kakehashi *et al.* (1984) demostraron esto por medio de modelos que contemplan dos parasitoides que poseen sus nichos solapados parcialmente. Briggs (1993), a su vez, encontró que la coexistencia es posible, en casos de multiparasitismo, cuando el segundo parasitoide puede desarrollarse con éxito sobre hospedadores previamente parasitados.

Amarasekare (2000) señaló que la coexistencia de especies de parasitoides en una comunidad espacialmente estructurada podría ocurrir a valores intermedios de la densidad de hospedadores. También encontró que cuando la densidad de hospedadores es baja domina la competencia por explotación, a través de la cual solo la especie de parasitoide con mejor capacidad de dispersión y búsqueda hará uso de los recursos y persistirá en el sistema. Por el contrario, cuando la densidad de hospedadores es alta el tipo de competencia preponderante resulta ser por interferencia, donde la especie más agresiva dominará. La primera evidencia de competencia por interferencia o intrínseca hallada a campo entre *D. phthorimaeae* y *P. dignus* en el Capítulo anterior permite plantear, tal como esta autora lo propusiera, que cuando la densidad de *T. absoluta* sea alta, el tipo de competencia dominante será por interferencia, donde la especie más agresiva -para este sistema el ectoparasitoide- será la dominante.

Otro aspecto importante del biocontrol consiste en analizar la relación entre la denso-dependencia de las poblaciones de enemigos naturales respecto de la especie hospedadora en el agroecosistema. El análisis de la tasa de parasitismo en relación con la densidad de hospedadores puede determinar tres posibles patrones: 1) una denso-dependencia directa, como resultante de la agregación de muchos parasitoides en sitios de mayor densidad o por medio de un aumento de la tasa per cápita de búsqueda en las zonas más densas de hospedadores (relacionado con la respuesta de agregación espacial del parasitoide); 2) una denso-dependencia inversa, vinculada a una limitación por parte de los parasitoides en el tiempo de manipuleo (*time limited*) y/o por una limitación en su carga de huevos (*egg limited*), a pesar de tener parches de alta densidad de hospedadores, y 3) una densoindependencia cuando el parasitismo no está influenciado por la densidad de hospedadores presentes (Hassell 2000, Heimpel y Casas 2008).

Numerosos trabajos predicen que una tasa de parasitismo denso-dependiente directa puede regular eficientemente las poblaciones de la especie plaga a considerar (Hassell y May 1973,1974; Murdoch y Oaten 1975, Heads y Lawton 1983). Sin embargo existen estudios que indicarían que tanto un patrón de parasitismo denso-dependiente inverso como denso-independiente podrían potencialmente conducir a densidades estables de las plagas si éstas poseen una distribución espacial de tipo agregada (Walde y Murdoch 1988, Pacala y Hassell 1991, Hassell 2000, van Veen *et al.* 2002).

Antecedentes de estudios del parasitismo de T. absoluta *a campo*

En un cultivo, la composición de especies y las tasas de mortalidad que infligen los enemigos naturales sobre las plagas se verán afectadas por el tipo de manejo sanitario. Así, un bajo o nulo uso de agroquímicos, laboreos que preserven la estructura del suelo y la presencia de una mayor heterogeneidad vegetal en el predio que actúen como refugio para los entomófagos contribuirán en el control biológico de plagas (Altieri 1992, Landis *et al.* 2000). En este sentido, en este trabajo de tesis se consideró prestar especial importancia a la interacción a campo entre los parasitoides *D. phthorimaeae* y *P. dignus*, comúnmente concurrentes en el cultivos de tomate de la Argentina, y explorar esta interacción según distintas condiciones agronómicas y de niveles de densidad de la plaga *T. absoluta*. Ya en el Capítulo 3 se mostró que el multiparasitismo a campo es probable que ocurra, aunque en baja proporción (hasta un 10 %) y que la edad de la hembra del ectoparasitoide, competidor superior en términos bioecológicos, determinará un uso diferencial de larvas de *T. absoluta*: mientras que las hembras jóvenes las usan como alimento (*host-feeding* para madurar oocitos) y para dejar descendencia, evitando larvas previamente endoparasitadas por *P. dignus*, las hembras más viejas no discriminan el estado previo del hospedador.

En este capítulo se dilucidan aspectos del comportamiento de forrajeo cuando co-ocurren estos parasitoides en cultivos de tomate con distintas situaciones (ubicación geográfica, manejo sanitario) y se generan conocimientos que aportan a un posible control biológico de la plaga.

Como ya se expresó en el Capítulo 1, ambos parasitoides larvales de la polilla del tomate son de distribución americana, aunque el área reportada para *P. dignus* (América del Norte y del Sur, e introducida en Hawaii (Cardona y Oatman 1971)) es mucho mayor que aquella para *D. phthorimaeae* (Argentina y Chile, De Santis 1983, Larraín 1986).

Con respecto a los estudios de parasitismo e interacción en el campo de las dos especies de avispas bajo estudio, se cuenta con varios antecedentes previos. Para *P. dignus*, Sánchez *et al.* (2009) analizaron los patrones de parasitismo cuando es prácticamente la única especie que ataca a *T. absoluta* en el cultivo de tomate en el CHP (noreste de Buenos Aires), para lo cual se tuvieron en cuenta distintas escalas espaciales

del cultivo (escalas de folíolo, hoja y planta). Estas autoras encontraron que la proporción de larvas de *T. absoluta* parasitadas por *P. dignus* fue independiente de la densidad del hospedador en todas las escalas, resultado consistente con una respuesta funcional de tipo I, reportada previamente por Luna *et al.* (2007). También detectaron una variabilidad moderada de la agregación del parasitoide en manchones más densos del hospedador en la escala de hoja y en todos los predios estudiados, sugiriendo que *T. absoluta* podría encontrar refugios parciales en los cultivos, lo cual contribuiría a la persistencia de la interacción parasitoide-hospedador.

Nieves (2013) aportó nuevos conocimientos sobre aspectos fundamentales de las estrategias de historia de vida de *P. dignus* y su demografía (a campo en cultivos del CHP, y en laboratorio). Este endoparasitoide puede parasitar todos los estadios larvales de *T. absoluta*, ajustando su tiempo de desarrollo con el del hospedador. La mayor mortalidad de *P. dignus* ocurre en las primeras etapas del desarrollo (L1) cuando tiene que enfrentar la reacción de encapsulamiento por parte del hospedador. En cuanto a su estrategia reproductiva, se demostró que se trata de una especie sinovigénica moderada, que no posee periodo de preoviposición y generalmente ovipone el 50% de sus huevos antes de completar la primera semana de vida como adulto. Las hembras adultas del parasitoide evitan el superparasitismo, tanto en el laboratorio como en el campo. Entre los parámetros demográficos a destacar, posee una elevada capacidad potencial de crecimiento poblacional, exhibiendo una tasa intrínseca de crecimiento levemente mayor al hallado para su hospedador y muestra una elevada capacidad de atacar hospedadores, tanto a bajas como a altas densidades de la plaga, causando una mortalidad total de la población de la polilla que puede alcanzar un 70 % a finales del ciclo del cultivo en tomate tardío.

Con respecto a *D. phthorimaeae*, un estudio hecho en Chile demostró que puede alcanzar hasta un promedio de 39 % de parasitismo cuando se presenta sólo en el cultivo (Larrain 1986). También se evidenció su gran sensibilidad por el uso de insecticidas, pudiendo afectar el desarrollo natural de las poblaciones fundamentalmente en invernáculos, donde es común un elevado uso de pesticidas de manera preventiva en ese país. En Argentina, Luna *et al.* (2010) estimaron algunos atributos de su historia de vida en laboratorio (ver también Capítulo 2). En cuanto a su co-ocurrencia con *P. dignus* en cultivos orgánicos del CHP, registraron ambas especies aunque con una

mayor tasa de parasitismo por parte del ectoparasitoide, sustentando la hipótesis de una mayor superioridad competitiva de este parasitoide idiobionte, cuando las condiciones ambientales lo favorecen. Resulta interesante entonces indagar como podrían verse afectadas las poblaciones de *D. phthorimaeae* en cultivos de tomate en donde se han realizado aplicaciones de insecticidas.

Estos antecedentes sobre *D. phthorimaeae* y *P. dignus* parasitando a *T. absoluta*, si bien son indicativos de su valor como enemigos naturales para el control biológico de la plaga, pueden ser considerados limitados como descripción del parasitismo en un contexto espacial más abarcativo (Heimpel y Casas 2008). Un aspecto crucial que determinará si el resultado de las interacciones de especies de parasitoides en el campo conducirá a la coexistencia o no, consiste en que ésta será posible siempre y cuando los competidores "inferiores" hayan desarrollado mejores capacidades en la búsqueda de hospedadores o en su dispersión, en relación a las de sus antagonistas.

Objetivo, hipótesis y predicciones

Debido entonces al interés por mejorar la acción de los parasitoides *D. phthorimaeae* y *P. dignus* sobre larvas de *T. absoluta* en el agroecosistema de tomate, se plantea como ***objetivo general*** de este capítulo analizar la interacción de ambas especies y de multiparasitismo en cultivos de dos regiones de Argentina: el Noroeste Argentino –NOA- y la provincia de Buenos Aires. Para ello se tuvieron en cuenta cultivos de tomate orgánicos y convencionales con interrupción en el uso de insecticidas

Como ***objetivos específicos*** se proponen:

1) evaluar las tasas de parasitismo alcanzadas por ambas especies individualmente y del multiparasitismo cuando coexisten en el campo.

2) inferir el comportamiento de forrajeo de las poblaciones de las dos especies de parasitoides cuando co-ocurren, por medio del análisis de la densodependencia respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta.

El fin último es determinar si la interacción entre estos enemigos de presencia espontánea en el campo podría conducir a la exclusión competitiva de alguna de ellas o

a la coexistencia. Esta información será relevante al momento de generar programas para el control biológico de la plaga, en el marco de un MIP para el cultivo de tomate.

La **hipótesis general** de trabajo es que las poblaciones naturales de ambas especies de parasitoides en el campo pueden coexistir bajo determinadas condiciones: 1. parte de la población de *P. dignus* escapa al multiparasitismoen en la interacción con *D. phthorimaeae* debido a que este último prefiere utilizar hospedadores sanos (Capítulo 3); y 2. el ectoparasitoide se ve afectado negativamente en cultivos de tomate con uso de agroquímicos.

Por lo tanto se **predice** que:

a- En cultivos de tomate con uso previo de plaguicidas, el parasitismo producido por *D. phthorimaeae* será menor que el de *P. dignus*, mientras que en los predios orgánicos se espera encontrar porcentajes de parasitismo similares para ambas especies.

Materiales y Métodos

Descripción de los sitios de muestreo

Para estimar el parasitismo a campo de *P. dignus* y *D. phthorimaeae* y la posible competencia o coexistencia entre ellos, se llevaron a cabo muestreos en cultivos de tomate, ubicados en predios comerciales de dos importantes regiones para la producción hortícola de la Argentina (Corvo Dolcet 2005, Fig. 1.1, Capítulo. 1, Fig. 4.1):

- Cinturón Hortícola Platense: en el noreste de la Provincia de Buenos Aires. Se consideraron cultivos situados en diferentes localidades pertenecientes a tres partidos, Berazategui (Pereyra), Florencio Varela (La Carolina) y La Plata (Lisandro Olmos y Melchor Romero).

- Provincia de Tucumán: en el NOA. Se muestrearon cultivos emplazados en localidades correspondientes a tres departamentos: Capital (San Miguel de Tucumán), Lules (San José de Lules, La Bolsa) y Tafí Viejo (El Colmenar).

Para la elección de estas dos áreas principales de estudio se tuvo en cuenta, en primer lugar, su importancia relativa en cuanto a la producción de tomate a nivel nacional (superficie cultivada y rendimiento) (Capítulo 1, Fig. 1.1) y en segundo lugar, que las especies involucradas en este estudio han sido reportadas en ambas regiones (Botto 1999, Colomo *et al.* 2002, Polack *et al.* 2002, Luna *et al.* 2007, Sánchez *et al.* 2009).

Figura 4.1: Ubicación de las dos regiones hortícolas de Argentina: NOA (Tucumán) y Buenos Aires (CHP) donde fueron realizados los muestreos.

Las dos áreas estudiadas presentan diferencias biogeográficas radicales (Cabrera y Willink 1973). Así, el CHP se encuentra emplazado en la Provincia Pampeana (Dominio Chaqueño). Esta provincia está representada por llanuras, siendo la vegetación dominante la estepa o seudoestepa de gramíneas. Las localidades situadas en Tucumán se disponen en un "nudo" o "encrucijada de dos provincias", la Chaqueña (Dominio Chaqueño) y la de las Yungas (Dominio Amazónico). El tipo de vegetación predominante del "Chaco" es el bosque xerófilo caducifolio, con un estrato herbáceo de gramíneas y presencia de plantas suculentas. Las Yungas se caracterizan por su fisonomía compleja, con selvas, bosques caducifolios y praderas. Como puede observarse, existen diferencias contrastantes en cuanto a las condiciones climáticas, edáficas, florísticas y faunísticas de ambas regiones. También el uso de la tierra para la agricultura es diferente, siendo mucho más homogéneo el paisaje del CHP.

Las condiciones del cultivo de tomate en las dos regiones estudiadas son bastante diferentes (ver también Capítulo 1). Debido a las condiciones climáticas más moderadas e inviernos con heladas, en el CHP es posible producir tomate tanto a cielo abierto como en invernáculos, lo que permite realizarlo prácticamente todo el año. El manejo sanitario se basa mayormente en el uso de pesticidas (Capítulo 1) por calendario (una aplicación semanal preventiva), pero existe un pequeño número de productores que lo cultivan de manera orgánica, generalmente en invernáculos. Los cultivos de tomate orgánicos son combinados con otras hortalizas de temporada como por ejemplo, pimiento, arveja, lechuga y aromáticas, lo que aumenta la diversidad vegetal del predio, promoviendo el control biológico natural como estrategia de manejo. En la provincia de Tucumán, en cambio, el cultivo de tomate se realiza casi exclusivamente a cielo abierto debido a las altas temperaturas imperantes todo el año. El control de plagas convencional se basa en la aplicación preventiva de insecticidas de síntesis, con una frecuencia de hasta tres veces por semana y por ciclo de cultivo. Generalmente en los predios hortícolas de esta región, el cultivo de tomate se encuentra acompañado principalmente por el cultivo de frutilla y en menor proporción por el de berenjena. Más detalles sobre características de la producción de tomate en el país fueron ya mencionados en el Capítulo 1.

Figura 4.2: Caracterización de los cultivos de tomate en las áreas de producción hortícola estudiadas.

El presente estudio abarcó un periodo de tres años de muestreos en ambas regiones. En el CHP se tuvieron en cuenta cultivos bajo cubierta con un manejo orgánico durante los años 2010, 2011 y 2012. En Tucumán se examinaron cultivos convencionales a cielo abierto y particularmente se tuvo en cuenta que se encontraran en una etapa de post-producción de modo que el efecto de aplicaciones previas de insecticidas estuviera atenuado para asegurar la presencia de los insectos en estudio. Los muestreos se llevaron a cabo durante los años 2009, 2011 y 2012. Para seleccionar los predios a muestrear en cada región, se monitoreó previamente la presencia del daño de *T. absoluta* en los mismos. Las colectas se realizaron durante los meses de mayor producción del cultivo de tomate y de incidencia de la plaga, que para el CHP correspondieron a los meses de enero a marzo, y para Tucumán entre los meses de octubre y noviembre.

Cabe mencionar que para llevar a cabo los muestreos en la provincia de Tucumán y el posterior traslado de los especímenes colectados hasta el CEPAVE, sito

en la ciudad de La Plata (prov. de Buenos Aires), se solicitó oportunamente el correspondiente Permiso de Colecta y Guía de Tránsito que otorga la Subsecretaría de Asuntos Agrarios y Alimentos, perteneciente a la Dirección de Flora, Fauna Silvestre y Suelos de la Provincia de Tucumán (Expediente Interno N° 1386/330/2009).

Procesamiento de las muestras

Cada sitio de muestreo consistió en un predio cultivado independiente. Una vez elegidos los predios, se procedió a realizar el muestreo según la técnica descripta por Sánchez *et al.* (2009). Ésta considera la colecta de 20 plantas de tomate al azar, por medio del corte del segmento superior que contiene las primeras ocho hojas apicales expandidas. Este método es apropiado ya que contempla el fototaxismo positivo de las larvas de *T. absoluta* en la planta. El material cortado fue colocado en una bolsa plástica (50 cm x 70 cm), etiquetado con información sobre lugar y fecha de colecta y acondicionado para su traslado al laboratorio.

El procesamiento del material se realizó en instalaciones de dos Centros de Investigación: el PROIMI (CCT Tucumán CONICET) y el CEPAVE.

En el laboratorio, se revisó individualmente cada planta, separando los folíolos con presencia de "daño fresco" y se observaron con lupa binocular (KYOWA SDZ PL Tokio, Japón), para registrar el número de larvas de *T. absoluta* vivas y las parasitadas por *D. phthorimaeae* (presencia de huevo o larva del ectoparasitoide, ya descrito en Capítulos 2 y 3). Además, los folíolos con galerías vacías se observaron cuidadosamente para colectar y registrar las pupas de *D. phthorimaeae* presentes en los mismos o sus restos. Todos los especimenes inmaduros de *D. phthorimaeae* encontrados se colocaron individualmente en tubos Kahn de vidrio (5 ml) etiquetados con fecha y lugar de colecta y cerrados con tapones plásticos, y se los aprovisionó con miel y agua. Las larvas vivas de *T. absoluta* fueron conservadas en el follaje donde se hallaban para detectar el parasitismo por *P. dignus*. Todas se acondicionaron individualmente en cápsulas de Petri plásticas herméticas (10 cm de diámetro × 2 cm de alto) con un trozo de papel humedecido y alimentadas periódicamente con folíolos de plantines de tomate mantenidos en el invernáculo del CEPAVE. Se controló diariamente la formación de la

pupa de la polilla o del cocón del endoparasitoide, que generalmente sucede unos 10 días después a su colecta en el campo.

En el caso del material colectado en Tucumán, luego de la revisión y separación de individuos inmaduros de *D. phthorimaeae* en tubos Kahn, las larvas vivas de la polilla se acondicionaron el bolsas Ziploc ® (Johnson Company) etiquetadas y se transportaron en heladeras portátiles a la ciudad de La Plata. Una vez arribadas, se acondicionaron en cápsulas de Petri según ya se describió.

Todo el material acondicionado fue criado en el bioterio del CEPAVE, bajo condiciones ambientales controladas (25 ± 2 °C, 70 ± 5 % HR y 14:10 L:O).

Para estimar el multiparasitismo, los restos de larvas de *T. absoluta* que permanecían en la mina junto a las larvas de *D. phthorimaeae* fueron disecadas para detectar la presencia de estadios larvales del endoparasitoide *P. dignus.* Dado que *P. dignus* es un endoparasitoide, para calcular el porcentaje de parasitismo infringido por esta especie se disecaron también aquellas larvas de la polilla que mostraban signos de parálisis y/o muertas, pero que no se observaba externamente al ectoparasitoide. Todas las disecciones fueron realizadas bajo lupa (Nikon, modelo SMZ 800, Tokio, Japón) para lo cual se montaron las larvas en una gota de solución fisiológica en portaobjeto de vidrio excavado y con el uso de agujas entomológicas. La identificación de los estados inmaduros de *P. dignus* fueron determinados según Cardona y Oatman (1971).

Toda la información registrada en los muestreos realizados se utilizó para estimar los porcentajes de parasitismo natural de ambos parasitoides, y analizar densodependencia del parasitismo, para estudiar el comportamiento de forrajeo e interacción a campo de ambos parasitoides.

Tasas de parasitismo

Para analizar las tasas de parasitismo se procedió a realizar una colecta en cada sitio de muestreo y cada fecha en ambas regiones hortícolas del país. Se registró para cada planta (n=20): el número total de larvas de *T. absoluta* colectadas (N_0), el número de hospedadores parasitados (Np) por cada especie de parasitoide independientemente y el número de larvas de la plaga multiparasitadas.

Se calcularon los porcentajes de parasitismo promedio por planta para *D. phthorimaeae*, *P. dignus* y de hospedadores multiparasitados según la fórmula:

$$\% \text{ de parasitismo} = Np/N_0 * 100$$

Luego, se procedió a evaluar posibles diferencias en el porcentaje de parasitismo promedio por planta mediante prueba de ANOVA de una vía. Previamente se verificó la homogeneidad de las varianzas por medio del test de Levene (STATISTICA 6.0; StatSoft 2004). Para el análisis de las diferencias significativas encontradas se realizó test de Tukey con un α de 0,05 de confianza.

Análisis de densodependencia del parasitismo a campo

La densodependencia espacial de *D. phthorimaeae*, *P. dignus* y del multiparasitismo sobre larvas de *T. absoluta* se analizó por medio de la regresión logística. Esta metodología es apropiada cuando la variable dependiente es categórica (una variable discontinua y discreta, i.e. proporción de hospedadores parasitados y no parasitados, cuyos errores asociados no están normalmente distribuidos), y puede ser usada con variables independientes continuas y/o discretas (Trexler *et al.* 1988, Trexler y Travis 1993). Si bien se han aplicado otros métodos para analizar la densodependencia en experimentos de laboratorio y de campo, como por ejemplo mediante el ajuste a regresiones lineales y no lineales de mínimos cuadrados (Sánchez *et al.* 2009), el modelo logístico que asume una distribución binomial de los errores ha demostrado ser el más adecuado (Juliano 2001).

Por lo tanto el modelo estadístico usado fue:

$$\text{Ln}\left[p / (1 - p)\right] = \alpha + \beta x$$

donde *p* es la proporción de hospedadores parasitados (por *D. phthorimaeae*, *P. dignus* o multiparasitadas), α y β son los coeficientes de la regresión. El coeficiente α es la ordenada al origen y no suele tener interés en el análisis, mientras que los valores de β reflejan la pendiente de la curva pudiendo ser iguales, mayores o menores que cero

indicando densoindependencia, densodependencia directa o inversa, respectivamente. La variable independiente (*x*) considerada fue el número de larvas de *T. absoluta* por planta de tomate.

Este modelo se ajustó a los datos utilizando el método de máxima verosimilitud (STATISTICA 6.0; StatSoft 2004). Los análisis fueron llevados a cabo para cada sitio en cada una de las regiones, CHP y Tucumán, y para ambas regiones en total.

Resultados

Parasitismo de D. phthorimaeae, P. dignus *y de larvas de* T. absoluta *multiparasitadas*

La información detallada sobre los predios muestreados se sintetiza en la Tabla 4.1. En total se muestrearon 14 predios, 5 en el CHP entre los años 2010, 2011 y 2012, y nueve en la provincia de Tucumán durante los años 2009, 2011 y 2012.

Tabla 4.1: Descripción de los sitios de muestreo en el Cinturón Hortícola Platense (CHP) y en la provincia de Tucumán.

SITIO DE MUESTREO	LOCALIDAD	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	FECHA MUESTREO	TIPO Y MANEJO DEL CULTIVO
CHP				
Olmos	Lisandro Olmos	35° 01' 04" S - 58° 02' 06" O	Feb. 2010-Ene. 2012-Mar. 2012	BC - O
Romero 1	Melchor Romero	34° 56' 08" S - 58° 06' 03" O	Mar. 2011 - Feb. 2012	BC - O
Romero 2	Melchor Romero	34° 56' 28" S - 58° 04' 41" O	Ene. 2011 - Feb. 2012	BC - O
F. Varela	Florencio Varela	34° 52' 12" S - 58° 13' 48" O	Ene. 2012 - Feb. 2012	BC - O
Pereyra	Pereyra	34° 50' 40" S - 58° 05' 40" O	Ene. 2011 - Feb. 2011	BC - O
TUCUMAN				
Lules 1	San José de Lules	26° 54' 34" S - 65° 20' 37" O	Nov. 2009	CA – C*
Lules 2	San José de Lules	26° 54' 35" S - 65° 20' 49" O	Oct. 2011	CA - C
Lules 3	San José de Lules	26° 54' 58" S - 65° 20' 43" O	Nov. 2009	CA - C
Lules 4	San José de Lules	26° 54' 36" S - 65° 21' 23" O	Nov. 2009	CA - C
Lules 5	San José de Lules	26° 54' 54" S - 65° 20' 23" O	Nov. 2012	CA - C
Lules 6	San José de Lules	26° 54' 26" S - 65° 19' 31" O	Nov. 2012	CA - C
San Miguel	S.M. de Tucumán	26° 48' 39" S - 65° 14' 25" O	Oct. 2011	CA - C
EEAOC	El Colmenar	26° 58' 34" S - 65° 12' 05" O	Oct. 2011	CA - C
La Bolsa	La Bolsa	26° 57' 01" S - 65° 17' 49" O	Nov. 2012	BC – C*

BC: cultivos bajo cubierta, CA: cultivos a cielo abierto; O: cultivos con manejo orgánico, C: cultivos con manejo convencional; *cultivos convencionales en post-producción, ca. 30 días desde la última aplicación de insecticidas.

Del total de los sitios muestreados en ambas regiones, se descartaron Romero 2, F. Varela y Pereyra en el CHP; y Lules 3 y Lules 4 para la provincia de Tucumán porque no cumplieron con el propósito de análizar la interacción cuando co-ocurren, ya que solo se constató la presencia de *P. dignus*.

En los predios se colectaron > 2000 individuos de *T. absoluta* (larvas) (Tabla 4.2.), de los cuales más del 75 % estaban parasitadas. Tanto el número de larvas de la polilla como el porcentaje de parasitismo resultaron similares en ambas regiones (Tabla 4.2). Se registró una variación entre 0,5 y 20,25 de larvas de la polilla promedio por planta registrados en los sitios de muestreo.

Tabla 4.2: Resumen general de los muestreos en las regiones del Cinturón Hortícola Platense y la provincia de Tucumán.

Regiones y sitios	***N* larvas de *T. absoluta***	**Promedio (±ESM)de larvas de *T.absoluta* por planta**	**% de parasitismo total (±ESM)**
***Total CHP* (100 plantas)**	909	6,71± 0,40	76,57 ± 3,37
Olmos 2010	306	15,3 ± 0,71	58,66 ± 1,82
Romero 1 2011	47	2,35 ± 0,14	75,92 ± 4,97
Olmos a 2012	137	6,85 ± 0,36	65,10 ± 7,49
Olmos b 2012	57	2,85 ± 0,39	97,22 ± 2,15
Romero 1 2012	124	6,20 ± 0,43	85,94 ± 0,44
***Tucumán* (140 plantas)**	845	8.69 ± 0,31	81,6 ± 2,15
Lules 1 2009	179	8,95 ± 0,40	82,12 ± 0,42
Lules 2 2011	34	1,7 ± 0,24	89,32 ± 4,57
EEAOC 2011	76	3,8 ± 0,53	67,75 ± 0,25
San Miguel 2011	124	6,20 ± 0,27	72,79 ± 1,01
Lules 5 2012	10	0,5 ± 0,07	94,44 ± 7,90
Lules 6 2012	17	0,85 ± 0,10	88,45 ± 0,25
La Bolsa2012	405	20,25 ± 0,61	77,49 ± 0,33

Es muy importante destacar que en este exhaustivo análisis del parasitismo del estado larval de *T. absoluta*, realizado en cultivos de dos regiones diferentes de la Argentina, prácticamente las dos únicas especies halladas fueron *D. phthorimaeae* y *P. dignus*. No obstante, cabe mencionar que el < 1 % fue atacados por otras especies, entre ellas el eulóphido *Neochrysocharis formosa* (identificación realizada por Umberto Bernardo, Istituto per la Protezione delle Piante (IPP - CNR) Italia).

En el CHP, se registró co-ocurrencia de ambos parasitoides en dos de los cinco predios muestreados (Olmos a y b, y Romero 1) (Fig. 4.3.). En los otros dos sitios (F. Varela y Pereyra), sólo se encontró al endoparasitoide *P. dignus*.

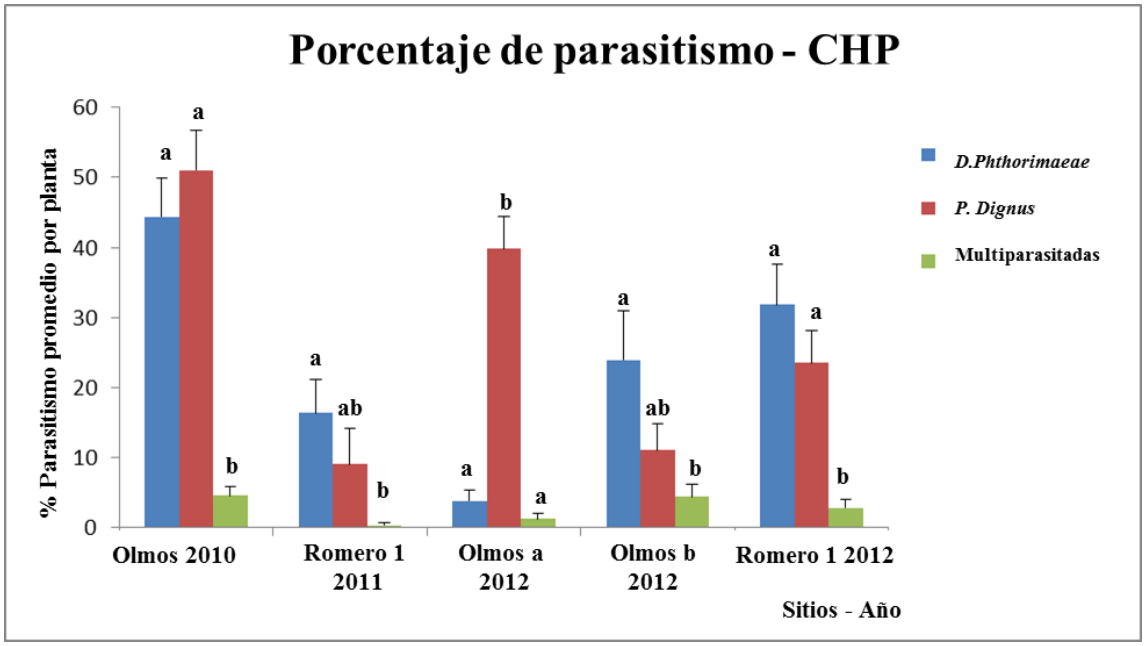


Figura 4.3: Porcentajes de parasitismo promedio (+ ESM) por planta producido por los parasitoides larvales *D. phthorimaeae* y *P. dignus* cuando atacan independientemente a larvas de *T. absoluta* o multiparasitan, en predios orgánicos del CHP (Tukey $p \leq 0{,}05$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas).

Considerando el parasitismo total (porcentaje de parasitismo por planta) causado por las dos especies de parasitoides, se observó un rango inferior del porcentaje de parasitismo del 25,8 % en Romero 1 (2011) y alcanzó el 100 % en Olmos (2010) (Fig. 4.3). El porcentaje de parasitismo del ectoparasitoide osciló entre 3,86 y 44,4 %, el de *P. dignus* entre 9 y 51 % y el porcentaje de multiparasitismo tuvo un rango entre 0,3 y 4,6 % (Fig. 4.3).

No se encontraron diferencias significativas de los valores promedio de larvas de *T. absoluta* por planta parasitadas por el ecto y el endoparasitoide cuando atacaron solos a su hospedador, con excepción de un predio (Olmos a 2012) donde se registró un mayor parasitismo por *P. dignus* (Fig. 4.3 y Tabla 4.3). En todos los casos en que se verificó el multiparasitismo, éste fue significativamente más bajo (< 5 %) que cuando se consideran las especies de parasitoides actuando independientemente.

Tabla 4.3: Resumen del análisis estadísticos mostrando los niveles de significancia del ANOVA de una vía para el porcentaje de parasitismo de larvas de *T. absoluta* por planta (n=20), producido por los parasitoides larvales *D. phthorimaeae* y *P. dignus* individualmente y multiparasitadas, registradas en cultivos de tomate del CHP (60 observaciones).

SITIOS	AÑOS	*F*	*gl*	*p*	N
Olmos	2010	30,23	2,58	0,0000**	20
Romero 1	2011	11,38	2,58	0,003*	20
Olmos a	2012	35,42	2,58	0,0000**	20
Olmos b	2012	3,60	2,58	0,033*	20
Romero 1	2012	20,2	2,58	0,0000**	20

* diferencias significativas (p<0,05), ** diferencias altamente significativas (p < 0,01).

En Tucumán, se registró la co-ocurrencia de ambas especies de parasitoides larvales en siete de los nueve predios muestreados (Tabla 4.1). Los parasitoides en conjunto produjeron entre un mínimo de 18 % y un máximo del 95 % de parasitismo de larvas de *T. absoluta* por planta en Lules 2 (2011) y en Lules 1 (2009), respectivamente (Fig. 4.4).

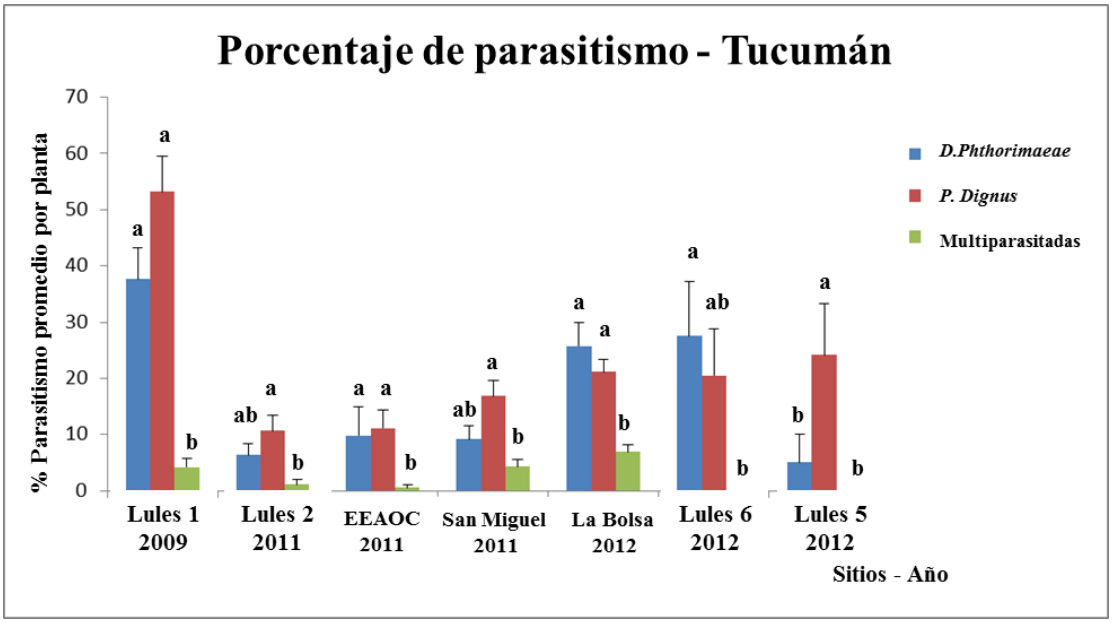


Figura 4.4: Porcentajes de parasitismo promedio (+ ESM) por planta producidos por los parasitoides larvales *D. phthorimaeae* y *P. dignus* cuando atacan larvas de *T. absoluta* de forma independiente o multiparasitan, en cultivos de tomate convencional de la Provincia de Tucumán (Tukey $p \leq 0,05$, (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas).

El rango del porcentaje de parasitismo de hospedadores en estos cultivos varió entre 6,3 y 37,6 % para *D. phthorimaeae*, entre 10,6 y 53,2 % para *P. dignus* y entre 0 y 6,9 % para hospedadores multiparasitados.

No se encontraron, en general, diferencias significativas entre los porcentajes de parasitismo de ambos parasitoides cuando atacaron de forma independiente a las larvas de *T. absoluta* (Fig. 4.4 y Tabla 4.4), con excepción del muestreo de Lules 5 (2012), donde el porcentaje de parasitismo de *P. dignus* fue significativamente mayor. Por otra parte, el multiparasitismo ocurrió siempre en una proporción significativamente más baja (< 7%) que la observada para cada especie cuando atacó de forma independiente.

Tabla 4.4: Resumen del análisis estadístico mostrando los niveles de significancia para un ANOVA de una vía para el porcentaje de parasitismo de larvas de *T. absoluta* por planta (n=20), producido por los parasitoides larvales *D. phthorimaeae* y *P. dignus* individulmente y multiparasitados, en cultivos de la prov. de Tucumán (60 observaciones).

SITIOS	AÑOS	*F*	*gl*	*p*	N
Lules 1	2009	22,99	2,58	0,000**	20
Lules 2	2011	7,44	2,58	0,024*	20
EEAOC	2011	10,53	2,58	0.005*	20
San Miguel	2011	5,81	2,58	0,005*	20
Lules 5	2012	9,67	2,58	0,008*	20
Lules 6	2012	6,80	2,58	0,033*	20
La Bolsa	2012	9,94	2,58	0,000**	20

* diferencias significativas ($p < 0,05$), ** diferencias altamente signficativas ($p< 0,01$).

Análisis de la densodependencia a campo de ambas especies de parasitoides

En todos los predios muestreados se halló que el parasitismo de larvas de *T. absoluta*, tanto el ocasionado por cada parasitoide por separado o en situación de multiparasitismo, fue denso- independiente de la densidad de hospedadores por planta (el coeficiente lineal (β) del análisis de regresión logística no fue significativamente diferente de cero) (Figs. 4.5 a 4.10).

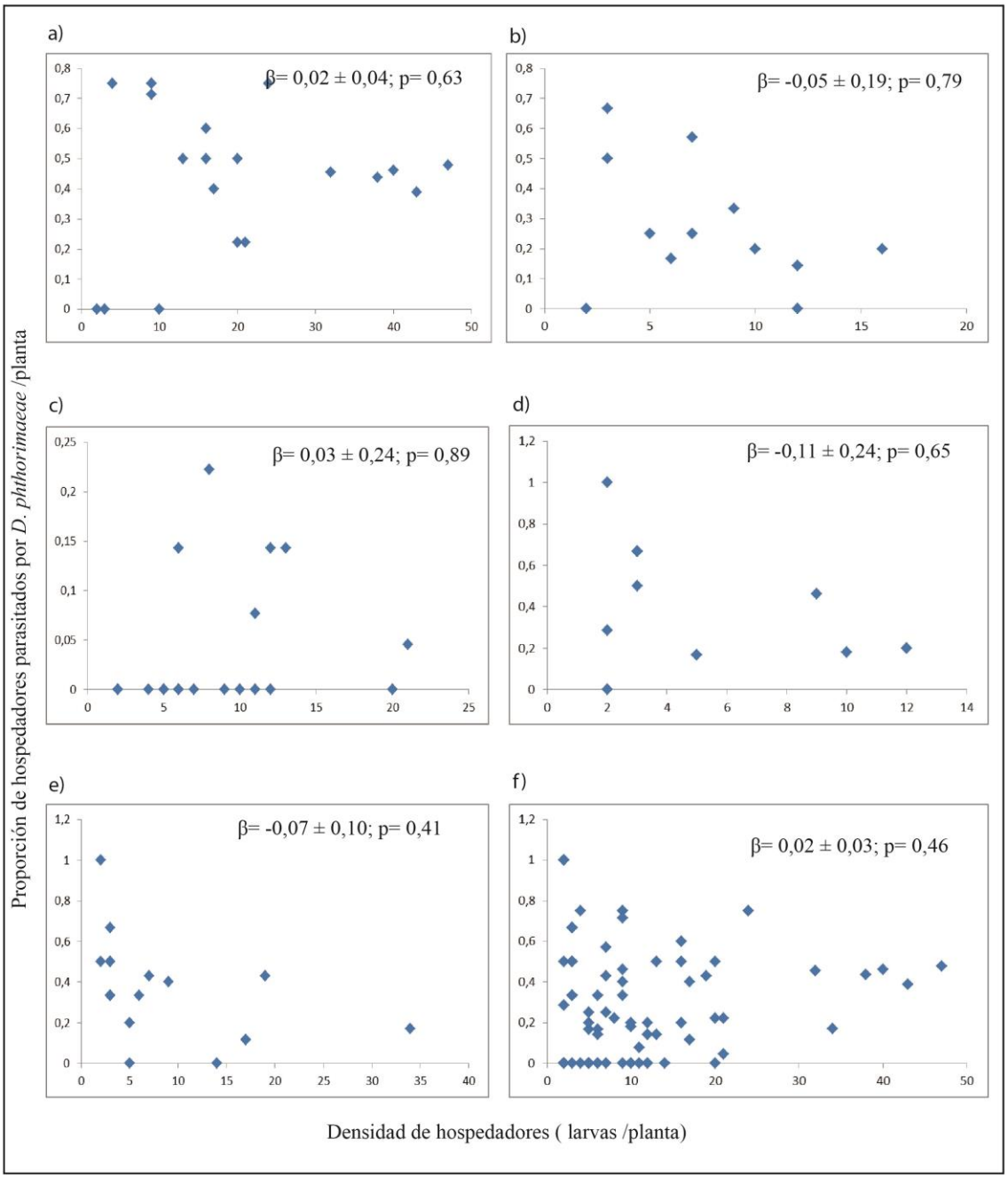


Figura 4.5: Regresiones logísticas que muestran la denso-independencia a campo entre la proporción de parasitismo del ectoparasitoide larval *D. phthorimaeae* respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta para los muestreos en el Cinturón Hortícola Platense (a: Olmos2010; b: Romero 1 2011; c: Olmos a 2012; d: Olmos b 2012; e: Romero 1 2012; f: Región CHP).

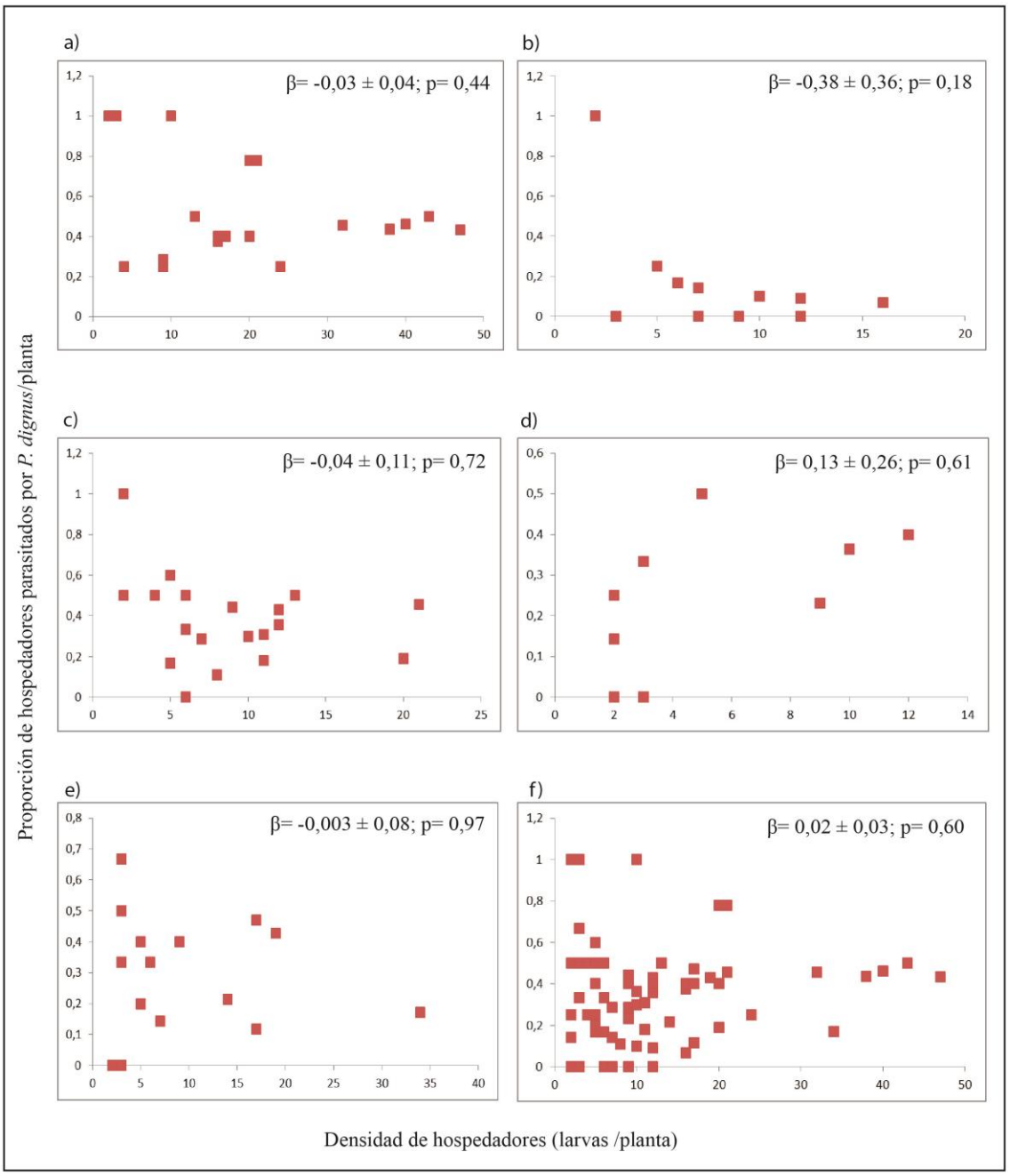


Figura 4.6: Regresiones logísticas que muestran la denso-independencia a campo entre la proporción de parasitismo del endoparasitoide larval *P. dignus* respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta para los muestreos en el Cinturón Hortícola Platense (a: Olmos 2010; b: Romero 1 2011; c: Olmos a 2012; d: Olmos b 2012; e: Romero 1 2012; f: Región CHP).

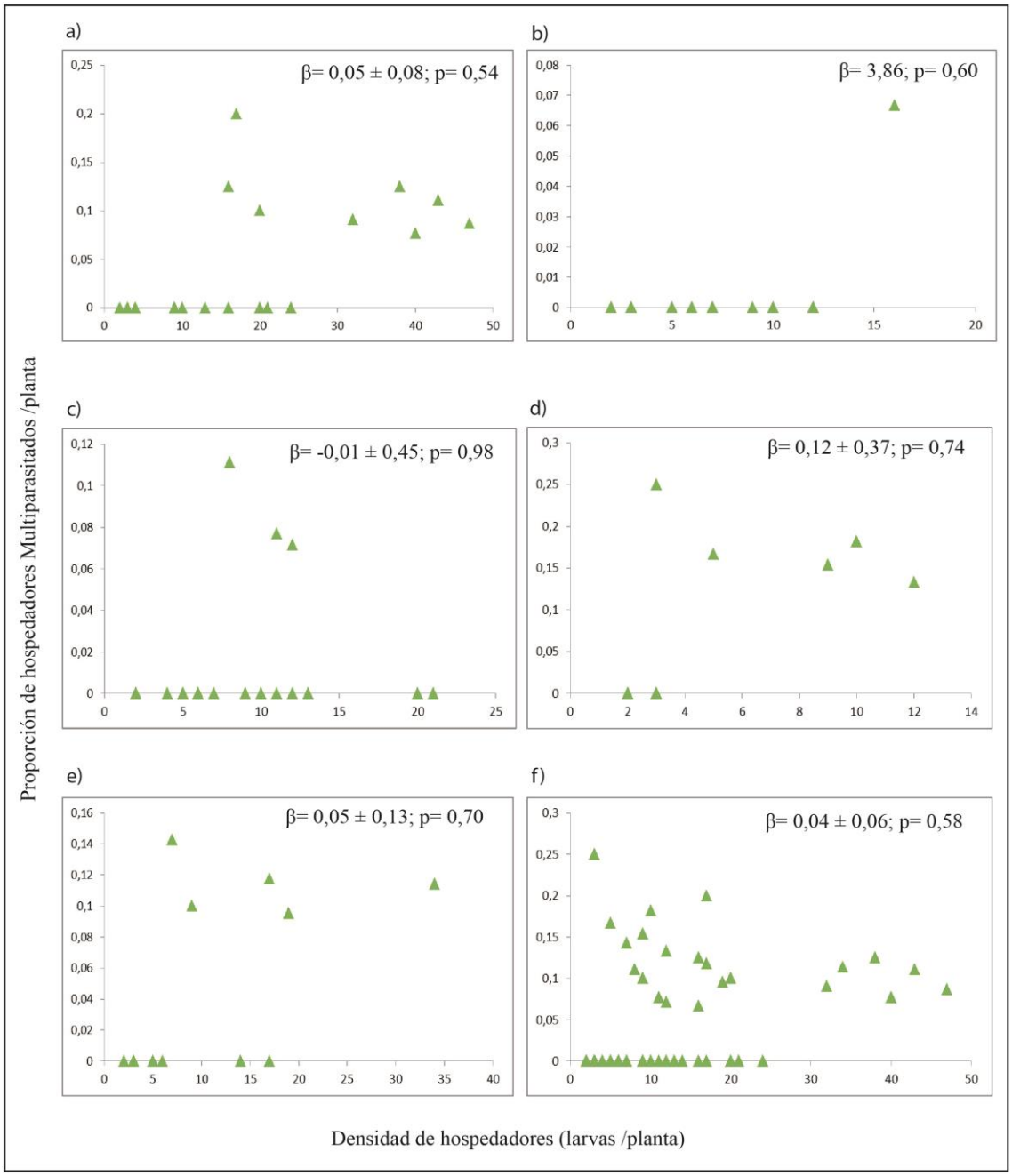


Figura 4.7: Regresiones logísticas que muestran la denso-independencia a campo entre la proporción de hospedadores multiparasitados respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta para los muestreos en el Cinturón Hortícola Platense (a: Olmos 2010; b: Romero 1 2011; c: Olmos a 2012; d: Olmos b 2012; e: Romero 1 2012; f: Región CHP).

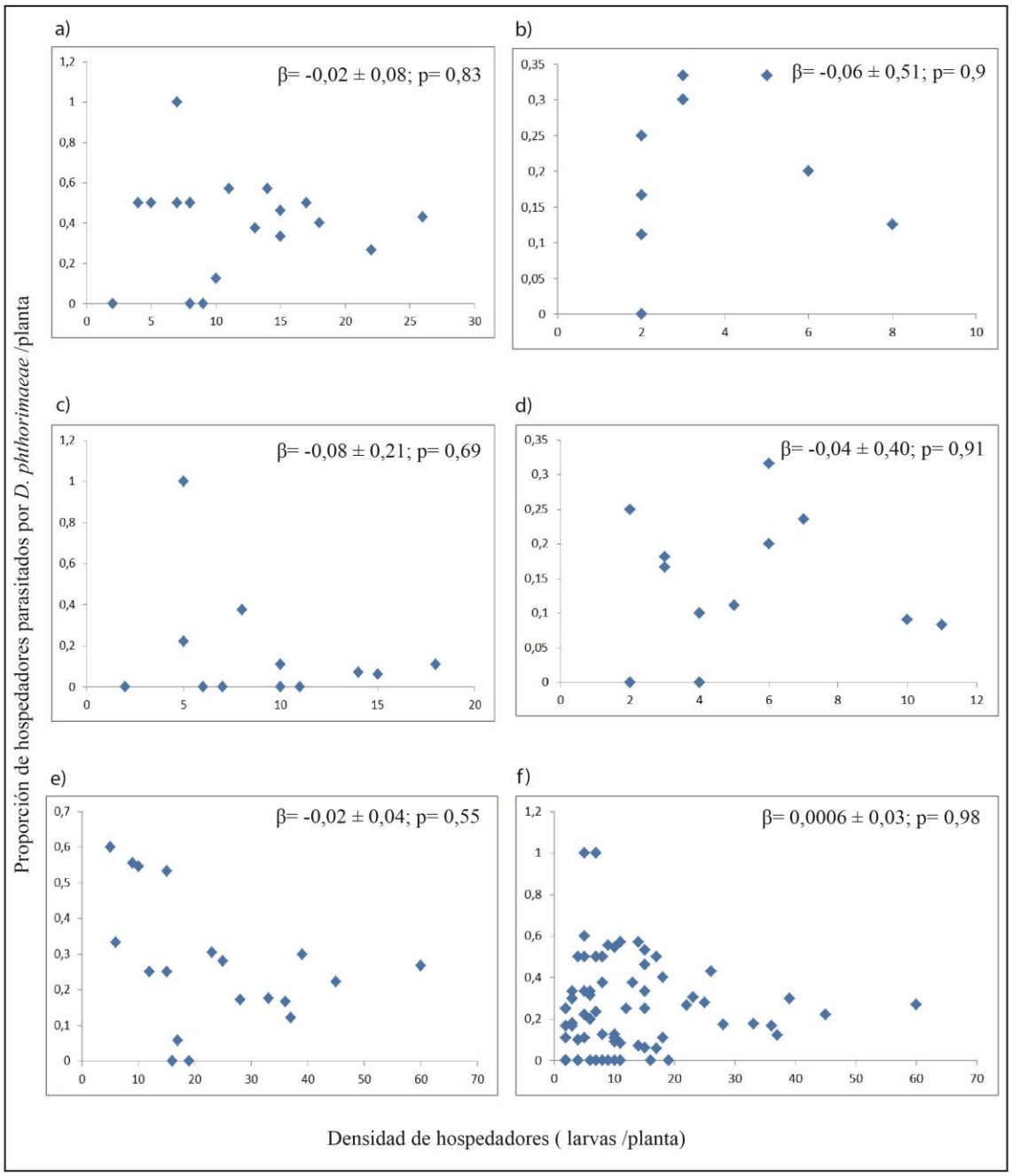


Figura 4.8: Regresiones logísticas que muestran la denso-independencia a campo entre la proporción de parasitismo del ectoparasitoide larval *D. phthorimaeae* respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta para los muestreos en la provincia de Tucumán (a: Lules 1 2009; b: Lules 2 2011; c: EE Ob. Colombres 2011; d: San Miguel 2011; e: La Bolsa 2012; f: Región Tucumán).

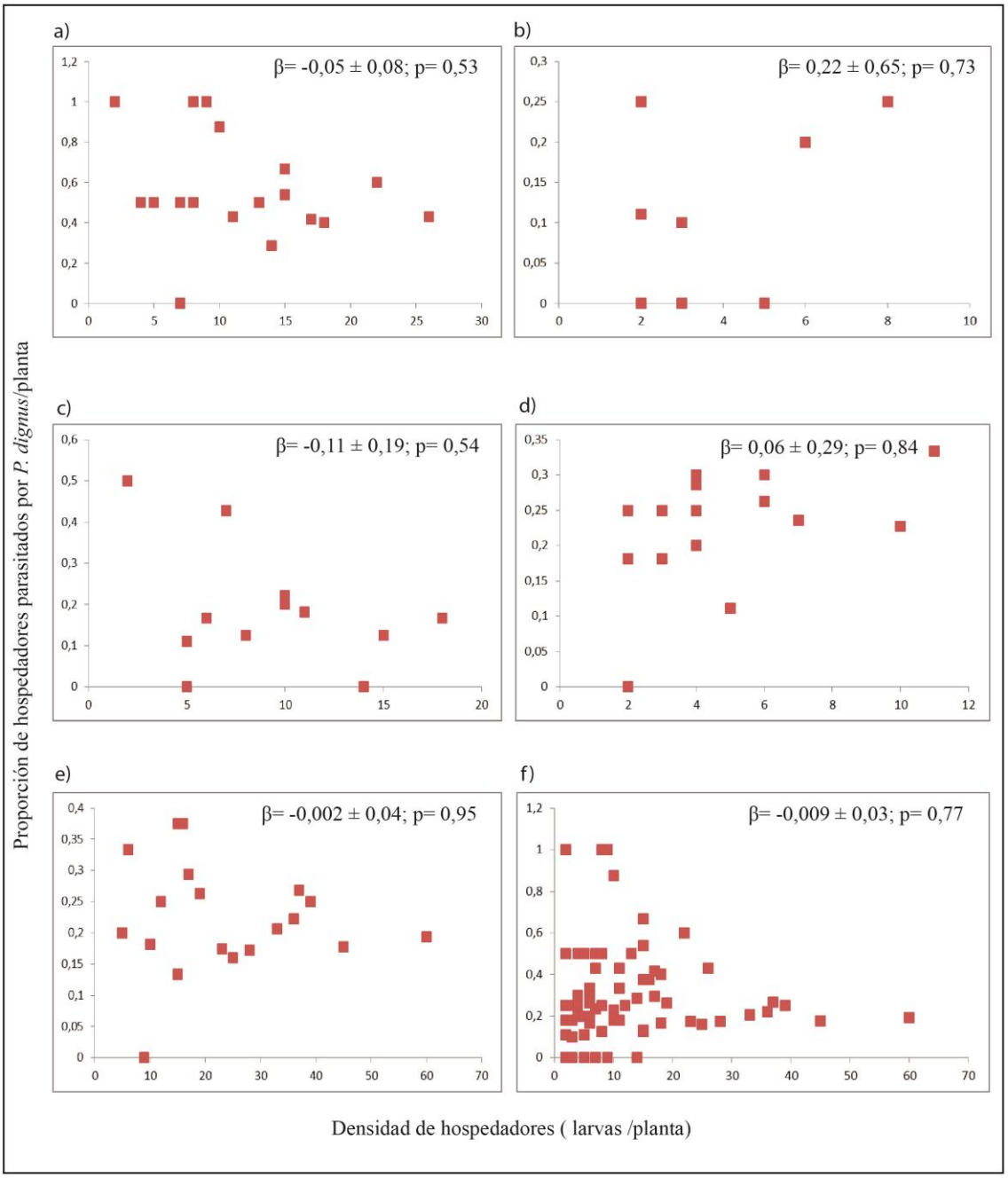


Figura 4.9: Regresiones logísticas que muestran la denso-independencia a campo entre la proporción de parasitismo del endoparasitoide larval *P. dignus* respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta en la provincia de Tucumán (a: Lules 1 2009; b: Lules 2 2011; c: EE Ob. Colombres 2011; d: San Miguel 2011; e: La Bolsa 2012; f: Región Tucumán).

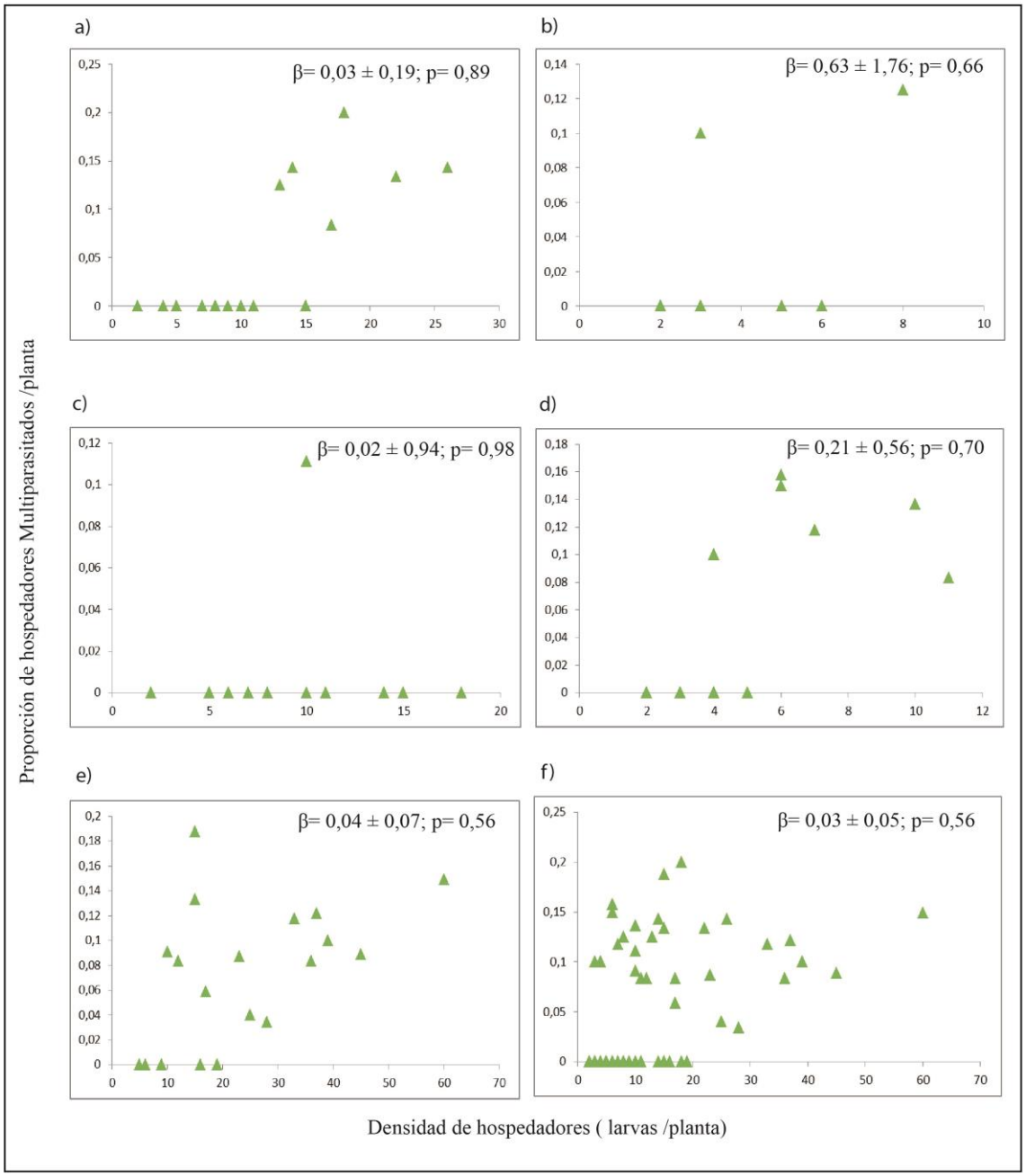


Figura 4.10: Regresiones logísticas que muestran la denso-independencia a campo entre la proporción de hospedadores multiparasitados respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta para los muestreos en la provincia de Tucumán (a: Lules 1 2009; b: Lules 2 2011; c: EE Ob. Colombres 2011; d: San Miguel 2011; e: La Bolsa 2012; f: Región Tucumán).

En la tabla 4.5 se resumen los resultados del análisis de regresión logística para cada sitio de muestreo, para cada parasitoide atacando como única especie y en situación de multiparasitismo.

Tabla 4.5. Parámetros de las regresiones logísticas que analizan la denso-independencia a campo de la proporción de parasitismo de los parasitoides larvales *D. phthorimaeae* y *P. dignus* solos (cada uno sobre un hospedador) y cuando ambos parasitan simultáneamente un mismo hospedador (multiparasitismo) respecto a la densidad de larvas de *T. absoluta* por planta para los muestreos en la provincia de Tucumán y en el Cinturón Hortícola Platense. (NS = no significativo)

SITIOS	PROPORCIÓN DE PARASITISMO														
	D. phthorimaeae					*P. dignus*					Multiparasitadas				
	B0	**β**	***p***	X^2	***N***	**B0**	**β**	***p***	X^2	***N***	**B0**	**β**	***p***	X^2	***N***
CHP															
Olmos 2010	-0,72	0,02	NS	0,23	32	0,76	-0,03	NS	0,6	32	-4,2	0,05	NS	0,37	32
Romero 1 2011	-0,77	-0,05	NS	0,07	18	0,84	-0,38	NS	1,81	18	-64,5	3,86	NS	0,27	18
Olmos a 2012	-3,49	0,03	NS	0,02	26	-0,16	-0,04	NS	0,13	26	-4,17	-0,01	NS	0,0008	26
Olmos b 2012	0,05	-0,11	NS	0,21	12	-1,86	0,13	NS	0,26	12	-2,95	0,12	NS	0,11	12
Romero 1 2012	-0,12	-0,07	NS	0,66	20	-1,12	-0,003	NS	0,001	20	-3,81	0,05	NS	0,14	20
Regional	-1,33	0,02	NS	0,54	50	-0,99	0,02	NS	0,27	50	-3,8	0,04	NS	0,31	50
Provincia de Tucumán															
Lules 1 2009	-0,14	-0,02	NS	0,04	30	0,87	0,05	NS	0,39	30	-3,4	0,03	NS	0,02	30
Lules 2 2011	-0,97	-0,06	NS	0,01	10	-3,05	0,22	NS	0,12	10	-7,27	0,63	NS	0,19	10
EEAOC 2011	-1,2	-0,08	NS	0,15	20	-0,45	-0,11	NS	0,37	20	-5,47	0,02	NS	0,0003	20
San Miguel 2011	-1,9	-0,04	NS	0,01	16	-1,77	0,06	NS	0,04	16	-4,42	0,21	NS	0,14	16
La Bolsa 2012	-0,65	-0,02	NS	0,36	36	-1,4	-0,002	NS	0,003	36	-4,02	0,04	NS	0,34	36
Regional	-1,35	0,0006	NS	0,0035	58	-0,9	-0,009	NS	0,08	58	-3,55	0,03	NS	0,33	58

Discusión

Las condiciones naturales en la que los individuos co-ocurren son mucho más complejas que las que se pueden estudiar de manera simplificada en un experimento realizado en el laboratorio. Los comportamientos que las hembras de parasitoides pueden tener no solo dependen de cómo se encuentran distribuidos los hospedadores en el ambiente, sino también de la susceptibilidad de éstos, la sincronía que presenten sus ciclos de vida, además de otros factores ambientales implícitos en la interacción (Hassell 2000, Heimpel y Casas 2008).

Un primer resultado de esta tesis respecto del análisis del parasitismo de *T. absoluta* en cultivos de tomate para diferentes regiones hortícolas de la Argentina, fue que *D. phthorimaeae* y *P. dignus* son los parasitoides larvales más abundantes y que alcanzan altos porcentajes de parasitismo, lo que presume su ubicuidad y complementariedad en el campo para lograr un buen control de la polilla.

Por otra parte, pudo ser aceptada la predicción que el parasitismo producido por *D. phthorimaeae* será menor al causado por *P. dignus* en cultivos donde se utilizó previamente plaguicidas, y que ambos parasitoides pueden alcanzar porcentajes de parasitismo similares en predios manejados orgánicamente. En el CHP *D. phthorimaeae* fue encontrada solo en las huertas orgánicas muestradas con tasas de parasitismo similares a las de *P. dignus*, estando ausente en cultivos convencionales. A su vez, en Tucumán, a pesar de que el cultivo de tomate se realiza de forma exclusivamente convencional, se registró la co-ocurrencia de ambas especies de parasitoides en aquellos predios muestreados en los cuales al estar finalizando en ciclo de cultivo se había interrumpido el uso de insecticidas. Esto confirma además lo reportado por Larraín (1986) en cuanto a la susceptibilidad de *D. phthorimaeae* a estos compuestos.

Existen dos puntos de vista teóricos contrapuestos acerca de si un complejo de enemigos naturales de una plaga más o menos ricos en número de especies puede llevar a un control biológico exitoso. En el primer caso, hay investigadores que argumentan que un mayor número de especies permitirá la diversificación de explotación de nichos, atacando varios estados de desarrollo de la plaga, o permitiendo concentrarse en una subpoblación de presas/hospedadores que difieren en espacio y tiempo (Dean y Ricklefs 1980, Hawkins 2000, Tscharntke y Kruess 1999). Al mismo tiempo, otros autores

aportan evidencias que sustentan que una baja riqueza reduce la competencia entre especies y por lo tanto, puede ser alcanzado un mejor control. El estudio del sistema *D. phthorimaeae – P. dignus – T. absoluta* brinda evidencias de la coexistencia de ambas especies de parasitoides en el campo para una amplia variedad de manejo sanitario sobre los cultivos de tomate, debido a que la especie más eficaz en la competencia se ve limitada por: 1) una parte de la plaga es inmune al ataque (las hembras sólo parasitan larvas del tercer estadío y rechaza larvas previamente endoparasitadas), y 2) las poblaciones de *D. phthorimaeae* se ven perjudicadas por el uso de insecticidas.

Además, de acuerdo a Luna *et al.* (2007), Sánchez *et al.* (2009), Luna *et al.* 2010, Nieves (2013) y a información provista en el Capítulo 2 de esta tesis, *P. dignus* tiene comparativamente una mayor fecundidad, tasa de ataque al hospedador, estrategia reproductiva moderadamente sinovigénica, una respuesta de agregación espacial –definida como la estrategia de búsqueda de las hembras en respuesta a una distribución irregular o "en manchones" de los hospedadores en el espacio (Hassell 2000) –, un rango de especies hospedadoras alternativas y una distribución geográfica al menos mayor que la conocida para *D. phthorimaeae*.

La presencia conjunta de *D. phthorimaeae* y *P. dignus* parasitando a *T. absoluta* se verificó para un importante rango de densidades del hospedador, desde valores por debajo del umbral de daño para esta plaga (2 larvas/planta, Polack 2003, 2011) hasta un máximo de 20 larvas por planta. Este hallazgo brinda evidencias empíricas del resultado de las interacciones interespecíficas en una comunidad de parasitoides algo diferente a lo propuesto por Amarasekare (2000), a favor de la coexistencia de las especies en el cultivo y en donde la competencia por interferencia (multiparasitismo) es mínima, aún a altas densidades del hospedador.

Numerosos estudios experimentales que tratan sobre la densodependencia en la interacción entre parasitoides y sus hospedadores han merecido una especial atención durante las últimas décadas. Estos estudios planteaban que la denso-dependencia -directa o inversa- del parasitismo sólo podrían contribuir a la regulación de las poblaciones de los hospedadores (Lessells 1895, Stiling 1987, Walde y Murdoch 1988).

D. phthorimaeae mostró un patrón de parasitismo independiente de la densidad de *T. absoluta*, a escala de planta en el cultivo. Esto coincide a su vez con la respuesta funcional analizada en el laboratorio, que fue de tipo I (Capítulo 2). Lo mismo sucedió

con *P. dignus*, quien también presenta una respuesta tipo I (Luna *et al.* 2007). Con respecto al mutiparasitismo, es notable que éste no resulte afectado con el incremento de la densidad de hospedadores ya que se esperaría que éste conduzca a una atenuación de la interacción competitiva entre *D. phthorimaeae* y *P. dignus*. Por otra parte, el patrón densoindependiente observado es coincidente con lo ya analizado en párrafos anteriores donde se discutió que la coexistencia de las dos especies de parasitoides de *T. absoluta* estudiadas parece ser la situación más común en cultivos de tomate.

La importancia de la agregación de los parasitoides que conduce a la estabilidad del sistema hospedador – parasitoide ha sido discutida. Actualmente, se concibe a la denso-independencia como factor de estabilidad del sistema basada fundamentalmente en la distribución heterogénea de la población de hospedadores en el ambiente, lo cual genera refugios parciales que actuarían entonces como un mecanismo estabilizador para la interacción parasitoide-hospedador (Murdoch 1994 y Reeve *et al.* 1994 a, b). Dado que las poblaciones de la polilla del tomate se distribuyen en forma agregada en el ambiente (Sánchez *et al.* 2009), un aspecto a dilucidar en estudios posteriores sería conocer si, al igual que *P. dignus*, las hembras de *D. phthorimaeae* presentan también una respuesta de agregación sobre áreas de alta densidad de hospedadores.

También se ha postulado que el patrón de parasitismo puede variar según la escala de estudio (Heads y Lawton 1983, Lill 1998, Jarosik y Lapchin 2001). Por ejemplo, para *P. dignus* se detectó un patrón denso-independiente de la densidad de *T. absoluta* a escalas de planta, hoja y folíolo del cultivo de tomate (Sánchez *et al.* 2009). Por lo tanto, surge del presente estudio la inquietud de evaluar a futuro éste patrón para *D. phthorimaeae* de manera similar.

La evaluación del multiparasitismo de larvas de *T. absoluta* abordada en este Capítulo amplió el conocimiento que se tenía de este fenómeno para un rango de cultivos de tomate mayor, demostrándose que se trata de un comportamiento común en condiciones naturales aunque con una incidencia muy baja, como ya se ha mencionado. Los ensayos previos sobre competencia en laboratorio (Capítulo 3) demostraron que una hembra adulta, joven y bien alimentada de *D. phthorimaeae* evita atacar hospedadores parasitados previamente por *P. dignus*, y en el campo se hallaron evidencias que sustentan la reducida interacción, manifestado por el bajo porcentaje de multiparasitismo e independiente de la densidad de hospedadores.

El control biológico de la polilla del tomate *T. absoluta* se podría ver beneficiado con la presencia de *D. phthorimaeae* y *P. dignus*. Además del parasitismo producido por estos enemigos se debe adicionar la mortalidad causada por el comportamiento de *host-feeding* no concurrente para alimentación y maduración de oocitos por parte del ectoparasitoide – un aspecto que queda aún por cuantificar en el campo.

Un manejo sanitario de *T. absoluta* más racional con respecto al uso de agroquímicos favorecerá el parasitismo natural de estos dos himenópteros. Como alternativa para el control de plagas, se podrían aplicar insumos aceptados para la producción orgánica (bioplaguicidas, tales como "purines" o a base de *B. thuringiensis*, y/o trampas de feromonas). También la asociación de especies vegetales espontáneas y cultivadas en el predio tendrá un rol importante como refugios para estos enemigos naturales.

Capítulo 5

Consideraciones finales

En este trabajo de tesis doctoral se pudieron determinar aspectos fundamentales de la la biología reproductiva del ectoparasitoide *D. phthorimaeae* y la interacción con el endoparasitoide *P. dignus*, enemigos naturales de la polilla del tomate *T. absoluta*, de amplia distribución y presencia espontánea, para implementar planes de MIP para la Argentina, basado en el control biológico.

Ambas especies de parasitoides, con biologías contrastantes, tienen potencialidad como biocontroladores para ser utilizados solos o en combinación, teniendo en cuenta estrategias tanto de control biológico aumentativo como por conservación.

En primer término, como producto de esta tesis se amplió el conocimiento existente sobre la ecología reproductiva del ectoparasitoide *D. phthorimaeae* (De Santis 1983, Larrain 1986, Ceriani *et al.* 1995, Colomo *et al.* 2002, Luna *et al.* 2010 y Savino *et al.* 2012) Los estudios anatómicos y bioecológicos confirmaron la predicción que *D. phthorimaeae*, es una especie fuertemente sinovigénica, y que necesita un lapso de aproximadamente 5 días para completar la maduración de los oocitos, con una carga máxima de 5 huevos en toda su vida adulta (Capítulo 2). Este tipo de maduración de oocitos se lleva a cabo mediante la incorporación gradual de nutrientes extra a su reserva teneral. La ingesta de estos nutrientes se efectúa fundamentalmente por medio del *host-feeding*, alimentándose de la hemolinfa de las larvas de *T. absoluta* lo cual fue comprobado experimentalmente en este trabajo frente a otras posibles fuentes de alimentación (Capítulo 2). Este comportamiento de alimentación resultó del tipo anautógeno y obligado, una estrategia común en himenópteros parasitoides (Quicke 1997) y no se descarta que la hembra adulta aproveche también otras fuentes del ambiente, principalmente azúcares (Bernstein y Jervis 2008). Debido a que los comportamientos de alimentación y de oviposición pueden no ocurrir simultáneamente, éstos puede convertirse en una oportunidad y/o pérdida en términos de ganancia de *fitness* inmediata para parasitoides como *D. phthorimaeae*.

También se comprobó que la hembra de *D. phthorimaeae* exhibe, según Jervis *et al.* (2008), una curva de ovigenia del tipo IV, es decir, que produce pocos huevos grandes y ricos en vitelo (anhidrópicos) durante su vida adulta y que en ausencia de hospedadores los reabsorbe a una tasa de un oocito cada 48 horas. El conocimiento de cómo las hembras de *D. phthorimaeae* toleran la privación de hospedadores y lo

compensan mediante el mecanismo de reabsorción de huevos, trae consecuencias sobre el parasitismo efectivo, lo cual es una información relevante en el caso de ser usado en programas de manejo para el control biológico de *T. absoluta.*

La respuesta funcional de la hembra de *D. phthorimaeae* fue independiente del incremento de la densidad de larvas de *T. absoluta* ofrecidas, tanto para los hospedadores que ataca (pica y parasita) como para los picados solamente (Capítulo 2). Esto reveló la importancia que el mecanismo de *host-feeding* de *D. phthorimaeae,* tiene sobre la mortalidad de su hospedador, sea para alimetarse u oviponer. Es necesario resaltar que este comportamiento tendrá implicancias en el éxito reproductivo de la especie según su estado nutricional, edad y frente la heterogeneidad de los recursos e interacción con otras especies en la naturaleza. A pesar de su relevancia, la magnitud de la mortalidad causada por especies de parasitoides que realizan *host-feeding* no concurrente es frecuentemente subestimada debido a la dificultad para evaluarla en el campo; en el caso de *D. phthorimaeae*, por ejemplo, una de las dificultades redica en que no deja marcas detectables del ataque en la larva de *T. absoluta*.

En segundo lugar, resultó importante dilucidar aspectos de la competencia entre las especies de parasitoides mencionadas, una temática de la ecología de gran implicancia para el control biológico (Hawkins 2000, Boivin y Brodeur 2006, Mills 2006, Messing *et al.* 2006). En esta tesis se obtuvieron evidencias que ambas especies de parasitoides pueden multiparasitar a larvas de *T. absoluta* en el campo, lo que concuerda con la predicción postulada, aunque esto ocurre con una frecuencia muy baja (≈ 10 % de larvas multiparasitadas). En el laboratorio, se comprobó que *D. phthorimaeae* interactúa competitivamente con *P. dignus* por interferencia al momento de la parasitación, ya que la primera es capaz de eliminar directamente a la segunda. Esto corrobora la predicción realizada que, en estas condiciones, el efecto competitivo de *D. phthorimaeae* sobre *P. dignus* es mayor que el de *P. dignus* sobre *D. phthorimaeae*. Sin embargo, se probó también experimentalmente que las hembras de *D. phthorimaeae* pueden evitar el multiparasitismo, debido a atributos intrínsecos de su biología, tales como una edad menor y la disponibilidad de hospedadores (Capítulo 3). Cuando ocurre el ataque de hospedadores previamente parasitados por *P .dignus*, este comportamiento de la hembra de *D. phthorimaeae* puede relacionarse con la estrategia de reabsorción de oocitos ya mencionada, y convertirse en un mecanismo que le

garantice sobrellevar situaciones ambientales adversas, para arriesgarse a futuros eventos de oviposición. Es importante señalar que el ataque de *D. phthorimaeae* no concluyó en una parasitación, sino que utilizó al hospedador para alimentarse, lo cual revela una desición energéticamente costosa en términos del *fitness*. En estas circunstancias, resulta interesante considerar el rol de *D. phthorimaeae* como un potencial depredador intragremio, más que como un competidor, de *P. dignus* en el sistema estudiado.

Finalmente, dentro del complejo de parasitoides que atacan a larvas de la polilla del tomate *T. absoluta*, el ectoparasitoide *D. phthorimaeae* y el endoparasitoide *P. dignus* muestran ser, los más abundantes y de presencia espontánea en los cultivos del CHP y de la provincia de Tucumán, alcanzando ≈ el 80 % de parasitismo natural de larvas si se consideran ambas especies en conjunto (Capítulo 4). Las dos regiones estudiadas, presentan características biogeográficas y de producción agrícola discímiles y en especial un manejo del cultivo de tomate bastante diferente. En el CHP, tal como se predijo, en aquellos sitios donde se halló la presencia de las dos especies de parasitoides, se registraron tasas de parasitismo similares entre ambos. Estos sitios eran cultivos protegidos orgánicos ubicados en predios asociados con otros cultivos y a vegetación espontánea. En la provincia de Tucumán, donde el cultivo se realiza en forma extensiva, a cielo abierto, y con un fuerte uso de insecticidas para controlar a la polilla y otras plagas, se puede concluir que estas condiciones seleccionan favorablemente la presencia y, generalmente, un mayor porcentaje de parasitismo de *P. dignus*, en detrimento de *D. phthorimaeae*. La confirmación de la superioridad competitiva de los parasitoides idiobiontes sobre los koinobiontes requiere de trabajos de laboratorio y de campo tal como lo sugiriera Godfray (1994). Este estudio brinda evidencias que tal superioridad puede verse limitada cuando la especie más eficaz en la competencia se ve restringida por su propia historia de vida y por condiciones ambientales.

El análisis de la interacción a campo cuando ambas especies de parasitoides larvales de *T. absoluta* co-ocurren indica que, al igual que *P. dignus* (Sánchez *et al.* 2009), *D. phthorimaeae* muestra un patrón denso-independiente tanto sobre hospedadores sanos como aquellos previamente endoparasitados, a escala de planta en el cultivo de tomate. Resta cuantificar, en estas condiciones, la mortalidad causada por

D. phthorimaeae sobre *P. dignus* cuando practica *host-feeding* no concurrente, cuya dificultad fue anteriormente mencionada. La coexistencia de especies parasitoides que pertenecen a distintos gremios se verá influenciada por la capacidad que tengan en explotar los diferentes nichos que el hospedador ofrece y también a la evolución de un amplio rango de características fisiológicas y de comportamiento de estos insectos con el objetivo de evitar la competencia (Mills 1992, Hawkins 2000, Capítulos 1 y 3). Además la co-ocurrencia puede ser promovida por la variabilidad espacial y temporal del uso del recurso (Dean y Ricklefs 1980, Hassell 2000, Hawkins 2000). Para profundizar el conocimiento de estas interacciones, se propone continuar a futuro el análisis del patrón de parasitismo, incluyendo distintas escalas espaciales del cultivo y la respuesta de agregación.

El control biológico de la polilla del tomate *T. absoluta* constituye una temática de dinámico desarrollo en el campo de la entomología aplicada, tanto en su región de origen como en las nuevas áreas invadidas por esta plaga (Larraín 1986, Botto 1999, Colomo *et al.* 2002, Polack *et al.* 2002, Luna *et al.* 2007,2010, 2012, Sanchez et al. 2009, Berta y Pérez 2011, López *et al.* 2011, 2012; Cáceres 2011, Desneux *et al.* 2010, 2011; Mollá *et al.* 2011, Bueno *et al.* 2012, 2013; Cabello *et al.* 2012, Nannini *et al.* 2012, Ferracini *et al.* 2012, Savino *et al.* 2012, Zappala *et al.* 2012, Belda *et al.* 2013, Biondi *et al.* 2013, Cantor y Rodriguez 2013, Chailleux *et al.* 2013, Ingegno *et al.* 2013, Chailleux *et al.* 2014, Ghoneim 2014, Speranza *et al.* 2014). En la gran mayoría de estas investigaciones se contempla el uso de depredadores y parasitoides nativos. Para la Argentina, el ectoparasitoide larval *D. phthorimaeae* cuenta con una serie de atributos respecto de su biología, tasas de parasitismo natural en el campo, su coincidencia estacional con la plaga, el poco efecto negativo sobre *P. dignus* -la otra especie de parasitoide larval con la que co-ocurre-, entre otras. Muy especialmente la acción de su comportamiento de *host-feeding* no concurrente es significativa, desde la perspectiva de infligir la muerte de un número mucho mayor de larvas de *T. absoluta* de lo que la avispa realmente parasita. Los mencionados atributos permiten plantear el uso de esta especie mediante dos posibles estrategias: el control biológico aumentativo y por conservación.

Para ello, futuras investigaciones deberían tener en cuenta las siguientes premisas:

- Ampliar los conocimientos sobre la distribución geográfica, y del rango de plantas e insectos hospedadores de *D. phthorimaeae.*

- Profundizar el estudio del comportamiento alimenticio de *D. phthorimaeae*, tanto en condiciones de laboratorio como de campo.

- Cuantificar en los cultivos la mortalidad de larvas de la polilla causada por el comportamiento de *host-feeding* no concurrente.

- Desarrollar protocolos de cría de colonias de *D. phthorimaeae*.

- Continuar las investigaciones sobre aspectos de la interacción de *D. phthorimaeae* con *P. dignus*, en particular aquellos referidos al mecanismo de competencia por explotación de hospedadores por parte de hembras adultas heteroespecíficas expuestas simultáneamente, y de la depredación intragremio producto del *host-feeding* no concurrente sobre larvas de *T. absoluta* previamente parasitadas por *P. dignus*.

- Completar el conocimiento sobre el patrón de parasitismo de *D. phthorimaeae* en el cultivo de tomate, teniendo en cuenta distintas escalas espaciales.

Bibliografía

Agrawal A.A., Kobayashi C. y Thaler J.S. 1999. Influence of prey availability and induced host-plant resistance on omnivory by western flower thrips. *Ecology*, 80, 518–523.

Altieri M.A. 1992. Biodiversidad, agroecología y manejo de plagas. CETAL Ed., Valparaiso, 162 pp.

Amarasekare P. 2000. Coexistence of competing parasitoids on a patchly distributed host: Local vs. Spatial mechanisms. *Ecology* 81: 1286-1296.

Argerich C.A. 2011. La importancia del cultivo de tomate en Argentina. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

Askew R.R. 1971. *Parasitic insects*. Heinemann Educational, London, 316 pp.

Askew R.R. 1975. The organization of chalcid-dominated parasitoid communities centred upon endophytic host. En Price P.W. (Ed). *Evolutionary Strategies in Parasitic Insects and Mites*, pp. 130-153. New York. Plenum Press.

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

Azzouz H., Giordanengo P., Wäckers F.L. y Kaiser L. 2004. Effects of feeding frequency and sugar concentration on behavior and longevity of adult aphid parasitoid: *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera:Braconidae). *Biological Control* 31: 445-452.

Bale J.S, van Lenteren J.C. y Bigler F. 2008. Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of Royal Society* 363: 761–776.

Barrientos Z.R., Apablaza H.J., Norero S.A. y Estay P.P. 1998. Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae). *Ciencia e Investigación Agraria* 25: 133-137.

Berryman A.A. 1999. The theoretical foundations of biological control. En: *Theoretical Approaches to Biological Control*, Hawkins B.A. y Cornell H.V. (eds.) Cambridge University Press, pp.3-21 .

Belda J., Javier Calvo F. J., Soriano J.D. and Bolckmans K.J.F. 2013. *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) as the basis for control *Tuta absoluta*

(Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato protected crops in Spain. 4th International Symposium of Biological control of Arthropods, Pucón, Chile.

Bellows T.S. y Fisher T.W. (Eds.). 1999. *Handbook of biological control. Principles and applications of biological control.* Academic Press. 1046 pp.

Bellows T.S. y van Driesche R.G. 1999. Life table construction and analysis for evaluating biological control agents. En: Bellows T.S. y Fisher T.W. (Eds.). 1999. *Handbook of biological control. Principles and applications of biological control*, pp: 103-124. Academic Press.

Bennett F.D. 1995. Parasites of the pepper flower-bud moth (Lepidoptera:Gelechiidae) in *Florida. Fla. Entomol.* 78:546-549.

Bernstein C. 2000**.** Host-prasitoids models: The story of a successful failure. In Hochberg M.E. y Ives A.R. (eds.) *Parasitoids population biology*, pp. 41-57. Princeton University Press, Princeton.

Bernstein C. y Jervis M. 2008. Food-searching in parasitoids: the dilemma of choosing between 'immediate' or future fitness gains In: Wajnberg E, Bernstein C, van Alphen J Editors. *Behavioral ecology of insect parasitoids*, pp. 129-171 Blackwell Publishing, USA.

Berta C.D. y Pérez E.C. 2011. Una alternativa biológica para el control de la "polilla del tomate". Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

Biondi A., Desneux N., Amiens-Desneux E., Siscaro G. y Zappala L. 2013. Biology and developmental strategies of the palaearctic parasitoid *Bracon nigricans* (Hymenoptera: Braconidae) on the notropical moth *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) *Journal of Economic Entomology* 106: 1638-1647.

Boivin G. y Brodeur J. (2006). Intra- and inerspecific interaccion among parasitoids: mechanisms, outcomes and biological control. En: Brodeur J. y Boivin G. (Eds.), *Trophic and Guild Interaccions in Biological Control*, pp.123 -144. Springer.

Borer E.T. 2002. Intraguild predation in larval parasitoids: implications for coexistence. *Journal of Animal Ecology* 71: 957–965

Botto E.N., Ceriani S., López S., Saini E., Cédola C., Segade G. y Viscarret M. 1998. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. La

experiencia hasta el presente. *Revista de investigaciones agropecuarias* (INTA) 29: 83-98.

Botto E. N. 1999. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 58 (1-2): 58-64.

Briggs C. 1993. Competition among parasitoid species on a stage-structured host and its effect on host suppression. *The American Naturalist* 141 (3): 372-397.

Brodeur J. y Boivin G. 2006. Trophic and guild interactions in biological control. Springer, pp.259.

Broglia V., Hernandez C., Pocoví M., Gilardón E. y Caruso G. 2011. Protocolo para evaluación de resistencia, medición del grado de ataque de *Tuta absoluta*. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

Bueno V.H.P. 2000. *Controle biológico de Pragas. Producao Massal e Controle de Qualidade*. Lavras. Editora UFLA, pp. 429.

Bueno V.H.P., Montes F.C., Pereira A.M.C., Lins Jr. J.C. y van Lenteren J.C. 2012. Can recently found Brazilian hemipteran predatory bugs control *Tuta absoluta*? Integrated Control in Protected Crops, *Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin* Vol. 80, pp. 63-67.

Bueno V.H.P., van Lenteren J.C., Lins Jr. J.C., Flavio C. Montes F.C., Calixto A.M. y Silva D.B. 2013. Biological control of *Tuta absoluta*: sampling and evaluation of new hemipteran predators found in Brazil. 4th International Symposium of Biological control of Arthropods, Pucón, Chile.

Bugg, R.L., Pickett, C.H. 1998. Introduction: enhancing biological control—habitat management to promote natural enemies of agricultural pests. In: Pickett, C.H., Bugg, R.L. (Eds.*), Enhancing Biological Control*. University of California Press, Berkeley, CA, pp. 1–23.

Burger J.M.S., Reijnen T.M., van Lenteren J.C. y Vet L.E.M. 2004. Host feeding in insect parasitoids: why destructively feed upon a host that excretes an alternative? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 112: 207-215.

Cabello T., Gallego J.R., Fernandez F.J., Gamez M., Vila E., Del Pino M., y Hernandez-Suarez E. 2012. Biological control strategies for the south american tomato

moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomatoes. *Journal of Economical Entomology* 105: 2085-2096.

Cabrera A.L. y Willink A. 1973. Biogeografía de América Latina. Monografía Nro. 13, Serie de Biología, Organización de los Estados Americanos.120 pp.

Cabrera Walsh G., Briano J y Briano A.E. de. 2012. Control Biológico de Plagas. *Ciencia Hoy* Vol. 22 nro. 128: 57-64

Cáceres S., Aguirre A., Miño V. y Almonacid R. 2011. Líneas de trabajo para el manejo integrado de la polilla del tomate en Corrientes. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

Cagnotti C., Viscarret M., Riquelme M., Botto E., Carabajal L. y López S. 2011. Estudios de radiobiología con rayos X en *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae): potencial para la aplicación de la Técnica del Insecto Estéril. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

Cancino J., Liedo P., Ruiz L., López G., Montoya P., Barrera J.F., Sivinski J. y Aluja M. 2012. Discrimination by *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) of host previously attacked by conspecifics of by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Science and Technology* 22: 899–914

Cantor F. y Rodriguez D. 2013. Implementation of a biological control program for *Tuta absoluta* in greenhouse with the parasitoid *Apanteles gelechiidivoris* in Colombia. 4th International Symposium of Biological control of Arthropods, Pucón, Chile.

Cardona C. y Oatman R. 1971. Biology of *Apanteles dignus* (Hymenoptera:Braconidae), a primary parasite of the tomato pinworm. *Annals of Entomological Society of America* 64: 996-1007.

Carluccio, C., M. Lenscak, M. Panelo, M. Colombo, S. Cáceres, N. Molina, E. Scaglia y C. Pernuzzi. 2002. Desarrollo actual de los cultivos protegidos en la República Argentina. En: Díaz Alvarez, R. y J. López Gálvez. Ed. *Situación de la Agroplasticultura en Países Iberoamericanos.* Tercera Reunión de Coordinación en Caracas, Venezuela. Cyted, Almería, España. Setiembre 2002. pp. 30-71.

Casas J., Nisbet R., Swarbrick S. y Murdoch W.W. 2000. Eggload dynamics and oviposition rate in a wild population of a parasitic wasp. *Journal of Animal Ecology* 69: 185-193.

Ceriani S.A., Botto E.N. y Jamardo O. 1995. Parasitismo natural de la polilla del tomate *Scrobipalpuloides absoluta* y otros lepidópteros por parasitoides oófagos del género *Trichogramma spp.* III Congreso Argentino de Entomología, Mendoza: p. 112.

Chailleux A., Droui A., Bearez P., Maignet P. y Desneux N. 2013. Impact of interspecific competition with an omnivorous predator on survivorship of an ectoparasitoid of *Tuta absoluta* in tomato agroecosystem. 4th International Symposium of Biological control of Arthropods, Pucón, Chile.

Chapman R.F. 1998. *The Insects: Sturcture and Function.* Cambridge University Press, Cambridge, pp.817.

Charnov E.L. 1976. Optimal foraging: the marginal value theorem. *Theoretical Population Biology* 9: 129-136.

Chesson P.L. y Murdoch W.W. 1986. Aggregation of risk: relationships among host-parasitoids models. *American Naturalist* 127: 696-715.

Clarke J.F. 1962. New species of microlepidoptera from Japan, *Entomology News* 73:102.

Clausen C.P. 1940. *Entomophagous insects.* Mc Graw-Hill, New York, pp. 688.

Collier T.R. 1995. Host feeding, egg maturation, resorption, and longevity in the parasitoid *Aphytis melinus* (Hymenoptera:Aphelinidae) *Annals of the Entomological Society of America* 88: 206-214.

Colomo M.V., Berta D. C. y Chocobar M.J. 2002. El complejo de himenópteros parasitoides que atacan a la "polilla del tomate" *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) en la Argentina. *Acta zoológica lilloana* 46 (1): 81-92.

Cordo H.A., Logarzo G., Braun K. y Di Iorio O. 2004. Catálogo de insectos fitófagos de la Argentina y sus plantas asociadas. Sociedad Entomológica Argentina Ediciones. Buenos Aires, Argentina. 734 pp.

Corvo Dolcet S. 2005. Zonas de producción del cultivo del tomate en la Argentina. SAGPyA. 15 pp.

Costamagna A.C. y Landis D.A. 2004. Effect of food resources on adult *Glyptapanteles militaris* and *Meteorus communis* (Hymenoptera:Braconidae),

parasitoids of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera:Noctuidae). *Environmental Entomology* 33: 128-137.

Coulson J.R., Vail P.V., Dix M.E., Nordlund D.A. y Kauffman W.C. 2000. 110 Years of biological control research and development in the Unated State Department of Agriculture 1883-1993. USDA. 654pp.

Crouzel, I.S. y Saini, E.D. 1983. Importation of *Trissolcus basalis* (Wollaston) (Hym.Scelionidae) into Argentina for the biological control of *Nezara viridula* (L.) (Hem. Pentatomidae) (in Spanish). *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina* 42: 257-260 (*Review of Applied Entomology* (A) 72: 5657, 1984).

Dean J.M. y Ricklefs R.E. 1980. Do parasites of Lepidoptera larvae compete for hosts? No evidence. *American Naturalist* 116: 882-884.

De Bach P. y Rosen D. 1991. The Natural Enemies. En: *Biological control by natural enemies*, pp. 35-87. Cambridge University Press.

De Santis, L. 1983. Un nuevo género y dos nuevas especies de Eulófidos Neotropicales (Insecta: Hymenoptera). *Revista Peruana de Entomología* 26 (1): 1-4.

Desneux N., Wajnberg E., Wyckhuys K.A.G., Burgio G., Arpaia S., Narváez-Vazquez C.A., González-Cabrera J., Catalán Ruescas D., Tabone E., Frandon J., Pizzol J., Poncet C., Cabello T. y Urbaneja A. 2010. Biological invasión of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansión and prospects for biological control. *Journal of Pest Science* 3:197–215.

Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T. y Urbaneja A. 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science* 84: 403-408.

Chiara Ferracini Ch., Barbara L. Ingegno B.L., Marco Mosti M., Paolo Navone P.,Tavella L. y Alma A. 2012. Promising native candidates for biological control of *Tuta absoluta* in Italy. Integrated Control in Protected Crops, *Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin*, 80: 51-55.

Eubanks M.D. y Denno R.F. 2000. Host plants mediate omnivore–herbivore interactions and influence prey suppression. *Ecology*, 81: 936–947.

Faría C.A., Torres J.B. y Farías A.M.I. 2000. Functional response of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to *Tuta absoluta*. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 85-93.

Fernandez-Arhex V. y Corley J.C. 2003. The functional response of parasitoids and its implications for biological control. *Biocontrol Science and Technology* 13: 403-413.

Fiedler A.K., Landis D.A. y Wratten S.D. 2008. Maximizing ecosystem services from conservation biological control: The role of habitat management. *Biological Control*, 45: 254–271.

Flanders S.E. 1935. Host influence on the profligacy and size of Trichogramma. *Pan Pacific Entomologist* 35: 834-835.

Flanders S.E. 1942. Oorsoption and ovulation in relation to oviposition in the parasitic Hymenoptera. *Annals of the Entomological Society of America* 35: 251-266.

Flanders S.E. 1950. Regulation of ovulation and egg disposal in the parasitic Hymenoptera. *Canadian Entomologist* 82: 134-40.

Galarza J. 1984. Laboratory assessment of some solanaceous plants as possible food plants of the tomato moth *Scrobipalpula absoluta.* IDIA Nos 421/424, 30–32**.**

García M.F. y Espul J.C. 1982. Bioecología de la polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*) en Mendoza, República Argentina. *Revista de Investigación Agropecuarias* INTA (Argentina) 18: 135-146.

García Roa F. 1989. Plagas del tomate y su manejo. ICA Palmira, Colombia;

García M., Strassera M.E., Luna M.G, Polack L.A. y Mezquiriz N. 2005. Monitoreo de plagas. *Boletín Hortícola* 10 (31): 31-37.

Gardiner M.M., Fielder A.K, Costamagna A.C. y Landis D.A. 2009. Integrating conservation biological control into IPM systems. En: E.B. Radcliffe, W.D. Hutchinson y R.E. Cancelado (eds.) *Integrated Pest Management*, pp.151–162. Cambridge University Press.

Gause G.F. 1934. "*The Struggle for Existence".* Williams & Wilkins,Baltimore.

Gilbert F. y Jervis M. 1998. Functional, evolutionary and ecological aspects of feeding-related mouthpart specializations in parasitoids flies. *Biological Journal of the Linnean Society* 63: 495-535.

Gillespie D.R. y McGregor R.R. 2000. The functions of plant feeding in the omnivorous predator *Dicyphus hesperus*: water places limits on predation. *Ecological Entomology* 25: 380–386.

Giron D., Pincebourde S. y Casas J. 2004. Lifetime gains of host-feeding in a synovigenic parasitic wasp. *Physiological Entomology* 29: 436–442.

Godfray H.C.J. 1994. *Insect parasitoids*. Princeton University Press, pp. 473.

Gols R., Bukovinszky T., Hemerik L., Harvey J.A., van Lenteren J.C. y Vet L.E.M. 2005. Reduced foraging efficiency of a parasitoid under habitat complexity: implications for population stability and species coexistence. *Journal of Animal Ecology* 74:1059–1068.

Greco, N. 2011.Avances y limitaciones en el uso de control biológico en la Argentina. Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria SISA 2011 La Habana, Cuba.

Haeselbarth E. 1979. Zur Parasitierung der Puppen von Forleule (*Panolis flammea* (Schiff.)), Kiefferspanner (*Bupalus piniarius* (L.)) und heidelbeerspanner (*Boarmia bistortana* (Goeze)) in bayerischen Keifernwaldern. Zeitschrift fur Angewandte *Entomologie* 87: 186-202.

Hassell M.P. y May R.M. 1973. Stability in host-parasite models. *Journal of Animal Ecology* 42: 693-726.

Hassell M.P. y May R.M. 1974. Aggregation of predators and insect parasites and its effects on stability. *Journal of Animal Ecology* 43: 567-494.

Hassell M.P. 2000. Host- parasitoids population dynamics. *Journal of Animal Ecology* 69: 543-566.

Hawkins B.A. 1994. *Patterns and processes in host-parasitoid interactions*. Cambridge University Press, pp. 190.

Hawkins, B.A. 2000. Species coexistence in parasitoid communities: Does competition matter? En: Hochberg, M.E. & A.R. Ives. *Parasitoid population biology*, pp. 198 - 213. Princeton University Press.

Hawkins B.A. y Sheehan W. Eds. 1994. *Parasitoid Community Ecology*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 516.

Heads P.A. y Lawton J.H. 1983. Studies on the natural enemy complex of the holly leaf-miner: the effects of the scale on the detection of aggregative responses and the implication for biological control. *Oikos* 40: 267-276.

Heimpel G.E. y Collier T.R. 1996. The evolution of host-feeding behavior in insects parasitoids. *Biological Reviews* 71:373-400.

Heimpel G.E. y Rosenheim J.A. 1998. Egg limitation in parasitoids: a review of the evidence and a case of study. *Biological Control* 11: 160-168.

Heimpel G.E., Mangel M. y Rosenheim J.A. 1998. Effects of time limitation and egg limitation on lifetime reproductive success of a parasitoid in the field. *American Naturalist* 152: 273-289.

Heimpel G.E. 2000. Effects of parasitoids clutch size on host-parasitoid population dynamics. En: Hochberg M.E. y Ives A.R. (eds.) *Parasite Population Biology*, pp. 27-40. Princeton University Press. Princeton.

Heimpel G.E. y Casas J. 2008. Parasitoid foraging and oviposition behavior in the field. En: Wajnberg E., Bernstein C. y van Alphen J. (eds.) *Behavioral Ecology of Insects Parasitoids*, pp 51- 70. Blackwel Publishing.

Heinz K.M. y Nelson J.M. 1996. Interspecific interactions among natural enemies of *Bemisia* in an inundative biological control program. *Biological Control* 6: 384-393.

Hilker M. y Mc Neil J. 2008. Chemical and behavioral ecology in insect parasitoids: how to behave optimally in a complex odorous environment. En: Wajnberg E., Bernstein C. y van Alphen J. (eds.) *Behavioral Ecology of Insects Parasitoids*, pp 92 - 112. Blackwel Publishing.

Hochberg M.E. y Lawton J.H. 1990. Spatial heterogeneity in parasitism and population dynamics. *Oikos* 59: 9-14.

Holling C. S. 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Canadian Entomology* 91: 385-398.

Ingegno B.L., Ferracini C., Gallinotti D., Alma A. y Tavella L. 2013. Evaluation of the effectiveness of *Dicyphus errans* (Wolff) as predator of *Tuta absoluta* (Meyrick). Biological Control 67: 246-252.

Iwata K. 1960. The comparative anatomy of the ovary of Hymenoptera. Part V. *Acta Hymenopterológica* 1: 115-169.

Jacas J.A. y Urbaneja A. 2008. *Control Biológico de Plagas Agrícolas*.pp. 496. Pytoma Ed.

Jacas J.A., Peña J.E. y Duncan R.E. 2009. Morphology and development of the immature stages of *Brachyufens osborni* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), an egg parasitoid of broad-nosed weevil species (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 102: 112-118.

Jacob H.S. y Evans E.W. 2000. Influence of carbohydrate foods and mating on longevity of the parasitoids *Bathyplectes curculionis* (Hymenoptera:Ichneumonidae). *Environmental Entomology* 29: 1088-1095.

Janssen A., Willemse E. y van der Hammen T. 2003. Poor host plant quality causes omnivoreto consume predator eggs. *Journal of Animal Ecology* 72, 478–483.

Jarosık V. y L. Lapchin. 2001. An experimental investigation of patterns of parasitism at three spatial scales in an aphid-parasitoid system (Hymenoptera: Aphidiidae).*European Journal of Entomology* 98: 295-299.

Jervis M.A. y Kidd N.A.C. 1986. Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biological Reviews* 61: 395-434.

Jervis M.A., Kidd N.A.C., Fitton M.G., Huddleston T. y Dawah H.A. 1993. Flower visiting by hymenopteran parasitoids. Journal of Natural History 27:67–105.

Jervis M. A. y Copland M.J.W. 1996. The life cycle. En: Jervis M. y Kidd N. (eds.) *Insect natural enemies: practical approaches to their study and evaluation*, pp. 63-161 Chapman & Hall, London.

Jervis M.A., Hawkins B.A. y Kidd N.A.C. 1996. The usefulness of destructive host feeding parasitoids in classical biological control: theory and observation conflict. *Ecological Entomology* 21: 41-46.

Jervis M.A., Heimpel G.E., Ferns P.N., Harvey J.A. y Kidd, N.A. 2001. Life-history strategies in parasitoids wasp: a comparative analysis of "ovigeny". *Journal of Animal Ecology* 70: 422-458.

Jervis M.A., Ellers J. y Harvey J.A. 2008. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annual Review of Entomology* 53: 361-385.

Jervis M. y Ferns P., 2011 Towards a general perspective on life-history evolution and diversification in parasitoid wasps. *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 443–461.

Juliano S.A. 2001. Nonlinear curve fitting. En: Scheiner SM, Gurevitch J. (eds.) *Design and Analysis of Ecological Experiments*, pp. 178-196. Oxford University Press.

Kakehashi M., Suzuki Y. y Iwasa Y. 1984. Niche overlap of parasitoids in host-parasitoids systems: its consequence to single versus multiple introduction controversy in biological control. *Journal of Applied Entomology* 21: 115-131.

Kogan M. 1986. Ecological theory and integrated pest management (Ed.).pp. 362. Wiley-Interscience.

Landis D.A., Wratten S.D. y Gurr G.M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pest in agricultura. *Annual Review of Entomology* 45: 175-201.

Larraín, P. 1986. Evaluación de la mortalidad total y parasitismo por *Dineulophus phtorimaeae* De Santis (Hym, Eulophidae). *Agricultura Técnica* (Chile) 46 (2): 227-228.

La Salle J. y Gauld I.D. 1993. Hymenoptera: Their diversity, and their impact in the diversity of other organism. En: J. La Salle y I.D. Gauld (eds.) *Hymenoptera and biodiversity*, pp. 1-26. CAB Institute of Entomology Publications, Wallingford.

Leius K. 1967. Influence of wild flowers on parasitism of tent caterpillar and codling moth. *Canadian Entomologist* 93: 771-780.

Lessells C.M. 1985. Parasitoids foraging: should parasitism be density dependent? *Journal of Animal Ecology* 54: 27-41.

Leveque L., Monge J.P., Rojas-Rousse D., Van Alebeek F. y Huignaud J. 1993. Analysis of multiparasitism by *Eupelmus vuilleti* (Craw) (Eupelmidae) and *Dinarmus basalis* (Rond) (Pteromalidae) in the presence of one of their common host, *Bruchidius atrolineatus* (Pic) (Coleptera Bruchidae). *Oecologia* 94: 272-277.

Lewis W.J. y Sheehan W. 1997. Parasitoid foraging from a multitrophic perspective: significance for biological control. En: Andow D.A., Ragsdale D.W. y Nyvall R.F. (eds.) *Ecological interactions and biological control*, pp. 271-281. Boulder, Colorado: Westview Press.

Lill J. T. 1998. Density-dependent parasitism of the hackberry nipplegall maker (Homoptera: Psyllidae): a multiple-scale analysis. *Environmental Entomology* 27: 657-661.

Lobos E. 2011. Uso de feromonas de *Tuta absoluta* Meyrick, para el monitoreo y la protección del cultivo del tomate. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

López S.N., Cagnotti C. y Andorno A. 2011. *Tupiocoris cucurbitaceus*: agente potencial de control biológico de *Tuta absoluta*. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

López S.N., Arce Rojas F., Villalba Velásquez V. y Cagnotti C. 2012. Biology of *Tupiocoris curcubitaceus* (Hemiptera:Miridae), a predator of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera:Aleyrodidae) in tomato crops in Argentina. *Biocontrol Science and Technology* 22: 1107-1117.

Luna M.G., Sánchez N.E. y Pereyra P.C. 2007. Parasitism of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) by *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) under laboratory conditions. *Environmental Entomology* 36 (4): 887-893.

Luna M.G., Sánchez N.E.y Wada V.I. 2010. Biology of *Dineulophus phtorimaeae* and field interaction with *Pseudapanteles dingus* (Hymenoptera:Braconidae), larval parasitoids of *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae) in tomato. *Annals of Entomological Society of America* 103: 936-942.

Luna M.G., Wada V., La Salle J. y Sánchez N.E. 2011. *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae), a newly recorded parasitoid of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), in Argentina. *Neotropical Entomology* 40: 412-414.

Luna M.G., Pereyra P.C. y Sánchez N.E. 2012. Biological control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae) in protected tomato crops in Argentina. Integrated Control in Protected Crops, *Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin* Vol. 80: 177-182.

Lundgren J.G. 2009. Relationship of Natural enemies and non-prey foods. Progress in Biological Control. Springer, pp. 496.

Mackauer M. 1990. Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids. En: Mackauer M., Ehler L.E. y Roland J. (eds.), *Critical Issues in Biological Control*, pp. 41-62. Intercept, Andover.

Matsumoto T., Itioka T., Nishida T y Kaneko S. 2003. Is one parasitoid enough? A test comparing one with a pair of parasitoid species in the biological control of arrowhead scales. *Population Ecology* 45: 61-66.

May R.M. 1978. Host- parasitoid systems in patchy environments: a phenomenological model. *Journal of Animal Ecology* 47: 833-843.

Mayhew P.J. y Blackburn T.M. 1999. Does parasitoid development mode organize life-history traits in the parasitoids Hymenoptera? *Journal of Animal Ecology* 68: 906-916.

Medeiros M.A., Sujii E.R. y Morais H.C. 2011. Mortality factors at egg stage of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on organic tomato system and on conventional tomato system. Bragantia, Campinas 70: 72-80.

Messing, R., Roitberg B. y Brodeur J. 2006. Measuring and predicting indirect impacts of biological control: competition, displacement and secondary interactions. En: Bigler F., Babendreier D. y Kuhlmann U. (eds.) *Environmental impact of invertebrates for biological control of arthropods*. *Methods and risk assessment*, pp. 64-77. CAB International.

Mills N.J. 1992. Parasitoid guilds, life-styles and host ranges in the parasitoid complexes of tortricoid hosts. *Environmental Entomology* 21: 230-239.

Mills N.J. 1994. Parasitoid guilds: defining the structure of the parasitoid communities of endopterygote insect hosts. *Environmental Entomology* 23: 1066-1083

Mills N.J. 2006. Interespecific competition among natural enemies and single versus multiple introductions in biological control. En: Brodeur J. y Boivin G. (Eds.),*Trophic and Guild Interaccions in Biological Control*, pp.123 -144. Springer.

Miranda M.M.M., Picanco M., Leite G.L.D., Zanuncio J.C. y De Clerq P. 1998. Sampling and non-action levels for predators and parasitoids of virus vectors and leaf miners of tomato in Brazil. *Medicine Faculty Landboww University Gent*. 63 (2b): 519-526.

Mollá O., González-Cabrera J. y Urbaneja A. 2011. The combined use of *Bacillus thuringiensis* and *Nesidiocoris tenuis* against the tomato borer *Tuta absoluta*.*BioControl* 56: 883–891.

Mondy N., Corio-Costet M.F., Bodin A., Mandon N., Vannier F. y Monge J.P. 2006. Importance of sterols acquired through host feeding in synovigenic parasitoid oogenesis. *Journal of Insect Physiology* 52: 897-904

Morrison G. 1986. "Searching time aggregation" and density dependent parasitism in a laboratory host – parasitoid interaction. *Oecologia* 68: 298 - 303.

Murdoch W.W. y Oaten A. 1975. Predation and population stability. *Advances in Ecological Researches* 9: 1-131.

Murdoch W.W., Chesson J. y Chesson P.L. 1985. Biological control in theory and practice. *American Naturalist* 125:344-366.

Murdoch W.W., Briggs C.J. y Collier T.R. 1998. Biological control of insects: implications for theory in population ecology. En: Dempster J.P. y McLean I.F.G. (eds.).*Insect Population*, pp. 167-186. Kluwer Academic Publishers.

Nannini M., Atzori F., Coinu M., Pisci R. y Sanna F. 2012. A three-year survey of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) population trends in Sardinian tomato greenhouses. Integrated Control in Protected Crops, *Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin* Vol. 80: 39-44.

Nettles W.C. 1987. *Eucelatoria bryani* (Diptera:Tachinidae): Effect on fecundity of feeding on hosts. *Environmental entomology* 16: 437-440.

Nieves E.L. 2013. Evaluación del parasitoide, *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera, Braconidae) como agente de control biológico de la "polilla del tomate" *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae). Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata

Oatman E.R. y Platner G.R. 1989. Parasites of the potato tuberworm, tomato pinworm, and other closely related gelechiids. *Proc. Hawaii Entomological Society* 29: 23-30.

Pacala S.W. y Hassell M.P. 1991. The persistence of host-parasitoids associations in the patchly environments. II. Evaluation of field data. *American Naturalist* 138: 584-605.

Paré P.W. y Tumlinson J.H. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121: 325–333.

Park T. 1962. Beetles competition and population. Science 138: 1369-1375.

Pereyra P.C. y Sánchez N.E. 2006. Effect of two solanaceous host plants on development and population parameters of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae).*Neotropical Entomology* 35: 671–676.

Persad A.B. y Hoy M.A. 2003. Intra- and interespecifc interaction between *Lysiphlebus testaceipes* and *Lipolexis scutellaris* (Hymenoptera: Aphidiidae) reared on *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 96: 564-569.

Polack A., Saini E. y García Sampedro C. 2002. Guía de monitoreo y reconocimiento de plagas y enemigos naturales de tomate y pimiento. Boletín de Divulgacion Tecnica nº 13. INTA

Polack A. 2011. Modelo fenológico. Perspectivas de uso para el monitoreo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae). Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. Noviembre de 2012. INTA-UNLP.

Polis G.A. y Myers C.A. 1989. The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20 : 297-330

Povolny D. 1975. On three neotropical species of Gnorimoschemini (Lepidoptera: Gelechiidae) mining Solanaceae. *Acta Univ. Agri*.. 23: 379-393.

Pschorn-Walcher H. 1987. Interspecific competition between the principal larval parasitoids of the pine sawfly *Neodiprion sertifer* Geoff. (Hymenoptera: Diprionidae). *Oecologia* 73: 621-625.

Quicke D.L.J. 1997. *Parasitic wasps*. Chapman & Hall, London, pp. 470.

Radcliffe E.B., Hutchinson W.D. y Cancelado R.E. 2009. *Integrated Pest Management. Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies.* Cambridge University Press.

Reeve J.D., Gronin J.T. y Strong D.R. 1994 a. Parasitism and generation cycles in a salt-marsh planthopper. *Journal of Animal Ecology* 63: 912-920.

Reeve J.D., Gronin J.T. y Strong D.R. 1994 b. Parasitoid aggregation and the stabilization of a salt-marsh host-parasitoid system. *Ecology* 75:288-295.

Riquelme Virgala M.B. 2009. Evaluación del parasitoide oófago *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja, 1979 (Hymenoptera, Trichogrammatidae) como agente de control biológico de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae) en cultivo de tomate en invernadero. Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de las Ciencias Biológicas.

Rivero A. y West S. A. 2005. The cost and benefits of host feeding in parasitoids. *Animal Behaviour* 69: 1293-1301.

Romero Sueldo M. R., Bruzzone O. A. y Virla E. G. 2010. Characterization of the earwig, *Doru lineare*, as a predator of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: A functional response study. *Journal of Insect Science* Vol. 10: Article 38.

Rosenheim J.A., Kaya H.K., Ehler L.E., Marois J.J. y Jaffee B.A. 1995. Intraguild predation among biological – control agents: theory and evidence. *Biological Control* 5: 303-335.

Sánchez N.E., Pereyra P.C. y Luna M.G. 2009. Spatial patterns of parasitism of the solitary parasitoid *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae) on the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environmental Entomology* 38 (2): 365-374

Savino V., Coviella C.E. y Luna M.G. 2012. Reproductive biology of *Dineulophus phhtorimaeae* De Santis (Hymenoptera: Eulophidae), a natural enemy of the tomato moth *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Insect Science* Vol. 12 Article 153.

Sinia A., Roitberg B., McGregor R.R. y Gillespie D.R. 2004. Prey feeding increases water stress in the omnivorous predator *Dicyphus hesperus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110: 243–248.

Sirot E y Bernstein C. 1996. Time sharing between host searching and food searching in parasitoids: state – dependent optimal startegies. *Behavioral Ecology* 7: 189-194.

Shi Z.-H., Li Q.-B. y Li X. 2004. Interespecific competition between *Diadegma semiclausum* Hellen (Hym., Ichneumonidae) and *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hym., Braconidae) in parasiting *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae). JEN 437-444.

Smith H. 1929. Multiple parasitism: its relation to the biological control of insects pests. *Bulletin of Entomological Research* 20: 141-149.

Speranza S., Melo M.C., Luna M.G. y Virla E.G. 2014. First record of *Zeluz obscuridorsis* (Hemiptera:Reduviidae) as a predator of the South American tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae). Florida Entomologist 97: 295-297.

Stapel J.O., Cortesero A.M., de Moraes C.M., Tumlinson J.H. y Lewis W.J. 1997. Extrafloral nectar, honeydew, and sucrose effects on searching behavior and efficiency of *Microptilis croceipes* (Hymenoptera:Braconidae) in cotton. *Environmental Entomology* 26: 617-623.

StatSoft, Inc. 2007 Statistica (data analysis software system), version 8.0. Tulsa, OK, StatSoft.

Stiling P.D. 1987. The frecuency of density dependence in insect host-prasitoids systems. *Ecology* 68:844-856.

Strand M.R. y Casas J. 2008. Parasitoids and host nutritional physiology in behevioral ecology. En: Wajnberg E., Bernstein C. y van Alphen J. (eds.) *Behavioral Ecology of Insects Parasitoid*, pp. 113- 128. Blackwel Publishing.

Strassera M.E. 2009. Análisis de la sustentabilidad de diferentes sistemas de producción comercial de tomate bajo cubierta para el manejo de las plagas *Trialeurodes vaporariorum* y *Tuta absoluta* en el Cinturón Hortícola Platense. Trabajo de tesis presentado. Carrera de Magister Scientiae en Protección Vegetal con orientación en Manejo de Plagas Animales. Fac. Cs. Agrarias y Forestales, UNLP.

Suarez R.K., Darveau C.A., Welch Jr. K.C., O´Brien D.M., Roubik D.W. y Hochachka P.W. 2005. Energy metabolism in orchid bee flight muscles: Carbohydrate fuels all. *Journal of Experimental Biology* 208: 3573-3579.

Thompson S.N. 1976. Effects of dietary amino acid level and nutritional balance on larval survival and development of the parasite *Exeristes roborator*. *Annals of Entomological Society of America* 69: 835-838.

Thompson S.N. 1999. Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology* 44: 561–92.

Trexler J.C., Charles E.M. y Travis J. 1988. How can the functional response best be determined? *Oecologia* 76:206–214.

Trexler J.C. y Travis J. 1993. Nontraditional regression analysis. *Ecology* 74: 1629–1637.

Tscharntke T. y Kruess A. 1999. Habitat fragmentation and biological control, pp: 190-205. En: *Theoretical approaches to biological control*. Hawkins B.A. y Cornell H.V. (eds.) Cambridge University Press.

Ueno T. 1999. Multiparasitism and Host Feeding by Solitary Parasitoid Wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) Based on the Pay-Off from Parasitized Hosts. Annals of Entomological Society of America 92: 601-608.

Urbaneja A., Vercher R., Navarro V., García Marí F. y Porcuna J.L. 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma* España 194:16-23.

Ulyshen M.D., Duan J.J. y Bauer L.S. 2009. Interactions between *Spathius agrili* (Hymenoptera: Braconidae) and *Tetratischus planipennisi* (Hymenoptera: Eulophidae), larval parasitoids of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Biological Control* 52: 188-193.

USDA 2011. New Pest Response Guidelines Tomato Leafminer (Tuta absoluta). USDA.

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

Van Alphen J.J.M. y Bernstein C. 2008. Information acquisition, information processing, and patch time allocation in insect parasitoids. En: Wajnberg E., Bernstein C. y van Alphen J. (eds.) *Behavioral Ecology of Insects Parasitoid*, pp. 172-192. Blackwell Publishing.

van Baalen M. y Hemerick L. 2008. Parasitoids fitness: from a simple idea to an intricate concept.

van Driesche R.G., Hoodle M.S. y Center T.D. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. USDA Forest Service Forest Health Technology Enterprise Team.

van Lenteren J.C. 1986. Parasitoids in the greenhouse: successes whit seasonal inoculative release systems. En: Waage J. y Greathead D. (eds.). *Insect Parasitoids*, pp. 342-375. The Royal Entomological Society of London. Academic Press.

van Lenteren J.C. (1986a) Evaluation, mass production, quality control and release of entomophagous insects. En: J.M. Franz (ed.), *Biological Plant and Health Protection*, Fischer, Stuttgart, pp. 31–56.

van Lenteren J.C. (1986b) Parasitoids in the greenhouse: Successes with seasonal inoculative release systems. En: J.K. Waage and D.J. Greathead (eds.), *Insect Parasitoids*, pp. 341–374. Academic Press, London.

van Lenteren J.C. 2000. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? *Crop Protection* 19: 375-384.

van Lenteren J.C. y Bueno V.H.P. 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *Biocontrol* 48: 123-139

van Lenteren J.C., Bale J., Bigler F., Hokkanen H.T.M. y Loomans A.J.M. 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropods pests. *Annual Review Entomology* 51: 609-634, Supplement.

van Lenteren J.C. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *Biocontrol* 57: 1-20.

van Lenteren J.C. (ed.). 2012. IOBC Internet Book of Biological Control, version 6. (www.IOBC-Global.org), Wageningen, The Netherlands.

van Veen F.J.F., Muller C.B. Adriaanse I.C.T y Godfray H.C.J. 2002. Spatial heterogeneity in risk of secondary parasitism in a natural population of an aphid parasitoid. *Journal of Animal Ecology* 71: 463-469.

Vargas H.C. 1970. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Idesia* 1: 75–110 (in Spanish).

Varley G.C. 1947. The natural control of population balance in the knapweed gallfly (*Urophaga jaceana*). *Journal of Animal Ecology* 16: 139-187.

Vinson S.B. 1976. Host selection by insect parasitoids. Annual Review of Entomology 21:109–33.

Vinson S.B. y Iwantsch G. 1980. Host regulation by insect parasitoids. *Quarterly Review of Biology* 55: 145-165.

Volterra V. 1926. Variations and fluctuations of the numbers ofindividuals in animal species living together. En: *Animal Ecology* (R. N. Chapman, Ed.). McGraw–Hill, New York.

Waage J. y Greathead D. 1986. *Insect parasitoids*. 13th.Symposium of the Royal Society of London. Academic Press, pp. 389.

Wäckers F.L. 2001. A comparison of nectar- and honeydew sugars with respect to their utilization by hymenopteran parasitoid *Cotesia glomerata*. *Journal of Insect Physiology* 47: 1077-1084.

Wajnberg E. 2006. Time-allocation strategies in insect parasitoids: from ultimate predictions to proximate behavioural mechanisms. *Behavioral Ecology & Sociobiology* 60: 589-611.

Walde S.L. y Murdoch W.W. 1988. Spatial density dependence in parasitoids. *Annual Review of Entomology* 33: 441-466.

Wang X. y Yang Z. 2008. Ecological mechanisms and prospects for utilization of toxins from parasitic hymenopterans. *Front. For. China* 3: 1–9.

Xu H.Y., Yang N.W. y Wan F.H. 2013. Competitive interactions between parasitoids provide new insight into host suppression. *PLoS ONE* 8 (11): e82003.

Zalazar L. y Salvo A. 2007. Entomofauna asociada a cultivos hortícolas orgánicos y convencionales en Córdoba, Argentina. *Neotropical Entomology* 36: 765-773.

Zapater M.C. (ed). 1996. *El control biológico en America Latina*. IOBC, Buenos Aires.

Zappalà L., Bernardo U., Biondi A., Cocco A., Deliperi S., Delrio G., Giorgini M., Pedata P.A., Rapisarda C., Tropea Garzia G. y Siscaro G. 2012. Survey on indigenous parasitoids of the invasive exotic pest *Tuta absoluta* in Southern Italy. Integrated Control in Protected Crops, *Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin* Vol. 80, pp. 57-62.

Zaviezo T. y Mills N.J. 2001. The response of *Hyssopus pallidus* to host previously parasitized by *Ascogaster quadridentata*.: heterospecific discrimination and host quality. *Ecological Entomology* 26: 91-99.

Zwölfer H. 1971. The estructure and effect to parasite complexes attacking phytophagous host insects. En: Der Boer P.J. y Gradwel G.R. (eds.) *Dynamics of*

populations: Proceedings of tha advanced study insttitute on "Dynamics of numbers of populations" (Oosterbeck, 1970), pp.405 – 418. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands.