



RIDAA

Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Chirino, Mónica Gabriela

Variación interespecífica, dimorfismo sexual en el tamaño adulto y mecanismo de determinación sexual en los parasitoides del género *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) desarrollados sobre *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) ...



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Chirino, M. (2010). *Variación interespecífica, dimorfismo sexual en el tamaño adulto y mecanismo de determinación sexual en los parasitoides del género Pseudacteon (Diptera: Phoridae) desarrollados sobre Solenopsis invicta (Hymenoptera: Formicidae). (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/111>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Variación interespecífica, dimorfismo sexual en el tamaño adulto y mecanismo de determinación sexual en los parasitoides del género *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) desarrollados sobre *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)

TESIS DOCTORAL

Mónica Gabriela Chirino

mchirino@unq.edu.ar

Resumen

En esta tesis se investigó el comportamiento y éxito reproductivo de los parasitoides *Pseudacteon curvatus* Borgmeier y *P. tricuspis* Borgmeier en relación a la forma social de su hospedador, la hormiga colorada *Solenopsis invicta* Buren, que presenta dos formas sociales alternativas simpátricas en el noreste de la Argentina.

La caracterización ecológica de ambas formas sociales reveló que las poblaciones monogínicas fueron 3,5 veces más comunes que las poligínicas ocupando cerca del 70% de los parches muestreados. A nivel morfológico, las obreras monogínicas fueron más grandes que las poligínicas al presentar mayor porcentaje de obreras *mayores* (9,2 vs. 6,2%), *grandes* (22,5 vs. 17,9%) y *medianas* (16,1 vs. 13,9%); mientras que las colonias poligínicas presentaron mayor porcentaje de obreras *menores* (36,1 vs. 45,8%). Finalmente, ambas formas sociales pudieron ser caracterizadas en base a sus comportamientos frente a coespecíficas ajenas al nido. Las hormigas monogínicas siempre agredieron a las obreras que no pertenecieron a su colonia, independientemente de sus formas sociales, y fueron las que iniciaron el ataque cuando se enfrentaron a hormigas poligínicas. Las hormigas poligínicas, aunque reconocieron a obreras de su propia colonia frente a obreras poligínicas de colonias cercanas, evitaron el contacto directo mostrando posturas defensivas y ofensivas estereotipadas. En definitiva, en este trabajo se demostró que ambas formas sociales de *S. invicta* pueden ser identificadas por la conducta de las hormigas, observación que fue concordante con otras características importantes tales como el número de reinas presentes por nido (una o varias reinas reina en colonias monogínicas y poligínicas, respectivamente) y por la expresión del gen nuclear *Gp-9^B*. Todas las hormigas de colonias monogínicas son homocigotas dominantes (*BB*); mientras que en las colonias poligínicas, hay hormigas homocigotas dominantes (*BB*) y heterocigotas (*Bb*) para este gen. Un comportamiento diferencial entre hormigas de diferentes formas sociales es fundamental porque permite identificar los nidos a campo sin tener que destruirlos o excavarlos.

En base a las diferencias reconocibles entre ambas formas sociales de *S. invicta* y al hecho de que esta especie hospeda hasta 22 especies del género *Pseudacteon*, se evaluó cómo se repartieron el recurso disponible dos especies de parasitoides de distinto tamaño, pero que presentan ritmos circanuales y fenologías similares. Los resultados mostraron que *P. curvatus* y *P. tricuspis* se desarrollaron sobre diferentes tamaños de obreras bajo las mismas condiciones de cría. Así *P. curvatus* eligió esencialmente a las hormigas *pequeñas*; mientras que *P. tricuspis* se desarrolló sobre un mayor rango de tamaños disponibles parasitando a obreras *grandes*, *medianas* y *pequeñas*. Además, ambas especies discriminaron la forma social de la especie hospedera porque prefirieron perseguir, atacar y se desarrollaron mejor sobre hormigas monogínicas.

Dado que *P. curvatus* (la especie de menor tamaño) se desarrolló fundamentalmente sobre un rango de distribución de tamaño de hormigas estrecho, las hembras y machos que emergieron carecieron de dimorfismo sexual en sus tamaños adultos, siendo las hembras sólo 5% más grandes que los machos, y ambos sexos estuvieron igualmente representados en la progenie (relación hembra:macho 1:1). En *P. tricuspis* las hembras fueron significativamente más grandes que los machos porque se desarrollaron en hormigas de mayor tamaño. Dado que en *P. tricuspis* producir hembras fue más costoso, la proporción de sexos estuvo sesgada a favor de los machos. No obstante, cuando a las hembras de *P. tricuspis* se les permitió oviponer en ausencia de competidoras y con abundantes hormigas *grandes*, el número de pupas y adultos producidos fue 3 veces más alto, las hembras representaron el 50% de la progenie y fueron, además, más grandes que las hembras desarrolladas cuando las madres compitieron por el recurso. Este resultado es importante porque indica que es posible modificar la proporción de sexos manipulando el tamaño de las obreras que se ofrecen y evitando que otras hembras compitan y consuman el recurso disponible. Al mismo tiempo las hembras pueden invertir toda su

energía en consumir el recurso eligiendo el tamaño del hospedador con más cuidado y posiblemente evaluar si fue previamente parasitado. Finalmente, aunque ambas especies de *Pseudacteon* parasitaron diferentes tamaños de obreras, se observó una correlación positiva entre el tamaño de las hormigas en la que se desarrollaron y el tamaño de los adultos emergidos.

Dado que en *P. tricuspis*, como en muchas especies de *Pseudacteon* analizadas hasta el momento, las hembras se desarrollan en hormigas más grandes que los machos y presentan tamaños corporales mayores, se postuló que uno de los posibles mecanismos de determinación del sexo podía ser ambiental y estar facultativamente condicionado por el tamaño del hospedador. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no validan esa hipótesis porque en *P. curvatus* ambos sexos se desarrollaron sobre el mismo tamaño de hormigas, por lo que el tamaño del hospedador condicionó el tamaño pero no el sexo de los parasitoides en desarrollo. En base a estos resultados se buscó establecer si la determinación del sexo en *Pseudacteon* tenía una base genética.

La caracterización citogenética reveló que ambas especies de *Pseudacteon* presentan un cariotipo de $2n = 6$, con 2 pares de cromosomas metacéntricos de tamaños similares y más grandes que el par subtelocéntrico. Además, *P. curvatus* y *P. tricuspis* pudieron ser caracterizadas citogenéticamente por presentar diferentes regiones heterocromáticas C positivas en el tercer par cromosómico. Sin embargo, no se detectaron cromosomas sexuales morfológicamente diferentes. Tampoco se detectaron diferencias en el complemento cromosómico entre las hembras y machos de *P. tricuspis*, por lo que la determinación del sexo tampoco es haplodiploide. En base al cariotipo observado en las especies analizadas, hipotetizamos que el mecanismo de determinación sexual que opera en *Pseudacteon* es genético y similar al descrito para *Megaselia* (Diptera: Phoridae) que presenta cromosomas sexuales homomórficos ($2n = 4 + XX/XY$) en una etapa de diferenciación molecular y estructural incipiente y en la que el sexo es determinado por la presencia o ausencia de un factor masculinizante M. En definitiva, si el mecanismo de determinación sexual de *Pseudacteon* es equivalente al observado en *Megaselia*, queda por detectar la presencia de este factor y obtener secuencias de ADN específicas para el desarrollo de machos o hembras, respectivamente.

Los resultados de esta Tesis son importantes para el conocimiento y cría en laboratorio de las especies de *Pseudacteon* estudiadas, ya que las mismas son utilizadas como agentes de control biológico contra las hormigas *Solenopsis* plaga. Ambas especies de *Pseudacteon* alteraron el patrón de conducta normal de las hormigas, parasitaron a diferentes tamaños de obreras, se desarrollaron sobre ambas formas sociales y, específicamente para *P. tricuspis*, este resultado es muy importante porque se pudo modificar la proporción de sexos de la progenie manipulando la distribución de tamaños de hormigas disponibles y eliminando la competencia por el recurso.

Investigación realizada en el marco del Programa de Investigaciones Biológicas: de las macromoléculas a las comunidades Centro de Estudios e Investigaciones (CEI)

Dedicado a:
mi madre, a Esther y a mis hermanas, especialmente Adriana,
por amar, por creer y por enseñarme
a diario que "lo que importa es la familia".
A Alba Papeschi y Adriana Ferreiro
por haber sido constantes, brillantes, luchadoras y honestas.

Agradecimientos

- Ph.D. Lawrence Gilbert por ser la primera persona en interesarse en este proyecto cuando aún era garabatos en un papel.

- Ph.D. Patricia Folgarait por aceptar dirigir esta tesis, por leer el borrador del manuscrito y los artículos relacionados haciendo comentarios esenciales para mejorarlos.

- Dra. Alba Papeschi por aceptar dirigir una tesis ya empezada brindando sus ganas, su conocimiento, claridad de objetivos, por enseñarme a trabajar en citogenética y por brindarme un espacio dentro de su grupo de trabajo.

- Dr. Luis Wall por aceptar ser mi profesor consejero y por sus consejos cuando los necesité.

- Dr. Claudio Valverde, a Patricio y a Minna por dedicar tiempo en tratar de capacitarme en el uso de las técnicas de extracción de ADN.

- A María José, Ayelén, Georgina y Zulema por hacerme fácil y agradable el trabajar en un grupo mientras exploraba el mundo de los cromosomas.

- Ph.D. Robert Plowes por su generosidad y disponibilidad para leer los artículos y hacer comentarios acertados.

A mi familia y amigos del alma (Esther, Vir, Abeja, Darío y María) por el amor incondicional.

A Normis (por su humanidad y capacidad), Glorieta, Andre, Marie y Gaby por ser mis amigos y excelentes compañeros de trabajo. Por compartir mates, chismes, conceptos estadísticos, innovaciones científicas y divagaciones varias.

A Emilce, Rodo, Oktas, Néstor, Ariel Calabró, Pato, Mari, Debo, Dani, Estefi y Ale. F por ser buena gente y buenos compañeros en el trabajo.

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) por otorgar la beca que posibilitó la realización de mi tesis.

- A la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) por permitirme desarrollar la tesis.

- A la Administración de Parques Nacionales (APN), especialmente Parque Nacional Chaco (PNC) por brindarme los permisos y autorizaciones para trabajar en el campo.

- A los proyectos de investigación: "Programa de Investigaciones Biológicas" (PIB-UNQ), "Diferenciación de los cromosomas sexuales y determinación del sexo en insectos" (FCEyN-UBA) y "R.J. Kleberg & H.C. Kleberg Foundation" por financiar campañas al campo, congresos y publicaciones científicas.

Contenido

Resumen

1. Introducción al sistema *Solenopsis-Pseudacteon*

1.1 Características generales de *Solenopsis invicta*

- 1.1.1 Sistemática
- 1.1.2 La colonia
- 1.1.3 Formas sociales
- 1.1.4 Importancia

1.2 Características generales de *Pseudacteon* spp.

- 1.2.1 Posición taxonómica
- 1.2.2 Ciclo de vida
- 1.2.3 Importancia

1.3 Hipótesis, predicciones, objetivos

2. Caracterización de ambas formas sociales de *Solenopsis invicta*

2.1 Introducción (objetivos particulares)

2.2 Materiales y métodos

- 2.2.1 Sitio de muestreo y colección
- 2.2.2 Caracterización molecular
- 2.2.3 Caracterización morfométrica
- 2.2.4 Tamaño, distribución y densidad de nidos
 - 2.2.4.a Tamaño de nidos
 - 2.2.4.b Distancia entre nidos y densidad de nidos
- 2.2.5 Tasas de forrajeo, tamaño y proporción de las obreras forrajeando
- 2.2.6 Mantenimiento de las colonias
- 2.2.7 Tamaño, peso y proporción de las obreras presentes en el nido
- 2.2.8 Agresividad de las hormigas
 - 2.2.8.a Ensayo de Agresividad Cualitativa
 - 2.2.8.b Ensayo de Agresividad Cuantitativa

2.3 Resultados

- 2.3.1 Tamaño, distribución y densidad de nidos
- 2.3.2 Tasas de forrajeo, tamaño y proporción de las obreras forrajeando
 - 2.3.2.a Tasas de forrajeo
 - 2.3.2.b Tamaño y proporción de las forrajeras
- 2.3.3 Tamaño, peso y proporción de las obreras presentes en el nido
 - 2.3.3.a Tamaño de las obreras en la colonia
 - 2.3.3.b Peso de las obreras en la colonia

- 2.3.3.c Proporción de las obreras en la colonia
- 2.3.3.d Comparación entre forrajeras y obreras de la colonia
- 2.3.4 Agresividad de las hormigas
 - 2.3.4.a Agresividad Cualitativa (a campo)
 - 2.3.4.b Agresividad Cuantitativa (en laboratorio)
 - 2.3.4.c Comportamiento de agresividad entre FS (*M* vs. *P*)
- 2.4 Discusión
- 2.5 Conclusiones

3. Características en el desarrollo y comportamiento de *Pseudacteon curvatus*

- 3.1 Introducción (objetivos particulares)
- 3.2 Materiales y métodos
 - 3.2.1 Sitio de muestreo y colección
 - 3.2.2 Oviposiciones y tiempos de orientación de *P. curvatus* a campo
 - 3.2.3 Efecto de *P. curvatus* en las tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*
 - 3.2.4 Evaluación de las obreras seleccionadas, periodos de desarrollo de los parasitoides, características de los adultos emergidos y eficiencias en el desarrollo de *P. curvatus* en ambas FS de *S. invicta*
- 3.3 Resultados
 - 3.3.1 Oviposiciones y tiempos de orientación a campo
 - 3.3.2 Efecto en las tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*
 - 3.3.2.a Efecto en las tasas de forrajeo
 - 3.3.2.b Efecto en el tamaño de las forrajeras
 - 3.3.2.c Efecto en la proporción de las forrajeras
 - 3.3.3 Características en el desarrollo de *P. curvatus* sobre ambas FS de *S. invicta*
 - 3.3.3.a Tamaño de las obreras parasitadas
 - 3.3.3.b Periodos de desarrollo
 - 3.3.3.c Características de los adultos emergidos
 - 3.3.3.d Éxito reproductivo y eficiencias en el desarrollo
- 3.4 Discusión
- 3.5 Conclusiones

4. Características en el desarrollo y comportamiento de *Pseudacteon tricuspis*

- 4.1 Introducción (objetivos particulares)
- 4.2 Materiales y métodos
 - 4.2.1 Sitio de muestreo y colección
 - 4.2.2 Oviposiciones y tiempos de orientación de *P. tricuspis* a campo

- 4.2.3 Efecto de *P. tricuspsis* en la tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*
- 4.2.4 Evaluación del desarrollo y eficiencia de *P. tricuspsis* en relación a ambas FS de *S. invicta*
- 4.2.5 Desarrollo y eficiencias de *P. tricuspsis* con y sin competencia por el recurso
- 4.2.6 Éxito reproductivo de *P. tricuspsis* con y sin competencia por el recurso
- 4.3 Resultados
 - 4.3.1 Oviposiciones y tiempos de orientación a campo
 - 4.3.2 Efecto en la tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*
 - 4.3.2.a Efecto en las tasas de forrajeo
 - 4.3.2.b Efecto en el tamaño de las forrajeras
 - 4.3.2.c Efecto en la proporción de las forrajeras
 - 4.3.3 Características en el desarrollo de *P. tricuspsis* sobre ambas FS de *S. invicta*
 - 4.3.3.a Tamaño de las obreras parasitadas
 - 4.3.3.b Periodos de desarrollo
 - 4.3.3.c Características de los adultos emergidos
 - 4.3.3.d Éxito reproductivo y eficiencias en el desarrollo
 - 4.3.4 Preferencias y fecundidad de *P. tricuspsis* en ausencia de competencia por el recurso
 - 4.3.4.a Número de oviposiciones y porcentaje de parasitismo
 - 4.3.4.b Tamaño de obreras parasitadas y de adultos emergidos
 - 4.3.5 Desarrollo y eficiencias de *P. tricuspsis* con y sin competencia por el recurso
 - 4.3.6 Comportamiento de oviposición de las hembras de *P. tricuspsis*
 - 4.3.6.a Comportamiento de las hembras nacidas en laboratorio
 - 4.3.6.b Comportamiento de las hembras salvajes
- 4.4 Discusión
- 4.5 Conclusiones

5. Comparación de las historias de vida de *Pseudacteon curvatus* y *Pseudacteon tricuspsis*

- 5.1 Introducción (objetivos particulares)
- 5.2 Materiales y métodos
 - 5.2.1 Oviposición y efectos de ambas especies de *Pseudacteon* sobre el tamaño y proporción de las forrajeras de *S. invicta*
 - 5.2.2 Características y eficiencia en el desarrollo de las especies de *Pseudacteon*
- 5.3 Resultados
 - 5.3.1 Oviposición y efectos de ambas especies de *Pseudacteon* sobre el tamaño y proporción de las forrajeras de *S. invicta*

- 5.3.1.a Oviposiciones
- 5.3.1.b Efecto en el tamaño de las forrajeras
- 5.3.1.c Efecto en la proporción de las forrajeras
- 5.3.2 Características y eficiencia en el desarrollo de las especies de *Pseudacteon*
 - 5.3.2.a Tamaño de las obreras parasitadas
 - 5.3.2.b Periodos de desarrollo
 - 5.3.2.c Características de los adultos emergidos
 - 5.3.2.d Éxito reproductivo y eficiencias en el desarrollo
- 5.4 Discusión
- 5.5 Conclusiones

6. Caracterización citogenética de *Pseudacteon curvatus* y *Pseudacteon tricuspis*

- 6.1 Introducción (objetivos particulares)
 - 6.1.1 Materiales y métodos
 - 6.1.2 Recolección de los ejemplares
 - 6.1.3 Obtención de células en división
 - 6.2.2.a A partir de ejemplares adultos
 - 6.2.2.b A partir de pupas
 - 6.1.4 Disección de los ejemplares y obtención de las preparaciones cromosómicas
 - 6.1.5 Confección de los cariotipos
 - 6.1.6 Morfología cromosómica
 - 6.1.7 Técnicas de bandas cromosómicas
 - 6.2.6.a Protocolo para la técnica de bandas C
 - 6.2.6.b Protocolo para la tinción DAPI-CMA₃
 - 6.2.6.c Protocolo de la impregnación argéntica
 - 6.1.8 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)
 - 6.2.7.a Marcado de la sonda
 - 6.2.7.b Desnaturalización e hibridación de la sonda
 - 6.2.7.c Desnaturalización y pre-tratamiento de los preparados
 - 6.2.7.d Hibridación
 - 6.2.7.e Lavados (en baño con agitación a 42°C)
 - 6.2.7.f Detección de la sonda
 - 6.2.7.g Tinción con DAPI (en baño con agitación a 25 °C)
 - 6.1.9 Análisis estadísticos
- 6.2 Resultados
 - 6.2.1 Cariotipos
 - 6.2.2 Bandas C
 - 6.2.3 Bandas DAPI-CMA₃
 - 6.2.4 Bandas Ag-NOR

- 6.2.5 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)
- 6.2.6 Idiogramas
- 6.3 Discusión
- 6.4 Conclusiones

- 7. **Discusión general**

- 8. **Bibliografía**

- 9. **Anexos**
 - 9.1 Protocolo para extracción del ADN
 - 9.2 Tabla 2.A (Capítulo 2)
 - 9.3 Tabla 2.B (Capítulo 2)
 - 9.4 Obtención de preparados y elaboración de las soluciones (Capítulo 6)

- 10. **Publicaciones**

Capítulo 1

Introducción al sistema *Solenopsis-Pseudacteon*

1.1 Características generales de *Solenopsis invicta*

La hormiga *Solenopsis invicta* Buren (Formicidae: Myrmicinae), vulgarmente conocida como hormiga colorada, hormiga brava (Argentina), “formiga de fogo” (Brasil), “red imported fire ant” (Estados Unidos) y “fire ant” (resto del mundo), entre otras, es una especie fundamentalmente neotropical nativa de Sudamérica (Trager 1991; Taber 2000). Su rango de distribución natural incluye Paraguay, Bolivia, sureste de Perú, sur y centro de Brasil, norte de Uruguay y, noreste y centro de Argentina hasta la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Trager 1991; Mescher *et al.* 2003; Folgarait *et al.* 2008). Las poblaciones introducidas accidentalmente hace aproximadamente 80 años en los Estados Unidos (Logfren 1986), eran originarias del noreste de Formosa (Ross *et al.* 1997, 2007; Shoemaker *et al.* 2006a; Caldera *et al.* 2008). Aunque la especie se estableció primero en Alabama (Logfren 1986; Callcott y Collins 1996) se fue dispersando por el sur y centro del país hasta llegar a California y Nuevo Méjico (Dowell *et al.* 1997; MacKay y Fagerlund 1997; Buckley 1999). A nivel mundial, hay varias poblaciones establecidas en Australia, Puerto Rico, Las Antillas y Taiwán (Davis *et al.* 2001; McCubbin y Weiner 2002; Henshaw *et al.* 2005; Chen *et al.* 2006; Yang *et al.* 2008) y también fue detectada, aunque teóricamente erradicada, en Nueva Zelanda (Pascoe 2002; Booth y Dhami 2008).

1.1.1 Sistemática

Solenopsis invicta forma parte del complejo *Solenopsis saevissima*, grupo conformado por 16 especies (13 descritas y 3 sin determinar) que presentan poca diferenciación en sus caracteres morfológicos, por lo que la sistemática de este grupo es compleja y está en continua revisión (Trager 1991; Ross y Shoemaker 2005; Pitts *et al.* 2005; Shoemaker *et al.* 2006a).

Las especies evolutivamente más recientes del grupo *S. saevissima*, entre las que se encuentra *S. invicta*, tienden a presentar obreras *mayores* de mayor tamaño que las especies basales, una tendencia hacia 2 formas sociales (FS) alternativas (Ross y Carpenter 1991) y distribuciones espaciales parapátricas o alopátricas (Pitts 2002). Los datos obtenidos de análisis de ADN mitocondriales y de ADN genómico (*Gp-9*; Krieger y

Ross 2002; Shoemaker *et al.* 2006a), junto con el estudio de caracteres morfológicos a partir de obreras adultas, reinas y larvas (Pitts *et al.* 2005), demostraron el origen monofilético de las especies polimórficas y un único origen de la poliginia. Específicamente, el supuesto origen polifilético de la especie nominal *S. invicta* (Shoemaker *et al.* 2000, 2003) fue resuelto con un análisis de ADN mitocondrial mediante el cual se encontraron al menos una especie críptica y siete haplotipos distintos (Ross y Shoemaker 2005; Shoemaker *et al.* 2006a).

Se detallan a continuación (Tabla 1.1) los principales caracteres diagnósticos usados para diferenciar morfológicamente a las obreras adultas de las principales especies polimórficas sudamericanas del complejo *S. saevissima*.

Tabla 1.1. Cuadro comparativo sobre el estado de los caracteres morfológicos de las obreras de diferentes especies del complejo *S. saevissima* (obtenido de Pitts *et al.* 2005).

Especie	Estado de los Caracteres										
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>S. electra</i>	0	2	1	2	0	1	1	0	1	1	1
<i>S. saevissima</i>	0	1	1	2	0	1	0	0	1	1	1
<i>S. interrupta</i>	0-1	1	1	2	0	1	0	0	1	1	1
<i>S. quinquecuspis</i>	0-1	0	0	0-2	1	0	0	1	0	0	0
<i>S. macdonaghi</i>	0	0	0	0-2	0	0	0	1	1	0	0
<i>S. richteri</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>S. invicta</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0

Detalle del estado de algunos caracteres diagnósticos observados:

6. Sutura media frontal. “Y invertida”. 0 = ausente; 1 = presente.
7. Ocelo mediano. Con o sin lente. 0 = ausente; 1 = presente.
8. Foveola pilígera. En cabeza. 0 = oval a elongada; 1 = redonda.
9. Cóstula mandibular. 0 = ausente; 1 = ausente en el medio; 2 = muy marcada.
10. Pronoto. 0 = redondeado antero-lateralmente, sin protuberancias; 1 = cuadrado antero-lateralmente, con protuberancias.
11. Sutura promesonotal. Presente solo en las obreras mayores de *S. macdonaghi* y *S. quinquecuspis*. 0 = medialmente angulosa, a veces hacia arriba; 1 = medialmente curvada, nunca hacia arriba.

12. Propodeo con esculturas. 0 = glabro posteroventralmente al espiráculo; 1 = granulado posteroventralmente al espiráculo.
13. Propodeo. En obreras mayores. 0 = curvado hacia arriba desde el surco metanotal a plano posteriormente; 1 = hacia arriba y curvado desde el surco metanotal a plano posteriormente.
14. Estrías posteriores en el post-pecíolo. 0 = cubren más del 75%; 1 = cubren más del 50% del post-pecíolo.
15. Forma del post-pecíolo. 0 = más ancho que alto; 1 = igual o más alto que ancho.
16. Esculturas posteriores en el post-pecíolo. Ocupan más del 50% del post-pecíolo. 0 = granulosa; 1 = glabro.

1.1.2 La colonia

Los nidos de *S. invicta* generalmente miden entre 5-12 cm de alto (Porter *et al.* 1992, 1997; Macom y Porter 1996), aunque en lugares inundables de la Argentina alcanzan una altura cercana al metro (Chirino Obs. Pers.). Se componen principalmente de tierra removida por las obreras que construyen una gran red de túneles y galerías que ocupan más del 50% del volumen y que se pueden extender a varios metros de distancia (Tschinkel 1993, 1998). Los montículos carecen de entradas, pero presentan pequeñas salidas en los extremos de los túneles que llegan a la superficie (Fig. 1.1).

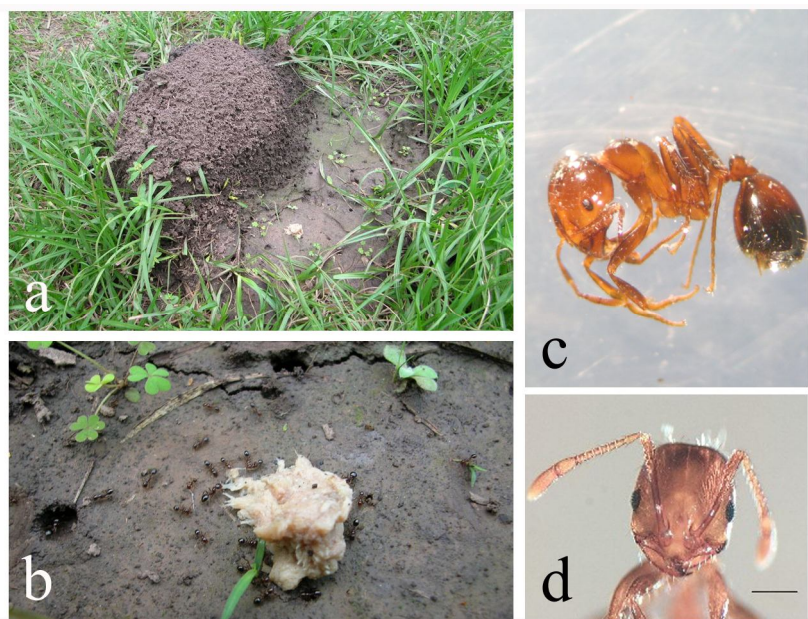


Figura 1.1. Características básicas de *S. invicta*. a) Morfología externa del nido. b) Entradas naturales al montículo. c) Cuerpo de obrera en vista lateral. d) Hormiga vista de frente. Escala: 0,5 mm.

La madurez de la colonia se alcanza a partir del séptimo mes de su fundación y establecimiento. En una colonia madura, el nido contiene entre 20.000 y 300.000 mil obreras polimórficas y totalmente estériles por presentar sus ovariolas atrofiadas y la reina pone cerca de 800 huevos al día (Markin *et al.* 1973; Tschinkel 1988a, 1993).

Las obreras presentan una distribución de tamaños continua conformando una alometría monofásica con variación isométrica (Fig. 1.2; Wilson 1953). Wilson (1971) fue el primero en separar a las obreras de *S. invicta* en cuatro castas (*naníticas*, *menores*, *medias* y *mayores*), aunque formalmente sólo existen dos castas físicas (Wheeler 1990). Las obreras *menores* presentan anchos de cabeza de menos de 0,75 mm y las *mayores* de más de 0,75 mm (Tschinkel *et al.* 2003); por lo tanto, las obreras *medianas* no conforman una casta verdadera. Esta distribución produce dos subpoblaciones que se superponen parcialmente conformando una distribución de frecuencias bimodal (Wilson 1953, Wheeler 1990, 1991; Tschinkel *et al.* 2003). El polimorfismo de las obreras también depende de la edad de la colonia, del número de reinas presentes y de la época del año (verano, invierno) lo que determina distintas frecuencias en la distribución de tamaños (Markin *et al.* 1973; Tschinkel 1988b, 1993, 1998; Goodisman y Ross 1997).

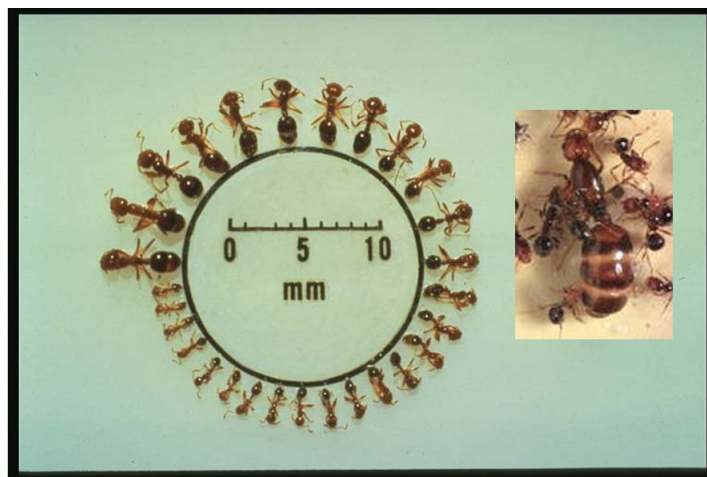


Figura 1.2. Variación continua y creciente en el tamaño de las obreras de *S. invicta*. Se observa el tamaño relativo de la reina (Fotos de S. D. Porter).

Las colonias de *S. invicta* también presentan verdaderas castas etarias. Las obreras más jóvenes son las nodrizas; las que tienen más de un mes conforman obreras de

reserva y, las obreras más viejas son las forrajeras. Además, las diferentes tareas que las obreras realizan también dependen de sus edades, tamaños, estados energéticos y de las necesidades de la colonia (Hölldobler y Wilson 1990; Vinson 1997; Cassill y Tschinkel 1999a, 1999c). Las obreras *pequeñas* (0,77 mm) son fundamentalmente nodrizas que cuidan y cubren a las larvas y, en menor medida, las alimentan. Las obreras *medianas* (0,86 mm) pertenecen a la reserva y presentan un comportamiento muy flexible para cambiar rápidamente de tarea, aumentando o disminuyendo sus frecuencias tanto adentro como afuera de la colonia (Hölldobler y Wilson 1990; Vinson 1997; Cassill y Tschinkel 1999a). Sus funciones son alimentar a las larvas, defender y mantener el nido y reclutar alimento. Finalmente, las obreras *mayores* (1,35 mm) suelen ser exclusivamente forrajeras y están especializadas en reclutar y almacenar el alimento en el intestino anterior (Cassill y Tschinkel 1995, 1996, 1999a; Weeks *et al.* 2004).

Solenopsis invicta es una especie omnívora atraída a fuentes ricas en proteínas, carbohidratos y aceites y, aunque las obreras depredan fundamentalmente invertebrados, cerca del 75% del alimento que colectan se encuentra en estado líquido y lo almacenan principalmente en el intestino anterior y, en menor medida, en las glándulas postfaríngeas (Cassill y Tschinkel 1996; Vinson 1997; Tschinkel 1998). El flujo de alimento dentro de la colonia es un proceso descentralizado, regulado por el estado de saciedad de las larvas y obreras (Cassill *et al.* 1998). Los aceites y proteínas pasan de las forrajeras a las hormigas de la reserva, a las nodrizas y a las larvas y reina; mientras que las soluciones azucaradas y los lípidos se traspasan fundamentalmente entre obreras (Tschinkel 1998; Cassill *et al.* 1998; Weeks *et al.* 2004). Las partículas sólidas transportadas en la faringe de las forrajeras se traspasan a las obreras de la reserva, a las nodrizas y las larvas de estadio IV, que son las únicas que pueden disgregar y digerirlas extraoralmente (Fig. 1.3; Cassill y Tschinkel 1999a, 1999b, 1999c; Cassill *et al.* 1998; Weeks *et al.* 2004).

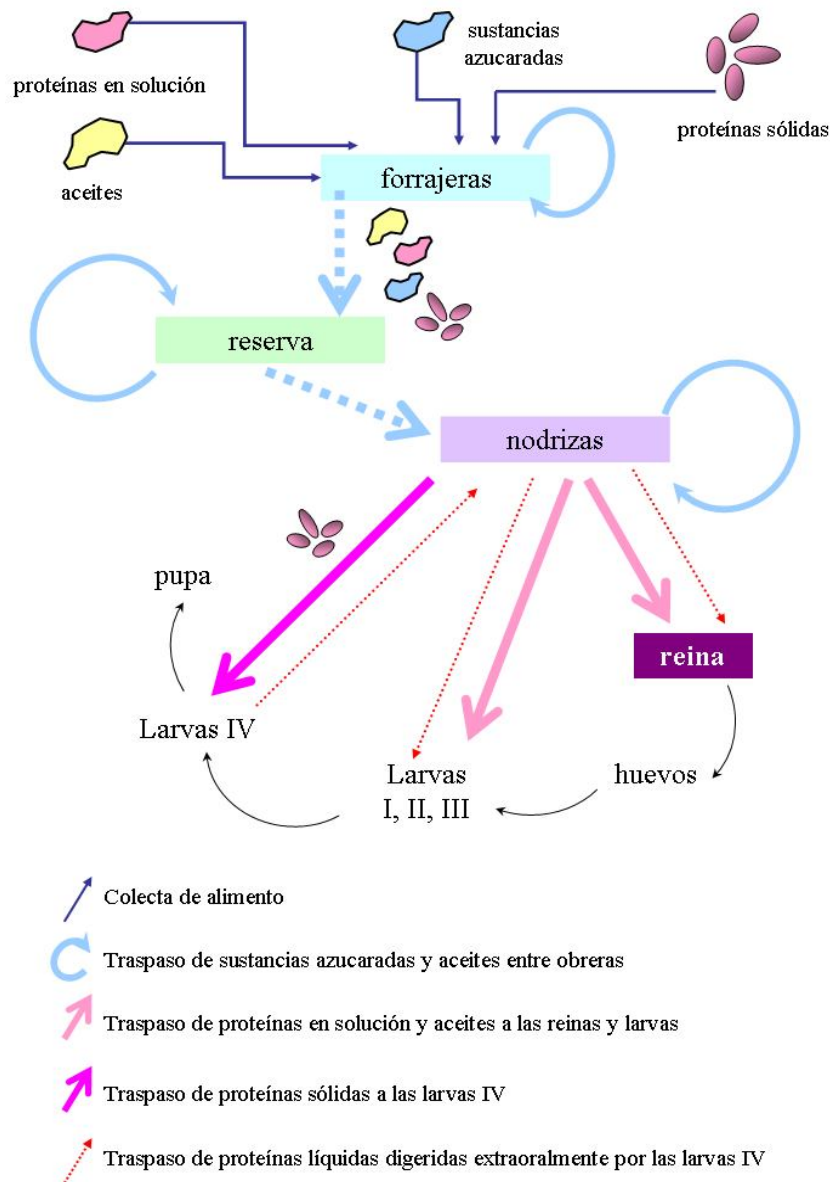


Figura 1.3. Flujo de alimento entre las forrajeras, hormigas de la reserva y nodrizas de *S. invicta* (de Vinson 1997 y Tschinkel 1998).

1.1.3 Formas sociales

Las colonias de *S. invicta* también se caracterizan por presentar dos formas de organización social (FS) distintivas: Monoginia (*M*) y Poliginia (*P*), con una o varias reinas funcionales por nido, respectivamente (Tabla 1.2; Ross y Keller 1995; Ross *et al.* 1997). La organización social está asociada a un genotipo y fenotipo particulares de las reinas y obreras (Ross y Keller 1995, 1998; Keller y Ross 1999; DeHeer 2002) y determina el modo en que se distribuye la reproducción entre los miembros de la colonia, el número de individuos presentes, sus relaciones genéticas y el comportamiento de las reinas y obreras

(Ross y Keller 1995; Goodisman y Ross 1997; Jerome *et al.* 1998; Adams y Balas 1999; Bourke 2002; Gotzek y Ross 2007). La cantidad e identidad de las reinas presentes en cada nido depende de la variación alélica de un factor Mendeliano simple, el gen nuclear *Proteína general-9* (*Gp-9*) que codifica para dos proteínas electroforéticamente diferentes (Ross 1997; Ross *et al.* 1997; Ross y Keller 1998; Krieger y Ross 2002). Las reinas de colonias *M* solo poseen alelos tipo-*B* para *Gp-9* (genotipo homocigoto dominante *BB*) lo que determina que sean más pesadas, fisogástricas, fecundas y longevas que las reinas de colonias *P* (Keller y Ross 1993, 1999; Ross y Keller 1995, 1998; Krieger y Ross 2002). Las colonias *P* presentan reinas heterocigotas (*Bb*) y homocigotas (*BB*), por lo que la poliginia está relacionada a la presencia de alelos tipo-*b* (Ross y Keller 1995, 1998; Ross *et al.* 1996b; Ross 1997; Krieger y Ross 2002). En las colonias *P* suelen faltar las obreras homocigotas recesivas (*bb*) porque esta condición suele ser letal (Keller y Ross 1998). Las hembras sexuales con genotipo heterocigota están limitadas energéticamente para realizar una fundación claustral de la colonia porque tienen menos contenido de grasas que las hembras *M* (DeHeer 2002). Por lo tanto, luego de sus vuelos nupciales, suelen entrar en nidos *P* ya establecidos. Las obreras *M* (homocigotas, agresivas y territoriales) no admiten otra reina u obreras ajenas al nido; mientras que las obreras *P* (con genotipos *BB* y *Bb*) toleran a coespecíficas ajenas al nido, no defienden agresivamente sus territorios, aunque sólo aceptan a otras reinas heterocigotas. Aunque la conducta de las hormigas depende del contexto social y ecológico en el que se desarrollan, la FS puede ser modificada manipulando la proporción de obreras de diferente genotipo (Keller y Ross 1993; Ross y Keller 2002).

Tabla 1.2. Principales diferencias observadas entre ambas FS de *S. invicta*.

Característica	Monoginia	Poliginia
Nº de reinas por nido	1	Varias
Parentesco entre madre e hijas ^a	0,75	0,75 (dentro de cada familia)
Obreras	territoriales y agresivas	poco territoriales y agresivas
Reina funcional	triplica su peso (14-16 mg)	duplica su peso (10-11 mg)
Expectativa de vida de la reina	10 años	3 años
Estrategia reproductiva	vuelo nupcial y fundación claustral de la colonia	fecundación cerca o dentro del nido, gemación
Variabilidad genética por área	alta	baja

^a relación de parentesco esperada para insectos haplodiploides con hembras y machos que se aparean una sola vez con un solo individuo.

En el noreste de la Argentina (Formosa, Chaco, Santa Fe y Corrientes) y Brasil, al igual que en algunos ambientes en donde la especie fue accidentalmente introducida, las poblaciones *M* predominan sobre las poblaciones *P* (Greenberg *et al.* 1985; Ross *et al.* 1987a, 1997; Trager 1991; Porter 1992, 1993; Porter *et al.* 1992, 1997). Sin embargo, en otros sitios de Norteamérica, las colonias *P* dominan gran parte del territorio y se distribuyen desde el oeste de Luisiana hasta el sur de Tejas (Ross *et al.* 1997). En estos sitios, los nidos *P* se disponen muy cercanos entre sí y presentan densidades entre 2 a 6 veces mayores que las poblaciones Sudamericanas (Greenberg *et al.* 1985; Porter y Savignano 1990; Porter *et al.* 1991, 1992, 1997; Macom y Porter 1996). Entre las posibles razones que justifican esta diferencia demográfica en el nuevo ambiente, se encuentran la falta de enemigos naturales, asociada a la pérdida de genes de reconocimiento por efecto fundador, lo que facilitó la selección de grupo entre reinas no emparentadas fundamentalmente en lugares disturbados por la actividad humana (Ross 1993; Ross *et al.* 1993, 1996b, 1997; Vinson 1997; Goodisman y Ross 1998; Porter *et al.* 1997; Tschinkel 1998; Taber 2000; King y Tschinkel 2006). La Tabla 1.3 muestra las principales diferencias entre las colonias *P* de Argentina y las de los Estados Unidos.

Tabla 1.3. Principales diferencias observadas entre colinas poligínicas de *S. invicta* de Argentina (poblaciones nativas) y de los Estados Unidos (poblaciones introducidas).

Características	Argentina	Estados Unidos
reinas por nido	4-6	20-100
Parentesco entre reinas	~ 45%	< 1%
Genotipo de las reinas	<i>BB</i> (50%) - <i>Bb</i> (50%)	<i>Bb</i> (100%)
Porcentaje de obreras <i>Bb</i>	< 50%	> 50%
Parentesco entre madres e hijas de la familia	25-75%	< 0,25%
Variabilidad genética en la colonia	alta	baja
Tipo de selección	Selección de parientes	Selección de grupo
Porcentaje de hembras aladas	< 12%	30%
Porcentaje de machos diploides (2n)	< 20%	80%
Relación hembra:macho	3:1	>>> 3:1
Densidad de nidos por área	baja	Alta
Hibridación con <i>S. richteri</i>	rara a inexistente	frecuente

1.1.3 Importancia

En general, *S. invicta* es una de las especies más intensamente estudiada por su impacto sanitario y económico (Vinson 1997; Williams *et al.* 2001, 2003), su explosión demográfica en ambientes introducidos en comparación con los ambientes nativos (Wojcik 1983; Porter *et al.* 1992, 1997), su importancia biológica y ecológica (Macom y Porter 1996; Vinson 1997; Tschinkel 1998; LeBrun *et al.* 2007; Calcaterra *et al.* 2008b), su efecto negativo en la diversidad biológica (Porter *et al.* 1988; Porter y Savignano 1990; Wojcik *et al.* 2001), su comportamiento asociado a la alimentación (Cassil y Tschinkel 1996, 1999a, 1999b; Vinson 1997; Cassil *et al.* 1998; Weeks *et al.* 2004) y por las diferencias genéticas (Ross y Keller 1995; Gotzek y Ross 2007) y de comportamiento (Obin y Vander Meer 1988; Vander Meer *et al.* 2008) relacionadas a su organización social, tanto en ambientes nativos como exóticos.

Debido a la cantidad de efectos negativos que esta especie produce en los ambientes en los que fue introducida, llegando a ser una de las especies plaga más problemática, en conjunto con el fracaso del uso de pesticidas, se han intensificado los estudios sobre posibles agentes de control biológico (Vinson 1997; Williams *et al.* 2001, 2003). Particularmente, el estudio de los niveles de impacto de los parasitoides del género *Pseudacteon* Coquillett (Diptera: Phoridae) como agentes de control biológico sobre las poblaciones de *S. invicta*, la relevancia de la FS del hospedador sobre el desarrollo, supervivencia y éxito reproductivo de los parasitoides no ha sido previamente explorada (Graham *et al.* 2003; Porter y Gilbert 2004; Vazquez *et al.* 2004; Vogt y Streett 2003; Thead *et al.* 2005; Estrada *et al.* 2006).

1.2 Características generales de *Pseudacteon* spp.

Las moscas escudo del género *Pseudacteon*, también conocidas como fóridos, moscas jorobadas y moscas estercoleras son mayoritariamente parasitoides solitarios de las hormigas *Solenopsis* (Disney 1994). *Pseudacteon* presenta una distribución cosmopolita (Disney 1994; Patrock *et al.* 2009) y en Sudamérica se registran hasta 22 especies parasitando a las hormigas del complejo *Solenopsis saevissima*. Además, la cantidad de especies que se desarrollan sobre las diferentes especies de *Solenopsis* excede la diversidad observada en la mayoría de las hormigas (Disney 1994; Brown *et al.* 2003; Folgarait *et al.* 2005a; Calcaterra 2007; Kronforst *et al.* 2007).

1.2.1 Posición taxonómica

La Familia Phoridae es una de las más diversas en el Orden Diptera (superfamilia Phoroidea), las cuales incluyen más de 26.000 especies muy pequeñas con diferentes estilos de vida que comprenden carroñeros, depredadores y parasitoides (Disney 1994; Gilbert y Jervis 1998). Los adultos del género *Pseudacteon* son fácilmente reconocibles porque sus alas presentan las venas costales y radiales gruesas y cortas, siendo las restantes muy finas. Además, presentan antenas con el extremo apical del segundo segmento (pedicelo) muy desarrollado, conformando un cono que está totalmente incluido en tercer segmento antenal. También poseen ojos grandes formados por cientos de omatidios, la frente subcuadrada con más de 4 setas y la tibia del tercer par de patas con un cepillo de pelos dorsales (Disney 1994). En particular, las hembras presentan un ovipositor muy esclerotizado y simétrico (Fig. 1.4) que permite diferenciar a las distintas especies del género (Tabla 1.4; Porter y Pesquero 2001).

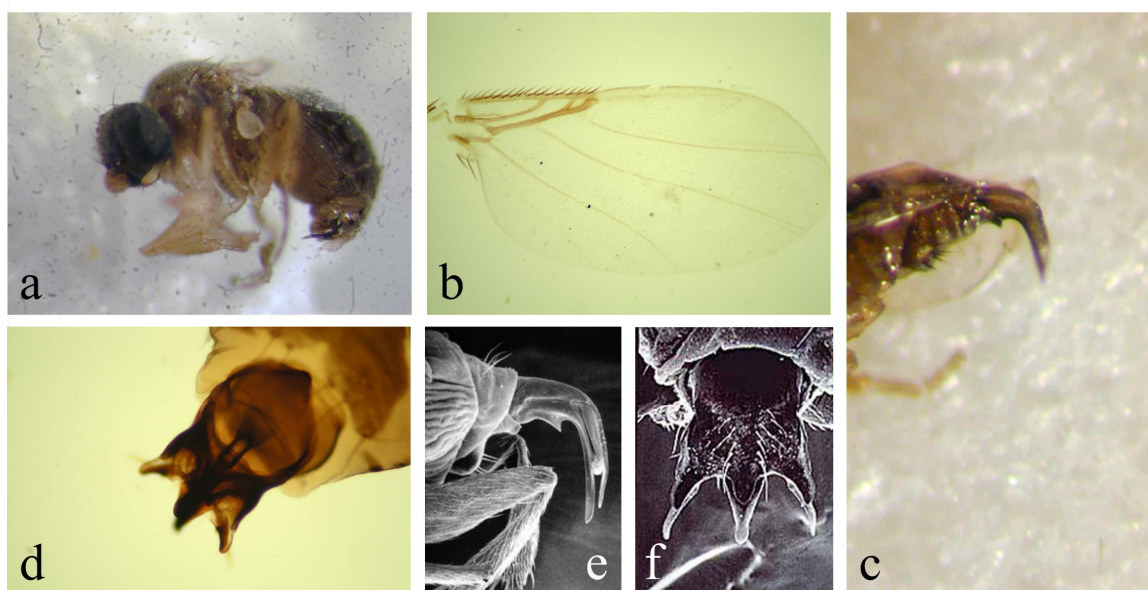


Figura 1.4. a) Macho adulto del género *Pseudacteon*. b) Ala característica de *Pseudacteon*. Se observan las venas gruesas (costal y radial) y finas del ala. c) Ovipositor de una hembra de *P. curvatus*. d) Ovipositor de una hembra de *P. tricuspis*. Ovipositores de *P. curvatus* (e) y *P. tricuspis* (f) con microscopía electrónica (obtenidas de Porter y Pesquero 2001).

Tabla 1.4. Cuadro comparativo de los ovipositores de las hembras de *P. curvatus* y *P. tricuspis* usadas en esta tesis (obtenido de Porter y Pesquero 2001).

Especie	Característica del ovipositor
<i>P. curvatus</i>	Ovipositor simple, recto en vista dorsal, curvado y largo dorsoventralmente, con un diente reforzado en posición ventral cerca de su base
<i>P. tricuspis</i>	Ovipositor trilobulado y puntiagudo con forma de tridente con un filamento membranoso en posición ventral en los lóbulos laterales

Las hembras de varias especies también presentan diferentes tamaños (Morrison *et al.* 1997; Morrison y Gilbert 1998; Folgarait *et al.* 2006) y diferente especificidad hospedera (Graham *et al.* 2003; Vazquez *et al.* 2004; Vogt y Streett 2003; Thead *et al.* 2005; Estrada *et al.* 2006).

1.2.2 Ciclo de vida

Las hembras de *Pseudacteon* parasitan a obreras adultas mientras forrajea inyectándoles un huevo en el tórax a nivel de las pleuras (Fig. 1.5a; Feener 1987; Disney 1994). Los primeros 2 estadios larvales se alimentan de los músculos torácicos (Fig. 1.5b); mientras que la larva de estadio III migra hacia la cabeza y empupa dentro de la cápsula cefálica luego de alimentarse de su contenido (Porter *et al.* 1995b; Porter 1998).

Las hormigas parasitadas suelen comportarse normalmente hasta pocas horas antes de que la larva III del parasitoide empupe (Henne y Johnson 2007). Durante la pupariación, sólo se esclerotizan y comprimen los primeros tres segmentos corporales para formar el opérculo, que cubrirá la cavidad oral de la cabeza de la hormiga; mientras que el resto del pupario queda protegido por la cabeza en la que se aloja (Fig. 1.5c-d; Porter *et al.* 1995b). Tres o 4 días después, emergen dos cuernos respiratorios que se extienden lateralmente hacia afuera a través de la cavidad oral de la cabeza de la hormiga (Porter 1998). Durante este proceso la hormiga pierde las mandíbulas y es decapitada (Porter 1998). Dado que la formación del pupario ocurre previamente al desarrollo de la pupa, formalmente se considera que la pupa se desarrolló (pupación) cuando aparecen los cuernos respiratorios (Disney 1994) que son necesarios para la supervivencia de las pupas (Folgarait *et al.* 2005c). Si los mismos no logran atravesar el tegumento del pupario se considera que la pupa no se formó o que es inviable (Disney 1994). Luego de 15 a 20 días de ocurrida la oviposición, dependiendo de la temperatura de cría y de las especies en desarrollo,

emerge el adulto (Fig. 1.5e; Folgarait *et al.* 2002a, 2005b, 2006; Gilbert y Morrison 1997; Morrison *et al.* 1999).

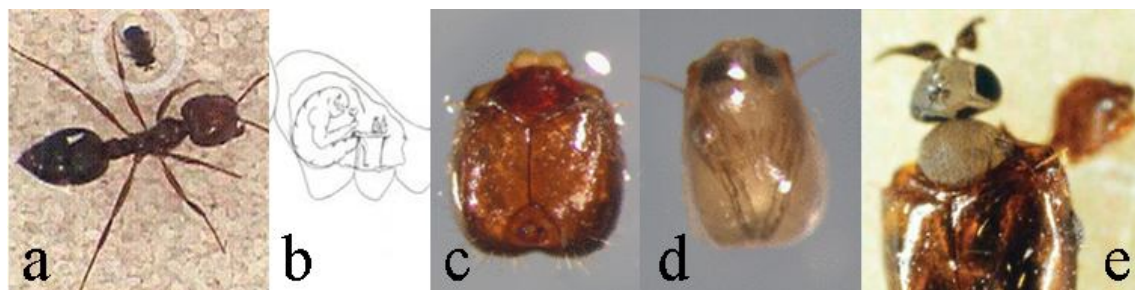


Figura. 1.5. Ciclo de vida de *Pseudacteon*. a) Hembra de *Pseudacteon* oviponiendo a una obrera de *S. invicta*. b) Larva de *Pseudacteon* en desarrollo. c) Pupa de *Pseudacteon* protegida por el opérculo y protegida por la cápsula cefálica de su hospedador. d) Adulto farado libre protegido por el resto del pupario sin esclerotizar. e) Adulto de *Pseudacteon* emergiendo.

Diferentes especies de *Pseudacteon* oviponen a diferentes tamaños de obreras (Morrison *et al.* 1997; Folgarait *et al.* 2002a; 2005b; 2006) observándose una correlación positiva entre el tamaño de las obreras atacadas y el tamaño de los fóridos emergidos (Morrison *et al.* 1997; Morrison y Gilbert 1998). Sin embargo, esta preferencia es limitada porque las especies de menor tamaño evitan oviponer a obreras más grandes que el tamaño promedio de la colonia (Morrison *et al.* 1997; Folgarait *et al.* 2002a). Se cree que el comportamiento de oviposición tamaño selectivo puede ser el medio por el cual muchas especies de *Pseudacteon* coexisten sobre la misma especie hospedera.

A pesar de que por su biología las especies de *Pseudacteon* matan a las hormigas durante su desarrollo (Fig. 1.5; Porter 1998), principalmente afectan el patrón de forrajeo de las hormigas (Feener y Brown 1992; Orr *et al.* 1997; Folgarait y Gilbert 1999; Feener *et al.* 2008) y, por lo tanto, podrían alterar el balance competitivo de *Solenopsis* frente a especies competidoras. Este es uno de los requisitos necesarios para que las especies de *Pseudacteon* sean efectivas como agentes de control biológico.

1.2.3 Importancia

Las diferentes investigaciones llevadas a cabo en *Pseudacteon* describieron sus historias de vida (Porter *et al.* 1995b; Morrison *et al.* 1997; Folgarait *et al.* 2002a; 2005b; 2006), sus especificidades hospederas (Porter *et al.* 1995a; Gilbert y Morrison 1997; Morrison y Gilbert 1999; Folgarait *et al.* 2002b; Vazquez *et al.* 2004; Estrada *et al.* 2006), sus comportamientos en la oviposición (Morrison *et al.* 1997; Wuellner *et al.* 2002) y el

efecto de los parasitoides sobre sus hospedadores (Wueller *et al.* 2002; Henne y Johnson 2007) incluyendo el impacto en el forrajeo (Feener y Brown 1992; Orr *et al.* 1995; Morrison *et al.* 1997; Morrison 1999; Morrison y Gilbert 1999; Porter y Gilbert 2004). Sin embargo, estos trabajos no evaluaron qué subcastas se ven afectadas por la acción del parasitoide ni evaluaron sus preferencias por ambas FS de *S. invicta*, tanto en el rango nativo como en el introducido.

Por los efectos directos e indirectos que provoca *Pseudacteon* sobre *S. invicta* y *S. richteri* Forel, nativas de Argentina (Mescher *et al.* 2003; Ross *et al.* 2008) pero plagas en Norteamérica (Porter *et al.* 2004; Thead *et al.* 2005; Morrison y Porter 2006) se han liberado desde el año 2000 a 4 especies de parasitoides (*P. curvatus*, *P. tricusps*, *P. litoralis* Borgmeier y *P. obtusus* Borgmeier). También está en progreso la liberación de *P. nocens* Borgmeier, junto a otras especies de *Pseudacteon* (Gilbert *et al.* 2008). En la actualidad, se evalúa cómo afectan estas especies a las poblaciones nativas (*S. geminata* (Fabricius) y *S. xyloni* McCook) e introducidas (*S. invicta* y *S. richteri*) de *Solenopsis* (Vogt y Streett 2003; Porter y Gilbert 2004; Estrada *et al.* 2006).

En particular, *P. curvatus* y *P. tricusps* se encuentran entre las especies más abundantes y ampliamente distribuidas en Sudamérica (Calcaterra *et al.* 2005; Folgarait *et al.* 2005a), presentan ritmos circadianos y circanuales amplios, prefieren temperaturas altas que otras especies no toleran (Folgarait *et al.* 2007a) y son muy abundantes al mediodía (Folgarait *et al.* 2003, 2007a, 2007b). Además, *P. curvatus* parasita principalmente a obreras de menor tamaño que *P. tricusps*. Por lo tanto, se encuentran entre las especies más estudiadas dentro del género, siendo las primeras en ser liberadas y en establecerse en diferentes sitios en los Estados Unidos (Morrison *et al.* 1997; Morrison y Gilbert 1998).

Por otra parte, los distintos biotipos sudamericanos de *P. curvatus* (Buenos Aires, Formosa, Brasil) usados como agentes de control biológico, presentan distintas preferencias y eficiencias cuando se desarrollan sobre *S. invicta*, *S. richteri* e híbridos *S. invicta* x *S. richteri* (Graham *et al.* 2003; Vazquez *et al.* 2004; Vogt y Streett 2003; Thead *et al.* 2005; Estrada *et al.* 2006). Por lo tanto, debe prestarse especial atención al origen de procedencia de los parasitoides y de las especies sobre las cuales se intenta aplicar el control biológico porque los parasitoides evolucionaron sobre diferentes especies y, posiblemente, sobre distintas FS.

En los estudios realizados con *P. tricusps* siempre se evaluó el tamaño de las hembras ($0,50 \pm 0,04$ mm), detectándose que la especie presenta dimorfismo sexual en el tamaño adulto a favor de las mismas, las cuales oviponen a obreras más grandes que el tamaño promedio de las colonias de *S. invicta* (Morrison *et al.* 1997, 1999; Porter *et al.* 1997; Morrison y Gilbert 1998). No obstante, estos datos no concuerdan con los valores registrados en Argentina (Cap. 4). Es decir que en Argentina las hembras son más pequeñas y parasitan obreras de menor tamaño que las establecidas en los Estados Unidos. Es probable que estas diferencias se deban al menor tamaño de las hormigas de *S. invicta* en Argentina (Tabla 2.8; Morrison y Gilbert 1998).

Como a nivel de la colonia las obreras *P* de *S. invicta* son, en promedio, más pequeñas que las obreras *M* (Greenberg *et al.* 1985) y no agreden a coespecíficas que se introducen en sus colonias (Keller y Ross 1998; Bourke 2002; Deheer 2002), es importante investigar si las especies de *P. curvatus* y *P. tricusps*, usadas como agentes de control biológico, difieren en sus historias de vida, especificidades hospederas y éxitos reproductivos en relación con la FS del hospedador. Este trabajo permitirá mejorar la cría masiva de los parasitoides y aumentar el éxito de las liberaciones a campo al elegir los ecotipos más afines en relación con las características de sus hospedadores.

1.3 Hipótesis, predicciones, Objetivos

Objetivos generales

- I) Describir las preferencias, comportamiento, desarrollo y éxito reproductivo de *P. curvatus* y *P. tricusps* en relación con la forma social del hospedador.
- II) Evaluar las causas que determinan que *P. tricusps* presente dimorfismo sexual en el tamaño de los adultos; mientras que *P. curvatus* carece del mismo.
- III) Investigar si estas diferencias se deben a que el sexo de la progenie es determinado por el tamaño de la hormiga en la que se desarrollan o si existe otro mecanismo de determinación sexual.

Hipótesis y Predicciones

Sección I ¿Qué prefieren y cómo se desarrollan ambas especies de *Pseudacteon* sobre su hospedador?

Hipótesis:

La variación interespecífica entre *P. curvatus* y *P. tricuspis* se debe a la preferencia por distintos tamaños y diferentes formas sociales de *S. invicta*.

Predicciones:

- *Pseudacteon curvatus* se desarrollará mejor y será más exitosa al oviponer a hormigas poligínicas de *S. invicta* porque presentan, en promedio, obreras más pequeñas.
- *Pseudacteon tricuspis* se desarrollará mejor y será más exitosa al oviponer a hormigas monogínicas de *S. invicta* porque presentan, en promedio, obreras más grandes.

Objetivos:

- Caracterizar a campo y en laboratorio a ambas formas sociales de *S. invicta*.
- Evaluar a campo y en laboratorio las preferencias, desarrollo y eficiencias de ambas especies de *Pseudacteon* en relación al tamaño y forma social de *S. invicta*.

Sección II ¿Por qué solo en algunas especies de *Pseudacteon* existe dimorfismo sexual en el tamaño adulto?**Hipótesis:**

Pseudacteon curvatus carece de dimorfismo sexual en el tamaño adulto porque parasita el menor rango de hormigas disponibles, limitando la posibilidad de que las hembras sean más grandes que los machos.

Pseudacteon tricuspis presenta dimorfismo sexual en el tamaño adulto porque parasita a obreras de distintos tamaños posibilitando una mayor optimización del recurso hormiga.

Predicciones:

- *Pseudacteon curvatus* seleccionará y se desarrollará en un pequeño rango de distribución de tamaños disponibles de *S. invicta*.
- *Pseudacteon tricuspis* seleccionará y se desarrollará en un mayor rango de distribución de tamaños disponibles de *S. invicta*.

Objetivos:

- Analizar el rango de distribución de tamaños de las obreras que ambas especies de *Pseudacteon* parasitan.

- Evaluar si en ambas especies de *Pseudacteon* existe una correlación positiva entre el tamaño del hospedador y el de los parasitoides emergidos.

Sección III ¿El dimorfismo sexual en los tamaños adultos de *Pseudacteon* se debe al mecanismo de determinación del sexo?

Hipótesis:

IIIa) El sexo en *Pseudacteon* es fijado ambientalmente por el tamaño del hospedador.

IIIb) El sexo en *Pseudacteon* es determinado genéticamente por un mecanismo haplodiploide.

Predicciones:

IIIa) Si existe Determinación Ambiental del Sexo no debería observarse gran superposición en el tamaño de las hormigas de las que emergen las hembras y machos en ambas especies *Pseudacteon*.

IIIb) Si existe Determinación Sexual por Haplodiploidía las hembras deberían presentar el doble de cromosomas que los machos en ambas especies *Pseudacteon*.

Objetivos:

- Comparar el nivel de superposición y los rangos de distribución en el tamaño de las hormigas parasitadas de las que emergen las hembras y machos de *Pseudacteon*.

- Caracterizar cariotípicamente a ambas especies de *Pseudacteon*.

- Comparar citológicamente a ambas especies de *Pseudacteon*.

- Dilucidar el posible mecanismo de determinación sexual que opera en ambas especies de *Pseudacteon*.

Capítulo 2

Caracterización de ambas formas sociales de *Solenopsis invicta* *

2.1 Introducción

Dentro de las poblaciones de *S. invicta* uno de los principales objetivos a nivel evolutivo es entender las bases genéticas y ambientales que determinan y regulan la organización social de las colonias, lo cual influye en el fenotipo y comportamiento de las reinas y obreras y, finalmente en el éxito reproductivo e invasivo de las poblaciones naturales e introducidas de esta especie (Passera 1994; Ross *et al.* 1997; Tsutsui y Suarez 2002; Krushelnycky *et al.* 2010).

En el noreste de la Argentina, y en algunos ambientes introducidos, ambas FS de *S. invicta* suelen presentarse en simpatría (Greenberg *et al.* 1985; Ross *et al.* 1987b, 1997; Trager 1991; Porter 1992, 1993). Además, las diferentes poblaciones de *S. invicta* presentan una correlación positiva entre el volumen del nido y el área del territorio (Tschinkel *et al.* 1995), el cual es regulado por el tamaño y la distancia de los nidos vecinos. El área que ocupa cada nido depende principalmente de la habilidad competitiva, el número y la biomasa de las obreras presentes (Tschinkel *et al.* 1995; Adams 2003); por lo que las colonias *M* presentan territorios de forrajeo definidos en los que cada colonia mantiene su área sin entrar en áreas vecinas y así evitan los contactos con obreras coespecíficas de otros nidos (Adams 1998, 2003; Adams y Tschinkel 2001). Sin embargo, los principales estudios sobre densidad y distribución espacial de nidos fueron realizados en los Estados Unidos, a pesar de que las poblaciones eran originarias de Sudamérica (Greenberg *et al.* 1985; Porter 1992; Porter *et al.* 1992, 1997; Macom y Porter 1996). Por lo tanto, en este capítulo se busca evaluar qué FS predomina en su ambiente nativo y cuáles son sus consecuencias demográficas (número versus tamaño de hormigas).

Finalmente, ambas FS de *S. invicta* también fueron caracterizadas por el comportamiento de las hormigas. Sin embargo, los diferentes ensayos de agresividad, realizados hasta el momento, consistieron en introducir obreras en las arenas de forrajeo de otras hormigas o directamente en las colonias residentes (Obin y Vander Meer 1988; Morel *et al.* 1990; Obin *et al.* 1993; Balas y Adams 1996a; Vander Meer y Alonso 2002; Fritz y Vander Meer 2003; Vander Meer *et al.* 2008), sin considerar que las hormigas evitan ingresar en áreas vecinas (Adams y Tschinkel 2001). Por lo tanto, debido a que se estableció que el área ocupada por las colonias de *S. invicta* depende de la habilidad

competitiva de las obreras, que evitan entrar en otras áreas de forrajeo, en este capítulo también se busca caracterizar el comportamiento de las hormigas evitando comportamientos asociados a la defensa del territorio.

Objetivos

Los objetivos particulares de este capítulo para caracterizar a ambas formas sociales de *S. invicta* son:

- 1) Comparar el tamaño, distribución espacial y densidad de nidos
- 2) Comparar las tasas de forrajeo, tamaño y proporción de las obreras forrajeando
- 3) Comparar la proporción, peso y tamaño de las subcastas de obreras presentes en el nido
- 4) Evaluar el nivel de agresividad de las obreras
- 5) Evaluar quién inicia la agresión en todas las interacciones entre FS
- 6) Desarrollar una herramienta rápida y confiable para evaluar a campo a ambas FS de *S. invicta* en función de los patrones de conducta de las obreras en interacción.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Sitio de muestreo y colección

Los experimentos a campo fueron realizados entre febrero y octubre de 2005 en el Parque Nacional Chaco (26° 48' Sur y 59° 34' Oeste, Provincia de Chaco) y entre noviembre de 2006 y octubre de 2007 en un campo cerca de la Ruta provincial N° 39 a 4 Km de la ciudad de San Javier (30° 35' Sur y 59° 55' Oeste, Provincia de Santa Fe) (Fig. 2.1). Ambos sitios presentan nidos *M* y *P* en simpatría (Ross *et al.* 1996a; Ross 1997; Ross y Keller 1998; Shoemaker *et al.* 2006b).

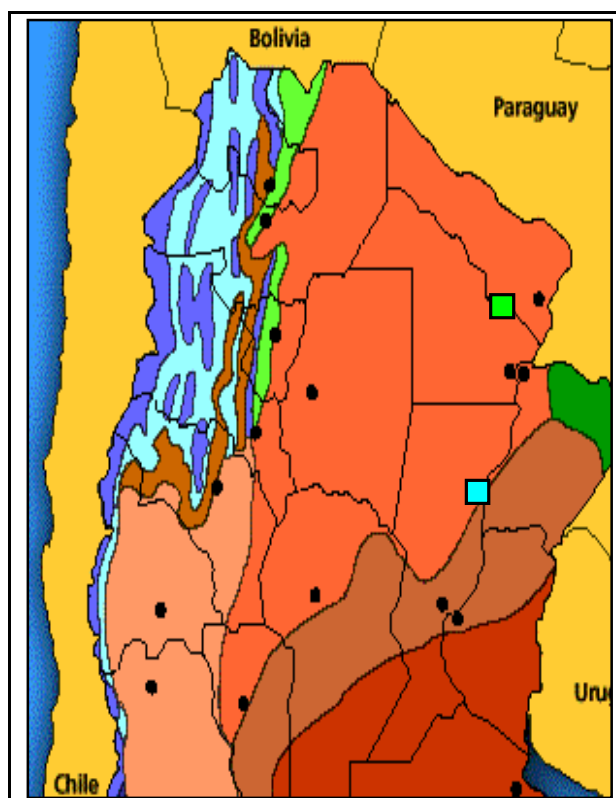


Figura 2.1. Mapa de la Provincia Biogeográfica Chaqueña (naranja) y Provincia Biogeográfica del Espinal (marrón). Se indica la ubicación del Parque Nacional Chaco (verde) y de la localidad de San Javier, Santa Fe (celeste).

El Parque Nacional Chaco está ubicado en la Provincia Biogeográfica Chaqueña, Dominio Chaqueño, Región Neotropical, que se extiende por el sur de Bolivia, oeste del Paraguay y el noreste de la Argentina, comprendiendo las provincias de Formosa, Chaco,

Santiago del Estero, este de Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca, oeste de Corrientes, norte de Córdoba y Santa Fe, con introgresiones en La Rioja y San Luis (Fig. 2.1). La vegetación comprende formaciones con árboles de gran porte (comúnmente caducifolios xerófitos), gramíneas, palmares, sabanas, cardonales y estepas halófilas. Debido a la actividad antrópica queda muy poco de la vegetación nativa. La temperatura media anual es de 20-23 °C y recibe un promedio de 500 mm de precipitaciones al año, principalmente en verano (Cabrera y Willink 1980).

La localidad de San Javier está ubicada en la parte norte de la Provincia Biogeográfica del Espinal, Dominio Chaqueño, Región Neotropical y se extiende, a modo de arco, desde el centro de la provincia de Corrientes y norte de Entre Ríos, el centro de Santa Fe y Córdoba, cubre la mayor parte de San Luis, el centro de La Pampa y el sur de Buenos Aires (Fig. 2.1). La vegetación dominante es el bosque xerófilo muy parecido al de la Provincia Chaqueña, pero más pobre en especies y más bajo en altura. El clima es cálido y húmedo, con precipitaciones cercanas a 1.170 mm al año y una temperatura media anual de 15-20 °C (Cabrera y Willink 1980). El sitio de muestreo es un campo natural usado principalmente para el pastoreo con incendios controlados durante el verano.

Las poblaciones de *S. invicta* se presentaron en los claros y al lado de los caminos vecinales (Fig. 2.2a y c). Las hormigas fueron identificadas en el laboratorio usando las claves de Trager (1991), Pitts (2002) y Pitts *et al.* (2005). La FS de *S. invicta* se determinó contando el número de reinas presentes por nido. Los nidos que presentaron más de una reina fueron denominados *Poligínicos (P)* y los que presentaron una o ninguna reina fueron analizados mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple específica para la especie (Valles *et al.* 2002; Valles y Porter 2003).



Figura 2.2. Sitios de muestro. a) Parque Nacional Chaco y b) cerca de San Javier. Se observa un nido de *S. invicta* de cada sitio de muestreo (c, d).

2.2.2 Caracterización molecular

Se caracterizó la FS de *S. invicta* usando la técnica de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (PCR-múltiple)**, ya que permite amplificar múltiples segmentos de ADN de más de una secuencia en una única reacción mediante el uso de dos o más pares de oligonucleótidos iniciadores (cebadores). Para amplificar los fragmentos específicos del gen *Gp-9* correspondientes a dos alelos (*B* y *b*) se usaron dos pares de cebadores diseñados por Invitrogen Argentina S. A. En la secuencia codificante de ambos alelos hay 9 nucleótidos de diferencia que codifican para 8 aminoácidos distintos (Krieger y Ross 2002). Los cebadores para el alelo dominante *Gp-9^B* amplifican un fragmento de 517pb y los del alelo recesivo *Gp-9^b* uno de 423 pb (Tabla 2.1).

Las PCR múltiples fueron conducidas en un termociclador Biometra T Personal (Biotron, Germany) y para un volumen final de 20 µl se adicionó 2 µl de Buffer *Taq* 10X, 2 µl de una mezcla de desoxinucleótidos dNTP/L mix, 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas Life, Sciences, Buenos Aires, Argentina), 2 µl de cada cebador y 1 µl de ADN genómico de *S. invicta*. Los ciclos de reacción consistieron en un paso inicial de

denaturalización del ADN de 2 min. a 94 °C; seguido de 34 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 55 °C y 45 seg. a 72 °C, y un paso de elongación final de 5 min. a 72 °C. Los productos de la PCR (10-15 µl) fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con bromuro de etidio 10%. Los segmentos amplificados fueron corridos junto al marcador de peso molecular Leader 100pb (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes). Las corridas electroforéticas presentaron 1 control positivo y 1 control negativo. Los controles positivos consistieron en muestras de hormigas *M* caracterizadas previamente. Si las muestras obtenidas presentaron la amplificación del segmento de ADN específico para el gen *Gp-9^B* (genotipo *BB*), los nidos fueron catalogados como *Monogínicos* (Fig. 2.3). Puede obtenerse el protocolo de extracción de ADN en el anexo del Cap. 2.

Tabla 2.1. Secuencia de los cebadores de ADN usados en la técnica de PCR múltiple para la detección de los alelos *B* y *b* del gen *Gp-9* de *S. invicta*.

Alelos	Cebador ^a	Secuencia (5'-3')	Nº de bases
<i>B</i>	26BS	CTCGCCGATTCTAACGAAGGA	21
	16BAS	ATGTATACTTTAAAGCATTCTAATATTTTGTC	33
<i>b</i>	24bS	TGGAGCTGATTATGATGAAGAGAAAATA	28
	25bAS	GCTGTTTTTAATTGCATTCTTATGCAG	28

^a Números de acceso al GenBank obtenidos de Valles y Porter (2003).

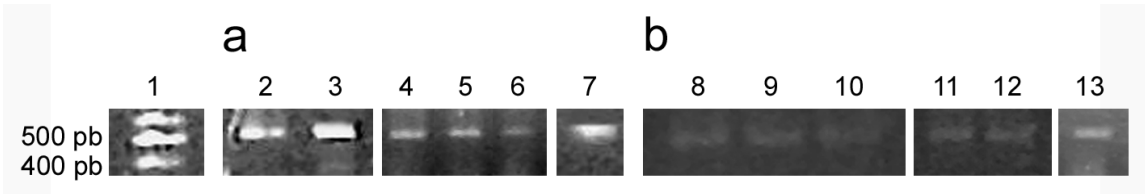


Figura 2.3. Patrón de las bandas del alelo *Gp-9^B* de las colonias *M* de *S. invicta* por obtenido PCR-múltiple. a) Patrón de bandas para las colonias *M* de Chaco. b) Patrón de bandas para las colonias *M* de San Javier. 1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2-7: Bandas de ADN de 517 pb de las colonias de Chaco; 8-13: Bandas de ADN de 517 pb de las colonias de San Javier.

2.2.3 Caracterización morfométrica

Para caracterizar a campo y en laboratorio a ambas FS de *S. invicta* se muestrearon 12 nidos (6 por FS) en cada sitio de muestreo (Chaco y San Javier) realizándose 3 mediciones por nido. Se comparó el tamaño promedio general de ambas FS midiendo el ancho de la cabeza (a la altura de los ojos) y el peso promedio de 250 hormigas seleccionadas al azar para cada colonia muestreada. Todas las mediciones fueron hechas con un ocular micrométrico calibrado con incrementos de 0,03 mm en un microscopio estereoscópico Nikon modelo SMZ-1B ESD (Microlat S. R. L., Buenos Aires, Argentina) con un aumento máximo de 30 veces. Los especímenes fueron depositados en la colección de la Dra. Folgarait en el Centro de Estudios e Investigaciones en la Universidad Nacional de Quilmes (Bernal, Buenos Aires, Argentina) y en el Museo de Historia Natural Bernardino Rivadavia (Buenos Aires, Argentina).

Análisis estadísticos. El tamaño y el peso promedios generales por colonia fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de 2 factores (sitio, FS) debido a que los datos estuvieron normalmente distribuidos (Sokal y Rohlf 1969).

2.2.4 Tamaño, distribución y densidad de nidos

2.2.4. a Tamaño de los nidos

Para comparar el tamaño de los nidos *M* y *P* de *S. invicta* se midió el perímetro (*P*), la altura (*H*), el diámetro mayor (*DM*) y el diámetro perpendicular (*DP*) al *DM* de todos los nidos seleccionados (Tabla 2.A, anexo Cap. 2). Se calculó el volumen de los nidos focales mediante la fórmula del cono truncado:

$$V = \frac{1}{3} \times B \times H \quad \text{Con } B = 3,14 \times R^2$$

$$R = \frac{(DM + DP)}{2}$$

2.2.4. b Distancia entre nidos y densidad de nidos

Para caracterizar la disposición de los nidos *M* y *P* de *S. invicta*, se consideró la mínima distancia (*m*) entre cada nido focal y el nido más cercano (ver Tabla 2.A, anexo Cap. 2). También se calculó la densidad porcentual de los nidos en 3 parches del bosque

usando el cociente “número de nidos M o P sobre el número total de nidos x 100”. Para evitar trabajar con el mismo nido más de una vez, se seleccionó solo al montículo de mayor tamaño de todos los nidos polidómicos (nidos compuestos por más de un montículo) dispuestos aproximadamente a 1 m de distancia unos de otros (Fig. 2.4). Luego de las observaciones a campo, los nidos fueron excavados y las hormigas separadas de la tierra mediante goteo continuo. Todas las hormigas fueron pesadas para obtener la biomasa total de la colonia por FS y sitio de muestreo.

Análisis estadísticos. El volumen promedio, la distancia mínima entre nidos, la densidad de nidos y la biomasa total de las hormigas fueron analizados con un ANOVA de 2 factores (sitio, FS) porque los datos estuvieron normalmente distribuidos.

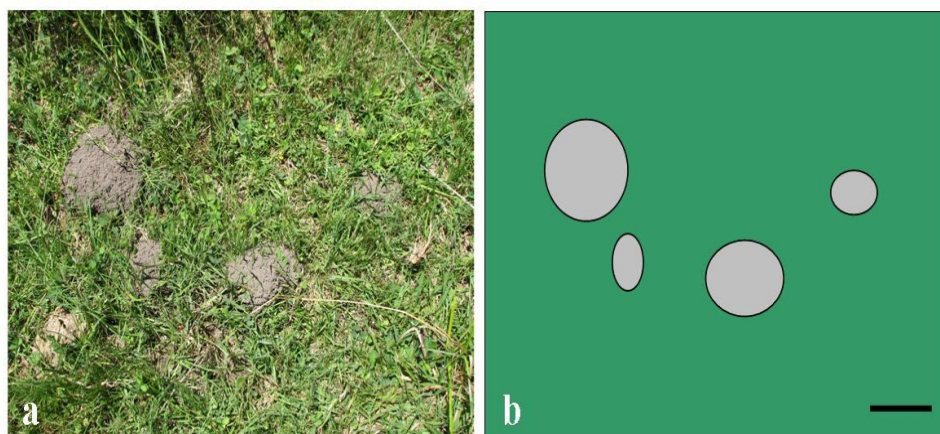


Figura 2.4. Nido polidómico de *S. invicta* (a) y su esquema (b) proveniente de San Javier.
Escala: 10 cm.

2.2.5 Tasas de forrajeo, tamaño y proporción de las obreras forrajeando

Para evaluar a campo la tasa de forrajeo y el tamaño y número de obreras involucradas en el forrajeo o en la defensa del cebo, se colocó $1,5 \pm 0,06$ g de atún *ad libitum* a 20 cm de una entrada natural de cada nido focal y se permitió que las hormigas empiecen un camino natural de forrajeo sin interrupciones. Los cebos fueron colocados a corta distancia para asegurar que las forrajeras pertenezcan a los nidos muestreados (Adams 2003) y para promover un forrajeo intenso y continuo. Para aislar a las hormigas de posibles enemigos naturales y competidores, los cebos y senderos de forrajeo fueron aislados usando túneles de acrílico transparente ($1 \times 0,15 \times 0,50$ m) con perforaciones a modo de ventanas cubiertas con tul de malla fina para amortiguar los cambios de temperatura (Fig. 2.5). Se midió la tasa de forrajeo contando el número de obreras que

pasaron por un punto durante 5 min. Posteriormente, se colectó una muestra al azar de 50-150 hormigas, las cuales fueron medidas (ancho de la cabeza a la altura de los ojos), contadas y separadas por tamaño.

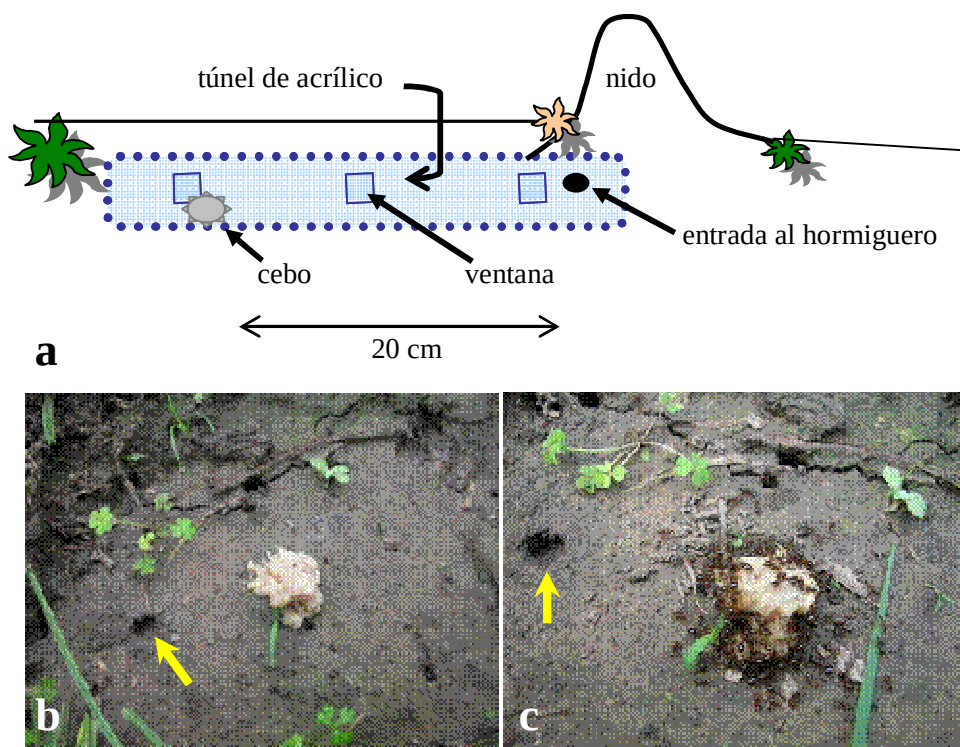


Figura 2.5. a) Esquema gráfico del túnel usado para aislar a las hormigas de otros competidores y de los parasitoides. b) Foto del cebo ubicado a 20 cm de un nido de *S. invicta*. c) Foto de las primeras forrajeras marcando el cebo antes de iniciar el forrajeo. Las flechas amarillas indican una entrada al nido natural.

Análisis estadísticos. Se analizó la tasa de forrajeo con un ANOVA de 2 factores (sitio, FS). Se comparó el tamaño promedio y la proporción de las forrajeras con un ANOVA de 3 factores (sitio, FS, subcasta). Se comparó la proporción de obreras de cada subcasta entre FS mediante un análisis de Proporciones. Para controlar el error global de Tipo I en las comparaciones múltiples en los análisis de tamaños y proporciones de hormigas por subcasta se usó el método secuencial de Bonferroni ($p < 0,017$).

2.2.6 Mantenimiento de las colonias

Las colonias de *S. invicta* fueron mantenidas en nidos artificiales dentro de recipientes plásticos (30 x 21 x 7,5 cm) con sus paredes internas cubiertas con un antideslizante (Fig. 2.6). Los nidos fueron colocados en un cuarto de cría aclimatado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 12: 12 (L:O) y a $80 \pm 10\%$ HR. Las hormigas fueron alimentadas 3 veces por semana con una dieta consistente en solución de azúcar al 50%, agua potable y 3 grillos (*Acheta domesticus* L.) o zofobas (*Zoophobas morio* Fabricius) frescos.



Figura 2.6. Colonia de hormigas de *S. invicta* proveniente del Parque Nacional Chaco colectada por goteo continuo y mantenida en el cuarto de cría.

2.2.7 Tamaño, peso y proporción de las obreras presentes en el nido

En el laboratorio y luego de obtener la biomasa total por colonia, se clasificó a las hormigas en 5 subcastas de tamaño usando tamices (ZONYTEST) de diferentes tamaños de poro (Fig. 2.7). Las 5 subcastas fueron denominadas: *mayores* (*Ma*; hormigas retenidas en el tamiz N° 16, con una abertura de poro de 1.190μ); *grandes* (*G*; hormigas retenidas en el tamiz N° 18, con abertura de 1.000μ); *medianas* (*M*; hormigas retenidas en el tamiz N° 20, con abertura de 840μ); *pequeñas* (*P*; hormigas retenidas en el tamiz N° 25, con abertura de 710μ) y *menores* (*Me*; hormigas que pasaron el tamiz N° 25). Se usaron estas categorías para discriminar con mayor detalle las diferencias en el polimorfismo entre ambas FS de *S. invicta* respecto a trabajos previos (Greenberg *et al.* 1985; Goodisman *et al.* 1999) y porque diferentes especies de *Pseudacteon* oviponen a diferentes tamaños de obreras (Feener 1987; Morrison y Gilbert 1998; Folgarait *et al.* 2002a, 2005b, 2006).



Figura 2.7. Colonia de *S. invicta* en proceso de tamizado para separar a las obreras por tamaño en diferentes subcastas.

Mediante regresión lineal entre el número y peso de grupos de 100-200 hormigas colectadas al azar se obtuvieron los pesos individuales de las hormigas por subcasta de las colonias colectadas (Tabla 2.B, anexo Cap. 2). Para cada colonia y FS de *S. invicta* se calculó la proporción representativa de las subcastas mediante el cociente “peso total sobre peso individual de hormiga”. De cada grupo muestreado también se colectó otra muestra al azar de 50 hormigas para calcular el tamaño promedio por subcasta.

Análisis estadísticos. El tamaño y peso individual promedios de las obreras por subcasta fueron analizados con un ANOVA de 2 factores (sitio, FS). Se analizó la proporción representativa de cada subcasta mediante un ANOVA de 3 factores (sitio, FS, subcasta). Se comparó la proporción de obreras de la misma subcasta pero de diferente FS mediante el análisis de Proporciones. Para controlar el error global de Tipo I en las comparaciones múltiples en los análisis de tamaños y proporciones de hormigas por subcasta se usó el método secuencial de Bonferroni ($p < 0,017$).

2.2.8 Agresividad de las hormigas

2.2.8. a Ensayo de Agresividad Cualitativa

Para evaluar a priori la posible FS de los nidos de *S. invicta* muestreados en el campo, se observó y comparó el comportamiento de las hormigas pertenecientes al mismo nido (tratamiento control) contra el comportamiento frente a obreras del nido más cercano (tratamiento experimental). Previo a las observaciones, las hormigas colectadas estuvieron

separadas por 30 min. para evitar comportamientos asociados al reconocimiento de la arena de ataque. Por cada interacción se usaron 8 hormigas (4 hormigas por nido) introducidas en arenas neutrales (recipiente plástico de 8 x 8 x 5 cm con sus paredes cubiertas con el antideslizante politetrafluoroetileno, Extol, PA) para evitar ventajas asociadas a la territorialidad. Se determinó de modo indirecto (sin contar reinas) la FS de los nidos en base a la “presencia” o “ausencia” de agresividad luego de 10 min. de interacción. Se registraron todas las conductas observadas.

2.2.8. b Ensayo de Agresividad Cuantitativa

En el laboratorio, se evaluó la conducta de las obreras *M* y *P* usando grupos de interacción simétricos en arenas neutrales. Se usaron hormigas de tamaño *grande* porque salen a forrajear, defienden el nido y son fáciles de observar (Obs. Pers.). Los controles consistieron en interacciones entre hormigas pertenecientes al mismo nido separadas previamente por 30 min. Los experimentales consistieron en interacciones entre hormigas de diferentes nidos, seleccionadas al azar, considerando sus FS respectivas (*M-M*, *P-P* o *M-P*). Se registraron todas las conductas observadas, a intervalos de 30 seg., durante 10 minutos de interacción. De cada interacción se calculó la agresividad promedio. Las hormigas se usaron una sola vez para evitar comportamientos asociados a la familiaridad. Posteriormente, en las interacciones entre obreras *M* y *P*, se consideró la FS de las hormigas que iniciaron la agresión y la FS de las hormigas agredidas, además de observar la reacción de las obreras agredidas. Las obreras de diferentes colonias presentaron sus gásteres pintados con un colorante de contacto que no modificó el comportamiento de las mismas (Markal®, LA-CO Industries Inc., 1996; Fig. 2.8).



Figura 2.8. Enfrentamiento entre hormigas de colonias *M* y *P* de *S. invicta*. Las hormigas pertenecientes a diferentes FS presentan los gásteres pintados de verde o rojo.

En base a las conductas observadas se elaboró un Etograma consistente en 6 rangos de agresividad creciente agrupados en 3 categorías de comportamiento (Tabla 2.2; Fig. 2.8):

- 1) **Comportamiento de Tolerancia (CT)**: reposo, anteneos, caminar.
- 2) **Comportamiento de Riesgo potencial (RP)**: posturas defensivas, evitar el contacto.
- 3) **Comportamiento agresivo (CA)**: enfrentamiento directo por ataque químico (veneno) o físico (mordidas, tirar miembros).

Análisis estadísticos. Los datos de agresividad obtenidos a partir del etograma fueron transformados a logaritmo en base 10 para que presenten homocedacea y fueron analizados mediante un ANOVA de 2 factores (sitio, FS). Las interacciones entre colonias *M* y *P* fueron analizadas mediante la prueba de Mann-Whitney porque los datos no estuvieron normalmente distribuidos (Daniel 1990). Para ajustar el nivel de significancia del error global de Tipo I ($\alpha = 0,05$) se usó el método secuencial de Bonferroni ($p < 0,017$) en las comparaciones múltiples (Sokal y Rohlf 1969). Los análisis fueron realizados el programa Statview (SAS Institute Inc. 1998, Cary, NC).

Tabla 2.2. Etograma elaborado a partir de la agresividad observada en las interacciones entre obreras de ambas FS de *S. invicta* discriminado por categorías de comportamiento (modificado de Obin y Vander Meer 1988).

Categoría	Rango	Conducta
CT	1	Reposo: las hormigas (solas o en grupos) están quietas o se limpian las antenas sin diferencias aparentes entre obreras.
CT	2	Reconocimiento: las hormigas caminan explorando el ambiente o antenean a otras hormigas por menos de 5 seg.
RP	3 ^a	Posturas defensivas estereotipadas: las hormigas con sus mandíbulas abiertas pueden presentar posturas en "C" o el cuerpo curvado hacia uno de los lados.
RP	4	Evitar el contacto: las hormigas con las mandíbulas abiertas caminan evitando a las demás o se rodean y giran en círculo manteniendo el cuerpo "de costado"; a veces se observan breves persecuciones y anteneos que duran menos de 5 seg.

CA^b	5	Amenaza física/química: las hormigas intentan morderse o levantan el gáster y lo hacen vibrar produciendo el olor característico cuando se disturba el nido.
CA	6	Ataque: 1 o 2 hormigas muerden el tórax, el post-pecíolo o el gáster de otra hormiga; pueden tironear de los miembros o agujonear.

^a Posturas típicas registradas en Wuellner *et al.* (2002).

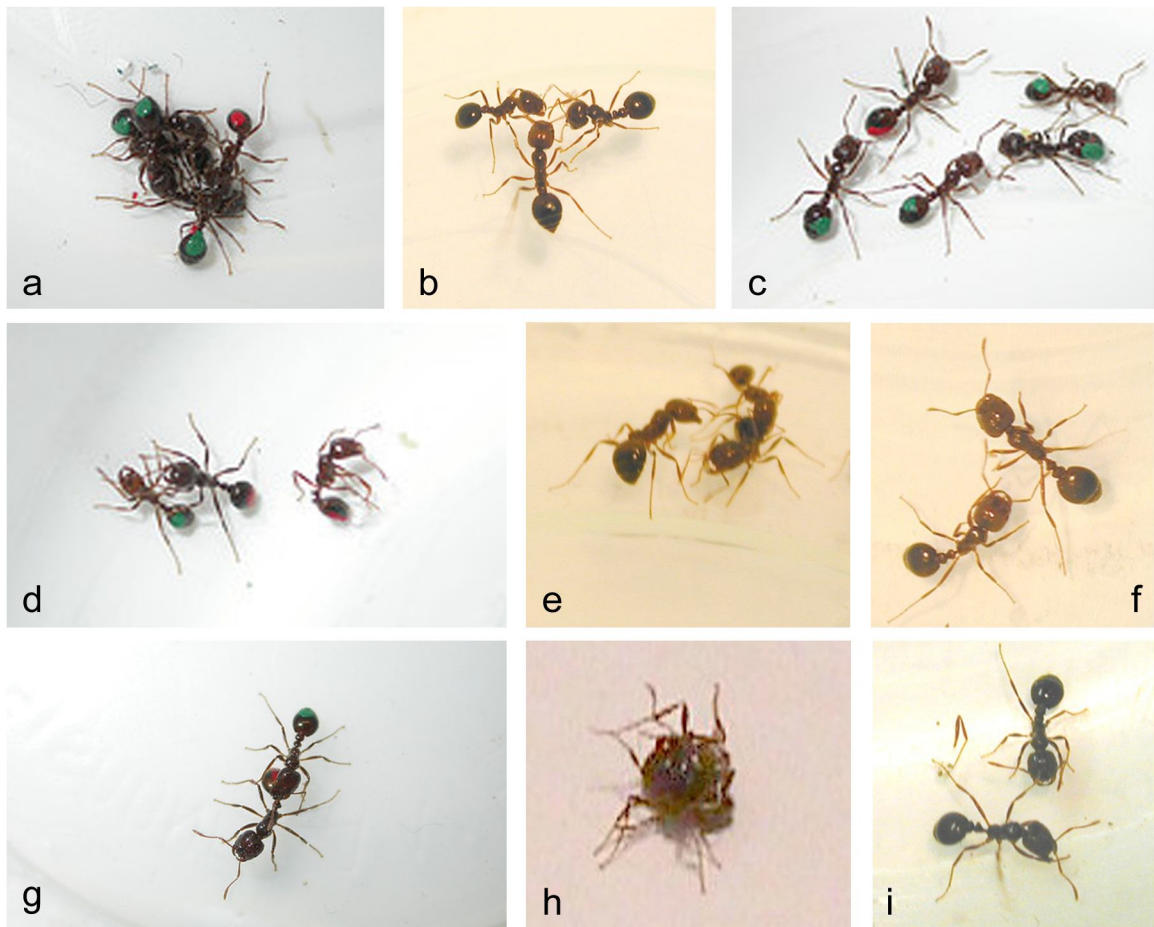


Figura 2.9. Principales conductas observadas en las obreras de *S. invicta* basadas en la Tabla 2.2. a) reposar, b) antenear, c) caminar, d) posturas estereotipadas, e) rodear, f) evitar el contacto, g) morder, h) sujetar y agujonear, i) desmembrar.

2.3 Resultados

2.3.1 Tamaño, distribución y densidad de nidos

Los nidos *M* y *P* de *S. invicta* presentaron tamaños similares ($0,0203 \pm 0,01$ y $0,0283 \pm 0,02 \text{ m}^3$ para nidos *M* y *P*, respectivamente; $F_{1, 20} = 1,70$; $p = 0,21$) tanto en Chaco como en San Javier ($F_{1, 20} = 0,08$; $p = 0,78$), por lo que la interacción FS*sitio no fue estadísticamente significativa ($F_{1, 20} = 2,23$; $p = 0,15$; Tabla 2.3). Sin embargo, la distancia entre nidos difirió significativamente entre ambas FS de *S. invicta* ($F_{1, 20} = 35,74$; $p < 0,001$), siendo la distancia relativa de cada nido *P* con su vecino más cercano significativamente menor que la distancia entre cada nido *M* y su vecino más cercano respectivo. Esta diferencia también no se mantuvo entre los sitios de muestreo ($F_{1, 20} = 4,47$; $p = 0,047$) aunque los nidos *M* y *P* de San Javier estuvieron más cercanos entre sí que los nidos *M* y *P* de Chaco. La interacción FS*sitio fue no significativa ($F_{1, 20} = 0,81$; $p = 0,38$; Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Tamaños y distancias relativas promedios (media $\pm$ DE) de los nidos de *S. invicta* discriminados por sitio de muestreo (Chaco, San Javier) y FS (*M*, *P*).

Sitio de muestreo	FS	Altura (cm) ^a	Volumen (m ³)	Dist. relativa (m)
Chaco	<i>M</i>	16,17 $\pm$ 4,20	0,026 $\pm$ 0,012	4,02 $\pm$ 1,75
	<i>P</i>	17,67 $\pm$ 7,95	0,025 $\pm$ 0,014	1,31 $\pm$ 0,48
San Javier	<i>M</i>	14,80 $\pm$ 2,95	0,015 $\pm$ 0,007	3,09 $\pm$ 1,44
	<i>P</i>	15,95 $\pm$ 4,10	0,032 $\pm$ 0,023	0,73 $\pm$ 0,34

^a Comparaciones entre sitios ($F_{1, 20} = 0,54$; $p = 0,47$), entre FS ($F_{1, 20} = 0,40$; $p = 0,54$) y en la interacción FS*sitio ($F_{1, 20} = 0,01$; $p = 0,93$).

Otra diferencia fundamental entre ambas FS de *S. invicta* se relacionó con la densidad porcentual de nidos (Tabla 2.4). Los nidos *M* presentaron en densidades 3,78 y 2,27 veces mayores que los nidos *P* ($F_{1, 20} = 28,12$; $p < 0,001$) en Chaco y en San Javier, respectivamente (Fig. 2.10). La densidad no estuvo asociada a los sitios de muestreo ($F_{1, 20} = 0,00$; $p > 0,90$) ni hubo interacción FS*sitio significativa ($F_{1, 20} = 4,25$; $p = 0,07$). También, se observó que los nidos *P* formaron enclaves dentro de las áreas ocupadas mayoritariamente por los nidos *M*.

Tabla 2.4. Densidad porcentual (%) de nidos *M* y *P* de *S. invicta* en ambos sitios de muestreo.

Sitio	Parche	FS	Nº de nidos	Nidos totales	Densidad (%)
CH	1	<i>M</i>	11	13	84,62
		<i>P</i>	2		15,38
	2	<i>M</i>	8	11	72,73
		<i>P</i>	3		27,27
	3	<i>M</i>	8	10	80,00
		<i>P</i>	2		20,00
SJ	1	<i>M</i>	16	27	59,26
		<i>P</i>	11		40,74
	2	<i>M</i>	15	19	78,95
		<i>P</i>	4		21,05
	3	<i>M</i>	7	10	70,00
		<i>P</i>	3		30,00

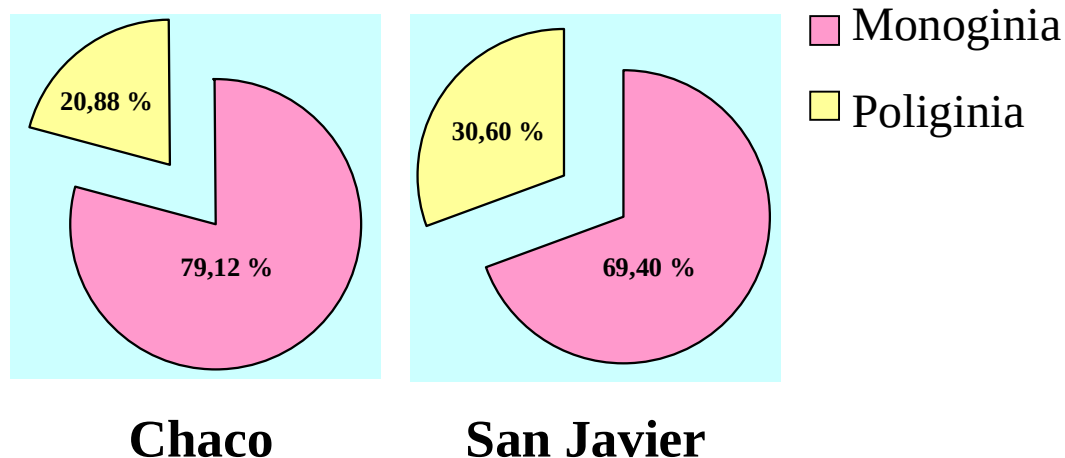


Figura 2.10. Densidad promedio porcentual (%) de los nidos *M* y *P* de *S. invicta* para ambos sitios de muestreo.

No se registraron diferencias significativas en la biomasa total de hormigas (Tabla 2.5) entre sitios de muestreo ($F_{1,20} = 3,56$; $p = 0,073$), FS de *S. invicta* ($F_{1,20} = 0,57$; $p = 0,46$) o en la interacción FS*sitio ($F_{1,20} = 0,04$; $p = 0,85$). Sin embargo, considerando el número de hormigas, a partir de la regresión peso contra número, los nidos *P* presentaron más

hormigas que los nidos *M* ($40,669 \pm 13,328$ vs. $21,645 \pm 10,825$ hormigas para nidos *P* y *M*, respectivamente; $t = 2,56$; $g.l. = 11$; $p = 0,0308$).

Tabla 2.5. Biomasa promedio total (media $\pm$ DE; g) de las hormigas colectadas por nido de *S. invicta* discriminado por sitio de muestreo y FS.

Sitio de muestreo	FS	Peso total de hormigas
Chaco	<i>M</i>	$38,51 \pm 21,13$
	<i>P</i>	$45,44 \pm 21,51$
San Javier	<i>M</i>	$26,01 \pm 17,76$
	<i>P</i>	$30,13 \pm 8,37$

2.3.2 Tasas de forrajeo, tamaño y proporción de las obreras forrajeando

2.3.2. a Tasas de forrajeo

Las obreras de *S. invicta* mostraron diferentes tasas de forrajeo ($F_{1, 20} = 74,50$; $p < 0,0001$) siendo el forrajeo de las hormigas de San Javier ($500,50 \pm 106,73$ vs. $539,33 \pm 105,29$ hormigas, para nidos *M* y *P*, respectivamente) más intenso que el forrajeo de las obreras de Chaco ($308,50 \pm 42,326$ vs. $226,33 \pm 38,344$ hormigas, para nidos *M* y *P*, respectivamente) independientemente de la FS de las mismas ($F_{1, 20} = 1,33$; $p = 0,26$). La interacción FS*sitio no fue significativa ($F_{1, 20} = 6,06$; $p = 0,02$).

2.3.2. b Tamaño y proporción de las forrajeras

Debido a que las obreras de *S. invicta* son polimórficas, se consideró el tamaño promedio general de las forrajeras y los tamaños y proporción de las diferentes subcastas involucradas en la recolección o defensa del cebo. En general, las forrajeras de San Javier presentaron un tamaño significativamente menor que las obreras de Chaco ($F_{1, 20} = 88,86$; $p < 0,001$; Tabla 2.6). También se encontraron diferencias significativas entre FS ($F_{1, 20} = 9,06$; $p = 0,0061$) y en la interacción FS*sitio ($F_{1, 20} = 5,45$; $p = 0,0283$). Por lo tanto, mientras que en Chaco las forrajeras *P* presentaron un tamaño mayor que las *M*, en San Javier el patrón se invirtió siendo las forrajeras *M* más grandes que las *P* (Tabla 2.6). Si bien las obreras *M* de Chaco y San Javier presentaron tamaños similares, las obreras *P* de Chaco fueron más grandes que las *P* de San Javier (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Tamaño promedio general (media $\pm$ DE; mm) de las forrajeras de *S. invicta* discriminado por sitio de muestreo y FS.

Sitio de muestreo	FS	Tamaño
Chaco	<i>M</i>	0,64 $\pm$ 0,02
	<i>P</i>	0,69 $\pm$ 0,02
San Javier	<i>M</i>	0,62 $\pm$ 0,03
	<i>P</i>	0,59 $\pm$ 0,02

Las hormigas *M* y *P* de *S. invicta* involucradas en el forrajeo presentaron gran variabilidad en sus tamaños porque pertenecieron a diferentes subcastas, las cuales variaron entre FS, pero no dependieron del sitio de muestreo (Tabla 2.7). Por otro lado, cada subcasta de *S. invicta* presentó diferentes proporciones independientemente de la FS o del sitio de muestreo (Tabla 2.7), por lo que se consideró un porcentaje general por subcasta de obreras. Las obreras *menores* representaron el 48,9% de las forrajeras, las *pequeñas* fueron la segunda subcasta en abundancia (30,8%), las *medianas* fueron la tercera (14%) y las *grandes* y *mayores*, que presentaron porcentajes de abundancia similares, constituyeron el 3,9 y el 1,9%, respectivamente ($F_{4, 150} = 118,4$; $p < 0,0001$; el nivel de significación es $p = 0,017$).

Tabla 2.7. Comparaciones en el tamaño y proporción de las forrajeras de *S. invicta*.

Característica	Factores	g.l.	<i>F</i>	<i>p</i>
Tamaño	Sitio	1	0,007	0,93
	FS	1	47,04	< 0,0001
	Subcasta	4	6911,39	< 0,0001
	Sitio*FS	1	0,039	0,84
	Sitio*Subcasta	4	12,76	< 0,0001
	FS*Subcasta	4	19,17	< 0,0001
	Sitio*FS*Subcasta	4	3,29	0,0132
	Residual	133		
Proporción	Sitio	1	0,02	0,90
	FS	1	0,02	0,90
	Subcasta	4	235,05	< 0,0001
	Sitio*FS	1	0,02	0,90
	Sitio*Subcasta	4	32,40	< 0,0001
	FS*Subcasta	4	15,24	< 0,0001
	Sitio*FS*Subcasta	4	7,95	< 0,0001
	Residual	135		

2.3.3 Tamaño, peso y proporción de todas las obreras presentes en el nido

2.3.3. a Tamaño de las obreras en la colonia

A nivel global, las obreras de Chaco fueron más chicas que las obreras de San Javier ($F_{1, 20} = 6,35$; $p = 0,0204$), y las hormigas *M* fueron más grandes que las hormigas *P* en ambos sitios de muestreo ($F_{1, 20} = 45,23$; $p < 0,0001$). La interacción FS*sitio fue significativa ($F_{1, 20} = 11,13$; $p = 0,0033$) ya que las hormigas *M* presentaron tamaños similares, mientras que las hormigas *P* de Chaco fueron más pequeñas que las de San Javier, por lo que la diferencia entre sitios de muestreo se asoció principalmente con la poliginia (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Tamaño promedio (media $\pm$ DE; mm) de las hormigas de *S. invicta*.

Sitio de muestreo	N (<i>n</i>) ^a	Forma Social	
		Monoginia	Poliginia
Chaco	6 (1500)	0,81 $\pm$ 0,006	0,70 $\pm$ 0,018
San Javier	6 (1500)	0,80 $\pm$ 0,041	0,73 $\pm$ 0,027

^a N indica el número de colonias muestreadas por FS y *n* el número de hormigas por colonia.

Dado que las obreras de cada subcasta presentaron tamaños promedios característicos (Tabla 2.9; $F_{4, 94} = 177,49$; $p < 0,0001$) que no difirieron entre FS de *S. invicta* ($F_{1, 94} = 2,23$; $p = 0,14$), ni entre sitios de muestreo ($F_{1, 94} = 0,68$; $p = 0,69$) o en las interacciones FS*subcasta ($F_{4, 94} = 0,50$; $p = 0,74$), FS*sitio ($F_{1, 94} = 0,77$; $p = 0,38$), subcasta*sitio ($F_{4, 94} = 0,12$; $p = 0,98$) y FS*subcasta*sitio ($F_{4, 94} = 0,14$; $p = 0,97$), se consideró un tamaño promedio general por subcasta independientemente del sitio de muestreo y FS de *S. invicta*.

Tabla 2.9. Tamaño promedio (media $\pm$ DE; mm) de las obreras de *S. invicta* discriminado por sitio de muestro, FS y subcasta.

Sitio	FS	N (<i>n</i>) ^a	Tamaño promedio por subcasta (mm)				
			<i>Ma</i>	<i>G</i>	<i>M</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>
Chaco	<i>M</i>	6 (300)	1,05 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,07	0,77 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,03
	<i>P</i>	6 (300)	1,06 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,02
San	<i>M</i>	6 (300)	1,06 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,02

Javier	P	6 (300)	1,03 ± 0,03	0,94 ± 0,01	0,73 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,52 ± 0,01
--------	---	---------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

^a N indica el número de colonias muestreadas y n el número de hormigas por subcasta.

Las obreras *mayores* presentaron un ancho de cabeza promedio de $1,05 \pm 0,06$ mm, las *grandes* midieron $0,95 \pm 0,09$ mm, las *medianas* $0,76 \pm 0,09$ mm y, las *pequeñas* y *menores* $0,63 \pm 0,07$ y $0,54 \pm 0,03$ mm, respectivamente ($F_{4,109} = 199,87$; $p < 0,0001$; Fig. 2.11; nivel de significación es $p = 0,017$).

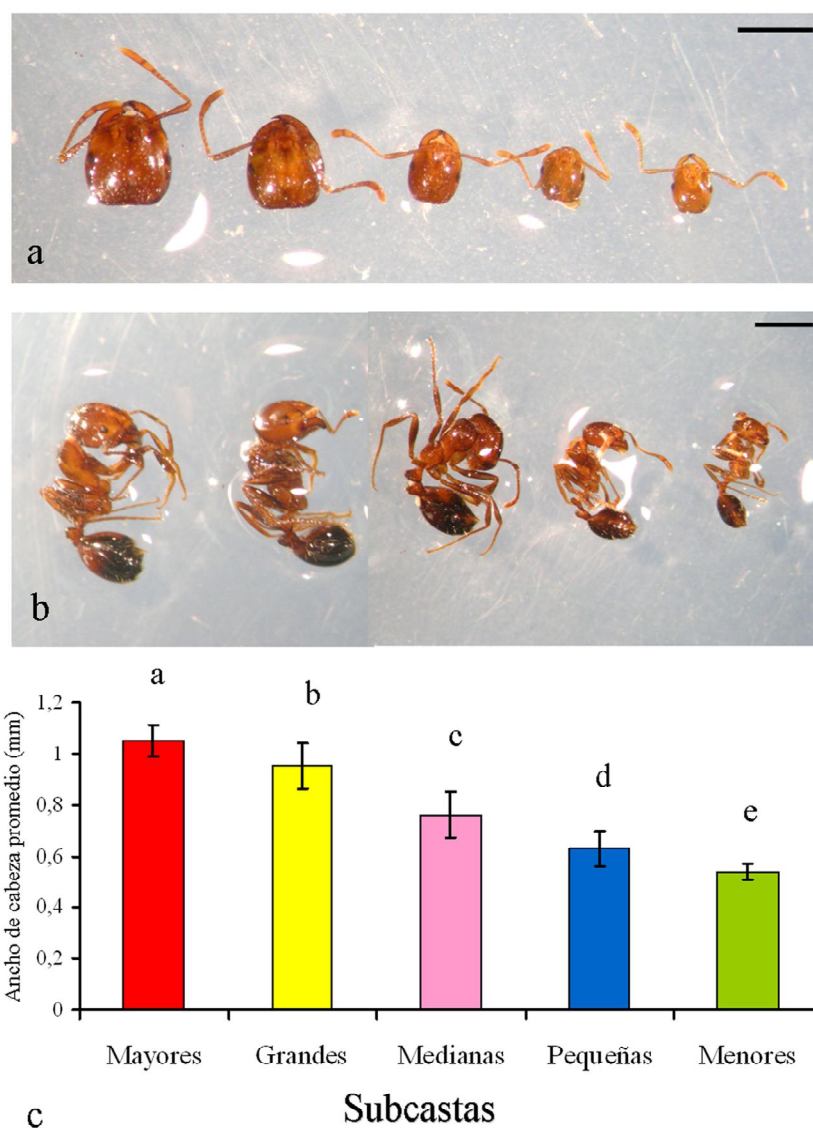


Figura 2.11. a) Vista frontal de la cabeza de las subcastas de *S. invicta*. b) Vista lateral del cuerpo. Escala: 1 mm. c) Ancho de cabeza promedio (mm). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.3.3. b *Peso de las obreras en la colonia*

Las hormigas de cada subcasta de *S. invicta* también presentaron pesos característicos ($F_{4, 94} = 192,75$; $p < 0,0001$) que no dependieron del sitio de muestreo ($F_{1, 94} = 0,40$; $p = 0,53$) o de la FS ($F_{1, 94} = 0,09$; $p = 0,92$), aunque se observaron leves diferencias en las interacciones FS*sitio ($F_{1, 94} = 4,77$; $p = 0,0315$) y FS*subcasta ($F_{4, 94} = 2,69$; $p = 0,0359$), pero las interacciones subcasta*sitio ($F_{4, 94} = 0,82$; $p = 0,51$) y FS*subcasta*sitio ($F_{4, 94} = 1,35$; $p = 0,26$) fueron no significativas (Tabla 2.10). El peso total de las obreras M de Chaco fue mayor que el de las P del mismo sitio (6,76 vs. 6,11 mg para M y P, respectivamente), pero los valores se invirtieron en San Javier siendo las hormigas P más pesadas que las M (6,32 vs. 6,89 mg para M y P, respectivamente). Considerando ambos sitios de muestreo en conjunto, el “peso umbral”¹ correspondió a las obreras grandes, por ende las mayores P fueron más pesadas que las mayores M; mientras que las obreras medianas, pequeñas y menores de los nidos M fueron más pesadas que las obreras de los nidos P (Tabla 2.10).

Tabla 2.10. Peso promedio (media $\pm$ DE; mg) estimado para las obreras de *S. invicta* discriminados por sitio de muestro, FS y subcasta.

Sitio	FS	N (<i>n</i>) ^a	Peso promedio por subcasta (mg)				
			<i>Ma</i>	<i>G</i>	<i>M</i>	<i>P</i>	<i>Me</i>
Chaco	<i>M</i>	6 (300)	2,05 $\pm$ 0,33	1,88 $\pm$ 0,51	1,08 $\pm$ 0,34	0,67 $\pm$ 0,19	0,43 $\pm$ 0,13
	<i>P</i>	6 (300)	2,80 $\pm$ 0,48	2,00 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,20	0,66 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,11
San	<i>M</i>	6 (300)	2,53 $\pm$ 0,63	2,07 $\pm$ 0,53	1,27 $\pm$ 0,23	0,62 $\pm$ 0,77	0,40 $\pm$ 0,04
Javier	<i>P</i>	6 (300)	2,48 $\pm$ 0,22	1,96 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,24	0,56 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,08

^a N indica el número de colonias muestreadas para cada FS y *n* el número de hormigas por subcasta.

Debido a que el peso de cada subcasta no dependió del sitio de muestreo o de la FS de *S. invicta* (excepto para las *menores P*), se consideró un peso promedio general para cada categoría de tamaño; por lo que las obreras *mayores* pesaron 2,48 $\pm$ 0,47 mg, las *grandes* 1,98 $\pm$ 0,37 mg, las *medianas* 1,05 $\pm$ 0,29 mg y las obreras *pequeñas* y *menores* 0,63 $\pm$ 0,13 y 0,40 $\pm$ 0,10 mg, respectivamente ($F_{4, 109} = 194,95$; $p < 0,0001$; el nivel de significación por comparaciones múltiples es $p = 0,017$).

2.3.3. c Proporción de las obreras en la colonia

Las colonias *M* y *P* presentaron diferentes proporciones de subcastas de obreras ($F_{4, 94} = 244,63$; $p < 0,0001$) cuyos porcentajes coincidieron en ambos sitios de muestreo ($F_{1, 94} = 0,05$; $p = 0,82$), siendo la interacción FS*sitio no significativa ($F_{1, 94} = 0,03$; $p = 0,96$). En ambas FS de *S. invicta*, las obreras *menores* fueron las más abundantes y la subcasta *mayores* la menos abundante, pero las colonias *M* y *P* presentaron diferencias en las tres subcastas intermedias (Tabla 2.11). Las colonias *P* presentaron porcentajes de obreras *grandes*, *medianas* y *pequeñas* cercanos al 15%; mientras que en las colonias *M* la segunda subcasta en importancia fue la de *grandes* que representó más del 20% de las obreras (Tabla 2.11). Particularmente, las colonias *M* presentaron mayor proporción de obreras *mayores* ($Z = 7,92$; $p < 0,0001$), *grandes* ($Z = 8,32$; $p < 0,0001$) y *medianas* ($Z = 4,30$; $p < 0,0001$) que las colonias *P*, una proporción similar de *pequeñas* ($Z = -0,27$; $p = 0,79$), pero una proporción significativamente menor de obreras *menores* ($Z = -14,01$; $p < 0,0001$; Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Porcentaje (%) de las subcastas de obreras en función de la FS de *S. invicta*.

Porcentaje (%) de obreras por subcasta presentes en las colonias							
FS	Ma	G	M	P	Me	$F_{4, 29}$	p
<i>Monoginia</i>	9,17 c	22,52 b	16,09 bc	16,14 bc	36,07 a	11,06	< 0,0001
<i>Poliginia</i>	6,18 c	17,79 b	13,91 b	16,29 b	45,82 a	104,67	< 0,0001
<i>M</i> vs. <i>P</i>	*	*	*	NS	*		

2.3.3. d Comparación entre forrajeras y obreras de la colonia

Dado que las forrajeras *M* y *P* de *S. invicta* no difirieron en la proporción por subcasta entre FS o sitios de muestreo (Sección 2.3.2.b), pero sí en el porcentaje de obreras dentro las colonias (Tabla 2.11), los datos de las forrajeras fueron agrupados y, se comparó cuáles subcastas fueron las más representativas dentro y fuera de las colonias. El porcentaje de las obreras que salieron a forrajear no representaron la proporción de las subcastas de la colonia (Fig. 2.12). Las obreras *menores* fueron las más abundantes dentro de las colonias, pero representaron cerca del 50% de la fuerza obrera ($F_{2, 27} = 4,21$; $p = 0,0256$). Las *pequeñas* constituyeron cerca del 15% de las obreras en las colonias *M* y *P* pero representaron cerca del 30% de las forrajeras ($F_{2, 27} = 15,25$; $p < 0,0001$). Las obreras *mayores* representaron más del 9 y 5% de las colonias *M* y *P*, respectivamente, pero conformaron menos del 2% de las forrajeras ($F_{2, 27} = 23,89$; $p < 0,0001$) y las *grandes*

que son la segunda subcasta en abundancia (Tabla 2.11) representaron en conjunto menos del 5% de las forrajeras ($F_{2, 27} = 41,16$; $p < 0,0001$). Por lo tanto, las obreras *mayores* y *grandes* parecerían estar especializadas en la defensa más que en el reclutamiento y la recolección de los ítems alimenticios ya que los cebos estuvieron aislados de parasitoides o de potenciales competidores. Las *medianas* fueron las únicas obreras en las que el porcentaje de las forrajeras fue comparable al porcentaje de las obreras presentes en la colonia ($F_{2, 27} = 2,38$; $p = 0,11$; Fig. 2.12).

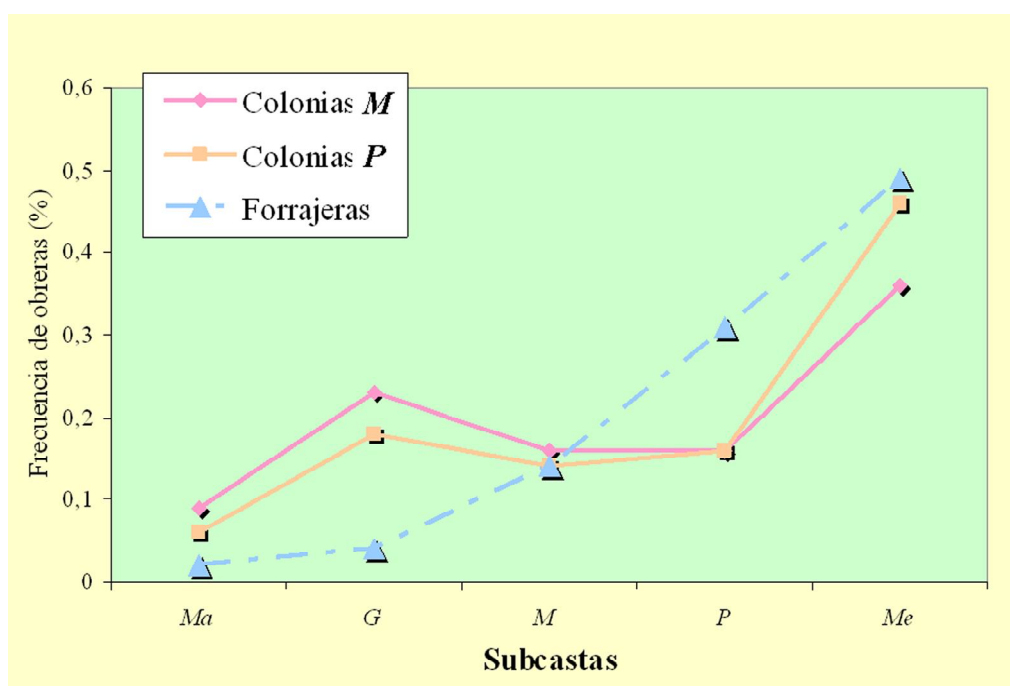


Figura 2.12. Comparación porcentual (%) entre las obreras presentes en las colonias M y P de *S. invicta* y las forrajeras de ambas FS discriminadas por subcasta. Subcastas: Ma: mayores, G: grandes, M: medianas, P: pequeñas, Me: menores.

2.3.4 Agresividad de las hormigas

2.3.4. a Agresividad Cualitativa (a campo)

La principal conducta observada en los tratamientos control fue caminar; mientras que en los experimentales se registró mayor diversidad de comportamientos. En general las obreras P no fueron agresivas frente a obreras foráneas pertenecientes al nido más cercano ubicado a aproximadamente 1 m de distancia de cada nido polidómico (Fig. 2.4; Tabla 2.12); en cambio, las obreras de nidos M mostraron diferentes conductas agresivas

mordiendo y aguijoneando a las demás obreras, aunque algunas vibraron sus gásteres mientras los mantenían en alto (Tabla 2.12).

Tabla 2.12. Conductas observadas en las interacciones entre hormigas de distintos nidos. Se indica la presencia y ausencia de agresividad para los distintos tratamientos.

Sitio	Nido	Comportamiento principal ^a	Porcentaje de comportamiento (%) ^b	Agresión	Posible forma social
Chaco	1	caminar	86,67	No	Poliginia
	2	morder-aguijonear	66,67	Si	Monoginia
	3	morder-aguijonear	100	Si	Monoginia
	4	antenear	93,33	No	Poliginia
	5	caminar	100	No	Poliginia
	6	vibrar el gáster	46,67	Si	Monoginia
	7	tirar miembros	46,67	Si	Monoginia
	8	reposar en grupo	76,67	No	Poliginia
	9	reposar	50,00	No	Poliginia
	10	caminar	70,00	No	Poliginia
	11	tirar miembros	40,00	Si	Monoginia
	12	desmembrar- hormigas muertas	60,00	Si	Monoginia
San Javier	1	morder-aguijonear	76,67	Si	Monoginia
	2	caminar	66,67	No	Poliginia
	3	hormigas muertas	46,67	Si	Monoginia
	4	reposar	66,67	No	Poliginia
	5	caminar	83,33	No	Poliginia
	6	antenear	50,00	No	Poliginia
	7	morder	33,33	Si	Monoginia
	8	tirar miembros	70,00	Si	Monoginia
	9	reposar	63,33	No	Poliginia
	10	caminar	73,33	No	Poliginia
	11	vibrar el gáster	53,33	Si	Monoginia
	12	morder	60,00	Si	Monoginia

^a Se indica el principal comportamiento observado en los tratamientos experimentales.

^b Se indica el porcentaje del comportamiento más frecuentemente observado de cada interacción.

2.3.4. b Agresividad Cuantitativa (en laboratorio)

El tipo de comportamiento dependió de la FS de las hormigas en interacción ($F_{3, 130} = 355,21$; $p < 0,0001$), aunque no del sitio de colecta ($F_{1, 130} = 0,03$; $p = 0,95$) ni de la

interacción FS*sitio ($F_{3, 130} = 1,33$; $p = 0,27$). Por lo tanto, el comportamiento de las obreras frente a coespecíficas ajenas al nido fue un indicador etológico confiable para caracterizar la FS de *S. invicta* (Fig. 2.13). Las obreras *M* siempre fueron agresivas frente a coespecíficas ajenas a su colonia, independientemente de la FS de las mismas (Fig. 2.13). Las obreras *P* presentaron conductas más versátiles, distinguieron a las obreras de sus propios nidos de las obreras foráneas y fueron menos agresivas frente a otras hormigas *P* porque prefirieron evitar el contacto físico antes que pelear. Sin embargo, las interacciones *M-P* presentaron niveles de agresividad cercanos a 5 (Fig. 2.13).

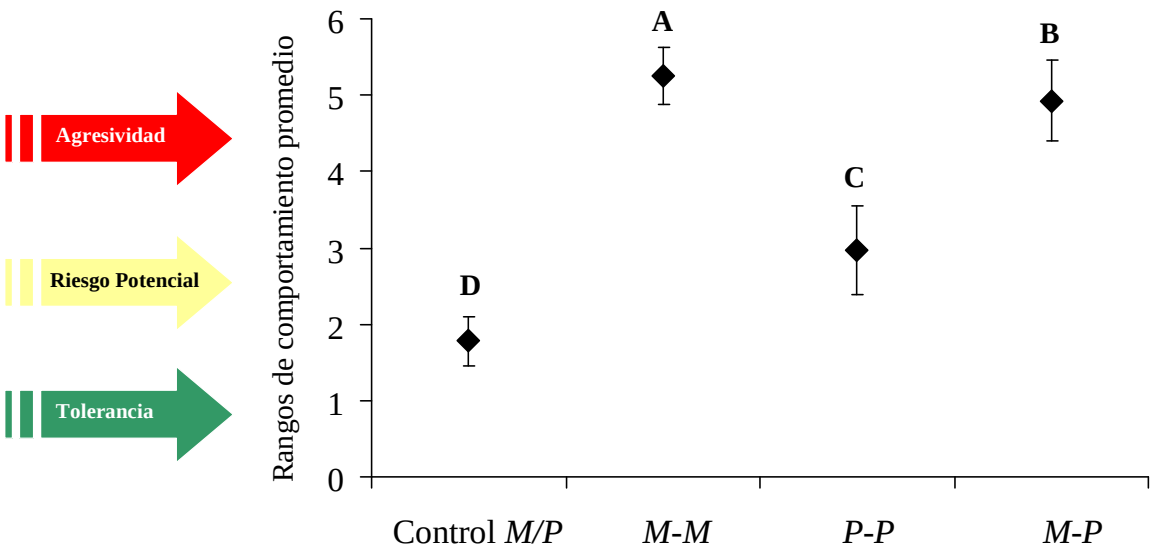


Figura 2.13. Rangos de comportamiento observados (media $\pm$ DE) en las interacciones entre hormigas *M* y *P* de *S. invicta* ($F_{3, 134} = 354,847$; $p < 0,0001$; el nivel de significación por comparaciones múltiples es de 0,017). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Datos basados en la Tabla 2.2.

En las interacciones *M-M* predominaron los encuentros agresivos (Tabla 2.13; Fig. 2.14). Mientras que, entre las hormigas *P* prevalecieron las interacciones de riesgo potencial, aunque se registraron algunas interacciones de tolerancia (Tabla 2.13). En las interacciones *M-P*, se observaron porcentajes similares de comportamientos agresivos y de riesgo potencial (Tabla 2.13).

Tabla 2.13. Comparación porcentual (N, %) del tipo de comportamiento observado en las interacciones entre hormigas *M* y *P* de *S. invicta*.

Categoría	Interacciones entre obreras Monogínicas		Interacciones entre obreras M y P		Interacciones entre obreras Poligínicas	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%

Tolerancia	0	0	4	7,41	6	20,00
Riesgo Potencial	4	13,33	23	42,59	24	80,00
Agresividad	26	86,67	27	50,00	0	0

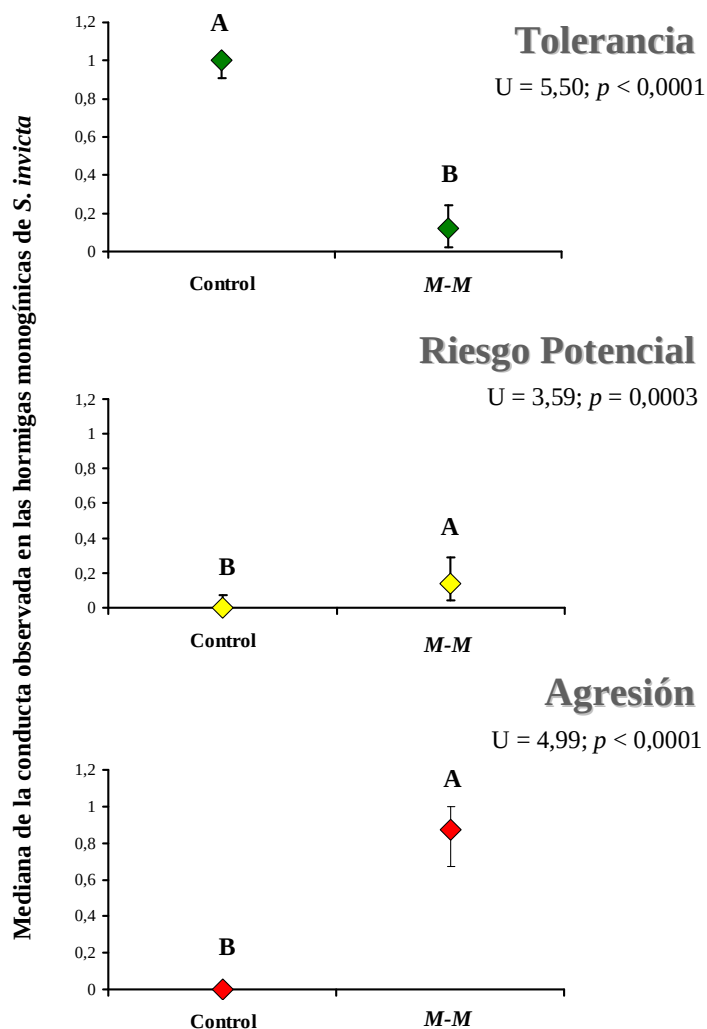


Figura 2.14. Comparación en los patrones de conducta observados (mediana; q1-q3) en las interacciones entre hormigas monogínicas de *S. invicta*, discriminadas para cada categoría de comportamiento, en comparación con los tratamientos control. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.3.4. c Comportamiento de agresividad entre FS (M vs. P)

Las interacciones agresivas entre hormigas *M* y *P* comenzaron mediante anteneos de las hormigas *M* sobre el gáster y cabeza de las hormigas *P* (Fig. 2.15 a-b), a las que rodearon y cercaron (Fig. 2.15 c-d) hasta que finalmente mordieron de modo continuo o intermitente el post-pecíolo de las hormigas agredidas (Fig. 2.15 d-f). En general, las hormigas *P* permanecieron pasivas frente a la agresividad recibida.

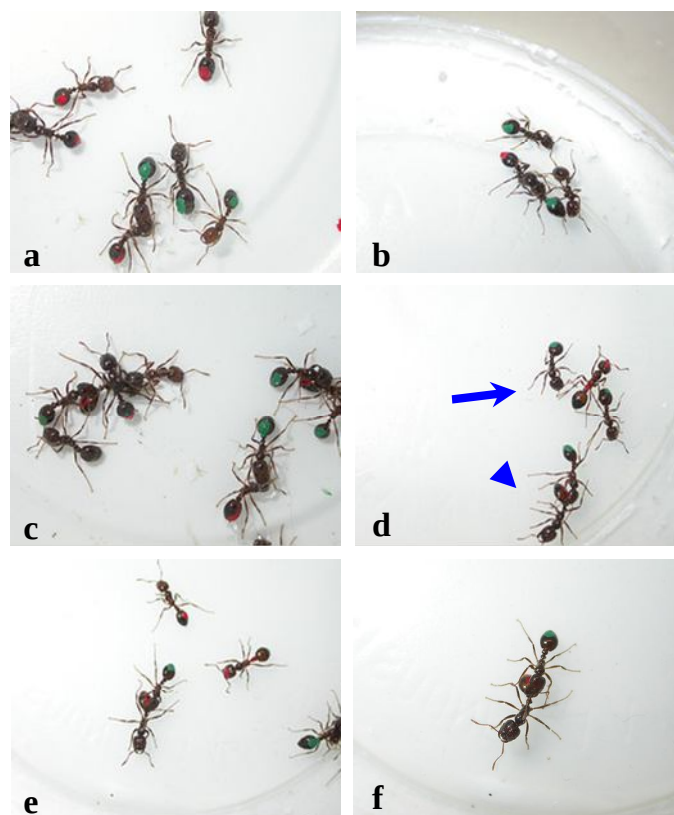


Figura 2.15. Conductas observadas en las interacciones entre ambas FS de *S. invicta*. Las obreras *M* (verde) antenean (a-b), rodean (c-d) y muerden (f) a las obreras *P* (rojo), que no reaccionan agresivamente al contacto. La flecha señala a dos hormigas *M* rodeando a una obrera *P*. La punta de flecha señala a una obrera *M* mordiendo el post-pecíolo de una obrera *P*.

De todas las interacciones *M-P*, las interacciones de Tolerancia se debieron a una mutua² aceptación luego del reconocimiento inicial (Tabla 2.14; Fig. 2.16a). En las interacciones de Riesgo Potencial, las obreras *M* y *P* evitaron el contacto directo (Tabla 2.14), aunque presentaron sus mandíbulas abiertas y se acecharon (Figs. 2.9e-f y 2.16b). Las interacciones de Agresividad dependieron exclusivamente de las obreras *M*, si bien algunas obreras *P* reaccionaron agresivamente (Tabla 2.14; Fig. 2.16c).

Tabla 2.14. Comparación porcentual (%), N) del comportamiento iniciado primero por las hormigas *M* o *P* de *S. invicta*. Se indica la FS que inicia la interacción. *M-P* indica que ambas FS mostraron el mismo comportamiento en simultáneo.

Categoría	M-P	N	M hacia P	N	P hacia M	N
Tolerancia	100	4	0	0	0	0
Riesgo potencial	56,52	13	26,08	6	17,39	4
Agresividad	22,22	6	51,85	14	25,93	7

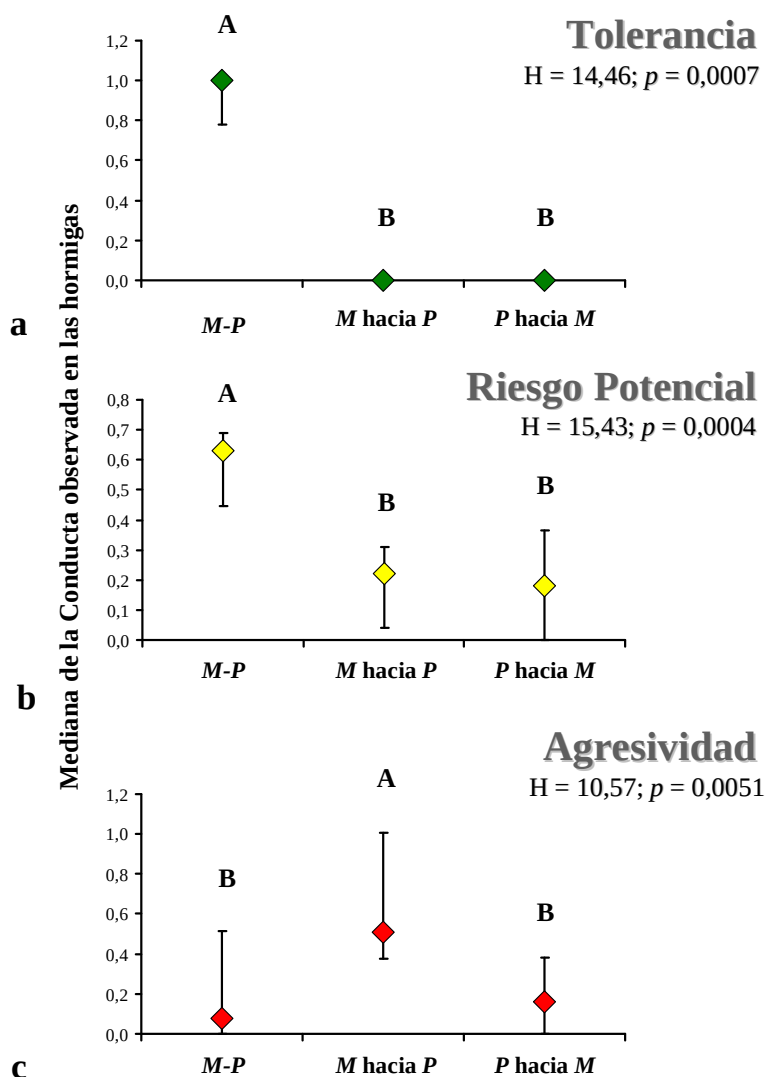


Figura 2.16. Comparación en los patrones de conducta observados (mediana; q1-q3) en las interacciones entre las hormigas *M* y *P* de *S. invicta* discriminadas por categoría de comportamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.4 Discusión

En este capítulo se describieron dos poblaciones naturales de la hormiga brava *S. invicta*, compuestas por nidos monogínicos (*M*) y poligínicos (*P*) en simpatría, en las que se consideraron sus características ecológicas, morfométricas y comportamentales. Ambas FS pudieron ser caracterizadas a campo midiendo la distancia mínima entre nidos y sus densidades relativas y, en el laboratorio, por el tamaño promedio de las hormigas, la proporción relativa de las diferentes subcastas de obreras y por el nivel de agresividad frente a coespecíficas ajenas al nido. La FS de *S. invicta* también pudo ser tipificada por el comportamiento de las hormigas en arenas de interacción simétricas.

A pesar de que los nidos *M* y *P* presentaron tamaños similares (Tabla 2.3), los nidos *P* se dispusieron mucho más cercanos entre sí que los nidos *M* (Tabla 2.3) y representaron entre el 20-30% de todos los nidos muestreados (Tabla 2.4; Fig. 2.10). Además, las colonias de ambas FS presentaron biomásas de hormigas similares (Tabla 2.5). Todos los nidos muestreados tenían como mínimo 2 años de establecidos (Markin *et al.* 1973; Tschinkel 1988b, 1993) y presentaron un volumen promedio de $0,025 \pm 0,014 \text{ m}^3$, un diámetro cercano a 80 cm, castas sexuadas, obreras de un tamaño promedio mayor a 0,70 mm y obreras *mayores* que representaron más del 5% de toda la fuerza obrera (Fig. 2.11; Tabla 2.11).

Es posible que los nidos *P* presenten mayor tasa reproductiva que los nidos *M* por poseer varias reinas funcionales y, por lo tanto, desarrollar mayor número de obreras de menor tamaño para cubrir el mismo volumen que los nidos *M* (Tablas 2.5 y 2.11). Además, se encontró que las hormigas *M* y *P* de Chaco fueron más grandes (Tabla 2.6) y presentaron tasas de forrajero significativamente menores que las obreras *M* y *P* de San Javier (Sección 2.3.2.a). Las diferencias entre FS y sitios de muestreo puede determinar que el área ocupada por los nidos de *S. invicta* dependa más del número de hormigas presentes que del tamaño de las mismas, tal como ocurre en áreas de los Estados Unidos (Tschinkel *et al.* 1995); sin embargo, el número y tamaño de las hormigas también depende de la época reproductiva y de la edad de la colonia (Tschinkel 1993, 1998; Adams y Tschinkel 2001). Es probable que la proporción y el tamaño de las subcastas de obreras determinen una relación de compromiso en ambas FS de *S. invicta* ya que no importa el sitio de origen, sino cómo las colonias alocan la energía en las distintas subcastas hasta alcanzar la madurez.

Si bien las colonias *P* presentaron hormigas más pequeñas y livianas que las colonias *M* (Greenberg *et al.* 1985; Porter 1992; Goodisman *et al.* 1999), este es el primer trabajo en el que se evaluó cómo se distribuyen los porcentajes de las diferentes subcastas de obreras entre ambas FS de *S. invicta*. Las colonias *M* presentaron mayor porcentaje de obreras de las 3 subcastas de mayor tamaño y mostraron un porcentaje significativamente menor de la subcasta *menores* que las colonias *P* (Tabla 2.11). Además, debido a que las obreras *pequeñas* y *menores* son las obreras más representativas en los cebos en ausencia de competidores se puede determinar que están especializadas en forrajear (Fig. 2.13; Tablas 3.3 y 4.3). Por la proporción de forrajeras presentes y por el comportamiento de las hormigas a campo, también se deduce que las obreras *mayores* y *grandes* estarían especializadas en proteger y defender al cebo o nido, ya que aunque representaron entre el 6-22% de todas las obreras (Tabla 2.11) constituyeron menos del 5% de las forrajeras. Por lo tanto, que las obreras *pequeñas* y *menores* sean las típicas forrajeras (Fig. 2.12) puede indicar un ajuste de la colonia frente al parasitismo por fóridos al liberar a obreras de menor tamaño (Tablas 3.3 y 4.3; Folgarait y Gilbert 1999) que son mas baratas de producir o que no son los hospedadores adecuados para la mayoría de los parasitoides.

La habilidad de poder reconocer lo propio de lo ajeno es una característica básica fundamental para la integridad de las colonias de los insectos sociales (Hölldobler y Wilson 1990) y ambas FS de *S. invicta* discriminaron entre obreras compañeras y ajenas al nido presentando diferentes tipos de comportamiento en el campo (Tabla 2.12) y en el laboratorio (Fig. 2.13). En este trabajo se describió por primera vez que las obreras *P* reconocieron y discriminaron a coespecíficas *M* y *P* ajenas al nido al exhibir comportamientos agresivos o de riesgo potencial, respectivamente (Fig. 2.13; Tablas 2.13 y 2.14). Por lo tanto, las hormigas *P* no agredieron a obreras provenientes de otras colonias *P* al buscar evitar el contacto directo. Por otra parte, las hormigas *M* siempre fueron agresivas frente a otras obreras independientemente de sus FS (Figs. 2.13 y 2.14; Tabla 2.13) y, en presencia de hormigas *P*, las rodearon y agredieron luego del reconocimiento inicial (Fig. 2.15). En conclusión, como el comportamiento de las obreras fue un buen indicador etológico de la FS de las hormigas, el etograma propuesto fue otro factor efectivo para caracterizar a las colonias *M* y *P* de *S. invicta*, además de considerar el tamaño promedio de las obreras, la densidad o la distancia entre nidos (Greenberg *et al.* 1985; Ross *et al.* 1987b, 1997; Trager 1991; Porter 1992, 1993; Tschinkel *et al.* 1995; Adams 1998, 2003; Goodisman *et al.* 1999; Adams y Tschinkel 2001).

El etograma propuesto (Tabla 2.2; Fig. 2.9) es útil para caracterizar a campo y rápidamente ambas FS de *S. invicta* debido a la conducta diferencial de las obreras *M* y *P* frente a coespecíficas pertenecientes al nido más cercano (Tabla 2.12). También, a diferencia de los etogramas previamente realizados sobre ambas FS de *S. invicta* (Morel *et al.* 1990; Obin *et al.* 1993; Balas y Adams 1996a; Vander Meer y Alonso 2002; Fritz y Vander Meer 2003; Vander Meer *et al.* 2008), el aquí propuesto tiene la ventaja de evaluar el comportamiento de las hormigas en arenas neutrales para evitar conductas asociadas con la defensa del territorio o del nido porque las hormigas suelen evitar las áreas de forrajeo de los nidos vecinos (Adams 1998, 2003; Adams y Tschinkel 2001). Además, en el laboratorio, se corroboró el etograma contando el número de reinas funcionales de las colonias *P* y por PCR-múltiple de las colonias *M* al caracterizar el alelo *B* (Tabla 2.16). La clasificación *a posteriori* de la FS de las colonias muestreadas coincidió en todos los casos excepto para una colonia en la que se colectó una reina pero no se pudo amplificar el alelo *b* (colonia 5 de San Javier, Tabla 2.16). Finalmente, se propone usar el etograma de la Tabla 2.2 en función del siguiente protocolo para determinar la FS de *S. invicta*, sin alterar, destruir o excavar los nidos a muestrear.

Protocolo para determinar a ambas formas sociales de las hormigas *Solenopsis*:

1. Colectar 20-50 obreras del mismo tamaño por colonia con pinzas e introducirlas en un recipiente plástico limpio con las paredes cubiertas con Fluon.
2. Pintar los gásteres de las hormigas para determinar la identidad de cada colonia.
3. Mantenerlas separadas por 30 min. antes de realizar las observaciones.
4. Seleccionar 4 hormigas por colonia (2 colonias por vez) e introducirlas en la arena de ataque (con las paredes cubiertas con Fluon). Seleccionar a las colonias al azar.
5. Registrar las interacciones observadas cada 30 seg. durante 10 min.
6. Usar cada arena una única vez para evitar comportamientos por habituación.
7. Repetir los pasos 4 a 6 para cada par de comparaciones.
8. Contar la frecuencia de los comportamientos observados (rangos 1-6, Tabla 2.2).
9. Calcular el valor medio de los comportamientos observados en cada interacción para obtener los rangos de comportamiento promedio.
9. a Si los valores de comportamiento promedio se encuentran entre los rangos 3-5, las hormigas de ambas colonias en interacción son poligínicas.

9. b Si los valores de comportamiento promedio son iguales o mayores a 5, registrar la colonia que inicia la agresión.

9. b1 Si las hormigas de ambas colonias inician la agresión con frecuencias similares, ambas colonias son monogínicas.

9. b2 Si las hormigas de una colonia agraden vigorosamente a las hormigas de la otra colonia (que son mayormente pasivas) e inician la mayoría de los ataques, esa colonia es monogínica; mientras que la colonia que recibe pasivamente la agresión es poligínica.

Para evaluar la eficiencia de este protocolo queda por analizar a campo el comportamiento de las hormigas, sobre todo en las poblaciones introducidas en otros países, para confirmar o refutar la generalidad del comportamiento agresivo y permisivo de las hormigas *M* y *P* de *S. invicta*, respectivamente.

Tabla 2.16. Características registradas en el laboratorio para caracterizar a ambas FS de *S. invicta*, número de reinas por colonia, amplificación del alelo *B* por PCR-múltiple y comportamiento de las obreras.

Sitio	Nido	Nº de reinas	PCR	FS por comportamiento ^a
Chaco	1	2 (<i>P</i>)		Poliginia
	2	0	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	3	1	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	4	2 (<i>P</i>)		Poliginia
	5	5 (<i>P</i>)		Poliginia
	6	1	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	7	1	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	8	3 (<i>P</i>)		Poliginia
	9	3 (<i>P</i>)		Poliginia
	10	2 (<i>P</i>)		Poliginia
	11	0	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	12	0	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
San Javier	1	0	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	2	3 (<i>P</i>)		Poliginia
	3	1	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	4	2 (<i>P</i>)		Poliginia
	5	1 ^b		Poliginia
	6	2 (<i>P</i>)		Poliginia
	7	1	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
	8	0	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia

9	2 (<i>P</i>)		Poliginia
10	3 (<i>P</i>)		Poliginia
11	0	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia
12	0	1 banda (<i>M</i>)	Monoginia

^a La forma social se determinó con el etograma de la Tabla 2.2.

^b No se pudo amplificar el alelo *b* por PCR-múltiple, aunque el nido era polidómico (4 montículos).

2.5 Conclusiones

- Se puede caracterizar a las colonias monogínicas y poligínicas de *Solenopsis invicta* a campo comparando la distancia mínima entre nidos y su densidad.
- Las colonias de *S. invicta* presentan 5 subcastas de obreras de tamaños y pesos característicos.
- Las obreras de colonias monogínicas son, en promedio, de mayor tamaño que las obreras de colonias poligínicas porque presentan mayor porcentaje de obreras *mayores, grandes y medianas*, pero menor porcentaje de obreras *menores* que las colonias poligínicas.
- Las colonias de ambas formas sociales de *S. invicta* presentan una relación de compromiso entre tamaño y número de obreras. Por lo que las colonias poligínicas poseen mayor cantidad de obreras pero de menor tamaño que las colonias monogínicas.
- Las formas sociales de *S. invicta* pueden ser caracterizadas por el comportamiento de las hormigas.

Capítulo 3

Características en el desarrollo y comportamiento de *Pseudacteon curvatus* *

1.3 Introducción

Pseudacteon curvatus es una de las especies de pequeño porte que ovipone principalmente a las obreras de menor tamaño de *S. invicta* y *S. richteri* (Morrison et al. 1997; Morrison y Gilbert 1998; Wuellner et al. 2002) y es una de las más abundantes y ampliamente distribuida en Sudamérica (Calcaterra et al. 2005; Folgarait et al. 2005a). Los distintos biotipos argentinos de *P. curvatus*, liberados en varios estados Norteamericanos para ser usados como agentes de control biológico contra las hormigas *Solenopsis* nativas de Sudamérica y plagas en Estados Unidos (Porter 2000), presentan diferente especificidad hospedera (Graham et al. 2003; Vazquez et al. 2004; Vogt y Streett 2003; Thead et al. 2005; Estrada et al. 2006). El ecotipo proveniente de la Provincia de Buenos Aires muestra una alta preferencia por *S. richteri* y por los híbridos *S. richteri* x *S. invicta* (Porter y Briano 2000; Graham et al. 2003; Thead et al. 2005); mientras que los parasitoides provenientes de Formosa prefieren atacar a las poblaciones introducidas de *S. invicta* (Vazquez et al. 2004). Dadas estas diferencias de los biotipos de *P. curvatus* por diferentes especies hospederas, es muy probable que la FS de *Solenopsis* sea otro factor importante para investigar la historia de vida de estos parasitoides. Como la FS de *S. invicta* afecta la proporción de las diferentes subcastas de obreras (Tabla 2.11; Wood y Tschinkel 1981; Porter y Tschinkel 1985; Tschinkel et al. 2003), el tamaño promedio de las mismas (Tabla 2.8; Greenberg et al. 1985) y sus niveles de agresividad (Fig. 2.13; Keller y Ross 1998; Bourke 2002; Deheer 2002), en este capítulo se evaluó si la organización social de *S. invicta* tiene relevancia de sobre el éxito reproductivo, desarrollo y supervivencia de *P. curvatus*.

En base a lo expuesto, se predice que *P. curvatus* podría desarrollarse mejor y ser mas exitosa al oviponer a hormigas poligínicas que presentan, en promedio, hormigas más pequeñas, mayor porcentaje de obreras “*menores*” pero menor porcentaje de obreras *grandes*, *medianas* y *pequeñas* que las colonias monogínicas (Tabla 2.11). Se detallan a continuación los objetivos específicos de este capítulo.

Objetivos

- 1) Evaluar a campo el efecto de *P. curvatus* sobre ambas FS de *S. invicta*, considerando:

- Número de oviposiciones realizadas y tiempos de orientación
- Efecto sobre el comportamiento de las forrajeras
- Efecto sobre el tamaño promedio de las forrajeras
- Efecto sobre la proporción de las forrajeras.

2) Evaluar en laboratorio el desarrollo y éxito reproductivo de *P. curvatus* sobre ambas FS de *S. invicta*, considerando:

- Tamaños de obreras elegidos para oviponer
- Periodos de desarrollo de la progenie
- Características de los adultos emergidos
- Eficiencias en el desarrollo.

Materiales y métodos

3.3.1 Sitio de muestreo y colección

Los experimentos fueron realizados entre febrero y octubre de 2005 en el Parque Nacional Chaco (26° 48' Sur y 59° 34' Oeste), Provincia de Chaco, Argentina (Fig. 2.1). Las hembras de *P. curvatus* fueron colectadas e identificadas a campo con lupa de mano (20X) según la clave de Porter y Pesquero (2001), colocadas en tubos de plástico individuales a baja temperatura y usadas dentro de las 48 h de su recolección. Los especímenes de *P. curvatus* y de *S. invicta* fueron depositados en la colección de la Dra. Folgarait en el Centro de Estudios e Investigaciones en la Universidad Nacional de Quilmes (Buenos Aires, Argentina) y en el Museo de Historia Natural Bernardino Rivadavia. Seis nidos por FS, con 3 réplicas cada uno, fueron usados para las observaciones a campo y en laboratorio. Todas las mediciones de hormigas y fóridos fueron hechas en un microscopio estereoscópico Nikon modelo SMZ-1 ESD (30 aumentos) con un ocular micrométrico calibrado con incrementos de 0,03 mm.

3.3.2 Oviposiciones y tiempos de orientación de *P. curvatus* a campo

Para evaluar las preferencias de oviposición de *P. curvatus* sobre ambas FS de *S. invicta*, se liberó una hembra sobre el cebo luego de haberse establecido el sendero de forrajeo. Para establecer un camino de alimentación desde el nido al cebo se colocó $1,5 \pm 0,06$ g de atún a 20 cm. de cada nido y se permitió que las hormigas forrajearan durante 45 min. Las hormigas y

cebos fueron aislados con túneles de acrílico transparente (Fig. 2.5) para evitar interacciones con posibles enemigos naturales o con especies de hormigas competidoras. Para este experimento se consideró el tiempo de orientación (tiempo invertido en detectar a las hormigas y empezar a oviponer) y el número de ataques (“oviposiciones”) realizados durante los primeros 15 min. Posteriormente, la hembra de *P. curvatus* fue recapturada y se colectó una muestra de hormigas al azar (50-150 obreras) sobre o cerca del cebo. Si el fórido no ovipuso dentro de los 10 min. se lo reemplazó por otro y si fue capturado por las hormigas se descartó la medición.

Análisis estadísticos. Los tiempos de orientación y el número de oviposiciones realizados por *P. curvatus* sobre ambas FS de *S. invicta* fueron promediados y analizados mediante la prueba T de Student debido a que los datos estuvieron normalmente distribuidos. Se comparó la relación entre el número de “ataques” realizados por el parasitoide y sus tiempos de orientación, y entre el número de ataques y el número de hormigas presentes mediante una regresión lineal.

3.3.3 Efecto de *P. curvatus* en la tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*

Se evaluaron las tasas de forrajeo, los tamaños y la proporción de forrajeras sobre ambas FS de *S. invicta* antes (“sin”) y después (“con”) de liberar una hembra de *P. curvatus* mediante el siguiente procedimiento. Luego de establecer el camino de alimentación desde cada nido, se permitió que las hormigas forrajeen por 45 min. y se determinó la tasa de forrajeo contando el número de obreras que pasaron por el mismo punto durante 5 min. ininterrumpidos. Luego, se colectó una muestra al azar de 50-150 individuos, los cuales fueron medidos y separados por tamaño. Posteriormente, para evaluar el efecto del parasitoide sobre el tamaño y la proporción de las obreras, se permitió restablecer el forrajeo por 10 min. y se liberó una hembra de *P. curvatus* a la que se le permitió oviponer por 10 min. (Sección 3.2.2). A continuación, la hembra fue recapturada y se colectó otra muestra de hormigas al azar (50-100 individuos) sobre o cerca del cebo. Se muestrearon 6 nidos por FS, con 3 mediciones por nido, en ausencia (“sin”) y en presencia (“con”) de los parasitoides. Cada parasitoide fue usado una sola vez.

Al finalizar las observaciones a campo, los nidos fueron excavados y las hormigas separadas de la tierra mediante goteo continuo. En el laboratorio las mismas fueron separadas en 5 subcastas de obreras (*mayores, grandes, medianas, pequeñas y menores*) (Sección 2.2.6).

Análisis estadísticos. Las comparaciones en las tasas de forrajeo por FS fueron hechas usando la prueba T de Student dado que los datos estuvieron normalmente distribuidos. Los tamaños promedio de las forrajeras en ausencia ("sin") y en presencia ("con") de *P. curvatus* fueron analizados con la prueba T de Student para medidas pareadas. La proporción de obreras por subcasta involucradas en el forrajeo o defensa del cebo fueron analizados mediante el análisis de Proporciones.

3.3.4 Evaluación de las obreras seleccionadas, periodos de desarrollo de los parasitoides, características de los adultos emergidos y eficiencias en el desarrollo de *P. curvatus* en ambas FS de *S. invicta*

Se evaluó en el laboratorio si los tiempos de desarrollo y el tamaño de los parasitoides variaron en relación con los tamaños y FS de las obreras de *S. invicta* elegidas. Este ensayo consistió en introducir en cada bandeja de vuelo igual cantidad de obreras *grandes*, *medianas* y *pequeñas* (667 hormigas por categoría) y de 3-6 hembras de *P. curvatus* ($4,33 \pm 1,33$ hembras), a las que se les permitió oviponer por 2 h. Las obreras *mayores* y *menores* fueron descartadas debido a que *P. curvatus* no las ovipone preferentemente (Morrison *et al.* 1997; Chirino *et al.* 2004).

Para mantener la humedad superficial, las bandejas de vuelo (45 x 35 x 25 cm.) presentaron en la base una capa de yeso de 2 cm. de profundidad (SEMIROCK, Synthetic Dental Hard Plaster). Para evitar que las hormigas trepen y se escapen, las paredes estuvieron cubiertas con un antideslizante (politetrafluoroetileno, Extol, PA) (Fig. 3.1). Para evitar que los parasitoides se escapen y para conservar la T° interna constante, las bandejas fueron cubiertas con una tapa de vidrio. Para proveer de comida y apoyo a los parasitoides, se colocó un gajo de *Manihot flabellifolia* Pohl (falso cafeto) que posee nectarios extraflorales. Finalmente, para promover el forrajeo de las hormigas se colocó agua y solución azucarada al 50% en recipientes plásticos. Las bandejas fueron iluminadas con luces de 500 watts de potencia y los ensayos de oviposición fueron conducidos a una temperatura ambiente promedio de $25 \pm 5^\circ\text{C}$.



Fig. 3.1. Bandeja de vuelo en la que se observa el gajo de falso cafeto y los recipientes plásticos con agua y solución azucarada al 50%.

Las hormigas “atacadas” se mantuvieron por 35 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 12:12 (L:O) y a $80 \pm 10\%$ HR. Las hormigas fueron alimentadas cada 2 días con solución de azúcar al 50%, tubos de agua potable y 3 grillos o zofobas frescos. Las mismas fueron revisadas a diario hasta observar la formación de pupas; las que fueron separadas, medidas (ancho de la cabeza a la altura de los ojos) y observadas por 45 días hasta la emergencia de los adultos; los cuales fueron sexados y medidos (ancho máximo del pronoto).

Análisis estadísticos. Se comparó el tamaño promedio de las obreras parasitadas de diferente FS con la prueba T de Student. El tamaño de las cabezas viables e inviables fueron comparados por FS con la prueba T de Student. El tamaño de los adultos emergidos fue analizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (sexo, FS). Para controlar el error global de tipo I en las comparaciones múltiples entre los tamaños de cabezas de hormigas elegidas por *P. curvatus* y el de los adultos emergidos se usó el método secuencial de Bonferroni ($p < 0,017$). Los periodos de desarrollo de *P. curvatus* criados sobre colonias *M* y *P* fueron analizados con la prueba de Mann-Whitney porque los datos no estuvieron normalmente distribuidos (Daniel 1990). Se comparó la proporción de sexos de los adultos emergidos sobre ambas FS de *S. invicta* con la distribución de probabilidad Binomial. Se calculó la supervivencia de pupas como el cociente “adultos emergidos por pupas formadas”. Las eficiencias en el desarrollo fueron analizadas dividiendo “número de pupas (adultos) por hembra que atacó”. Estos cocientes fueron analizados con el análisis de Proporciones. Los análisis fueron realizados con el programa Statview (SAS Institute Inc. 1998, Cary, NC).

3.3. Resultados

3.3.1 Oviposiciones y tiempos de orientación a campo

Pseudacteon curvatus presentó tiempos de orientación más cortos y mayor número de oviposiciones cuando atacó a las obreras *M* en comparación con los valores obtenidos sobre las obreras *P* (Tabla 3.1). No se encontró una relación lineal significativa entre el número de oviposiciones realizadas por *P. curvatus* y el número de hormigas presentes en el sendero de forrajeo ($R^2 = 0,08$; $F_{1,4} = 1,70$; $p = 0,23$ y $R^2 = -0,12$; $F_{1,4} = 0,17$; $p = 0,70$ para hormigas *M* y *P*, respectivamente). Tampoco se observó una relación lineal significativa entre el número de “ataques” realizados y el tiempo invertido por *P. curvatus* en orientarse ($R^2 = -0,05$; $F_{1,4} = 0,65$; $p = 0,45$ y $R^2 = -0,11$; $F_{1,4} = 0,18$; $p = 0,69$ para hormigas *M* y *P*, respectivamente).

Tabla 3.1. Tiempos de orientación (media $\pm$ DE; seg.) y tasa de ataques de *P. curvatus* sobre ambas FS de *S. invicta*.

FS	N ^a	Tiempos de orientación (seg.)	<i>t</i>	<i>p</i>	Tasa de ataques	<i>t</i>	<i>p</i>
<i>M</i>	6	49,83 $\pm$ 34,38	5,10	< 0,001	36,17 $\pm$ 7,36	2,20	0,026
<i>P</i>	6	120,50 $\pm$ 70,62			15,83 $\pm$ 6,43		

^a N indica el número de nidos muestreados con 3 réplicas por nido. Las comparaciones fueron hechas con la prueba T de Student (a 2 colas).

3.3.2 Efecto en la tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*

3.3.2. a Efecto en las tasas de forrajeo

Las obreras *M* de *S. invicta*, en ausencia del parasitoide, presentaron tasas de forrajeo significativamente mayores que las obreras *P* (308,50 $\pm$ 42,33 vs. 221,33 $\pm$ 38,34 hormigas, para nidos *M* y *P*, respectivamente; $t = 3,74$; $g.l. = 10$; $p = 0,0039$). Al instante en que *P. curvatus* empezó a sobrevolar a las hormigas, las mismas dejaron de forrajear aunque no dejaron de proteger al cebo, independientemente de su FS. Las obreras ubicadas sobre el cebo empezaron a vibrar sus gásteres, a curvar el cuerpo o a mantener posturas estereotipadas principalmente en forma de “U”; luego empezaron a forrajear subterráneamente, por lo que el parasitoide no pudo seguir oviponiéndolas.

3.3.2. b Efecto en el tamaño de las forrajeras

Pseudacteon curvatus afectó negativamente el tamaño de las forrajeras de *S. invicta*. En ausencia del parasitoide, el tamaño promedio de las obreras *M* fue estadísticamente menor que el de las obreras *P* (Tabla 3.2). En presencia del parasitoide, el tamaño de las hormigas disminuyó en ambas FS de *S. invicta*, y las obreras *M* siguieron presentando un tamaño promedio estadísticamente menor (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Tamaño promedio (media $\pm$ DE; mm) de las forrajeras de *S. invicta* en ausencia ("sin") y en presencia ("con") de *P. curvatus* discriminado por FS.

Forma social	SIN	Parasitoide			
		CON	N	t^b	p
Monoginia	0,64 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,02	6	14,33	< 0,001
Poliginia	0,69 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,03	6	4,20	0,003
t^a	6,50	3,20			
p	< 0,001	0,0056			

^a Las comparaciones entre FS fueron hechas con la prueba T de Student (a 2 colas).

^b Las comparaciones "sin" y "con" parasitoides en cada FS fueron hechas con la prueba T de Student para medidas pareadas. N indica número de nidos muestreados.

3.3.2. c Efecto en la proporción de las forrajeras

La proporción de obreras por subcasta que defendieron o reclutaron en el cebo resultó afectada por la presencia de *P. curvatus*, a pesar de que el parasitoide prefirió atacar preferentemente a las obreras pequeñas (Fig. 3.2).

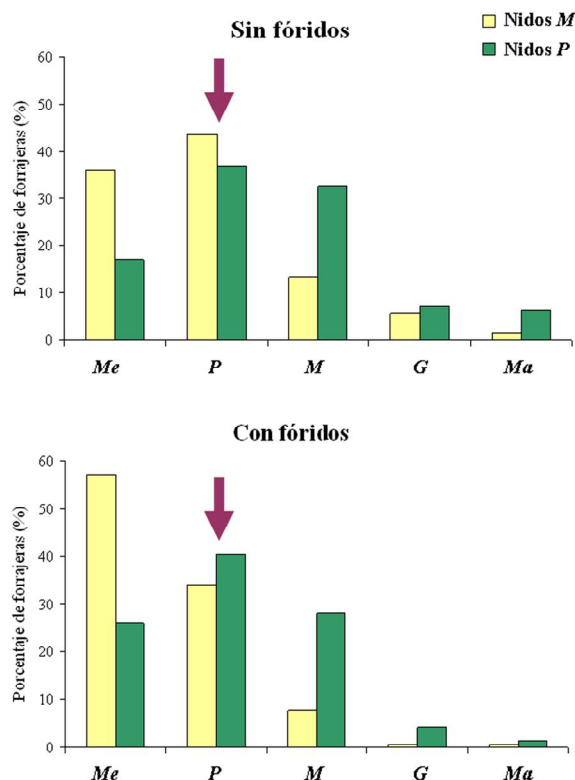


Figura 3.2. Porcentaje de las forrajeras de *S. invicta* en el campo, discriminadas por subcasta y FS. Las flechas verticales indican el tamaño promedio elegido por *P. curvatus* ($0,63 \pm 0,04$ mm). Subcastas: Ma: mayores, G: grandes, M: medianas, P: pequeñas, Me: menores.

En ausencia del parasitoide, el 5,6% de las forrajeras de los nidos M estuvo representado por las obreras *grandes*, y el 93,1% por las subcastas *medianas*, *pequeñas* y *menores*; mientras que, en comparación, el 7,1% de las forrajeras de los nidos P correspondió a las obreras *grandes* y el 86,7% a las 3 subcastas de menor tamaño (Tabla 3.3). En presencia de *P. curvatus* el porcentaje de obreras *grandes* descendió a 0,5 y 4,2% para los nidos M y P, respectivamente; y el porcentaje de las obreras *medianas*, *pequeñas* y *menores* ascendió a un 98,9 y a un 94,5% para los nidos mencionados (Tabla 3.3). En presencia del parasitoide se observaron diferentes patrones de conducta en las forrajeras de ambas FS de *S. invicta*, debido a que el porcentaje de obreras *mayores* no se modificó significativamente en los nidos M, pero disminuyó en los nidos P. El porcentaje de obreras *grandes* fue significativamente menor en ambas FS. El porcentaje de obreras *medianas* y *pequeñas* disminuyó en los nidos M, sin embargo, los porcentajes en los nidos P no se vieron afectados. Finalmente, la proporción de obreras *menores* aumentó de modo significativo en ambas FS de *S. invicta* (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Tamaño promedio (media $\pm$ DE; mm) y proporción de obreras de *S. invicta* en ausencia ("sin") y en presencia ("con") de *P. curvatus* discriminadas por subcasta y FS de *S. invicta*.

FS	Parasitoide	Tamaño promedio (mm) ^a	Proporción de obreras por subcasta ^b					Subcastas más abundantes	Porcentaje (%)	Z ^c	p
			Ma	G	M	P	Me				
M	Sin	0,64 $\pm$ 0,02	0,013	0,056	0,134	0,438	0,359	M, P y Me	91,30	- 2,27	0,0231
	Con	0,59 $\pm$ 0,02	0,005	0,005	0,076	0,342	0,571		98,90		
			=	*	*	*	*				
P	Sin	0,69 $\pm$ 0,02	0,062	0,071	0,326	0,370	0,171	M, P y Me	86,70	- 5,43	< 0,001
	Con	0,63 $\pm$ 0,03	0,013	0,042	0,281	0,403	0,261		94,50		
			*	*	=	=	*				

^a Ver comparaciones estadísticas en la Tabla 3.2.

^b Las proporciones para cada subcasta en ausencia y en presencia del parasitoide fueron comparadas con la prueba de Proporciones. Los asteriscos indican cambios significativos ($p < 0,05$) en las proporciones. Subcastas de obreras: Ma: mayores, G: grandes, M: medianas, P: pequeñas y Me: menores.

^c Se comparó la suma de las subcastas más abundantes en presencia y en ausencia de *P. curvatus* con la prueba de Proporciones ($p < 0,05$).

3.3.3 Características en el desarrollo de *P. curvatus* sobre ambas FS de *S. invicta*

3.3.3. a Tamaño de las obreras parasitadas

El tamaño promedio de las obreras elegidas por *P. curvatus* ($0,63 \pm 0,04$ mm, para colonias *M* y *P*, respectivamente; $t = 0,16$; $g.l. = 9$; $p = 0,88$) fue similar independientemente de la FS de *S. invicta* (Fig. 3.3). Las hembras y machos emergieron de obreras de tamaño similar para ambas FS ($0,64 \pm 0,05$ vs. $0,63 \pm 0,05$ mm, para hembras emergidas de obreras *M* y *P*, respectivamente; $t = 0,18$; $g.l. = 7$; $p = 0,86$ y $0,63 \pm 0,05$ vs. $0,64 \pm 0,09$ mm, para machos emergidos de obreras *M* y *P*, respectivamente; $t = 0,11$; $g.l. = 9$; $p = 0,91$).

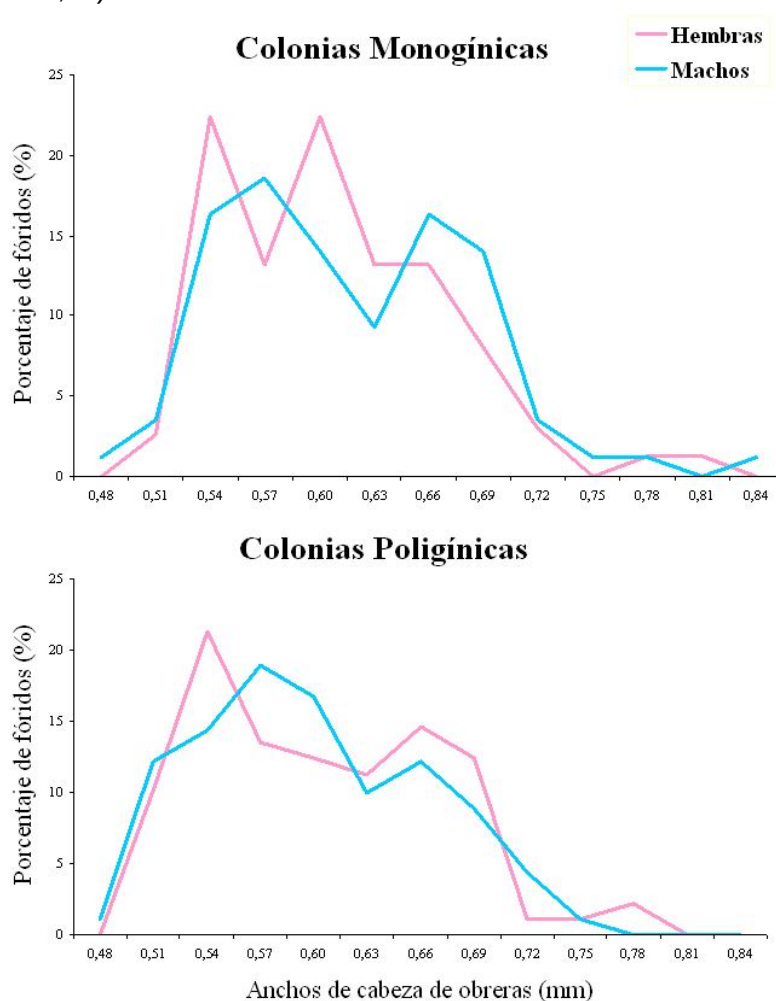


Figura 3.3. Distribución de los tamaños de cabeza (mm) de *S. invicta* de las que emergieron machos y hembras de *P. curvatus* discriminadas por FS. Se indica la distribución de las hembras en rosa y la de los machos en celeste.

Las obreras parasitadas que produjeron pupas inviables (I) y de las que emergieron adultos (V) presentaron tamaños similares ($0,62 \pm 0,06$ vs. $0,63 \pm 0,04$ mm, para pupas inviables y viables de colonias *M*; $t = 0,59$; $g.l. = 225$; $p = 0,56$ y $0,62 \pm 0,10$ vs. $0,62 \pm 0,06$ mm para pupas inviables y viables de colonias *P*; $t = 1,49$; $g.l. = 239$; $p = 0,14$, respectivamente). El 34,7 y el 38,6% de las pupas inviables pertenecieron a obreras de mayor tamaño ($0,69 \pm 0,03$ vs. $0,73 \pm 0,07$ mm, para obreras *M* y *P*, respectivamente; $t = 3,01$; $g.l. = 9$; $p < 0,01$) y de un tamaño estadísticamente menor ($0,55 \pm 0,03$ vs. $0,54 \pm 0,02$ mm, para obreras *M* y *P*, respectivamente; $t = 0,76$; $g.l. = 9$; $p < 0,01$) al tamaño promedio preferido por *P. curvatus*. El rango de distribución de las pupas viables estuvo incluido en su totalidad en la distribución de tamaños de las pupas inviables ($X^2 = 1,223$; $p > 0,90$ y $X^2 = 4,68$; $p = 0,19$ para nidos *M* y *P*, respectivamente; Fig. 3.4). Los mayores porcentajes de viabilidad se observaron dentro de la subcasta *pequeñas* (87 y 80% para pupas desarrolladas en colonias *M* y *P*, respectivamente), los porcentajes para la subcasta *menores* fueron de 6,8 y 15% y, para las *medianas* de 6,2 y 5% para las colonias *M* y *P*, respectivamente.

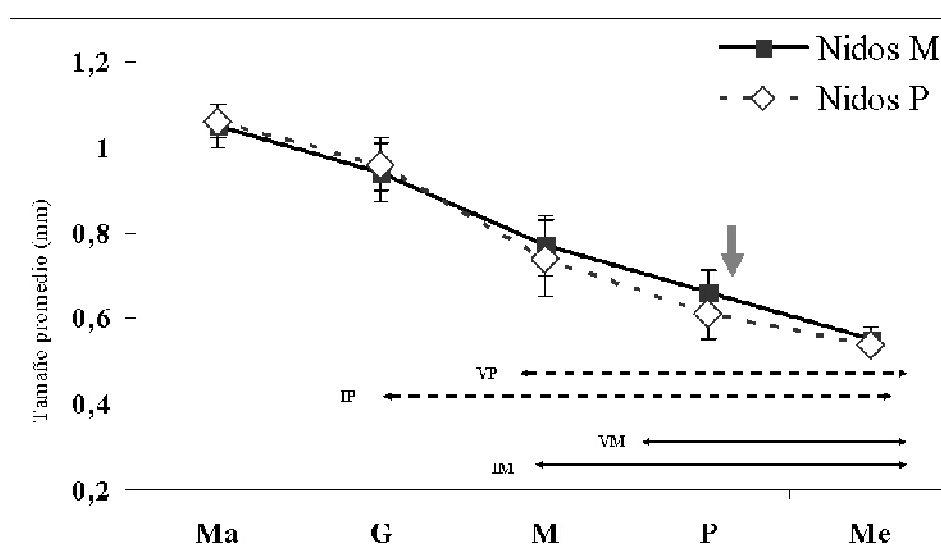


Fig. 3.4. Tamaños de las obreras de *S. invicta* elegidas por *P. curvatus* discriminados por subcasta y FS. La flecha vertical indica el tamaño elegido ($0,63 \pm 0,04$ mm). Las flechas horizontales indican el rango de distribución de tamaños de las pupas viables (V) e inviables (I) por FS (*M* o *P*). (Min-Max: 0,48-0,68 mm vs. 0,48-0,78 mm para las pupas monogénicas viables e inviables; Min-Max: 0,48-0,75 mm vs. 0,51-0,93 mm para las pupas poligénicas viables e inviables). Subcastas: *Ma*: mayores; *G*: grandes; *M*: medianas; *P*: pequeñas; *Me*: menores. **VM**: pupas monogénicas viables, **IM**: pupas monogénicas inviables, **VP**: pupas poligénicas viables, **IP**: pupas poligénicas inviables.

3.3.3. b Periodos de desarrollo

Las hembras y machos de *P. curvatus* criados dentro de la misma FS presentaron tiempos de desarrollo similares (Tabla 3.4). Los periodos de desarrollo larval de las hembras y machos emergidos de obreras *M* fueron más cortos (2 días) que los periodos obtenidos cuando se desarrollaron sobre hormigas *P* (Tabla 3.4). Sin embargo, esta diferencia solo afectó al tiempo de desarrollo total de los machos (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Periodos de desarrollo (mediana; q1-q3) larval, pupal y total (días) de hembras y machos de *P. curvatus* desarrollados en ambas FS de *S. invicta*.

FS	Sexo	N (n) ^a	Periodos de desarrollo (días)					
			Larval	<i>p</i>	Pupal	<i>p</i>	Total	<i>p</i>
<i>M</i>	Hembras	5 (82)	16,00 (13,5-16,25)	0,92	16,60 (16-17)	0,35	32,00 (30-32,75)	0,75
	Machos	6 (89)	15 (14,25-16)		16,20 (16-16,50)		31,80 (30,75-32)	
<i>P</i>	Hembras	5 (89)	17,00 (16-17)	0,46	16,40 (16-17)	0,75	33,00 (32-34)	0,40
	Machos	5 (92)	17,00 (16,50-17,50)		16,75 (16,50-17)		33,60 (33-34,50)	
Entre	Hembras			0,04		0,68		0,14
	Machos			0,02		0,25		0,03

^a N indica el número de nidos de los que emergieron hembras o machos y *n* el número de individuos desarrollados. Las comparaciones entre sexos en cada FS de *S. invicta* y por sexos entre FS fueron hechas con la prueba de Mann-Whitney (a 2 colas).

3.3.3. c Características de los adultos emergidos

Los adultos de *P. curvatus* presentaron tamaños similares independientemente de la FS en la que se desarrollaron ($0,33 \pm 0,02$ vs. $0,34 \pm 0,04$ mm, para los adultos de las colonias *M* y *P*, respectivamente; $t = 0,21$; $g.l. = 9$; $p = 0,84$). Las hembras y machos de *P. curvatus* no presentaron dimorfismo sexual en sus tamaños respectivos ($0,33 \pm 0,03$ vs. $0,34 \pm 0,04$ mm, para hembras y machos, respectivamente; $F_{1, 17} = 2,23$; $p = 0,15$); ni diferencias entre los individuos del mismo sexo desarrollados sobre diferente FS de *S. invicta* ($F_{1, 17} = 0,003$; $p = 0,96$), o en la interacción sexo*FS ($F_{1, 17} = 1,05$; $p = 0,32$). Las hembras representaron el 50% de los adultos emergidos independientemente de la FS en

la que se desarrollaron (82 hembras y 171 adultos; $p = 0,32$ para los fóridos que emergieron de colonias *M*; 89 hembras y 181 adultos, $p = 0,44$ para las colonias *P*).

3.3.3. d Éxito reproductivo y eficiencias en el desarrollo

Supervivencia de pupas. Todos los ataques de *P. curvatus* realizados sobre las colonias *M* de *S. invicta* fueron productivos; mientras que el 83,3% de los ataques realizados sobre las colonias *P* produjeron al menos una pupa. En general, la supervivencia de pupas fue del 72,5 y del 73,6% para los nidos *M* y *P*, respectivamente. Sin embargo, por ataque las colonias *M* fueron significativamente más productivas que las colonias *P* (76,2 vs. 14 % para colonias *M* y *P*, respectivamente; $Z = 8,16$; $p < 0,0001$). El número de pupas producidas por ataque fue de $38,83 \pm 36,25$ y $40,50 \pm 63,91$ para hormigas *M* y *P*, respectivamente; por lo que, hubo mayor variabilidad cuando el desarrollo ocurrió sobre las hormigas *P*. Además, el número de adultos emergidos por ataque fue 3,9 veces mayor para las hormigas *M* que para las hormigas *P* (23,5 vs. 6 adultos para colonias *M* y *P*, respectivamente; $Z = 4,20$; $p < 0,05$).

Eficiencias en la formación de pupas y adultos. Se observó mayor efectividad en la formación de pupas y adultos cuando el desarrollo ocurrió sobre las hormigas *M* obteniéndose 11,9 pupas por cada hembra que parasitó a las hormigas *M* contra 1,2 pupas cuando los ataques fueron realizados sobre las hormigas *P* ($Z = 3,92$; $p < 0,001$). También emergieron más adultos a partir de las obreras parasitadas de las colonias *M* (8,2 vs. 0,2 adultos, para hormigas *M* y *P* respectivamente; $Z = 2,80$; $p = 0,0051$).

3.4 Discusión

En este capítulo se compararon las conductas de oviposición y las características en el desarrollo de *Pseudacteon curvatus* en función de la forma social (FS) de *Solenopsis invicta*. En estudios a campo, *P. curvatus* presentó menores tiempos de orientación y mayores tasas de oviposición en presencia de forrajeras monogínicas (*M*), en comparación con forrajeras poligínicas (*P*; Tabla 3.1). Además, *P. curvatus* modificó los tamaños y porcentajes de las forrajeras a favor de las obreras *menores* y en contra de las *grandes* en ambas FS de *S. invicta*; aunque disminuyeron los porcentajes de las obreras *medias* y *pequeñas* solo para las forrajeras *M* (Tablas 3.2 y 3.3). Sin embargo, en los nidos *M*, el porcentaje de obreras *mayores* que permanecieron en el cebo no fue afectado por la presencia del parasitoide (Tabla 3.3). El reemplazo a favor de forrajeras *menores* puede ser beneficiosa para *S. invicta* debido a que siguen forrajeando gran cantidad de hormigas de menor tamaño al preferido por *P. curvatus*. Si bien las obreras de las colonias *M* son, en promedio, más grandes que las obreras de colonias *P* (Tabla 2.8; Greenberg *et al.* 1985), se observó que las forrajeras *M* fueron más pequeñas que las forrajeras *P* (Tabla 3.2). Por lo tanto, se cree que en *Solenopsis* existió una relación de compromiso entre el tamaño y número de forrajeras, ya que las forrajeras *M* también presentaron tasas de forrajeo mayores, así pudieron mantener un reclutamiento en masa al liberar mayor cantidad de obreras más pequeñas.

Es interesante destacar que, en Argentina, las hormigas de *S. invicta* parasitadas por *P. curvatus* (Fig. 3.4) fueron más pequeñas que las parasitadas en Estados Unidos ($0,71 \pm 0,06$ y $0,66 \pm 0,11$ mm para colonias *M* y *P*, respectivamente; Morrison y Gilbert 1998). Asimismo, en Chaco la densidad de los nidos *M* fue 3,8 veces mayor que la de los nidos *P* (Tabla 2.4, Fig. 2.8; Cap. 2); mientras que en el sureste de los Estados Unidos, la densidad de nidos *P* fue 3,2 veces mayor que la densidad de nidos *M* y, específicamente en Tejas, fue 2,3 veces mayor (Porter *et al.* 1991, 1992). Es probable que la mayor densidad de nidos *P* en los sitios introducidos en comparación con lo observado en Argentina, se deba a una combinación entre la ausencia de enemigos naturales (Porter *et al.* 1997) y al efecto fundador en el nuevo ambiente (Ross *et al.* 1996) permitiendo que las poblaciones exóticas de *S. invicta* aloquen más energía en la reproducción y vigor de las obreras. En consecuencia, la poliginia se tornó la FS más importante y abundante en el nuevo ambiente.

En el laboratorio, *P. curvatus* se desarrolló exitosamente sobre ambas FS, pero su productividad, calculada como el número de pupas formadas y como la supervivencia de las mismas, fue mayor cuando el desarrollo ocurrió sobre colonias *M*. Los periodos de desarrollo de las hembras y machos de *P. curvatus* fueron similares dentro de cada FS, pero los parasitoides desarrollados sobre hormigas *M* presentaron menores tiempos de desarrollo, aunque este patrón se mantuvo en el periodo de desarrollo total de los machos (Tabla 3.4). Dado que el desarrollo de *P. curvatus* fue más exitoso en colonias *M*, el parasitoide discriminaría la FS del hospedador a favor de la monoginia. Es probable que las diferencias observadas en el número de oviposiciones, en los tiempos de orientación y en las eficiencias de *P. curvatus* al desarrollarse sobre hormigas *P* se deba a que esta FS es la menos abundante en la Argentina (Wojcik 1983; Ross y Trager 1990; Porter *et al.* 1997; Ross *et al.* 1997; Mescher *et al.* 2003) por lo que el parasitoide estaría menos adaptado. Si bien el tamaño promedio de las obreras *M* es mayor al de las obreras *P* (Tabla 2.8), *P. curvatus* ovipuso principalmente a las hormigas *pequeñas*, que son de menor tamaño ($0,63 \pm 0,04$ mm) que el tamaño promedio de las colonias de ambas FS de *S. invicta* (Fig. 3.2). La preferencia por obreras *pequeñas* también puede ser evaluado por el alto porcentaje de pupas inviables (73,2%) que no pertenecieron al rango de tamaños óptimo para el desarrollo de *P. curvatus* (obreras *grandes*, *medianas* y *menores*; Fig. 3.4). Lo mismo ocurre con *P. cultellatus* (Folgarait *et al.* 2002a), otra especie de pequeño porte que se desarrolla sobre las obreras de menor tamaño de *S. invicta* y *S. richteri*.

Ninguno de los trabajos realizados hasta el momento sobre *P. curvatus* (Gilbert y Morrison 1997; Wuellner *et al.* 2002; Vazquez *et al.* 2004) evaluaron la existencia de dimorfismo sexual en el tamaño de los adultos. En este capítulo no se encontró dimorfismo sexual en los tamaños entre hembras y machos de *P. curvatus*, quienes presentaron la misma proporción de sexos (50%). En los artrópodos, el dimorfismo sexual en el tamaño de los adultos resulta de la presencia de estadios de desarrollo adicionales, periodos de desarrollo más largos o por tasas de crecimiento más altas en el sexo más grande (Esperck y Tammaru 2006; Stillwell y Fox 2007), aunque también depende de la temperatura de cría y de la calidad del alimento disponible (Parker y Johnston 2006; Stillwell y Fox 2007). *P. curvatus* es una especie pequeña y aparentemente el costo de producir hembras y machos fue el mismo. A pesar de que para el género *Pseudacteon* se propuso que el tamaño de los parasitoides depende del tamaño del hospedador (Morrison *et al.* 1999), el hecho de que las pupas de *P. curvatus* desarrolladas sobre obreras

grandes y *menores* fueran inviables, no permitiría que evolucione el dimorfismo sexual en el tamaño a favor de las hembras, como ocurre con *P. nocens* (Folgarait *et al.* 2006) y *P. tricuspis*, especies en la que se observa una distribución de tamaños bimodal y en las que las hembras emergen de obreras más grandes que los machos (Fig. 4.1). Tampoco se encontraron diferencias en el tamaño adulto de hembras y machos en *P. cultellatus*, especie de menor tamaño que *P. curvatus* que parasita a obreras aún más chicas (Folgarait *et al.* 2002a).

P. curvatus es una de las especies con menor especificidad hospedera (Gilbert y Morrison 1997; Morrison y Gilbert 1998), es una de las especies de mayor distribución y abundancia en Argentina y está adaptada a diferentes biomas y climas (Folgarait *et al.* 2005a; Calcaterra *et al.* 2007). Diferentes biotipos desarrollan mejor en *S. richteri*, en híbridos *S. richteri* x *S. invicta* (Graham *et al.* 2003; Thead *et al.* 2005), o en *S. invicta* (Vazquez *et al.* 2004), por lo que la FS de *S. invicta* (principalmente *M* en su rango nativo y *P* en los Estados Unidos) puede afectar la coevolución parasitoide-hospedador (Hufbauer y Roderick 2005). Las liberaciones a campo del biotipo de Las Flores (capturado sobre *S. richteri*) para controlar las poblaciones híbridas de *S. richteri* x *S. invicta* demostraron que el parasitoide ovipuso y se desarrolló con éxito en Alabama (donde predominan las colonias *M*), pero fracasó en Florida (con ambas FS presentes) y Tennessee (principalmente *M*) porque sus tasas de oviposición fueron muy bajas (Graham *et al.* 2003). Mientras que el biotipo de Formosa (colectado sobre *S. invicta*) mostró alta especificidad y preferencia hacia las colonias de *S. invicta* de Florida (Vazquez *et al.* 2004). Por otro lado, las colonias *M* dominan en Alabama y Tennessee; mientras que en Florida ambas FS están igualmente representadas.

Los resultados aquí presentados sugieren que la FS del hospedador, tanto en el sitio de origen como en el introducido, debería ser considerada al momento de evaluar el efecto, éxito e impacto de las poblaciones de *Pseudacteon* usadas como agentes de control biológico. Sin embargo, la rápida dispersión observada en las poblaciones de *P. curvatus* nativas de Corrientes introducidas en poblaciones *P* de *S. invicta* en Tejas (Gilbert *et al.* 2008) demuestran la plasticidad de la especie para ajustarse a esa FS. No se sabe si los diferentes biotipos de *P. curvatus* son especies crípticas o en anillo. Hasta el momento el único caso de posibles especies crípticas para *Pseudacteon* se registró entre *P. obtusus* “grandes” y “pequeños”, los cuales presentan diferencias morfológicas en sus tamaños y la presencia o ausencia de una arista en sus antenas, respectivamente

(Kronforst *et al.* 2007). Por otra parte, las poblaciones brasileras y argentinas de *P. curvatus* presentan tamaños similares (Morrison *et al.* 1999; Wuellner *et al.* 2002), aunque muestran variabilidad en la forma de sus ovipositores. Los ovipositores de los *P. curvatus* argentinos son más rectos y presentan un refuerzo en el diente ventral que está ausente en los *P. curvatus* de Brasil (Porter y Pesquero 2001). En consecuencia, no se sabe si los diferentes biotipos del parasitoide o la FS del hospedador explicaría el éxito de las diferentes poblaciones de *P. curvatus* introducidas en los Estados Unidos. Sería interesante comparar genéticamente a las diferentes poblaciones de *P. curvatus* y evaluar sus productividades en las áreas o parches en donde predominan diferentes FS de *S. invicta*, como también considerar si existen cambios en las historias de vida de los parasitoides luego de ser introducidos y de establecerse en los nuevos ambientes.

3.5 Conclusiones

- *Pseudacteon curvatus* afecta el patrón de forrajeo de ambas formas sociales de *S. invicta*, haciendo que las obreras que salen a forrajear sean de menor tamaño al preferido por el parasitoide.
- *Pseudacteon curvatus* discrimina la forma social de *S. invicta* y se desarrolla mejor sobre colonias monogínicas.
- A pesar de que las obreras de colonias monogínicas son, en promedio, más grandes que las obreras de colonias poligínicas, *P. curvatus* selecciona y se desarrolla en hormigas de tamaños similares.
- *Pseudacteon curvatus* carece de dimorfismo sexual en el tamaño adulto, por lo que las hembras y machos están igualmente representados en la progenie.

Capítulo 4

Características en el desarrollo y comportamiento de *Pseudacteon tricusps* *

1.4 Introducción

De las especies de *Pseudacteon* liberadas en los Estados Unidos (Porter y Gilbert 2004), *P. tricusps* fue la primera criada en laboratorio para ser liberada en el campo (1997-1999) para el control biológico de las poblaciones introducidas de *S. invicta* y *S. richteri* introducidas en los Estados Unidos (Porter *et al.* 2004; Morrison y Gilbert 2005). En la actualidad, diferentes poblaciones de *P. tricusps* están establecidas en Florida (en donde se encuentran ambas FS de *S. invicta*; Porter *et al.* 2004; Morrison y Porter 2005a; Pereira y Porter 2006) y en Tejas (LeBrun *et al.* 2008; Gilbert *et al.* 2008). Estas poblaciones se están dispersando rápidamente, a pesar de que los patrones de distribución no sean uniformes (Morrison y King 2004; LeBrun *et al.* 2008) y sus impactos como agentes de control biológico sobre *S. invicta* todavía están bajo estudio (Morrison y Porter 2005b).

Pseudacteon tricusps, al igual que *P. curvatus*, es otra de las especies más abundantes y ampliamente distribuida en Sudamérica (Calcaterra *et al.* 2005; Folgarait *et al.* 2005a). También presenta ritmos circadianos y circanuales amplios y prefiere temperaturas altas que otras especies no toleran (Folgarait *et al.* 2003, 2007a). *P. tricusps* es una especie de gran porte ($0,50 \pm 0,04$ mm para las hembras, Morrison *et al.* 1997) que presenta dimorfismo sexual en el tamaño adulto a favor de las hembras y que ovipone a obreras más grandes que el tamaño promedio de las colonias de *S. invicta* (Morrison *et al.* 1997, 1999; Morrison y Gilbert 1998). Los diferentes ensayos de especificidad hospedera demostraron que *P. tricusps* presenta alta especificidad por el complejo *S. saevissima* (Gilbert y Morrison 1997; Morrison *et al.* 1997; Morrison y Gilbert 1998; Folgarait *et al.* 2002b; Morrison y Porter 2006).

De los diferentes estudios realizados a campo y en laboratorio se determinó que el principal efecto de *P. tricusps* sobre las forrajeras de *S. invicta* es indirecto alterando la actividad de forrajeo y el tamaño de las hormigas (Morrison y King 2004; Morrison y Porter 2005b), ya que el porcentaje de parasitismo natural es muy bajo (Morrison *et al.* 1997; Morrison y Porter 2005a; Calcaterra *et al.* 2008a). Además, el comportamiento de búsqueda y motivación de *P. tricusps* para oviponer a las obreras de *S. invicta* está asociado a la liberación de feromonas de alarma que emiten las hormigas en condiciones de estrés, como por ejemplo: frente a nidos disturbados o en interacciones intraespecíficas

con obreras ajenas al nido (Morrison y King 2004). El efecto en el patrón de forrajeo de las hormigas también fue observado en parasitoides de las hormigas cortadoras de hojas (Feener y Brown 1993; Tonhasca *et al.* 2001; Siqueira Gazal e Silva *et al.* 2007).

Dado que el número de reinas presentes en la colonia determina la FS y el genotipo de las obreras (Tabla 2.16; Keller y Ross 1998; Deheer 2002), afectando la proporción de las subcastas (Tabla 2.11), el tamaño promedio de las obreras (Tabla 2.8; Greenberg *et al.* 1985; Morrison y Gilbert 1998) y la agresividad frente a coespecíficas ajenas al nido (Fig. 2.12; Morel *et al.* 1990; DeHeer 2002): se hace fundamental comparar las preferencias relativas de los parasitoides por cada FS de *S. invicta*. La liberación de *P. tricuspsis* sobre la FS correcta podría aumentar su eficiencia reproductiva, como ocurrió con *P. curvatus* (Cap. 3), especie en la que hubo mayor preferencia y descendencia cuando el desarrollo ocurrió sobre hormigas *M*. En consecuencia, se cree que *P. tricuspsis*, un fórido más grande que *P. curvatus*, podría desarrollarse mejor sobre hormigas *M* dada la mayor proporción de obreras más grandes que las encontradas en colonias *P* (Tabla 2.11).

Debido a que *P. tricuspsis* está presente a lo largo de todo el año, que presenta una amplia distribución, alta especificidad, a que ovipone a obreras más grandes que *P. curvatus*, a que su comportamiento está asociado a la liberación de feromonas de alarma de las forrajeras y a que en la Argentina se lo colecta principalmente en nidos *M*; mientras que en los Estados Unidos se estableció sobre ambas FS, en este capítulo se evaluará la relevancia de la FS de *S. invicta* en el desarrollo y éxito reproductivo de *P. tricuspsis*. Además se comparará el comportamiento y éxito reproductivo de las hembras en ausencia y en presencia de otras hembras coespecíficas competidoras por el recurso hormiga.

Objetivos

1) Evaluar a campo el efecto de *P. tricuspsis* sobre ambas FS de *S. invicta*, considerando:

- Número de oviposiciones realizadas
- Efecto sobre el comportamiento y tamaño de las forrajeras
- Efecto sobre la proporción de las forrajeras

2) Evaluar en laboratorio el desarrollo y éxito reproductivo de *P. tricuspsis* sobre ambas FS de *S. invicta*, considerando:

- Tamaño de obreras elegidas
- Tamaño de la progenie,
- Dimorfismo sexual en el tamaño adulto y proporción de sexos
- Eficiencias en el desarrollo
- Número de oviposiciones y porcentaje de parasitismo

3) Comparar las eficiencias en el desarrollo de *P. tricuspis* en presencia y en ausencia de competencia por el recurso.

Materiales y Métodos

3.4.1 Sitio de muestreo y colección

Los experimentos fueron realizados entre noviembre de 2006 y octubre de 2007 en un campo ubicado cerca de la Ruta provincial N° 39 a 4 km de la ciudad de San Javier (30° 35' Sur y 59° 55' Oeste), Provincia de Santa Fe, Argentina (Fig. 2.1). Las hembras de *P. tricuspis* fueron identificadas con lupa de mano (20X) según la clave de Porter y Pesquero (2001) y fueron usadas dentro de las 48 h de su recolección. Los especímenes de *P. tricuspis* y de *S. invicta* fueron depositados en la colección de la Dra. Folgarait en el Centro de Estudios e Investigaciones, Universidad Nacional de Quilmes (Buenos Aires, Argentina) y en el Museo de Historia Natural Bernardino Rivadavia. Para las observaciones a campo y en laboratorio se muestrearon 6 nidos por FS, y se realizaron 3 mediciones por nido. Todas las mediciones de hormigas y fóridos fueron hechas en un microscopio estereoscópico Nikon modelo SMZ-1 ESD (30 aumentos) con un ocular micrométrico calibrado con incrementos de 0,03 mm.

3.4.2 Oviposiciones y tiempos de orientación de *P. tricuspis* a campo

Para evaluar los efectos de *P. tricuspis* sobre las forrajeras de *S. invicta*, se siguió la misma metodología usada para *P. curvatus* (Sección 3.2.2).

Análisis estadísticos. Los tiempos de orientación y el número de oviposiciones realizados por *P. tricuspis* sobre cada FS de *S. invicta* fueron promediados y analizados mediante la prueba T de Student porque los datos estuvieron normalmente distribuidos. Se

regresionó el número de “ataques” realizados por el parasitoide y el tiempo de orientación y el número de ataques en función del número de hormigas presentes.

3.4.3 Efecto de *P. tricusps* en la tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*

Se evaluaron las tasas de forrajeo, los tamaños y la proporción de forrajeras sobre ambas FS de *S. invicta* antes (“sin”) y después (“con”) de liberar una hembra de *P. tricusps* siguiendo el mismo procedimiento usado con *P. curvatus* (Sección 3.2.3). Al finalizar las observaciones, los nidos fueron excavados, las hormigas separadas de la tierra y separadas en 5 subcastas: *mayores*, *grandes*, *medianas*, *pequeñas* y *menores* (Sección 2.2.6).

Análisis estadísticos. Las tasas de forrajeo de las hormigas fueron analizadas con la prueba T de Student porque los datos estuvieron normalmente distribuidos. Los tamaños promedio de las forrajeras en ausencia (“sin”) y en presencia (“con”) de *P. tricusps* fueron analizados mediante la prueba T de Student para medidas pareadas. Se comparó el tamaño promedio de las forrajeras de cada subcasta por FS mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) de 1 factor. La proporción de obreras involucradas en el forrajeo o defensa del cebo, en ausencia y en presencia de una hembra de *P. tricusps*, se analizó con el análisis de Proporciones. Para controlar el error global de Tipo I en las comparaciones múltiples en las proporciones de obreras por subcasta y FS se utilizó el método secuencial de Bonferroni ($p < 0,017$).

3.4.4 Evaluación del desarrollo y eficiencia de *P. tricusps* en relación en ambas FS de *S. invicta*

Para evaluar si el desarrollo y el tamaño de los parasitoides dependió del tamaño y FS de las hormigas de *S. invicta* se realizaron 12 ensayos de oviposición (6 por FS), por bandeja de vuelo se introdujo igual cantidad de obreras *grandes*, *medianas* y *pequeñas* (667 hormigas por categoría) junto con 3 hembras de *P. tricusps*, a las que se les permitió oviponer por 2 h. Para detalles sobre metodología ver Sección 3.2.3.

Análisis estadísticos. El tamaño promedio de las obreras parasitadas y los periodos de desarrollo de los parasitoides criados sobre colonias *M* y *P* fueron analizados con la prueba T de Student porque los datos estuvieron normalmente distribuidos. Para evaluar la relación entre FS y sexo se corrió un Análisis de Covarianza (ANCOVA) de 2 factores

tomando el ancho del tórax de los parasitoides como covariable. El tamaño de la progenie de *P. tricusps* y el de sus hospedadores se relacionó mediante regresión lineal para ambas FS de *S. invicta*. Se usó el procedimiento secuencial de Bonferroni para controlar el error global de Tipo I en las comparaciones múltiples entre el tamaño de los parasitoides y del hospedador ($p < 0,007$). Se comparó la proporción de sexos de la progenie mediante distribución de probabilidad Binomial. Las eficiencias en el desarrollo fueron analizadas con el cociente “número de pupas desarrolladas (adultos) por hembra que atacó” y la supervivencia de las pupas como “adultos emergidos por pupas formadas”. Ambos cocientes fueron examinados mediante el análisis de Proporciones.

3.4.5 Desarrollo y eficiencias de *P. tricusps* con y sin competencia por el recurso

Para evaluar si el tamaño del hospedador elegido, las oviposiciones realizadas, el éxito reproductivo de los parasitoides y la proporción de sexos de la progenie se modifica en ausencia de competencia por el recurso, se realizaron ensayos de oviposición usando hembras y machos nacidos en el laboratorio (segunda generación). En los ensayos de oviposición se introdujeron por bandeja de vuelo igual proporción de obreras *grandes*, *medianas* y *pequeñas* de *S. invicta* y una sola hembra de *P. tricusps* (nacida en el laboratorio y apareada con un solo macho de su camada) a la que se le permitió oviponer por tiempo ilimitado hasta que perdiera la motivación de perseguir y atacar a las obreras (3-5 hrs.). Se usaron hormigas monogínicas por ser la FS más abundante en la Argentina y de la que se obtuvo mayor cantidad de parasitoides (Tabla 4.11). En cada ensayo de oviposición ($N = 7$) se determinó el número de ataques realizados y el tamaño de las obreras elegidas a intervalos de 10 min. Las hormigas ovipuestas (“tocadas” en las pleuras entre los tres pares de patas) dentro del mismo intervalo de tiempo fueron colectadas mediante aspirador manual, medidas (ancho de la cabeza) y criadas por separado. Las mismas fueron revisadas a diario hasta observar la formación de pupas y la emergencia de los adultos, quienes fueron sexados y medidos (ancho de pronoto). Se comparó el tamaño de las hormigas atacadas en cada intervalo de tiempo y se calculó la proporción de sexos de la progenie. También se calculó el porcentaje de parasitismo real de cada hembra con el cociente “número de pupas formadas sobre el número de oviposiciones” y el porcentaje de supervivencia como “adultos emergidos sobre pupas formadas”.

Análisis estadísticos. La tasa de oviposiciones por intervalo de tiempo y el tamaño promedio de las obreras atacadas fueron analizados con un ANOVA de 1 factor, y se usó

el método secuencial de Bonferroni para las comparaciones múltiples (Sokal y Rohlf 1969). Los porcentajes de parasitismo realizados por cada hembra de *P. tricuspsis* fueron contrastados con el análisis de Proporciones. El tamaño de las hormigas parasitadas y el de los adultos emergidos fueron analizados mediante la prueba T de Student. Se calculó la proporción de sexos con la distribución de probabilidad Binomial.

3.4.6 Éxito reproductivo de *P. tricuspsis* con y sin competencia por el recurso

Con el objeto de aumentar las investigaciones realizadas previamente por Porter (1998) y Smith y Gilbert (2003), en el laboratorio se investigó: 1) la conducta de cortejo y de apareamiento entre una hembra y un macho de *P. tricuspsis* vírgenes nacidos en el laboratorio, antes de que la hembra empiece a oviponer a hormigas monogínicas de *S. invicta* (N = 7) y 2) el éxito reproductivo de *P. tricuspsis* sin-competencia (1 hembra) y con-competencia (3 hembras salvajes, sin machos presentes) por el recurso hormiga (N = 12, 6 nidos por FS).

Análisis estadísticos. El tamaño de los adultos emergidos y el tamaño de las hormigas en la que se desarrollaron con y sin hembras competidoras por el recurso, fueron analizados con la prueba T de Student. Se comparó la proporción de sexos con la distribución de probabilidad Binomial. Las eficiencias en el desarrollo fueron analizadas mediante el cociente “número de pupas formadas (adultos) por hembra atacante” y la supervivencia de las pupas con el cociente “adultos emergidos por pupas formadas”. Ambos cocientes fueron analizados con la prueba de Proporciones. Todos los análisis fueron realizados el programa Statview (SAS Institute Inc. 1998, Cary, NC).

Resultados

3.4.7 Oviposiciones y tiempos de orientación a campo

Pseudacteon tricuspsis invirtió menos tiempo (50%) en orientarse cuando atacó a las obreras *M* que cuando atacó a las obreras *P* (Tabla 4.1), aunque las tasas de oviposición fueron similares para ambas FS de *S. invicta* (Tabla 4.1). El número de oviposiciones no dependió de la cantidad de hormigas presentes en el sendero de forrajeo ($R^2 = 0,02$; $F_{1,4} = 0,09$; $p > 0,90$ y $R^2 = 0,18$; $F_{1,4} = 0,87$; $p = 0,40$ para hormigas *M* y *P*, respectivamente). Sin embargo, *P. tricuspsis* presentó menores tiempos de orientación y tasas de oviposición

mayores cuando fue expuesto a las forrajeras *M* ($R^2 = -0,76$; $F_{1,4} = 5,50$; $p = 0,0245$), pero no cuando fue expuesto a las forrajeras *P* ($R^2 = -0,14$; $F_{1,4} = 0,17$; $p = 0,44$).

Tabla 4.1. Tiempos de orientación (media $\pm$ DE) y tasa de ataques de *P. tricuspsis* sobre ambas FS de *S. invicta*.

FS	N ^a	Tiempos de orientación (seg.)	<i>t</i>	<i>p</i>	Tasa de ataques	<i>t</i>	<i>p</i>
<i>M</i>	6	50,33 $\pm$ 27,86	4,56	< 0,001	23,22 $\pm$ 12,49	0,94	0,816
<i>P</i>	6	89,17 $\pm$ 103,46			17,67 $\pm$ 7,23		

^a N indica el número de nidos muestreados con 3 réplicas por nido. Las comparaciones fueron hechas con la prueba T de Student (a 2 colas).

3.4.8 Efecto en las tasas de forrajeo, tamaños y proporción de forrajeras de ambas FS de *S. invicta*

4.3.2. a Efecto en las tasas de forrajeo

En ausencia del parasitoide, las obreras *M* de *S. invicta* presentaron tasas de forrajeo levemente menores que las obreras *P* (500,50 $\pm$ 106,73 vs. 539,33 $\pm$ 105,29 hormigas, para nidos *M* y *P*, respectivamente; $t = 1,71$; $g.l. = 10$; $p = 0,0436$). *P. tricuspsis* afectó el comportamiento de las forrajeras de ambas FS, debido a que cuando el parasitoide empezó a sobrevolar y a oviponerlas, las obreras dejaron de forrajear y abandonaron el cebo buscando las entradas naturales al nido o presentando conductas estereotipadas conformando grupos de hormigas apiñadas e inmóviles.

4.3.2. b Efecto en el tamaño de las forrajeras

Pseudacteon tricuspsis afectó negativamente el tamaño de las forrajeras *M* de *S. invicta*. En ausencia del parasitoide, el tamaño promedio de las forrajeras *M* fue mayor que el de las forrajeras *P* (Tabla 4.2); mientras que en presencia de *P. tricuspsis* las obreras *M* y *P* de *S. invicta* presentaron tamaños similares (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Tamaño promedio $\pm$ DE (mm) de las obreras de *S. invicta* que forrajearon en ausencia ("sin") y en presencia ("con") de *P. tricuspsis* discriminado por FS.

Forma social	SIN	Parasitoide			
		CON	N	<i>t</i> ^b	<i>p</i>
Monoginia	0,62 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,02	6	2,97	0,0156

Poliginia	0,59 ± 0,02	0,58 ± 0,01	6	1,69	0,08
t^a	1,89	0,66			
p	0,039	0,52			

^a Las comparaciones entre FS fueron hechas con la prueba T de Student (a 2 colas).

^b Las comparaciones "sin" y "con" parasitoides en cada FS fueron hechas con la prueba T de Student para medidas pareadas. N indica número de nidos muestreados.

4.3.2. c Efecto en la proporción de las forrajeras

La proporción de las subcastas de obreras que reclutaron en el cebo se vio afectada por la presencia de *P. tricusps* principalmente para las obreras *M*. En ausencia del parasitoide, las obreras *grandes* representaron el 4% de las forrajeras, las *medianas* el 7,7%, las *pequeñas* el 27,1% y las *menores* el 59,7%. En cambio, para los nidos *P*, el 2,7% de las forrajeras correspondió a las *grandes*, el 12,2% a las *medianas*, el 28,3% a las *pequeñas* y el 55,4% a las *menores* (Tabla 4.3). Por lo tanto, las obreras de los nidos *P* presentaron el doble de obreras *medianas* pero la mitad de obreras *grandes*, en comparación con los nidos *M*.

En presencia de *P. tricusps* los porcentajes de obreras *mayores* y *grandes* no se modificaron de modo significativo en relación con los porcentajes precedentes, mientras que el porcentaje de las *pequeñas* disminuyó y el de las *menores* aumentó en ambas FS de *S. invicta*; solo el porcentaje de las forrajeras *medianas* se modificó diferencialmente entre ambas FS, debido a que para los nidos *M* el porcentaje se redujo casi en un 50%, pero se mantuvo constante para los nidos *P* (Tabla 4.3).

3.4.9 Características en el desarrollo de *P. tricusps* sobre ambas FS de *S. invicta*

4.3.3. a Tamaño de las obreras parasitadas

Pseudacteon tricusps parasitó a obreras de tamaño similar independientemente de la FS de *S. invicta* ($0,79 \pm 0,07$ vs. $0,82 \pm 0,05$ mm, para colonias *M* y *P*, respectivamente; $t = 0,67$; $g.l. = 7$; $p = 0,53$). Sin embargo, las hembras emergieron de hormigas más grandes que los machos ($0,92 \pm 0,06$ vs. $0,76 \pm 0,04$ mm, para las hembras y machos emergidos de obreras *M*; $t = 4,62$; $g.l. = 7$; $p = 0,0024$; y $0,93 \pm 0,02$ vs. $0,77 \pm 0,06$ mm, para las hembras y machos emergidos de obreras *P*; $t = 4,18$; $g.l. = 6$; $p = 0,0058$) y se desarrollaron en un rango de distribución de tamaños más estrecho ($\chi^2 = 32,91$; $p < 0,0001$; Fig. 4.1).

En colonias *M*, las hembras emergieron de obreras *grandes* (66,7%; $0,95 \pm 0,07$ mm) y *medianas* (33,3%; $0,80 \pm 0,05$ mm); mientras que los machos emergieron de obreras *medianas* (86,7%) y *pequeñas* (13,3%; $0,65 \pm 0,05$ mm). En colonias *P*, las hembras emergieron solo de obreras *grandes* ($0,94 \pm 0,01$ mm), mientras que los machos emergieron de obreras *grandes* (26,9%), *medianas* (53,8%; $0,73 \pm 0,04$ mm) y *pequeñas* (19,2%; $0,62 \pm 0,03$ mm; Fig. 4.1). Sin embargo, algunos machos ($n = 15$) se desarrollaron en hormigas óptimas para las hembras (0,84-0,90 mm) y algunas hembras ($n = 4$) en hormigas óptimas para el desarrollo de los machos (0,78 mm). Estos machos presentaron tamaños similares a los de las hembras (0,48-0,51 mm), pero las hembras presentaron tamaños levemente menores (0,42 mm) al promedio.

Tabla 4.3. Tamaño promedio (media $\pm$ DE; mm) de las hormigas de *S. invicta* y proporción de las subcastas en ausencia ("sin") y en presencia ("con") de *P. tricuspis* discriminadas para ambas FS.

FS		Tamaño y proporción de obreras por subcasta ^a					<i>F</i> ^c	<i>p</i>
		Mayor	Grande	Mediana	Pequeña	Menor		
<i>M</i>	Tamaño ^b	1,06 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,02	95,90	< 0,0001
	Sin	0,017	0,040	0,077	0,271	0,597	8,23	0,017
	Con	0,020	0,034	0,045	0,186	0,715		
		=	=	*	*	*		
<i>P</i>	Tamaño ^b	1,03 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,01	373,85	< 0,0001
	Sin	0,014	0,027	0,122	0,283	0,554	2,25	0,165
	Con	0,017	0,022	0,116	0,249	0,596		
		=	=	=	*	*		

^a Los cambios en las proporciones por subcasta, en ausencia y en presencia de *P. tricuspis*, fueron analizados con la prueba de Proporciones. Los asteriscos indican cambios significativos ($p < 0,05$). Subcastas de obreras: *Ma*: mayores; *G*: grandes; *M*: medianas; *P*: pequeñas y *Me*: menores.

^b Las comparaciones en el tamaño de obreras entre colonias *M* y *P* fueron analizadas con la prueba T de Student. Solo las obreras medianas difirieron significativamente entre FS ($t = 2,41$; $g.l. = 10$; $p = 0,0367$; en las otras $p > 0,05$).

^c Se comparó el tamaño promedio de las subcastas con un ANOVA de 1 factor ($p < 0,05$).

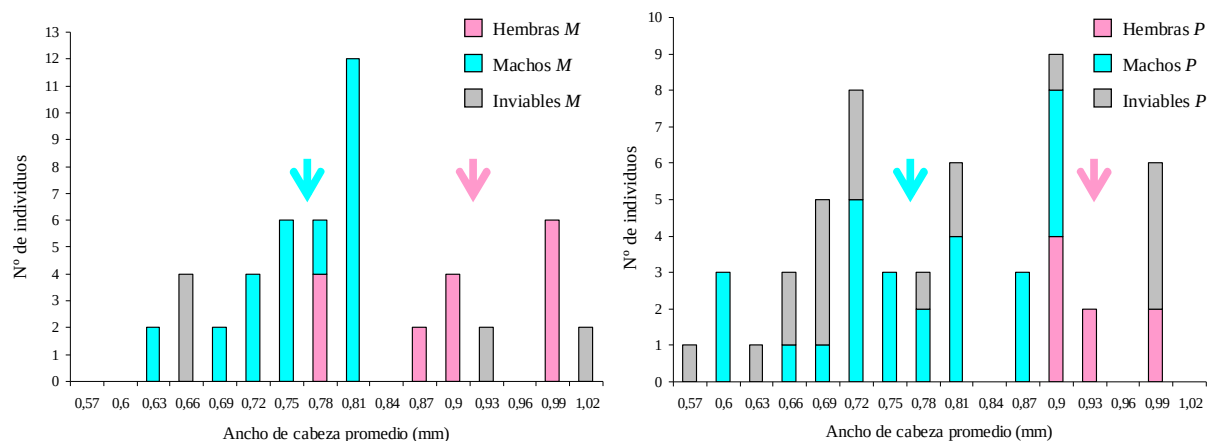


Fig. 4.1. Anchos de cabeza promedio (mm) de las obreras parasitadas por *P. tricuspidis* discriminados por FS de *S. invicta*. Las flechas verticales indican el tamaño promedio de las hormigas de las que emergen las hembras (rosa) y los machos (celeste) de *P. tricuspidis*.

En colonias M, las pupas inviables aparecieron en los extremos de la distribución de tamaños de las hembras y machos de *P. tricuspidis* (Fig. 4.1); mientras que cuando el desarrollo ocurrió sobre obreras P, las pupas inviables se presentaron a lo largo de toda la distribución de tamaños disponibles (Fig. 4.1).

4.3.3. b Periodos de desarrollo

Las hembras y machos de *P. tricuspidis* criados sobre ambas FS de *S. invicta* presentaron tiempos de desarrollo similares, a pesar de que las hembras emergieron de obreras más grandes que los machos (Tabla 4.4).

4.3.3. c Características de los adultos emergidos

Las hembras de *P. tricuspidis* fueron más grandes que los machos ($F_{1,71} = 126,55$; $p < 0,0001$; Tabla 4.5) y el tamaño de los parasitoides dependió del tamaño de las hormigas parasitadas ($F_{1,71} = 31,30$; $p < 0,0001$), pero no de la FS en la que se desarrollaron ($F_{1,71} = 0,04$; $p = 0,84$).

Tabla 4.4. Periodos de desarrollo larval, pupal y total (media $\pm$ DE; días) de las hembras y machos de *P. tricuspidis* desarrollados sobre ambas FS de *S. invicta*.

FS	Sexo	N (n) ^a	Periodos de desarrollo (d)					
			Larval	p	Pupal	p	Total	p
M	Hembras	4 (16)	17,75 $\pm$ 2,87	0,20	16,54 $\pm$ 0,36	0,40	34,29 $\pm$ 2,99	0,36

	Machos	5 (28)	15,73 ± 1,34		17,04 ± 1,06		32,77 ± 1,60	
P	Hembras	3 (8)	18,83 ± 1,44	0,33	16,50 ± 0,01	0,77	35,33 ± 1,44	0,16
	Machos	5 (26)	17,15 ± 2,44		15,97 ± 0,88		33,12 ± 2,03	
Entre	Hembras			0,58		0,38		0,61
	Machos			0,29		0,12		0,78

^a N indica el número de nidos de los que emergieron hembras o machos y *n* el número de individuos desarrollados. Las comparaciones entre sexos en cada FS de *S. invicta* y por sexos entre FS fueron hechas con la prueba T de Student (a 2 colas).

Tabla 4.5. Tamaño promedio (ancho de tórax ± DE; mm) de las hembras y machos de *P. tricuspidis* desarrollados sobre ambas FS de *S. invicta*.

FS	N (<i>n</i>) ^a	Sexo	Tamaño promedio
M	4 (16)	Hembras	0,47 ± 0,04
	5 (28)	Machos	0,36 ± 0,02
P	3 (8)	Hembras	0,46 ± 0,02
	5 (26)	Machos	0,37 ± 0,02

^a N indica el número de nidos y *n* el número de individuos desarrollados.

Se encontró una relación lineal positiva y significativa entre el tamaño de la progenie y el de las obreras en las que se desarrollaron (Fig. 4.2). Aunque las hembras fueron más grandes que los machos, las pendientes entre sexos no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$ para ambas FS; Fig. 4.2).

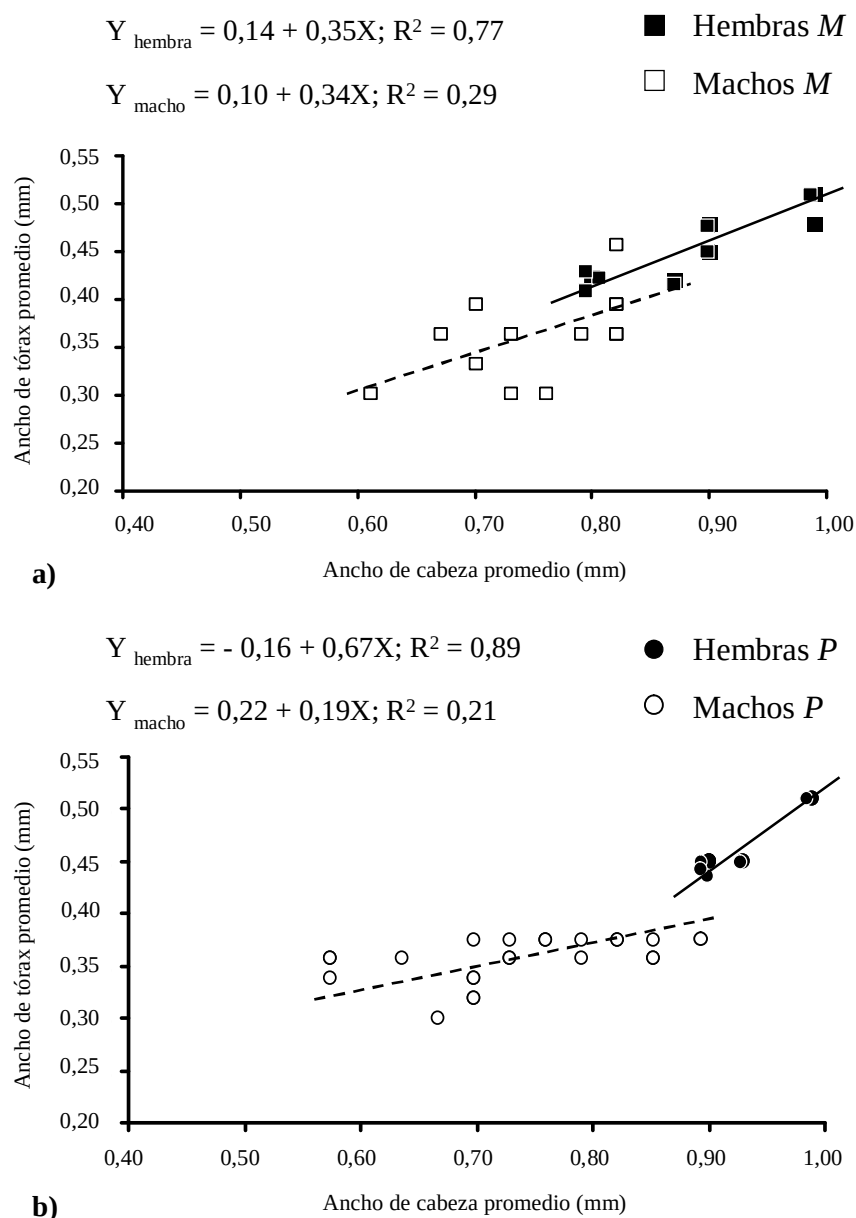


Fig. 4.2. Relación lineal entre el tamaño de las obreras de *S. invicta* y el tamaño de los parasitoides de *P. tricusps* discriminados por sexo y FS (*M*, *P*). Los parasitoides desarrollados en colonias *M* y *P* se indican con cuadrados y círculos, respectivamente. Las hembras se indican en negro y los machos en blanco.

En *P. tricusps* la proporción de sexos estuvo sesgada a favor de los machos en ambas FS de *S. invicta*. Las hembras representaron el 35% de los adultos desarrollados sobre hormigas *M* (16 hembras, 46 adultos; $p = 0,027$) y el 24% de los adultos en las obreras *P* (8 hembras, 34 adultos; $p = 0,001$), siendo la relación hembras a machos de 1:2 y 1:3 para las colonias *M* y *P*, respectivamente. Por consiguiente, se obtuvo el doble de hembras cuando el desarrollo ocurrió sobre hormigas *M*.

3.3.3. d Éxito reproductivo y eficiencias en el desarrollo

Supervivencia de pupas. El 83% de los ataques de *P. tricuspsis* realizados sobre colonias *M* y *P* fueron similarmente productivos (54 y 53 pupas para las colonias *M* y *P*, respectivamente); aunque la supervivencia de las pupas fue mayor para los nidos *M* (85,2%) que para los nidos *P* (64,2%; $Z = 2,28$; $p = 0,0225$). Considerando la supervivencia de pupas por ensayo, se registró mayor productividad cuando el desarrollo ocurrió sobre las colonias *M* de *S. invicta* (88,0 vs. 64,8 %, para colonias *M* y *P*, respectivamente; $Z = 3,67$; $p < 0.001$). Si bien el número promedio de pupas formadas por ensayo fue mayor para las colonias *M* en relación con las colonias *P* (13,50 vs. 13,25 pupas para hormigas *M* y *P*, respectivamente; $Z = 3,67$; $p < 0,001$), no hubo diferencias en la emergencia de adultos entre FS de *S. invicta* (11,50 vs. 8,50 adultos para hormigas *M* y *P*, respectivamente; $Z = 0,62$; $p = 0,54$).

Eficiencia en la formación de pupas y adultos. Considerando el número de hembras que atacaron por ensayo, se obtuvieron la misma cantidad de pupas ($4,5 \pm 3,2$ vs. $4,42 \pm 2,7$ pupas para colonias *M* y *P*, respectivamente; $Z = 0,15$; $p = 0,88$) y de adultos ($3,84 \pm 2,69$ vs. $2,83 \pm 1,99$ adultos para colonias *M* y *P*, respectivamente; $Z = 0,53$; $p = 0,59$) en ambas FS de *S. invicta*.

Preferencias y fecundidad de *P. tricuspsis* en ausencia de competencia por el recurso

4.3.4. a Número de oviposiciones y porcentaje de parasitismo

Las hembras de *P. tricuspsis* presentaron un tiempo de oviposición promedio de $37,14 \pm 16,04$ min., pero la tasa de oviposiciones disminuyó con el tiempo de exposición (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Tasa de oviposiciones (media $\pm$ DE) por intervalo de tiempo (min.) de las hembras de *P. tricuspsis*. Se realizaron 7 ensayos con cada hembra por separado.

Intervalo (min.)	Nº de oviposiciones	N^a	F	p
0-10	$55,43 \pm 14,54$ a	7	5,58	0,0032
10-20	$43,33 \pm 15,69$ ab	6		
20-30	$32,67 \pm 7,97$ b	6		
30-40	$31,50 \pm 3,42$ b	4		

^a Las comparaciones fueron hechas con un ANOVA de un factor ($p < 0,05$).

Las hembras de *P. tricusps* presentaron tasas de oviposiciones similares ($F_{6, 19} = 2,12$; $p = 0,10$), pero difirieron en el número de pupas desarrolladas y en los porcentajes de parasitismo, siendo el parasitismo promedio de 5,78% (Tabla 4.7). El número de oviposiciones realizadas por las hembras de *P. tricusps* no es un buen indicador de la productividad porque no se observó una relación lineal significativa entre la tasa de oviposiciones y el número de pupas desarrolladas ($R^2 = 0,18$; $F_{1, 5} = 1,12$; $p = 0,34$).

Tabla 4.7. Tasa de oviposiciones, número de pupas desarrolladas y porcentaje de parasitismo (%) de las hembras de *P. tricusps*.

Ensayo	Nº total de oviposiciones	Tasa de oviposiciones (media ± DE)	Nº de pupas desarrolladas	Porcentaje de parasitismo (%) ^a
1	234	38,83 ± 14,99	11	4,70 b
2	179	44,75 ± 12,29	5	2,79 b
3	113	38,00 ± 16,64	5	4,42 b
4	181	60,63 ± 21,13	6	3,32 b
5	175	34,60 ± 11,42	31	17,71 a
6	55	55	0	0,00 c
7	106	26,75 ± 4,99	8	7,55 b

^a Se compararon los porcentajes de parasitismo con un análisis de Proporciones ($p < 0,05$).

4.3.4. b Tamaño de obreras parasitadas y de adultos emergidos

El tamaño de las obreras elegidas por *P. tricusps* no varió a lo largo del tiempo ($0,88 \pm 0,02$ mm; $F_{6, 19} = 2,49$; $p = 0,06$; Tabla 4.8). Las hembras emergieron de hormigas de mayor tamaño que los machos ($1,01 \pm 0,07$ vs. $0,82 \pm 0,11$ mm, para hembras y machos, respectivamente; $t = 6,87$; g.l. = 43; $p < 0,0001$) y presentaron un tamaño estadísticamente mayor ($0,50 \pm 0,03$ vs. $0,39 \pm 0,05$ mm para hembras y machos, respectivamente; $t = 8,59$; g.l. = 43; $p < 0,0001$), por lo que en *P. tricusps* el patrón tamaño-selectivo es constante. Las pupas inviables se desarrollaron en cabezas de tamaños similares a las de los machos ($0,84 \pm 0,17$ mm; $t = 0,39$; g.l. = 39; $p = 0,70$).

Tabla 4.8. Tamaño promedio (media $\pm$ DE; mm) de las hormigas atacadas por *P. tricuspis* discriminadas por ensayo de oviposición e intervalos de tiempo (min).

Ensayo	Intervalo de tiempo (min.)	Tamaño promedio (media $\pm$ DE)	F^a	p
1	0-10	0,94 $\pm$ 0,12	2,52	0,08
	10-20	0,89 $\pm$ 0,14		
	20-30	0,90 $\pm$ 0,15		
	30-40	0,87 $\pm$ 0,14		
	40-50	0,88 $\pm$ 0,14		
	50-60	0,91 $\pm$ 0,09		
2	0-10	0,85 $\pm$ 0,17	1,58	0,19
	10-20	0,88 $\pm$ 0,12		
	20-30	0,90 $\pm$ 0,13		
	30-40	0,91 $\pm$ 0,12		
3	0-10	0,88 $\pm$ 0,19	0,16	0,85
	10-20	0,86 $\pm$ 0,14		
	20-30	0,86 $\pm$ 0,18		
4	0-10	0,88 $\pm$ 0,14	1,11	0,33
	10-20	0,91 $\pm$ 0,12		
	20-30	0,91 $\pm$ 0,14		
5	0-10	0,88 $\pm$ 0,21	0,52	0,72
	10-20	0,88 $\pm$ 0,21		
	20-30	0,84 $\pm$ 0,18		
	30-40	0,85 $\pm$ 0,19		
	40-50	0,91 $\pm$ 0,17		
6	0-10	0,89 $\pm$ 0,19		
7	0-10	0,87 $\pm$ 0,14	0,25	0,86
	10-20	0,86 $\pm$ 0,13		
	20-30	0,84 $\pm$ 0,16		
	30-40	0,84 $\pm$ 0,15		

^a Las comparaciones por ensayo de oviposición fueron hechas con un ANOVA de un factor.

Sorprendentemente, la proporción de sexos de la progenie desarrollada a partir de oviposiciones libres de competencia fue de 1:1 (26 hembras, 50 adultos; $p = 1$) y el porcentaje de supervivencia promedio del 73,5% (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Supervivencia de pupas (%) y proporción de sexos de la progenie de *P. tricuspis* desarrollada en condiciones libre de competencia.

Ensayo	Nº de pupas	Nº de adultos	Supervivencia de pupas (%)	Nº de hembras	Proporción de sexos ^a	P
1	11	9	81,82	6	2	0,91
2	5	4	80,00	2	1	0,67
3	5	3	60,00	0	0	0,13
4	6	4	66,67	4	---	1
5	31	24	77,42	12	1	0,58
7	8	6	75,00	2	0,5	0,34
Media ± DE	11 ± 9,18	8,33 ± 7,27	73,49 ± 7,72	4,33 ± 3,90	0,90 ± 0,66	

^a La proporción de sexos (hembras:machos) fue calculada mediante proporción Binomial.

3.4.10 Desarrollo y eficiencias de *P. tricusps* con y sin competencia por el recurso

Las hembras que emergieron de oviposiciones libres de competencia (1 hembra) fueron más grandes que las hembras desarrolladas cuando las madres (3 hembras) compitieron por el recurso (Tabla 4.10); mientras que los machos presentaron tamaños similares (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Tamaño de los adultos (media ± DE; mm) de *P. tricusps* desarrollados con y sin competencia por el recurso.

Sexo	Ensayo	FS	Tamaño (media ± DE)	N ^a	F	p ^b
Hembras	Con competencia	M	0,46 ± 0,03 b	16	7,59	0,0014
	Con competencia	P	0,47 ± 0,03 b	8		
	Sin competencia	M	0,50 ± 0,03 a	24		
Machos	Con competencia	M	0,36 ± 0,04 b	28	3,73	0,0280
	Con competencia	P	0,37 ± 0,05 ab	26		
	Sin competencia	M	0,39 ± 0,05 a	21		

^a N indica el número de individuos. Las comparaciones fueron hechas con un ANOVA de un factor.

^b El nivel de significación por comparaciones múltiples es $p = 0,017$.

Además, las hembras también emergieron de hormigas más grandes que las hembras criadas bajo condiciones de competencia ($1,01 \pm 0,07$ vs. $0,92 \pm 0,06$ mm, para las hembras de *P. tricusps* desarrolladas en ausencia y en presencia de competidoras, respectivamente; $F_{2, 45} = 11,07$; $p = 0,0001$), pero los machos emergieron de hormigas de

tamaño similar en todos los casos considerados ($F_{2, 72} = 2,33$; $p = 0,10$). Asimismo, en los experimentos libres de competencia se produjeron 3 veces más pupas y adultos que cuando las madres compitieron por el recurso, y las hembras representaron el 50% de la progenie (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Productividad y eficiencia de *P. tricuspis* cuando las madres compitieron (ambas FS) y no compitieron (solo en M) por el recurso hormiga disponible.

Productividad	Con competencia		Sin competencia
	Monoginia	Poliginia	Monoginia
Nº de ensayos	6	6	7
Nº de hembras por ensayo	3	3	1
Nº de pupas totales	54	53	66
Nº de adultos totales	46	34	50
Hembras totales	16	8	26
Machos totales	30	26	24
Relación hembra:macho	0,53	0,31	1,08
Supervivencia de pupas (%)	85,19	64,15	75,76
Eficiencias totales en el desarrollo de <i>P. tricuspis</i>			
Nº de pupas por hembra	3	2,94	9,43
Nº de adultos por hembra	2,56	1,89	7,14

3.4.11 Comportamiento de oviposición de las hembras de *P. tricuspis*

4.3.6. a Comportamiento de las hembras nacidas en laboratorio

Al momento de liberar 1 hembra y 1 macho vírgenes de *P. tricuspis* se observó que los machos “acosaron” a las obreras “pateándolas” con sus patas traseras en la cabeza o en el protórax; mientras que las hembras volaban lejos de las hormigas. En una de las bandejas, mientras el macho acosaba a las hormigas, la hembra se alejó sin intentar oviponer o aparearse con el macho (hembra A; Tabla 4.12). En los otros 2 ensayos, el cortejo entre hembras y machos presentó los siguientes pasos: 1) antes del apareamiento, los machos patearon a las hormigas para atraer a las hembras; 2) las hembras y machos volaron en círculos cerca de las hormigas y, 3) el macho volando por encima y por detrás de la hembra, se apoyó sobre ella y ambos acoplados cayeron en caída libre. El amplexo

duró entre 2-3 seg. y se repitió entre 2-3 veces en ambas bandejas. En ambos casos, luego de copular, las hembras persiguieron y “parasitaron” a las hormigas durante 30 minutos (hembras B y C; Tabla 4.12). Dado que el porcentaje de parasitismo en *P. tricusps* fue bajo aún en condiciones de laboratorio controladas (Tabla 4.7), se obtuvo descendencia solo en uno de los experimentos realizados (hembra C; Tabla 4.12). Sorprendentemente, las hormigas que eligieron las hembras nacidas y copuladas en el laboratorio fueron significativamente más pequeñas ($0,75 \pm 0,05$ mm) que las elegidas por hembras salvajes ($0,88 \pm 0,02$ mm; $t = 7,18$; $g.l. = 11$; $p < 0,0001$; el nivel de significación por comparaciones múltiples es $p = 0,017$).

4.3.6. b Comportamiento de las hembras salvajes

Entre las hembras salvajes de *P. tricusps* se observó un efecto de interferencia al intentar oviponer sobre ambas FS de *S. invicta*, dado que 2 o 3 de las hembras liberadas invirtieron parte de su tiempo (87 ± 22 min.) en enfrentamientos cuerpo a cuerpo (“choques”) o se atravesaron en el camino de las otras hembras mientras intentaban oviponer a las hormigas. Los “choques” implicaron golpes de tórax en los que la hembra “atacante” desvió la dirección de vuelo de la hembra “atacada”. Este comportamiento fue observado en el 41,7% de todos los ensayos realizados (24 ensayos). Este comportamiento también fue observado en el campo, aunque los datos no fueron analizados.

Tabla 4.12. Comparación en el comportamiento de las hembras de *P. tricuspis* nacidas en el laboratorio, oviposiciones realizadas por intervalo de tiempo (min.), tamaño de hormigas parasitadas (media $\pm$ DE; mm) y productividad (número de pupas y adultos obtenidos).

Ensayo ^a	Cortejo y cópula	Nº de oviposiciones	Intervalo de tiempo (min)	Tamaño de hormigas (mm)	Nº de pupas	Nº de adultos	Progenie
A	NO	0	---	---	---	---	---
B	SI	15	0-10	0,82 $\pm$ 0,17	0	0	0
C ^b	SI	41	0-10	0,78 $\pm$ 0,17	6	4	1 hembra
		42	10-20	0,71 $\pm$ 0,15			1 macho
		38	20-30	0,72 $\pm$ 0,17			2 no viables
		27	30-40	0,71 $\pm$ 0,15			
		29	40-50	0,73 $\pm$ 0,15			

^a En los ensayos B y C, cada hembra se apareó con el macho y ovipuso a las hormigas.

^b Las comparaciones en el tamaño de las hormigas parasitadas por intervalo de tiempo fueron hechas con un ANOVA de un factor ($F_{4,172} = 1,40$; $p = 0,24$).

4.4 Discusión

En este capítulo se evaluó el comportamiento y desarrollo de *Pseudacteon tricuspis* en función de la forma social (FS) de su hospedador, la hormiga *Solenopsis invicta*. También se comparó el éxito reproductivo de las hembras de *P. tricuspis* en ausencia y en presencia de competencia por el recurso hormiga.

En el campo, *P. tricuspis* presentó tiempos de orientación más cortos cuando atacó a obreras *M* afectando el tamaño de las mismas (Tabla 4.2), pero no afectó a las forrajeras *P*, a pesar de que presentó tasas de oviposición similares sobre ambas FS de *S. invicta* (Tabla 4.1). En presencia de *P. tricuspis*, las forrajeras *pequeñas* y *menores* de las colonias *M* y *P* aumentaron y disminuyeron sus proporciones, respectivamente. La diferencia en el comportamiento de las forrajeras entre ambas FS se registró en las obreras *medianas*, porque en las colonias *M* disminuyeron sus porcentajes pero en las colonias *P* no se modificaron significativamente (Tabla 4.3). Es probable que el mayor efecto sobre las obreras *M* se deba a una mayor experiencia de los parasitoides porque estos nidos son más abundantes que los nidos *P* (Tabla 2.4). En ambas FS, las forrajeras *mayores* huyeron y las obreras *pequeñas* y *menores* formaron grupos de hormigas inmóviles sobre o cerca del cebo. Este comportamiento les permitiría a las hormigas retener el cebo manteniendo obreras de menor tamaño al preferido por *P. tricuspis* ($0,80 \pm 0,06$ vs. $0,58 \pm 0,02$ mm para los tamaños de obreras preferidos y disponibles, respectivamente). Así, en presencia de *P. tricuspis*, como ocurrió con *P. curvatus*, *S. invicta* presentó una relación de compromiso entre el tamaño y número de forrajeras y, en este caso las hormigas *M* fueron más grandes pero presentaron tasas de forrajeo más bajas que las hormigas *P*.

En los ensayos de laboratorio, *P. tricuspis* se desarrolló exitosamente sobre ambas FS de *S. invicta* y las hembras y machos presentaron periodos de desarrollo similares (Tabla 4.4). Los adultos, sin embargo, presentaron un desarrollo tamaño-selectivo (Fig. 4.2) porque las hembras emergieron de hormigas de mayor tamaño (Fig. 4.1) y fueron más grandes que los machos (Tabla 4.5; Fig. 4.2). El éxito reproductivo de *P. tricuspis*, medido como la supervivencia de pupas y el número de hembras formadas, fue 24,7% mayor cuando el desarrollo ocurrió sobre colonias *M* que sobre colonias *P*. Sin embargo, el número de pupas y de adultos desarrollados por ensayo de oviposición fue similar en ambas FS de *S. invicta*. No obstante, cuando el desarrollo ocurrió sobre las hormigas *P* la

inviabilidad de las pupas fue mayor (Fig. 4.1) y la proporción de sexos estuvo más sesgada hacia los machos. Es probable que estas diferencias se deban a que 1) las hormigas de colonias *P* son, en promedio, más pequeñas que las *M* (Tabla 2.8) y 2) a que las hembras de *P. tricuspis* emergen principalmente de obreras *grandes* (Fig. 4.1), pero los nidos *P* tienen el doble de obreras *medianas* (óptimas para desarrollar machos) y la mitad de obreras *grandes* en comparación con los nidos *M* (Tabla 4.3).

La proporción de sexos obtenida a partir de datos de campo (Morrison y Porter 2005b; Calcaterra *et al.* 2008a) y de laboratorio (este capítulo), siempre han mostrado un sesgo a favor de los machos, siendo la relación hembra a macho de 1:2 (Tabla 4.11; Morrison y Porter 2005b) o de 1:3 (Tabla 4.11; Morrison y Gilbert 1998), respectivamente. No obstante, este patrón pudo ser modificado cuando se les permitió a las hembras de *P. tricuspis* oviponer en ausencia de competencia por el recurso (Tabla 4.11). En estas condiciones, la relación de sexos fue 1:1 y el número de pupas y adultos producidos fue 3 veces mayor que cuando las madres compitieron por las hormigas *M* o *P* de *S. invicta* (Tabla 4.11). Este resultado indica que es posible modificar la proporción de sexos manipulando el tamaño de las obreras que se ofrecen y evitando que otras hembras compitan y consuman el recurso disponible. Las hembras de *P. tricuspis*, por un efecto de interferencia (Godfray 1994), invirtieron parte de su tiempo y energía en competir antes que en consumir el recurso. Sin competencia, las hembras podrían elegir el tamaño del hospedador con más cuidado y podrían evaluar si ya fue previamente parasitado. En consecuencia, el costo de interferencia llevó a una menor cantidad de obreras preferidas para desarrollar hembras y en menos pupas y adultos formados (Tabla 4.11).

En ausencia de competencia por el recurso, las hembras de *P. tricuspis* presentaron tasas de oviposición similares y el tamaño de las obreras elegidas no se modificó a lo largo del tiempo (Tabla 4.6), sin embargo, los porcentajes de parasitismo variaron considerablemente (Tablas 4.7 y 4.8). Las diferencias en los porcentajes de parasitismo indicarían que, a pesar de que las colonias de *S. invicta* puedan parecer similares, las hormigas pueden diferir en calidad. Por lo tanto, es posible que *P. tricuspis* no pueda evaluar la edad, el vigor o si las hormigas ya estaban parasitadas porque las forrajeras parasitadas se comportan normalmente hasta pocas horas antes de que el parasitoide empuje y provoque la muerte de las mismas (Cassill y Tschinkel 1999c; Henne y Jonson 2007). No obstante, *P. tricuspis* tuvo mayor éxito reproductivo cuando no compitió por el recurso (5,78%) siendo superior a los porcentajes de parasitismo natural (< 1%) obtenidos

a partir de poblaciones establecidas en los Estados Unidos sobre nidos *M* de *S. invicta* (Morrison y Porter 2005a) y a los registrados en ensayos de laboratorio con *P. tricuspis* colectados en Brasil pero criados sobre colonias *P* en Austin, (< 3%, Morrison *et al.* 1997). Además, datos colectados de diferentes especies de *Pseudacteon* Sudamericanas, presentaron tasas de parasitismo naturales del 0,24% (Calcaterra *et al.* 2008a).

Este patrón de interferencia no fue observado en *P. curvatus* (Cap. 3), otra de las especies liberadas en los Estados Unidos, junto con *P. tricuspis*, para controlar a las poblaciones introducidas de *Solenopsis* (Porter y Gilbert 2004; Gilbert *et al.* 2008) y, es probable que la ausencia de comportamientos agresivos o territoriales frente a otras hembras se deba a que: 1) *P. curvatus* ovipone esencialmente a obreras *pequeñas*, que son abundantes en el campo (Fig. 3.2, Tabla 3.3) y 2) porque ambos sexos se desarrollan en hormigas de tamaños similares (Figs. 3.3 y 5.2). Además, bajo condiciones de cría similares, *P. curvatus* produjo 4,5 veces más pupas y adultos que *P. tricuspis*. En contraposición, cuando se liberaron entre 15-20 hembras de *P. curvatus* sobre el mismo grupo de hormigas se obtuvieron $5,03 \pm 1,55$ pupas/hembra (Vazquez *et al.* 2004). Finalmente, a pesar de que *P. tricuspis* prefiere a hormigas más grandes que *P. curvatus*, ambas especies se superponen parcialmente en el tamaño de las obreras que parasitan (Fig. 5.2). Esta superposición en el tamaño de obreras parasitadas podría afectar diferencialmente a ambas especies de parasitoides; por ejemplo *P. curvatus* podría desplazar a *P. tricuspis* por competencia explotativa al utilizar el mismo rango de hormigas que usa esta especie para producir machos (Fig. 5.2), lo que provocaría un cambio operacional en la proporción de sexos a favor de las hembras de *P. tricuspis* cuando ambas especies están en simpatría (LeBrun *et al.* 2009). Sin embargo, aunque el número de hembras aumente, podría reducirse la densidad poblacional si los machos de *P. tricuspis* se volvieran escasos debido a la competencia con *P. curvatus* por las hormigas *pequeñas*. O contrariamente a lo esperado, el comportamiento agresivo de *P. tricuspis* podría afectar directa (mediante contacto físico) o indirectamente (afectando el comportamiento de las forrajeras) el éxito reproductivo de *P. curvatus*.

Para evaluar el impacto de los parasitoides sobre las colonias *Solenopsis*, es necesario cuantificar los efectos indirectos que provocan las especies de *Pseudacteon* sobre la proporción relativa de obreras (Tablas 3.3 y 4.3; Folgarait y Gilbert 1999), en el comportamiento de las obreras (esta tesis; Morrison 1999; Wuellner *et al.* 2002), en las tasas de forrajeo (esta tesis; Mottern *et al.* 2004) y en la competencia interespecífica

(LeBrun *et al.* 2009) e intraespecífica entre hembras (este capítulo). También sería importante evaluar si en otras especies de *Pseudacteon* de tamaño grande (Fig. 5.1) existe un efecto de interferencia. Este efecto podría ser evaluado comparando el éxito reproductivo y el tamaño de los adultos de las especies de *Pseudacteon* que coexisten simpátrica y alopátricamente. Además, se debería considerar la FS de las hormigas porque diferentes especies de *Pseudacteon* prefieren diferentes tamaños de obreras (Fig. 5.1) y distintas FS (Tablas 3.1, 4.1 y 4.11) y porque los nidos *M* y *P* de *S. invicta* presentan distintas abundancias relativas (Fig. 2.8), lo que podría afectar la coexistencia de las especies de *Pseudacteon* usadas como agentes de control biológico contra las poblaciones introducidas de *S. invicta* y *S. richteri*.

4.5 Conclusiones

- *Pseudacteon tricuspis* afecta el patrón de forrajeo de las obreras *Solenopsis invicta*, promoviendo a que permanezcan en el cebo obreras más pequeñas que las preferidas por el parasitoide.
- *Pseudacteon tricuspis* afecta principalmente a las hormigas monogónicas de *S. invicta*.
- Aunque *P. tricuspis* prefiere a obreras de colonias monogónicas, ovipone y se desarrolla en ambas FS de *S. invicta*.
- Existe una relación tamaño dependiente positiva entre el tamaño del hospedador y el del parasitoide en desarrollo, por lo que de hormigas más grandes emergen parasitoides de mayor tamaño.
- Los adultos de *P. tricuspis* presentan dimorfismo sexual sus tamaño a favor de las hembras, las que se desarrollan sobre obreras más grandes que los machos, independientemente de la FS de *S. invicta*.
- En general, la proporción de sexos en *P. tricuspis* está sesgada a favor de los machos.
- La proporción de sexos en *P. tricuspis* puede ser modificada manipulando el tamaño y proporción de las obreras en las que se desarrolla.
- Las hembras de *P. tricuspis* compiten por el recurso hormiga mediante interferencia por contacto directo.
- En ausencia de competencia por el recurso, *P. tricuspis* aloca su energía en oviponer a las hormigas obteniendo un éxito reproductivo mayor y produciendo igual cantidad de hembras y machos.

Capítulo 5

Comparación de las historias de vida de *P. curvatus* y *P. tricuspis*

SE SUPRIMIÓ VOLUNTARIAMENTE EL CAPÍTULO 5
(12 páginas)

Capítulo 6

Caracterización citogenética de *Pseudacteon curvatus* y *P. tricuspis* *

6.1 Introducción

El orden Diptera incluye una gran cantidad de especies, lo cual lo convierte en un grupo interesante para estudios citogenéticos y de citotaxonomía a nivel evolutivo y, si bien la familia Phoridae es una de las más diversas e interesantes dentro de los Diptera (Disney 1994), sus antecedentes citogenéticos son muy limitados y se refieren exclusivamente a *Megaselia scalaris* (Loew) y *M. spiracularis* Schmitz (Mainx 1964; Willhoeft y Traut 1990). Particularmente en *Pseudacteon*, no existen estudios previos a esta tesis de investigación.*

En Diptera, las familias suelen presentar cromosomas monocéntricos con un número cromosómico bajo ($2n = 4-20$) y con valores modales de 6 a 8 en varias familias “inferiores” (SO Nematocera) y de 12 en numerosas especies de las familias “superiores” (SO Brachycera; White 1973). En Sarcophagidae y Calliphoridae (SO Brachycera, superfamilia Oestroidea), casi todas las especies tienen $2n = 12$ con un par XY, los autosomas son metacéntricos y los cromosomas sexuales poseen gran variación en tamaño y forma (Parise-Maltempi y Avancini 2000, 2001). En Drosophilidae (SO Brachycera, superfamilia Acalypttrata) el número cromosómico primitivo parece ser $2n = 12$ con 5 pares de cromosomas telocéntricos (incluido el par sexual XY) y un par muy pequeño parecido a un punto. La reducción en el número cromosómico parece haber ocurrido muchas veces de modo independiente por la fusión de éstos elementos (White 1973). La mayoría de las especies de Muscidae (SO Brachycera, superfamilia Muscoidea) poseen 6 pares de cromosomas ($2n = 12$) con un par de cromosomas sexuales X e Y pequeños y heterocromáticos, aunque en algunas especies se han perdido y presentan $2n = 10$ (Hediger *et al.* 1998; Parise-Maltempi y Avancini 2001). En Phoridae (SO Brachycera, superfamilia Phoroidea), *Megaselia scalaris* y *M. spiracularis*, presentan un número cromosómico $2n = 6$ con dos pares de cromosomas metacéntricos y un par telocéntrico (Mainx 1964; Traut *et al.* 1990; Willhoeft y Traut, 1990; Wolf *et al.* 1996). En ambas especies el par cromosómico sexual es homomórfico con una incipiente diferenciación estructural y molecular y el sexo de los individuos se determina por la presencia o ausencia de un factor masculinizante simple “M” ubicado en cualquiera de los 3 grupos de

ligamiento por recombinación de un cromosoma con su homólogo o por translocación o transposición a un cromosoma no homólogo (Mainx 1964; Traut y Willhoeft 1990; Traut *et al.* 1990).

Los Diptera también se caracterizan por presentar apareamiento somático en mitosis o en meiosis. Los cromosomas homólogos se ubican próximos uno al otro a lo largo de su longitud desde la interfase hasta la metafase; en metafase el apareamiento se hace menos fuerte y los homólogos quedan ligeramente separados (Fung *et al.* 1998; McKee 2004). Se considera que el apareamiento somático se debe a fuerzas de atracción similares a las que operan en el apareamiento meiótico (Fung *et al.* 1998; McKee 2004).

Si bien en la mayoría de las familias del SO Brachycera y en algunas del SO Nematocera la espermatogénesis es aquiasmática, en el género *Megaselia* la meiosis masculina es quiasmática (Mainx 1964; White 1973) y, existe la posibilidad de que los Phoridae hayan descendido a partir de moscas con meiosis masculina aquiasmática en las que ocurrió una reversión; sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que hayan evolucionado de antecesores nematoceros independientemente a los demás Brachycera (White 1973).

En general los insectos poseen diversos mecanismos de determinación sexual y, en muchas especies los cromosomas presentan alguna asimetría en uno de los pares cromosómicos del complemento que se corresponden a los cromosomas sexuales (Bull 1983; Macgregor 1993). En los sistemas sexuales simples, los cromosomas X e Y son parcialmente homólogos o no homólogos y, en el curso de la evolución, algunas especies perdieron el cromosoma Y originando el sistema XX/X0. Si bien en la mayoría de los dípteros los machos son el sexo heterogamético, existen especies donde el sexo heterogamético corresponde a la hembra (Sistema ZW/ZZ; White 1973; Bull 1983). Particularmente, en Diptera existen dos mecanismos de determinación del sexo básicos (Bull 1983; Schüt y Nöthiger 2000). En el sistema de “balance génico”, como ocurre en *Drosophila*, el fenotipo sexual depende del equilibrio entre ciertos genes presentes en los cromosomas X y otros presentes en los autosomas; mientras que el cromosoma Y (necesario para la fertilidad del macho) carece de función en el fenotipo sexual (Bull 1983; Laugé 1985). En el sistema “Y dominante” el cromosoma Y porta el gen que determina la masculinidad, como ocurre en varias líneas de *Musca domestica* Linnaeus (Hediger *et al.* 1998; Dübendorfer *et al.* 2002). No obstante, en varios géneros y familias los cromosomas

sexuales son homomórficos y la determinación del sexo depende de un factor masculinizante autosómico M (Tabla 6.1).

A pesar de los avances a nivel molecular, todavía se realizan mapeos físicos de los genes para analizar rasgos básicos del cariotipo porque el comportamiento de los cromosomas y sus genes determinan el mecanismo de la herencia (Sumner 2003). Dado que los caracteres cromosómicos son esencialmente morfológicos pueden ser analizados igualmente que los demás rasgos fenotípicos de los individuos y de las especies (Macgregor 1993) y muchos de estos caracteres son discretos y fáciles de reconocer (Laugé 1985). El estudio del cariotipo de especies relacionadas permitió descubrir que las mismas suelen presentar el mismo número cromosómico y que los cromosomas tienen formas similares, aunque difieren en los valores C de contenido de ADN por genoma haploide (MacGregor 1993; Rafael y Tadeo 1998; Parise-Maltempi y Avancini 2001; Selivon *et al.* 2005). Por lo tanto, dentro de un mismo género una de las especies tiene cromosomas más grandes que las demás y, a nivel evolutivo, los cromosomas pueden cambiar en tamaño aunque no se modifiquen las dimensiones relativas del complemento cromosómico y sin que varíe demasiado la morfología o naturaleza de las especies involucradas (White 1973; MacGregor 1993).

Tabla 6.1. Breve resumen sobre los diferentes tipos de cromosomas sexuales y de los mecanismos de determinación de sexo en el Orden Diptera (obtenido de Marín y Baker 1998). H indica cromosomas sexuales homomórficos; A indica cromosomas autosómicos.

Suborden	Infraorden	Familia	Género	Cromosomas sexuales	Mecanismo de determinación del sexo
Nematocera	Tipulomorpha	Tipulidae	<i>Tipula</i>	XX/XY; H	
			<i>Pales</i>	XX/XY	Factor masculinizante dominante
	Bibionomorpha	Sciaridae	<i>Sciara</i>	XX/X0 (somático)	Genotipo de la madre; balance génico X:A
		Cecidomyiidae	<i>Mayetiola</i>	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ / X ₁ X ₂ 0	Genotipo de la madre; balance génico X:A (?)
	Culicomorpha	Culicidae	<i>Culex</i>	H	Factor masculinizante dominante
			<i>Anopheles</i>	H	Factor masculinizante dominante
			<i>Aedes</i>	XX/XY	Factor masculinizante dominante
		Simuliidae	<i>Eusimulium</i>	H	Factor masculinizante dominante
		Chironomidae	<i>Chironomus</i>	H	Factor masculinizante dominante (con localización variable)
			<i>Polypedilum</i>	ZW/ZZ	
Brachycera	Tabanomorpha	Tabanidae		XX/XY	
		Stratiomyidae		XX/XY	
Cyclorrhapha	Muscomorpha-Aschiza	Phoridae	<i>Megaselia</i>	H	Factor masculinizante dominante (con localización variable)
	Schizophora-Acalyptrata	Tephritidae	<i>Ceratitis</i>	XX/XY	Factor masculinizante dominante
			<i>Anastrepha</i> (con excepciones)	X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ / X ₁ X ₂ Y; ZW/ZZ	
		Drosophilidae	<i>Drosophila</i>	XX/XY (pocos XX/X0;	Balance génico X:A

			X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ / X ₁ X ₂ Y; XX/XY ₁ Y ₂	
Schizophora-Calyptrata	Muscidae	<i>Musca</i>	XX/XY; H	Varios mecanismos ^a
	Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	XX/XY; H	Factor masculinizante dominante
		<i>Chrysomya</i>	XX/XY; H	Genotipo de la madre
		<i>Lucilia</i>	XX/XY	Factor masculinizante dominante

^a Ver Dübendorfer *et al.* 2002.

En todo estudio citogenético se considera el tamaño, número, forma y diferenciación lineal de los cromosomas usando técnicas de bandeos (Lacadena 1996) para detectar y diferenciar regiones eucromáticas y heterocromáticas (Heitz 1928; Macgregor 1993; Lacadena 1996). La condición heterocromática se manifiesta por una mayor (heteropicnosis positiva) o menor tinción (heteropicnosis negativa) en relación con la eucromatina (Heitz 1928). Además, la heterocromatina puede ser *constitutiva* si permanece condensada durante todo el ciclo celular y es visible en interfase, o *facultativa* cuando se condensa diferencialmente en ciertos tejidos o en determinadas etapas del ciclo celular (Macgregor 1993; Lacadena 1996).

Los cromosomas de los Diptera, como ocurre en los insectos en general, no responden al tratamiento para bandas G (White 1973; Laugé 1985; Lacadena 1996) pero pueden aplicarse otras técnicas de bandas cromosómicas (Bull 1983; Lacadena 1996) junto con las técnicas moleculares modernas (Selivon y Perondini 1997; Willhoeft 1997; Hediger *et al.* 1998; Parise-Maltempi y Avancini 2000, 2001). Las regiones organizadoras del nucleolo (NORs) se pueden teñir con plata cuando están activas (Howell y Black 1980) y mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), usando sondas específicas para el ADN ribosomal (Sumner 2003).

El principal objetivo de este capítulo es caracterizar cariotípicamente a ambas especies de *Pseudacteon* porque puede ser útil para 1) resolver problemas taxonómicos a nivel de especie, variedades o demos (Folgarait *et al.* 2006; Kronforst *et al.* 2007), 2) determinar el mecanismo de determinación sexual y 3) porque para trabajar en control biológico es necesario conocer las características citológicas de las especies para poder manipular la proporción de sexos a favor de las hembras, mientras sea posible.

Objetivos

Poner a punto la técnica para la obtención de preparados citogenéticos

Caracterizar por primera vez el cariotipo de *Pseudacteon curvatus* y *P. tricuspis*

Comparar a nivel citológico de ambas especies analizadas

Materiales y métodos

6.2.1 Recolección de los ejemplares

Los experimentos fueron realizados entre agosto de 2006 y noviembre de 2007. *Pseudacteon curvatus* y *P. tricuspis*, fueron criados sobre colonias de *Solenopsis invicta* colectadas en las cercanías de Mercedes, Corrientes (29° 47' Sur y 58° 03' Oeste). Los adultos de *P. curvatus* fueron colectados en la Reserva Ecológica Costanera Sur (RECS), Buenos Aires (34° 37' Sur y 58° 22' Oeste), y los de *P. tricuspis* en San Javier, Santa Fe (30° 58' Sur y 59° 94' Oeste), Argentina.

6.2.2 Obtención de células en división

Para obtener individuos en desarrollo se realizaron varios ensayos de oviposición en el laboratorio introduciendo en cada bandeja de vuelo igual cantidad de obreras *grandes*, *medianas* y *pequeñas* (667 hormigas por categoría) y de 3-6 hembras de *P. curvatus* o de *P. tricuspis* a las que se les permitió oviponer por 2 h. Las hormigas “atacadas” se mantuvieron en cuartos de cría a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 12: 12 (L:O) y a 80 ± 10 % HR. Los ejemplares fueron diseccionados en el Laboratorio de Citogenética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (LACYE, FCEN, UBA).

6.2.2. a A partir de ejemplares adultos

Para obtener células en división mitótica se diseccionaron los ganglios cerebrales de hembras y machos de *Pseudacteon* y para obtener células en meiosis se diseccionaron sus gónadas. Los ganglios cerebrales presentaron índices mitóticos muy bajos, las ovariolas huevos maduros y los testículos espermatozoides, por lo que no fueron útiles para los estudios citogenéticos.

6.2.2. b A partir de pupas

Posteriormente, se diseccionaron pupas de diferentes etapas de desarrollo para elegir las que presentaran el mayor índice mitótico. Las pupas de 3 a 5 días de desarrollo carecieron de tejidos diferenciados por lo que no fue posible determinar el sexo de las mismas (Fig. 6.1a). Las pupas con más de 7 días de desarrollo presentaron tejidos diferenciados y pudieron ser sexadas. Las pupas con 11 días de desarrollo presentaron órganos y apéndices desarrollados (Fig. 6.1b-f). Para caracterizar citogenéticamente a

ambas especies de *Pseudacteon* se eligieron a las pupas de 3 a 5 días de desarrollo porque presentaron los índices mitóticos más altos.

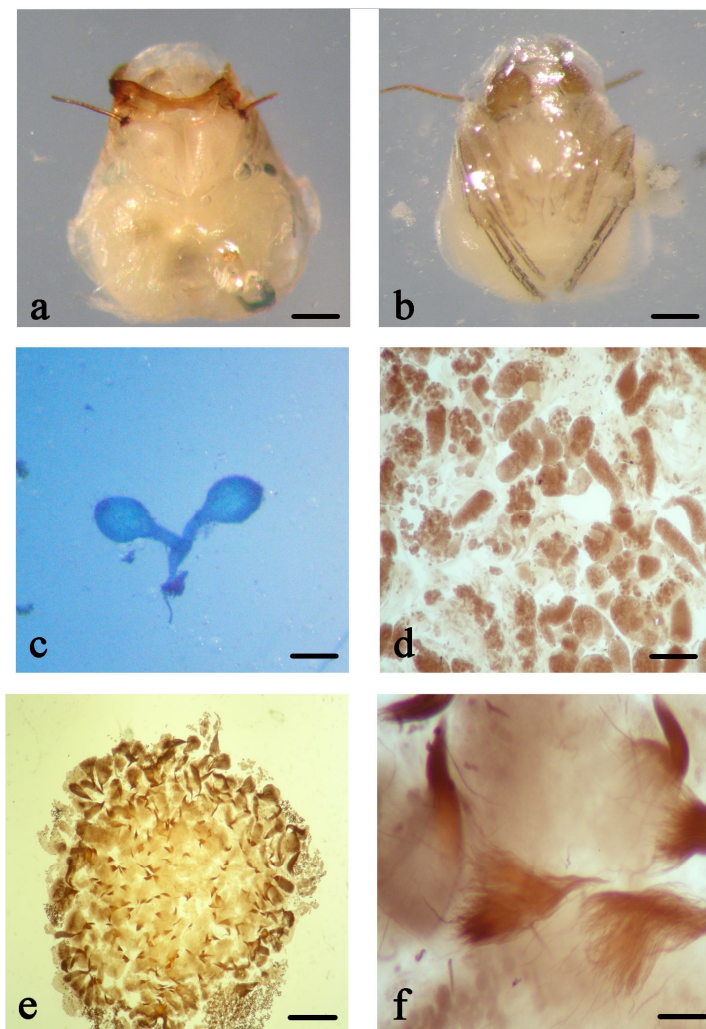


Figura 6.1. Diferentes estados en el desarrollo de las pupas de *P. tricuspidatus* obtenidas de las cabezas del hospedador. a) Pupa de 4 días de desarrollo; no se observan tejidos diferenciados. b) Pupa de 7 días de desarrollo; se empiezan a observar los tejidos del adulto. c) Ovariolas de una pupa femenina con 11 días de desarrollo. d) Ovariola con huevos maduros. e) Testículo de una pupa masculina de 8 días de desarrollo lleno de pseudoespermatozoides. f) Pseudoespermatozoides. Escalas: 250 μm (Figs. a y b); 100 μm (Fig. c); 10 μm (Figs. d y f); 50 μm (Fig. e).

Como en *P. tricuspidatus* las pupas femeninas se desarrollan en hormigas más grandes que las pupas masculinas (Fig. 4.1), las cabezas fueron medidas (a la altura de los ojos) antes de ser diseccionadas. Las pupas desarrolladas en cabezas de $0,93 \pm 0,05$ mm fueron catalogadas como hembras y las que se desarrollaron en cabezas de $0,77 \pm 0,04$

mm como machos potenciales. Debido a que las hembras y machos de *P. curvatus* se desarrollan en hospedadores de igual tamaño las pupas no pudieron ser catalogadas por sexo (Fig. 3. 3).

6.2.3 Disección de los ejemplares y obtención de las preparaciones cromosómicas

Las pupas fueron separadas de la cabeza de la hormiga en solución fisiológica para insectos (anexo Cap. 6) y se usó todo el contenido de las mismas para obtener las preparaciones cromosómicas mediante el método de dispersión en plato caliente (45 °C), siguiendo el siguiente protocolo:

1. Preparación de los portaobjetos: incubar los preparados en HCl 1% en etanol 96% por 1 hora. Secarlos con papel absorbente.
2. Diseccionar el ejemplar en solución fisiológica bajo microscopio estereoscópico.
3. Colocar la pupa en solución hipotónica durante 20 min.
4. Fijar en solución Carnoy durante 15 min.
5. Colocar 15 µl de ácido acético glacial 60% en el portaobjetos y mediante una pequeña incisión sacar la mayor cantidad de grasa posible.
6. Traspasar la pupa a otro portaobjetos con 15 µl de ácido acético glacial 60% y macerar los tejidos usando agujas de disección con filamentos de tungsteno..
7. Descartar el pupario y dispersar el material sobre el plato caliente moviéndolo en una superficie que corresponda al cubreobjetos usando las agujas de tungsteno a medida que la gota se contrae.
8. Colocar el preparado sobre un borde lateral para retirar el exceso de citoplasma y restos de tejido. Dejar secar boca abajo.
9. Observar la preparación cromosómica al microscopio de contraste de fase.
10. Deshidratar la preparación mediante pasajes sucesivos en etanol 70%, etanol 80% y etanol 96% durante 30 seg. en cada uno.
11. Dejar secar.
12. Conservar a - 20 °C.

Los preparados obtenidos fueron teñidos con Giemsa 4% o DAPI para confeccionar el cariotipo (Sección 6.2.4), con diferentes técnicas de bandas cromosómicas (Bandas C, NOR; Sección 6.2.6) o con DAPI-CMA₃ para hibridación *in situ* fluorescente (FISH; Sección 6.2.7).

6.2.4 Confección de los cariotipos

Para estudiar las características morfológicas, los pares de cromosomas homólogos fueron ordenados en relación a su tamaño (de mayor a menor) y a su forma (posición del centrómero). Para describir la morfología de los cromosomas se usó la nomenclatura descripta por Levan *et al.* (1964), clasificando a los cromosomas en función de sus índices centroméricos (IC; Tabla 6.2).

$$IC = (\text{longitud brazo corto} / \text{longitud cromosómica}) \times 100$$

Tabla 6.2. Categoría de los cromosomas en función de sus índices centroméricos (IC).

Índice centromérico (IC)	Categoría	Sigla
50,0 - 37,5	metacéntrico	m
37,5 - 25,0	submetacéntrico	sm
25,0 - 12,5	subtelocéntrico	st
12,5 - 0	telocéntrico	t

Para comparar la morfología cromosómica dentro y entre las especies de *Pseudacteon* también se consideró:

- el índice de brazos (r),
- el porcentaje del complemento haploide (% set) y
- la longitud cromosómica total (LCT).

$$r = q / p \quad \text{con} \quad \begin{array}{l} p = \text{longitud brazo corto} \\ q = \text{longitud brazo largo} \end{array}$$

$$\% \text{ set} = (LC \times 100) / LCT \quad \text{con} \quad \begin{array}{l} LC = \text{longitud de cada cromosoma} \\ LCT = \text{longitud cromosómica total} \end{array}$$

$$LCT = \sum LC$$

6.2.5 Morfología cromosómica

Los cromosomas seleccionados pertenecieron a individuos que presentaron células en prometafase mitóticas. Para la confección de los cariotipos se consideraron los preparados que tuvieron al menos 3 células en prometafase ($20,78 \pm 9,76$ células/preparado). Se diseccionaron en total 264 pupas de *P. curvatus* y 93 pupas de *P. tricuspis*. El cariotipo de *P. tricuspis* se determinó a partir de 17 pupas potencialmente masculinas y de 24 pupas potencialmente femeninas; mientras que el cariotipo de *P. curvatus* se determinó a partir de 35 pupas.

6.2.6 Técnicas de bandas cromosómicas

La técnica de **Bandas C** es el método convencional para estudiar las regiones de heterocromatina constitutiva ya que se extrae ADN de modo selectivo de las regiones eucromáticas permitiendo que las regiones heterocromáticas se tiñan con mayor intensidad. Las técnicas de bandas secuenciales con fluorocromos **DAPI** (4'6-diamidino-2-fenilindol) y **CMA₃** (cromomicina A₃) permiten detectar regiones ricas en AT y en GC, respectivamente. La **tinción argéntica** (Ag-NOR) se usa para identificar nucléolos y regiones organizadoras nucleolares (NORs) que han participado en la síntesis del nucléolo en la profase o interfase precedente a la división celular. Por lo tanto, este método sirve para estudiar la actividad génica de las zonas de ADN ribosomal (ADNr) por medio de la microscopía óptica.

6.2.6. a Protocolo para la técnica de **bandas C**

1. Hidrolizar los preparados en HCl 0,2N a temperatura ambiente durante 15 min.
2. Lavarlos con H₂O_d e incubarlos en solución de hidróxido de bario 5% a temperatura ambiente durante 35 min.
3. Lavarlos bajo agua corriente durante 1 min. agitando el portaobjetos.
4. Incubarlos en solución salina 2xSSC a 60 °C durante 1 h.
5. Realizar un lavado en H₂O_d rápido y colorear los preparados con Giemsa 4% en buffer fosfato pH 6,8-7,0 controlando la coloración bajo microscopio. O teñirlos con DAPI (ver Sección 6.2.6.b).
6. Interrumpir la coloración mediante un breve enjuague en H₂O_d.
7. Dejar secar y montar en medio de montaje DPX.

6.2.6. b Protocolo para la tinción con **DAPI-CMA₃**

1. Incubar las preparaciones cromosómicas en Tritón X-100 1%/PBS en baño con agitación a 25 °C durante 5 min.
2. Teñir en 0,1 µg/ml de DAPI en Tritón x-100 1%/PBS en baño con agitación a 25 °C por 15 min.
3. Lavar en Kodak Photo-Flo 1%/PBS en baño con agitación por 4 min.
4. Lavar en Kodak Photo-Flo 1%/H₂O ultrapura en baño con agitación a 25 °C por 1 min.
5. Lavar sucesivamente con agua destilada, buffer McIlvaine y H₂O_d.
6. Agregar 75 µl de CMA₃, cubrir con cubreobjetos de plástico y mantener en cámara húmeda en oscuridad por 1 h.
7. Lavar con H₂O_d, buffer McIlvaine y H₂O_d y retirar el cubreobjetos.
8. Agregar 30 µl de medio de montaje Vectashield, colocar cubreobjetos de vidrio de 24 x 50 mm.
9. Presionar el cubreobjetos para remover el exceso de medio de montaje y sellar.
10. Incubar a 37 °C en cámara húmeda en oscuridad durante 72 h.
11. Conservar a 4 °C hasta su observación con microscopio de fluorescencia.

NOTA I: En todas las soluciones el PBS puede reemplazarse por 2xSSC.

NOTA II: En el caso de teñir solo con DAPI se pasa del punto 4 al punto 8.

6.2.6. c Protocolo de la impregnación argéntica (Howell y Black (1980))

1. Colocar 2 gotas de la solución de gelatina 1% en H₂O_d ajustada con ácido fórmico a pH 3,5 y 4 gotas de la solución de AgNO₃ 100% en H₂O_d sobre la preparación cromosómica (ver anexo Cap. 6).
2. Colocar un cubreobjetos de vidrio.
3. Colocar la preparación en plato caliente a 60 °C hasta que el preparado obtenga una coloración amarilla (en menos de 30 seg. la mezcla se tornará de color amarillo y en menos de 2 min. se volverá de color marrón dorado).
4. Retirar la preparación y lavar con H₂O_d hasta que se desprenda el cubreobjetos.
5. Dejar secar y montar en medio de montaje DPX.

6.2.7 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para la técnica de **Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)** se utilizó una sonda de ADN ribosomal 18S (ADNr 18S) desarrollada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por la Dra. Silvia Lanzavecchia, según la metodología de Fuková *et al.* (2005), en el INTA de Castelar. Los dos pares de cebadores (Het 62218s F y Het 143018s R) usados para elaborar la sonda fueron diseñados a partir de una secuencia consenso de

ADNr 18S de *Ceratitis capitata* (Weidemann) (Diptera: Tephritidae) por GibcoBRL Custom Primers (Invitrogen Life Technologies Inc., Buenos Aires, Argentina). La PCR fue conducida en un termociclador Mastercycler® Gradient Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 µl al que se agregó 4 µl de Buffer *Taq* 1x, 10 µmol de desoxinucleótidos dNTP/L mix, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas Life, Sciences, Buenos Aires, Argentina), 30 ng/µl de cada cebador y 100 ng de ADN genómico de *Ceratitis capitata* como ADN molde de acuerdo con el procedimiento seguido por Baruffi *et al.* (1995). Los ciclos de reacción presentaron un paso de denaturalización inicial del ADN de 4 min. a 94 °C; seguido de 29 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 48 °C y 75 seg. a 72 °C, y un paso de elongación final de 7 min. a 72 °C. Los productos de la PCR (12-15 µl) fueron sembrados en gel de agarosa 1% y visualizados con bromuro de etidio 10%. Los segmentos amplificados de 900 pb fueron corridos junto a un marcador de peso molecular Leader 100pb (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes). Se cortó del gel la banda correspondiente a los segmentos amplificados y se extrajo el ADN usando el equipo de extracción de ADN QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

6.2.7. a Marcado de la sonda

La sonda se marcó mediante “nick translation” con 14-biotina dUTP (BioNick Labelling System, Invitrogen Life Technologies Inc., Buenos Aires, Argentina).

6.2.7.b Desnaturalización e hibridación de la sonda

1. Mezclar la sonda marcada (~5-50 ng/preparado), ADN competidor (esperma de salmón 2,5 µl= 25 µg/preparado) y agua miliQ.
2. Agregar NaOAc 3M (1/10 volumen) y etanol 100% (2,5 volúmenes).
3. Precipitar a -80 °C durante 60 min.
4. Centrifugar a 13.000 *rpm* durante 20 min.
5. Descartar el sobrenadante y lavar con etanol 70% frío (400 µl).
6. Centrifugar a 13.000 *rpm* durante 10 min.
7. Descartar el sobrenadante, vortecear y dejar secar entre 2 a 3 min.
8. Disolver en formamida deionizada precalentada a 37 °C durante 30 min. (5 µl/preparado).
9. Agregar sulfato de dextrano 20% (5 µl/preparado) y mezclar.
10. Desnaturalizar la sonda a 90 °C durante 5 min.
11. Colocar en hielo e incubar durante 3 min. mínimo.

6.2.7. c Desnaturalización y pre-tratamiento de los preparados

1. Envejecer los preparados a -20 °C durante 2 hs o más. Deshidratarlos en etanol 70% (durante 2 min.), etanol 80% y etanol 100% (30 seg. cada uno). Dejar secar.
2. Incubar con RNasa A (100 µg/ml en 2X SSC) a 37 °C en cámara húmeda por 1 h.
3. Remover los cubreobjetos y realizar dos lavados en 2X SSC en baño con agitación a 25 °C durante 15 min.
4. Incubar en solución Denhart 5X a 37 °C en baño con agitación por 30 min.
5. Desnaturalizar en formamida 70% (100 µl/preparado) a 72 °C en plato caliente durante 3,5 min.
6. Remover el cubreobjetos y colocar a los preparados en etanol 70% frío (-20 °C) durante 2 min.
7. Deshidratar en etanol 80% y 100% a temperatura ambiente 30 seg. cada uno.
8. Secar al aire.

6.2.7. d Hibridación

1. Agregar 10 µl de la mezcla de hibridación en cada preparado.
2. Colocar un cubreobjetos de vidrio de 24x24 mm, presionar para distribuir la mezcla homogéneamente y sellar con pegamento.
3. Incubar durante toda la noche a 37 °C en cámara húmeda.

6.2.7. e Lavados (en baño con agitación a 42°C)

1. Retirar el pegamento con pinza y remover el cubreobjetos en una solución 2X SSC.
2. Lavar en 2X SSC durante 10 min.
3. Lavar en formamida 20% / 0,1X SSC durante 10 min.
4. Lavar en 0,1X SSC y en 2X SSC durante 5 min. cada uno
5. Lavar dos veces en Tween 20 0,2% / 4X SSC, durante 5 min. a temperatura ambiente.

6.2.7.f Detección de la sonda

1. Incubar en BSA 5% / Tween 20 0,2% / 4X SSC a temperatura ambiente durante 20 min. (150 µl BSA/preparado).
2. Agregar 100 µl/preparado de solución de Cy3-estreptavidina en BSA 5% e incubar a 37 °C durante 1 h en oscuridad en cámara húmeda.
3. Lavar tres veces en Tween 20 0,2% / 4X SSC a 37 °C durante 3 min. cada uno.

6.2.7. g Tinción con DAPI (en baño con agitación a 25 °C)

1. Lavar en Tritón X-100 1% / PBS durante 5 min.
2. Teñir con DAPI (0,1 µg/ml) en Tritón X-100 1% / PBS durante 15 min.
3. Lavar en Kodak PhotoFlo 1% / PBS durante 4 min.
4. Lavar en Kodak PhotoFlo 1% / H₂O ultrapura durante 1 min.
5. Agregar 30 µl de medio de montaje Vectashield, cubrir con cubreobjetos de 24x24 mm y sellar con esmalte.
6. Conservar a 4-8° C en oscuridad.

6.2.8 Análisis estadísticos

Para la confección del cariotipo, se fotografiaron a las células más representativas con una cámara fotográfica digital Leica DFC 350 FX, acoplada a un microscopio Leica DMLB equipado con sistema de epifluorescencia. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa de procesamiento de imágenes Leica IM50 Image Manager (Imagic Bildverarebeitung AG). Las medidas de los cromosomas (IC, r, % complemento haploide) fueron realizadas con el programa Micromesure 3.3 (Aaron Reeves, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA). Los datos usados para comparaciones dentro y entre especie fueron analizados con la prueba T de Student y con un análisis de la varianza (ANOVA) de 1 factor porque los mismos fueron normales y presentaron homocedacea seguido por un ajuste secuencial de Bonferroni para controlar el error global de Tipo I ($p = 0,025$; Sokal y Rohlf 1969). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTIX (Analytic Software 1998, Tallahassee, FL). Las láminas fueron confeccionadas utilizando el programa computacional Adobe Photoshop versión 6.0.

6.3 Resultados

Cariotipos

Pseudacteon curvatus y *P. tricuspidatus* presentaron un cariotipo de $2n = 6$ con dos pares de cromosomas metacéntricos y un par subtelocéntrico (Fig. 6.2) que mostraron apareamiento somático desde la profase hasta la metafase mitótica, que fue más evidente en las regiones pericentroméricas. Los cromosomas de las hembras y machos de *P.*

tricuspis no fueron heteromórficos ni presentaron diferentes longitudes cromosómicas ($t = 0,43$; g.l. = 39; $p = 0,67$).

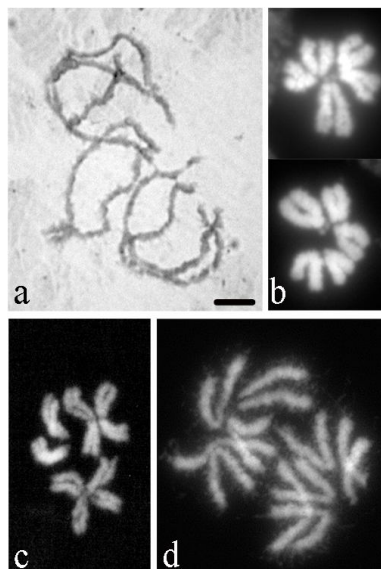


Figura 6.2. a) Células en profase mitótica de *P. curvatus*. b) Células en metafase mitótica de *P. tricuspis*. c) Célula en metafase mitótica de *P. curvatus*. d) Célula en anafase mitótica de *P. curvatus*. Los cromosomas fueron teñidos con Giemsa (a) o DAPI (b-d). Barra = 10 μ m

Los pares cromosómicos metacéntricos I y II presentaron tamaños similares (LC) y fueron de mayor tamaño que los cromosomas subtelocéntricos en ambas especies analizadas ($F_{2, 102} = 11,68$; $p < 0,0001$ y $F_{2, 120} = 36,93$; $p < 0,0001$, para *P. curvatus* y *P. tricuspis*, respectivamente; Tabla 6.3). Asimismo, para ambas especies analizadas, los 3 pares de cromosomas representaron diferentes porcentajes en el complemento haploide y los cromosomas del par I representaron cerca del 20% del complemento ($F_{2, 102} = 628,87$; $p < 0,0001$ y $F_{2, 120} = 420,11$; $p < 0,0001$, para *P. curvatus* y *P. tricuspis*, respectivamente; Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Comparación del complemento somático (% complemento haploide, r: índice de brazos, IC: índice centromérico) de ambas especies de *Pseudacteon*. a) Comparaciones en *P. curvatus*. b) Comparaciones en *P. tricuspis*.

a) <i>Pseudacteon curvatus</i>						
Cromosoma	Longitud cromosómica promedio (media ± DE; µm) ^a	% del complemento haploide ^a	r = p/q	IC	Categoría	N ^b
I	47,11 ± 17,53 a	19,96 a	1,14 ± 0,10	46,87	metacéntrico	35
II	42,19 ± 14,89 a	17,75 b	1,15 ± 0,09	46,63	metacéntrico	
III	30,01 ± 12,14 b	12,29 c	3,99 ± 0,89	21,18	Subtelocéntrico	
b) <i>Pseudacteon tricuspis</i>						
I	44,69 ± 11,14 a	19,88 a	1,20 ± 0,17	45,78	metacéntrico	41
II	40,43 ± 9,26 a	18,07 b	1,18 ± 0,16	46,20	metacéntrico	
III	27,20 ± 7,77 b	12,05 c	5,20 ± 0,74	14,53	Subtelocéntrico	

^a Las comparaciones en la longitud cromosómica (LC) y en el complemento haploide para cada especie de *Pseudacteon* fueron hechas con un ANOVA de 1 factor. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,025$).

^b N indica el número de preparados muestreados por especie.

Asimismo ambas especies de *Pseudacteon* presentaron longitudes cromosómicas totales ($225,31 \pm 70,74$ vs. $220,11 \pm 54,69$ μm , para *P. curvatus* y *P. tricuspis*, respectivamente; $t = 0,79$; $g.l. = 53$; $p = 0,78$) y tamaños relativos de los cromosomas en el complemento haploide similares ($t_{\text{crom I}} = 0,15$, $g.l. = 47$, $p = 0,88$; $t_{\text{crom II}} = 1,49$, $g.l. = 47$, $p = 0,14$, y $t_{\text{crom III}} = 1,10$, $g.l. = 47$, $p = 0,28$ para los pares cromosómicos I, II, y III, respectivamente).

6.3.1 Bandas C

Ambas especies de *Pseudacteon* presentaron escasa cantidad de heterocromatina C positiva. En *P. curvatus* se detectó una banda C positiva en el brazo corto (p) del par subtelocéntrico que ocupó el 81% del brazo y una banda C positiva en el brazo largo (q) del par metacéntrico II; mientras que el par metacéntrico I fue totalmente C negativo (Fig. 6.3). En *P. tricuspis* también se observó una banda C positiva en el brazo largo (q) del par metacéntrico II y el par metacéntrico I fue totalmente C negativo, pero el par subtelocéntrico presentó la banda C positiva en el brazo largo (q) ubicada cerca del centrómero y representó el 4% del mismo (Fig. 6.4).

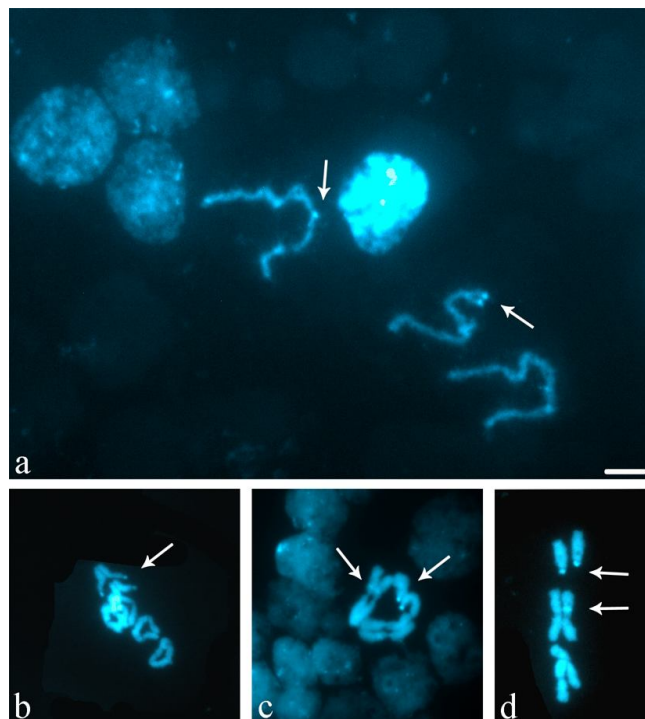


Figura 6.3. Bandas C en cromosomas mitóticos de *P. curvatus*. a) Profase. b) Anafase temprana. c-d) Metafase. Los cromosomas fueron teñidos con DAPI. Se observan bandas C positivas en el par cromosómico II y en el brazo corto (p) del par subtelocéntrico (III). Las flechas indican las bandas C+. Barra = 10 μm .

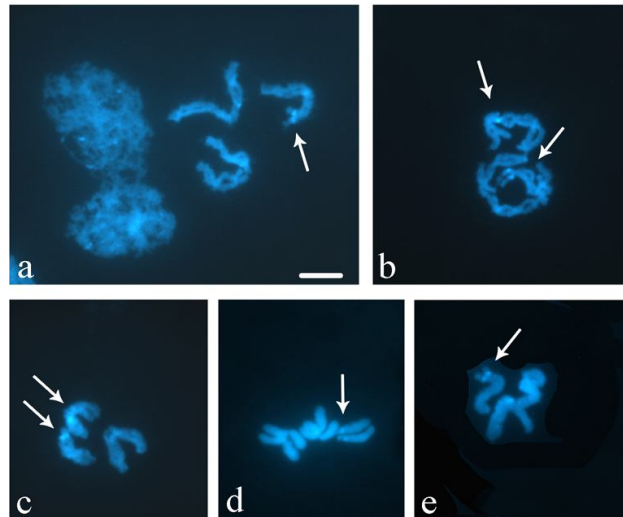


Figura 6.4. Bandas C en cromosomas mitóticos de *P. tricuspis*. a-b) Profase. c-e) Metafase. Los cromosomas fueron teñidos con DAPI. Se observan bandas C positivas en el par cromosómico II y en el brazo largo (q) del par subtelocéntrico (III). Las flechas indican las bandas C+. Barra = 10 μ m.

6.3.2 Bandas DAPI-CMA₃

La técnica de bandas fluorescentes DAPI-CMA₃ no reveló regiones particularmente ricas en AT (DAPI⁺) o en CG (CMA₃⁺) en *P. curvatus* (Fig. 6.5) o en *P. tricuspis* (Fig. 6.6).

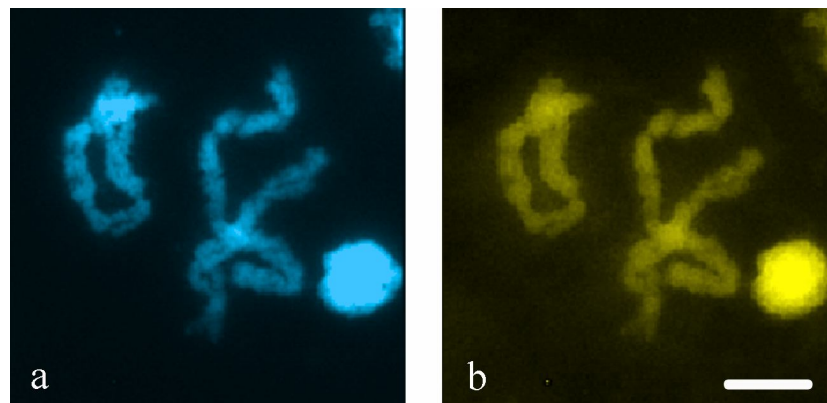


Figura 6.5. Bandas fluorescentes DAPI-CMA₃ en los cromosomas de *P. curvatus*. No se observan bandas DAPI o CMA₃ positivas. Se observa a una misma célula en profase mitótica teñida con DAPI (a) y con CMA₃ (b). Barra = 10 μ m.

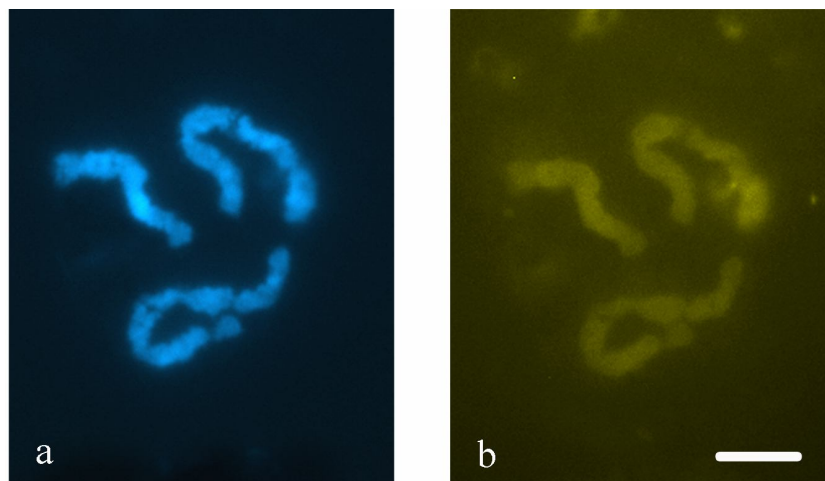


Figura 6.6. Bandas fluorescentes DAPI-CMA₃ en los cromosomas de *P. tricuspidis*. No se observan bandas DAPI o CMA₃ positivas. Se observa a una misma célula en profase mitótica teñida con DAPI (a) y con CMA₃ (b). Barra = 10 µm.

6.3.3 Bandas Ag-NOR

La técnica de impregnación argéntica reveló un solo nucleolo en los núcleos interfásicos y 2 señales en profase temprana en ambas especies de *Pseudacteon*, pero no se obtuvieron resultados NOR positivos de los cromosomas en metafase (Fig. 6.7).

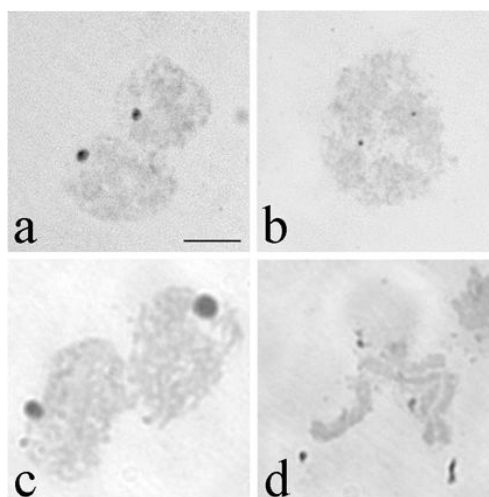


Figura 6.7. Núcleos interfásicos de *P. curvatus* (a) y de *P. tricuspidis* (c) en los que se observa un solo nucleolo. b) En profase temprana se observan 2 señales Ag-NOR. d) En metafase no se observan señales Ag-NOR. Barra = 10 µm.

6.3.4 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La señal de hibridación en *P. curvatus* (Fig. 6.8) y en *P. tricuspis* (Fig. 6.9) estuvo localizada en el par cromosómico II en la misma posición que la banda C (Figs. 6.3 y 6.4) y posiblemente también se corresponda con las señales Ag-NOR (Fig. 6.7).

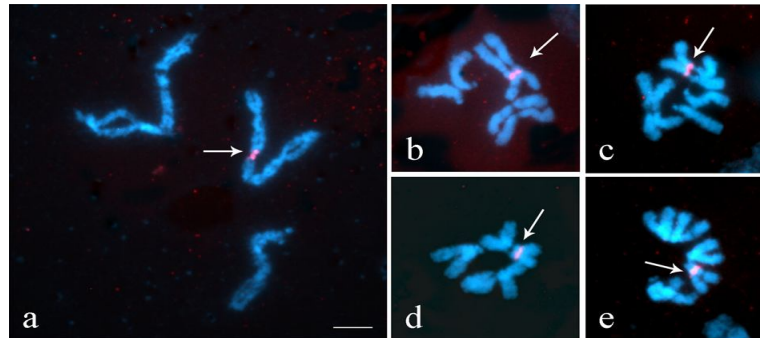


Figura 6.8. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de la sonda de ADNr en los cromosomas de *P. curvatus*. La señal de hibridación está en el par II. a) Profase mitótica. b-e) Metafase mitótica. Barra = 10 μ m.

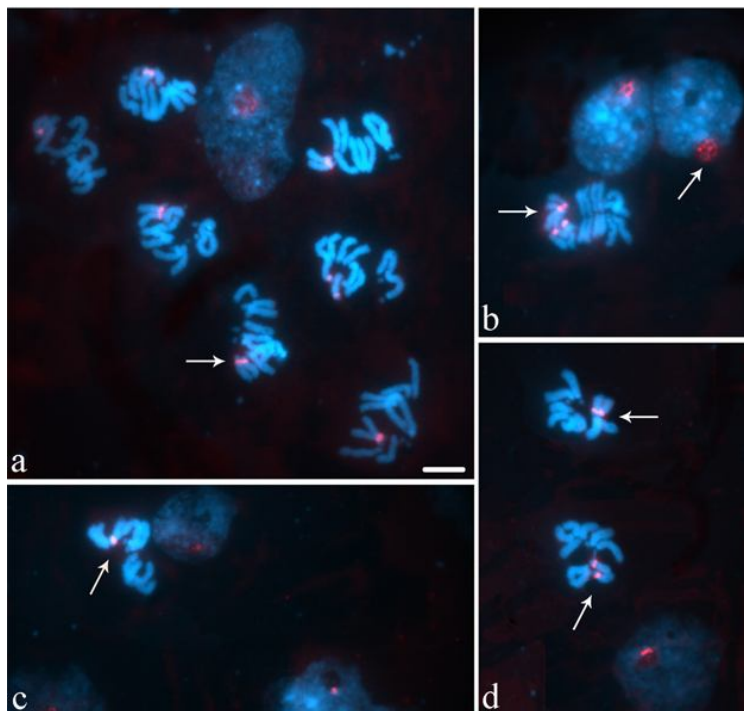
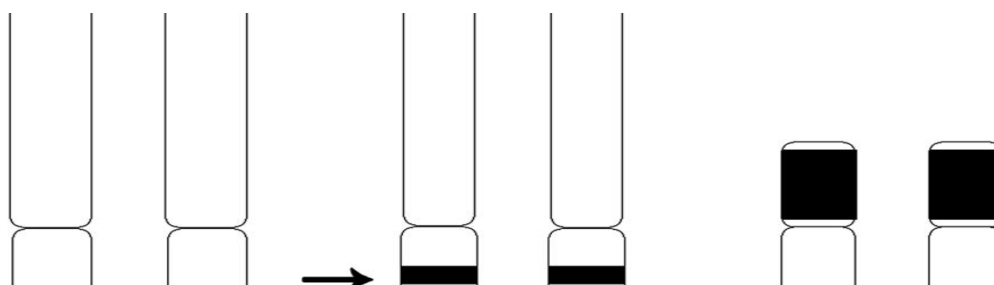


Figura 6.9. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de la sonda de ADNr en el par II de *P. tricuspis*. a) Prometáfase. b) Se observa las cromátidas hermanas en metafase. c-d) Metafase. Barra = 10 μ m.

6.3.5 Idiogramas

En base a las diferentes técnicas de bandas cromosómicas aplicadas, se elaboraron los idiogramas de ambas especies de *Pseudacteon* (Fig. 6.10).

Figura 6.10. Idiogramas de los cariotipos de *Pseudacteon*. a) Idiograma de *P. curvatus*. b) Idiograma de *P. tricuspis*. Se indican las bandas C positivas como bloques de color negro y las regiones organizadoras nucleolares detectadas con FISH con flechas.



6.4 Discusión

Pseudacteon curvatus y *P. tricuspis* presentaron cariotipos similares de $2n = 6$, con dos pares de cromosomas metacéntricos y un par de cromosomas subtelocéntricos (Fig. 6.2). Aunque ambas especies presentaron similares longitudes cromosómicas totales (LCT), sus LCT fueron mayores que las observadas en *P. nocens*, lo cual podría estar revelando mayor contenido de ADN (Chirino *et al.* 2009*). Esta diferencia, sin embargo, no alteró la morfología cromosómica de las 3 especies analizadas; por lo que el incremento en el contenido de ADN habría ocurrido de manera proporcional en los tres pares cromosómicos (Fig. 4 en Chirino *et al.* 2009*). Esta escasa diferencia en las longitudes relativas de los cromosomas y en la relación de brazos de *P. curvatus*, *P. tricuspis* y *P. nocens*, sugeriría que los cromosomas de *Pseudacteon* están altamente conservados y que los rearrreglos que pudieron haber ocurrido no afectaron la morfología general de los cariotipos. El incremento de ADN sin cambios relativos en la morfología de los cromosomas del complemento también ha sido observado en otras familias de Diptera, como Culicidae (Rafael y Tadei 1998), Calliphoridae (Parise-Maltempi y Avancini 2001) y Tephritidae (Selivon *et al.* 2005).

En *P. curvatus* y *P. tricuspis* también se observó una única región organizadora nucleolar (NOR) ubicada en el brazo largo (q) del par metacéntrico II (Fig. 6.7) que coincidió con la señal de hibridación *in situ* fluorescente específica para la subunidad ribosomal 18S (Figs. 6.8 y 6.9). En los dípteros, las regiones NOR están altamente conservadas y por ende son buenos marcadores para estudiar la evolución del cariotipo y, en la mayoría de las especies, suelen estar localizadas en los cromosomas sexuales del complemento (Parise-Maltempi y Avancini 2000).

Una de las diferencias más evidentes estuvo relacionada con la presencia de una banda C positiva que en *P. curvatus* se localizó en el brazo corto (p) del par cromosómico subtelocéntrico (Fig. 6.3); mientras que en *P. tricuspis* se ubicó en el brazo largo (q) cerca del centrómero (Fig. 6.4). Esta diferencia puede ser explicada por una inversión pericéntrica en uno de los cromosomas del par III seguida de una posterior homocigosis de ese rearrreglo cromosómico, lo cual habría ocurrido durante el proceso de diferenciación entre ambas especies (Fig. 6.11). Sin embargo, a partir de los datos disponibles no es posible asegurar la dirección del cambio evolutivo, lo cual se indica en la doble dirección de las flechas en la Figura 6.11. En *Pseudacteon*, la banda C positiva del segundo par cromosómico coincidió con la localización de la señal de hibridación *in situ* fluorescente (Figs. 6.3, 6.4, 6.8 y 6.9). En general, los dípteros presentan bloques heterocromáticos pericentroméricos y, cuando existen bandas C positivas intersticiales, éstas coinciden con las señales para el ADN ribosomal obtenidos mediante FISH (Willoheft 1997; Hediger *et al.* 1998; Parise-Maltempi y Avancini 2000). Por lo tanto, ambas especies de *Pseudacteon* aquí descriptas se ajustaron a esta regularidad presente en otros dípteros, a pesar de la escasa heterocromatina C positiva (Fig. 6.10).

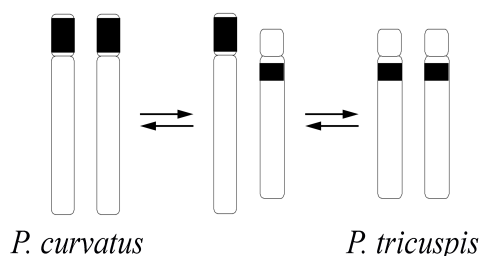


Figura 6.11. Posibles cambios ocurridos en el par cromosómico III de *P. curvatus* (izquierda) y *P. tricuspis* (derecha). Las líneas horizontales indican la inversión pericéntrica ocurrida, seguida de la homocigosis en ese rearrreglo. Se marcan en negro los bloques de heterocromatina.

Es interesante destacar que en un estudio cariotípico similar llevado a cabo con *Pseudacteon nocens* Borgmeier, también se encontró un cariotipo con $2n = 6$, con dos pares de cromosomas metacéntricos y uno telocéntrico (Chirino *et al.* 2009*), que presentó una región NOR activa en el brazo q del par metacéntrico II. El análisis de bandas C también reveló una pequeña banda C positiva asociada a esta región NOR; mientras que el par telocéntrico fue totalmente C negativo. Estos datos sugerirían que la adquisición de la heterocromatina en el tercer par cromosómico en *Pseudacteon* habría ocurrido con posterioridad a la diversificación ocurrida entre *P. nocens* y el antecesor de *P. curvatus* y *P. tricuspis*, las que se diferenciaron citogenéticamente con posterioridad. De los pocos estudios a nivel filogenético realizados en *Pseudacteon*, se indica que *P. nocens* tendría un antecesor más cercano diferente al antecesor común entre *P. curvatus* y *P. tricuspis*, aunque la relación filogenética del complejo de especies analizadas sigue aún sin resolverse (Calcaterra *et al.* 2008a).

El análisis citogenético realizado hasta el momento en *Pseudacteon* no permite reconocer cromosomas sexuales diferenciados morfológicamente, aunque podría ocurrir una situación similar a la descrita para *M. scalaris* y *M. spiracularis* (Willhoeft y Traut 1990; Wolf *et al.* 1996). Particularmente, *M. scalaris* presenta el mismo número cromosómico y una morfología cromosómica similar a la observada para *Pseudacteon*. El sexo se determina por la presencia/ausencia del factor M determinante de la masculinidad, cuya presencia activa las secuencias génicas para el desarrollo masculino (Mainx 1964; Traut *et al.* 1990; Willhoeft y Traut 1990; Traut y Wollert 1998). El factor M puede cambiar de posición entre diferentes cromosomas mediante translocaciones o transposiciones (Mainx 1964; Willhoeft y Traut 1990; Traut 1999). En la línea original las tasas de translocaciones entre los grupos de ligamiento I, II o III son menores al 0,5% (Mainx 1964) y el factor M se ubica en el tercer par cromosómico; mientras que en las líneas Wien y Tennessee (derivadas de la original) el factor M se localiza en el par cromosómico II aunque las tasas de translocación siguen siendo extremadamente bajas ($0,08 \pm 0,03$ %; Traut y Willhoeft 1990; Traut *et al.* 1990; Traut 1994).

Hasta el momento, en las líneas de *M. scalaris* el análisis citogenético no permitió detectar diferenciación morfológica entre los cromosomas X e Y, ni tampoco diferencias a nivel de hibridación genómica comparada (CGH; Traut *et al.* 1999), aunque se detectó que los cromosomas sexuales están en un estado de diferenciación incipiente y el cromosoma Y, que es altamente conservado, presenta una región no recombinante (Willhoeft y Traut

1990; Traut 1994; Traut *et al.* 1999). Por lo tanto, a pesar de que en los machos de la línea original de *M. scalaris* (Mainx 1964) existía recombinación entre ambos cromosomas X e Y, la misma se ha ido reduciendo en las diferentes líneas derivadas hasta llegar a ser inexistente en la región en la que se encuentra el factor M de la línea Wien (Traut y Wollert 1998). Es probable que los cromosomas sexuales de *Megaselia* estén en las primeras etapas de diferenciación luego de haber adquirido una función determinante del sexo (el factor M), seguida por la supresión de recombinación entre los cromosomas X e Y del macho, lo cual podría evolucionar en una mayor diferenciación (diferenciación morfológica) entre los cromosomas sexuales en el sexo heterogamético.

En base a las similitudes encontradas en los cariotipos de *Pseudacteon* y *Megaselia* en cuanto al número y forma de los cromosomas y, a la presencia de un factor masculinizante con cromosomas morfológicamente homomórficos en muchos géneros y familias dentro del orden Diptera (Tabla 6.1), proponemos que el mecanismo de determinación del sexo en *Pseudacteon* es genético y parecido al encontrado en *M. scalaris* (Mainx 1964; Traut *et al.* 1990; Traut 1994), con la presencia de un factor masculinizante M en uno de los pares cromosómicos del complemento. Queda por investigar la presencia o ausencia de este factor mediante técnicas de hibridación con sondas específicas como las desarrolladas para *M. scalaris*, determinar en cual de los tres pares cromosómicos estaría localizado ese factor y encontrar secuencias de ADN específicas para hembras y machos, respectivamente.

6.5 Conclusiones

- Las pupas de 3 a 5 días de desarrollo presentan los mejores índices mitóticos para realizar los preparados citológicos en *Pseudacteon*.
- *Pseudacteon curvatus* y *P. tricuspis* presentan un cariotipo similar de $2n = 6$, con dos pares de cromosomas metacéntricos y un par subtelocéntrico.
- Los cromosomas pertenecientes a las hembras y machos de *P. curvatus* y *P. tricuspis* son morfológicamente indistinguibles.
- Ambas especies de *Pseudacteon* presentan escasa heterocromatina C positiva.
- Ambas especies de *Pseudacteon* se caracterizan en función de sus Bandas C.
- *Pseudacteon curvatus* presenta una banda C positiva en el brazo corto del tercer par cromosómico, mientras que *P. tricuspis* presenta una banda C positiva en el brazo largo del mismo par cromosómico.
- Ambas especies de *Pseudacteon* presentan una región NOR en el brazo largo del segundo par cromosómico coincidente con la banda C de ese par.
- El cariotipo de las especies de *Pseudacteon* analizadas es similar al observado en *Megaselia*.

Capítulo 7

Discusión general

Sección I ¿Qué prefieren y cómo se desarrollan ambas especies de *Pseudacteon* sobre su hospedador?

Este trabajo fue el primero en caracterizar ecológica y comportamentalmente a ambas formas sociales de la hormiga *S. invicta* en Argentina. En ambos sitios de muestreo (Chaco y San Javier, Santa Fe) las colonias monogínicas predominaron ecológicamente sobre las poligínicas, como ocurre en Corrientes, Formosa y Brasil (Greenberg *et al.* 1985; Ross *et al.* 1987, 1997; Trager 1991; Porter 1992, 1993; Porter *et al.* 1992, 1997). Los nidos monogínicos fueron 3,5 veces más abundantes y se dispusieron a mayores distancias relativas entre sí que los poligínicos (Tabla 2.3; Fig. 2.9). Esta separación espacial concuerda con las observaciones de que las hormigas monogínicas son agresivas y territoriales frente a coespecíficas ajenas al nido (Obin y Vander Meer 1988; Vander Meer *et al.* 2008) manteniendo áreas de forrajeo exclusivas (Adams 2003; Adams y Tschinkel 2001); mientras que las hormigas poligínicas no defienden agresivamente su territorio bajo las mismas condiciones. Por ende, se concluye que la ausencia de comportamientos agresivos entre colonias poligínicas vecinas les brinda la ventaja de poseer áreas de forrajeo mayores porque con un comportamiento cooperativo se incrementa la productividad de las colonias por una mayor disponibilidad de alimento. Además, un forrajeo cooperativo también se vería facilitado porque las colonias presentan montículos satélites al nido principal.

Los nidos de ambas formas sociales en Chaco y San Javier fueron más altos (Tabla 2.3) que los nidos de Estados Unidos y Brasil. Además, presentaron volúmenes similares; mientras que en los Estados Unidos y Brasil los nidos monogínicos fueron más grandes que los poligínicos (Porter *et al.* 1992, 1997; Macom y Porter 1996). Es probable que estas diferencias se deban a que los nidos muestreados estaban establecidos en campos de pastoreo de menor altura con respecto a lotes y campos cercanos, dedicados al cultivo de soja y girasol que presentaban acequias para evitar las inundaciones por lluvia (Obs. Pers.).

Las diferentes estrategias reproductivas entre ambas formas sociales de *S. invicta* quedaron reflejadas en la relación de compromiso entre el número y tamaño de las obreras. Ambas formas sociales presentaron biomasas de hormigas similares (Tabla 2.5), pero las obreras de colonias monogónicas fueron más grandes (Tabla 2.8) y presentaron mayor proporción de obreras *mayores*, *grandes* y *medianas* que las colonias poligónicas; mientras que las colonias poligónicas presentaron mayor proporción de obreras *menores* (Tabla 2.11). Esta mayor proporción de obreras más grandes en las colonias monogónicas es muy importante porque, al ser territoriales y agresivas (Tabla 2.13; Figs. 2.12 y 2.13), son más eficientes en mantener áreas de forrajeo exclusivas; mientras que las colonias poligónicas se ven favorecidas por poseer nidos polidómicos y mayor cantidad de obreras *menores* para reclutar alimento a mayores distancias.

Sin embargo, aunque se estableció que las hormigas poligónicas no agreden a hormigas coespecíficas de otros nidos (Obin y Vander Meer 1988; Vander Meer *et al.* 2008), este trabajo también demostró que su aparente pasividad no significa que no discriminen lo propio de lo ajeno porque presentaron comportamientos diferentes frente a compañeras de nido y coespecíficas ajenas al mismo (Fig. 2.12). Por lo tanto, en presencia de otras hormigas poligónicas evitan el contacto directo, pero en presencia de hormigas monogónicas pueden responder agresivamente cuando son atacadas (Tabla 2.14; Fig. 2.15).

En base a las características diferenciables entre colonias monogónicas y poligónicas de *S. invicta*, se acepta parcialmente la primera hipótesis de este trabajo porque *P. curvatus* y *P. tricuspis* parasitaron diferentes tamaños de obreras (Fig. 5.2). Sin embargo, ambas especies prefirieron atacar y se desarrollaron mejor sobre hormigas monogónicas (Tabla 3.1; Sección 3.3.3.d; Tablas 4.1 y 4.11). Las preferencias de ambas especies de *Pseudacteon* por las colonias monogónicas puede deberse a un mayor reconocimiento, experiencia y coevolución por ser la forma social más abundante. Por otro lado, *P. curvatus* también alteró el forrajeo de hormigas poligónicas haciendo que en su presencia las obreras sean más pequeñas que las que empezaron el forrajeo y reclutamiento en el cebo. Este efecto puede deberse a que siguen forrajeando hormigas *pequeñas* en las cuales el parasitoide puede desarrollarse (Fig. 3.2) y porque es una de las especies menos específica que ataca a hormigas que no pertenecen al complejo *S. saevissima* (Porter y Gilbert 2004; Estrada *et al.* 2006).

Sección II ¿Por qué solo en algunas especies de *Pseudacteon* existe dimorfismo sexual en el tamaño adulto?

Dado que *P. curvatus* parasitó fundamentalmente a hormigas *pequeñas* de ambas formas sociales de *S. invicta* (Fig. 3.2) obteniendo mayores porcentajes de inviabilidad en los extremos superior e inferior del rango de distribución de tamaños elegido (Fig. 3.4), se acepta la primer hipótesis planteada en esta sección. Además, el costo materno en producir ambos sexos fue el mismo porque las hembras y machos de *P. curvatus* se desarrollaron sobre el mismo rango de hormigas (Fig. 3.3), presentaron tamaños similares y estuvieron igualmente representados en la progenie.

Dado que *P. tricuspis* parasitó hormigas de diferentes subcastas (*grandes*, *medianas* y *pequeñas*) y las hembras emergieron de obreras más grandes (Fig. 4.1) y presentaron cuerpos de mayor tamaño que los machos (Fig. 4.5), también se acepta la segunda hipótesis de esta sección. Una mayor disponibilidad de alimento para las hembras de *P. tricuspis*, que se desarrollaron fundamentalmente sobre hormigas *grandes* (menos frecuentes que las *medianas* y *pequeñas*), condicionó a que la proporción de sexos esté sesgada a favor de los machos (Tabla 4.11). La proporción de sexos y el tamaño de las hembras también se vieron afectados por la forma social en la que los parasitoides se desarrollaron y por el efecto de interferencia entre las madres (Tablas 4.10 y 4.11). Por lo tanto, la hipótesis general de que una mejor calidad o cantidad de comida permite desarrollar un cuerpo más grande es validada en ausencia de competencia por un recurso no limitante, así las hembras de *P. tricuspis* pudieron elegir y explotar el mejor y mayor recurso disponible. Por ejemplo, en *Drosophila* el crecimiento de las larvas en desarrollo se detiene en condiciones de dieta mínima porque las mismas no llegan a alcanzar el peso crítico antes de empupar (Britton y Edgar 1998; Parker y Johnston 2006). Datos obtenidos de *P. cultellatus* Borgmeier también validan esta hipótesis (Chirino *et al.* 2008). Esta especie parasita el menor rango de distribución de tamaños disponible de *S. invicta* y los adultos emergidos son más pequeños que los adultos de *P. curvatus* (Fig. 5.1). La poca cantidad de comida podría limitar la capacidad de la larva para alcanzar el tamaño adulto. Además, *P. cultellatus* también presenta un porcentaje de supervivencia menor (60,4%) al de *P. curvatus* y *P. tricuspis*, aunque se desarrolle a partir de obreras *pequeñas* y *menores*, las 2 subcastas más abundantes de *S. invicta* (Fig. 2.11). Finalmente, el tamaño de los adultos de *P. curvatus* y *P. tricuspis* se correlacionaron positiva y significativamente

con el tamaño de su hospedador (Fig. 5.2). Este patrón no solo fue observado en varias de las especies de *Pseudacteon* de morfo grande (Feener 1987; Morrison *et al.* 1997, 1999; Morrison y Gilbert 1998; Folgarait *et al.* 2005b, 2006), sino que también fue detectado en *P. cultellatus* la especie más pequeña analizada hasta el momento ($r = 0,58$; $p = 0,0019$; $Z = 3,10$; $N = 25$; datos sin publicar).

Sección III ¿El dimorfismo sexual en el tamaño de los adultos en *Pseudacteon* se debe al mecanismo de determinación del sexo?

En base a los datos obtenidos en la Sección II, se rechaza la hipótesis de que el sexo en *Pseudacteon* sea determinado ambientalmente por el tamaño del hospedador. No solo las hembras y machos de *P. curvatus* se desarrollaron sobre el mismo rango de hormigas (Fig. 5.1), sino que en *P. tricuspis* algunos machos emergieron de hormigas óptimas para el desarrollo de las hembras y, algunas hembras sobre hormigas óptimas para el desarrollo de los machos. En estos casos, las hembras presentaron cuerpos de menor tamaño al tamaño promedio (Sección 4.3.3.a). Por lo tanto, aunque el tamaño de la hormiga determine el tamaño de los parasitoides, no es el factor determinante del sexo. También en *P. cultellatus* se observó una superposición total en el tamaño de las hormigas de las que emergieron ambos sexos; mientras que se registró gran superposición en el tamaño de las hormigas de las que emergieron las hembras y machos de *P. obtusus* “pequeño” y *P. litoralis* (una especie de mayor tamaño con dimorfismo sexual en el tamaño de los adultos; Fig. 1.5).

Mediante el análisis citológico, se detectó un cariotipo $2n = 6$ en ambas especies de *Pseudacteon*, siendo los 2 pares de cromosomas metacéntricos más grandes que el par subtelocéntrico (Fig. 6.2; Tabla 6.3). Asimismo, *P. curvatus* y *P. tricuspis* también pudieron ser caracterizadas por las bandas de heterocromatina C positiva ubicadas en el brazo corto y largo del tercer par cromosómico, respectivamente (Figs. 6.3 y 6.4). Sin embargo, no se pudieron detectar cromosomas sexuales morfológicamente diferenciables. Además, en *P. nocens*, se observó el mismo número cromosómico ($2n = 6$) aunque el tercer par fue telocéntrico (Chirino *et al.* 2009*). Dado que los preparados de pupas femeninas y masculinas de *P. tricuspis* presentaron el mismo número cromosómico (Sección 6.3.1) también se rechaza la hipótesis de que la determinación del sexo sea haplodiploide.

En base al cariotipo observado en *P. curvatus*, *P. tricuspis* y *P. nocens* se plantea que el mecanismo de determinación sexual es genético y similar al descrito para *M. scalaris* y *M. spiracularis* ($2n = 4 + XX/XY$), que poseen cromosomas sexuales homomórficos en incipiente etapa de diferenciación molecular y estructural, en las que el sexo es determinado por la presencia o ausencia de un factor masculinizante M (Willhoeft y Traut 1990; Wolf *et al.* 1996). Por lo tanto, se concluye que los parasitoides determinados genéticamente como hembras (sin factor M) que se desarrollan en obreras más pequeñas que las óptimas, generalmente van a abortar por no tener alimento suficiente para alcanzar su peso crítico antes de empupar; mientras que los parasitoides determinados genéticamente como machos (con factor M) que se desarrollan en hormigas de mayor tamaño, generalmente morirán arrestados porque alcanzarán el peso crítico antes de consumir todo el alimento disponible y no podrán emerger de las cabezas con restos de musculatura en descomposición. Intentando probar esta hipótesis, se diseccionaron las pupas no viables de *P. tricuspis*. La mayoría de estas pupas de tamaño “grande” ($0,85 \pm 0,16$ mm; N = 11) consistieron en machos farados y muertos que no ocuparon toda la cabeza de la hormiga (Fig. 7.1); mientras que las pupas inviables de menor tamaño ($0,70 \pm 0,11$ mm; N = 5) carecieron de tejidos diferenciados, las cuales no pudieron ser catalogadas por sexo porque murieron antes de desarrollar los tejidos del adulto (Fig. 7.2). Para determinar el mecanismo de determinación sexual que opera en *Pseudacteon*, queda por detectar la presencia del factor masculinizante en los parasitoides en desarrollo o en los adultos emergidos, analizar meióticamente a las larvas de estadio III y/u obtener secuencias de ADN específicas para hembras o machos.

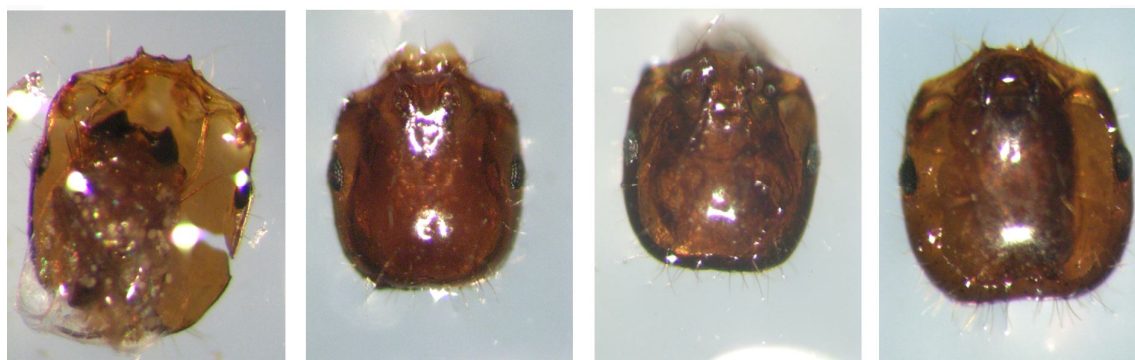


Figura 7.1. Adultos farados arrestados en cabezas de hormigas de mayor tamaño de *S. invicta*. Se observa que no ocupan todo el espacio disponible.

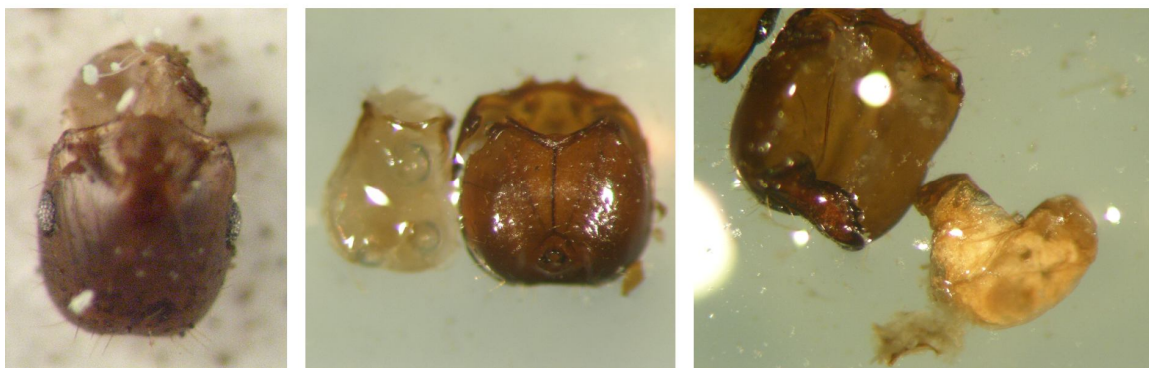


Figura 7.2. Pupas sin tejidos diferenciados alojadas en las cabezas de hormigas *S. invicta*.

Finalmente, conocer la mayor parte de la historia de vida de las especies usadas como agentes de control biológico y de las especies plaga que se quieren controlar, es fundamental y necesario para que el control biológico sea lo más eficiente y productivo posible. Así, los resultados originados en esta Tesis suman conocimiento a los previamente encontrados en el sistema *Pseudacteon-Solenopsis*. Sin embargo, es importante resaltar que lo más novedoso de este trabajo fue el estudio de las características ecológicas de *S. invicta* en su área de origen, el estudio de las preferencias de *Pseudacteon* en función de la forma social de su hospedador y, la relevancia de poder manipular la proporción de sexos en *P. triscupis* a favor de las hembras a pesar de que la especie no presente un mecanismo de determinación del sexo ambiental o haplodiploide. Aspecto fundamental para la cría masiva de los parasitoides.

Bibliografía

1. Adams E. S. 1998. Territory size and shape in fire ants: a model based on neighborhood interactions. *Ecology* 79: 1125–1134.
2. Adams E. S. 2003. Experimental analysis of territory size in a population of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioural Ecology* 14: 32-37.
3. Adams E. S. y M. T. Balas. 1999. Worker discrimination among queens in newly founded colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 45: 330-338.
4. Adams E. S. y W. R. Tschinkel. 2001. Mechanisms of population regulation in the fire ant *Solenopsis invicta*: an experimental study. *Journal of Animal Ecology* 70: 355–369.

5. Balas M. T. y E. S. Adams. 1996a. Nestmate discrimination and competition in incipient colonies of fire ants. *Animal Behaviour* 51: 49-59.
6. Balas M. T. y E. S. Adams. 1996b. The dissolution of cooperative groups: mechanisms of queen mortality in incipient fire ant colonies. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 38: 391-399.
7. Baruffi L. G. Damiani, C. Guglielmino, C. Bandi, A. Malacrida y G. Gasperi. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*. Comparison between RAPD and Multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity* 74: 524-537.
8. Booth K. y M. Dhimi. 2008. Red imported fire ant (*Solenopsis invicta*): a review of the literature regarding the determination of colony age. MAF Biosecurity New Zealand.
9. Bourke A. F. G. 2002. Genetics of social behaviour in fire ants. *Trends in Genetics* 18: 221-223.
10. Britton J. S. y B. A. Edgar. 1998. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* 125: 2149-2158.
11. Brown B. V. y D. H. Feener, Jr. 1998. Parasitic phorid flies (Diptera: Phoridae) associated with army ants (Hymenoptera: Formicidae: Ecitoninae, Dorylinae) and their conservation biology. *Biotropica* 30: 482-487.
12. Brown B. V., P. J. Folgarait y L. E. Gilbert. 2003. A new species of *Pseudacteon* attacking *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. *Sociobiology* 41: 685-688.
13. Brown C. A. 2003. Offspring size-number trade-offs in scorpions: an empirical test of the Van Noordwijk and de Jong model. *Evolution* 59: 2184-2190.
14. Buckley A. 1999. Fire ants in California. *American Bee Journal* 139: 88.
15. Bull J. J. 1983. Evolution of Sex Determining Mechanisms. Benjamin-Cummings Publishing Company, Menlo Park, California.
16. Cabrera A. L. y A. Willink. 1980. Biogeografía de América Latina. Serie de biología 13. Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C.
17. Calcaterra L. A. 2007. *Pseudacteon calderensis*, a new fly species (Diptera: Phoridae) attacking the fire ants *Solenopsis interrupta* (Hymenoptera: Formicidae) in northwestern Argentina. *Annals of the Entomological Society of America* 100: 470-473.
18. Calcaterra L. A., S. D. Porter y J. A. Briano. 2005. Distribution and abundance of fire ant decapitating flies (Diptera: Phoridae: *Pseudacteon*) in three regions of southern South America. *Annals of the Entomological Society of America* 98: 85-95.

19. Calcaterra L. A., A. Delgado y N. D. Tsutsui. 2008a. Activity patterns and parasitism rates of fire ant-decapitating flies (Diptera: Phoridae: *Pseudacteon* spp.) in their native Argentina. *Annals of the Entomological Society of America* 101: 539-550.
20. Calcaterra L. A., J. P. Livore, A. Delgado y J. A. Briano. 2008b. Ecological dominance of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in its native range. *Oecologia* 156: 411-421.
21. Caldera E. J., K. G. Ross, C. J. DeHeer y D. Shoemaker. 2008. Putative native source of the invasive fire ant *Solenopsis invicta* in the USA. *Biological Invasions* 10: 1457-1479.
22. Callcott A. M. y H. L. Collins. 1996. Invasion and range expansion of red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) in North America from 1918-1995. *Florida Entomologist* 79: 240-251.
23. Cassill D. L. y W. R. Tschinkel. 1995. Allocation of liquid food to larvae via trophallaxis in colonies of fire ants, *Solenopsis invicta*. *Animal Behaviour* 50: 801-813.
24. Cassill D. L. y W. R. Tschinkel. 1996. A duration constant for worker-to-larva trophallaxis in fire ants. *Insectes Sociaux* 43: 149-166.
25. Cassill D. L. y W. R. Tschinkel. 1999a. Task selection by workers of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 45: 301-310.
26. Cassill D. L. y W. R. Tschinkel. 1999b. Regulation of diet in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Behavior* 12: 307-328.
27. Cassill D. L. y W. R. Tschinkel. 1999c. Effects of colony-level attributes on larval feeding in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Insectes Sociaux* 46: 261-266.
28. Cassill D. L., A. Stuy y R. G. Buck. 1998. Emergent properties of food distribution among fire ant larvae. *Journal of Theoretical Biology* 195: 371-381.
29. Cônsoli F. L., C. T. Wuellner, S. B. Vinson y L. E. Gilbert. 2001. Immature development of *Pseudacteon tricuspidis* (Diptera: Phoridae), an endoparasitoid of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94: 97-109.
30. Chen J. S. C., C. H. Shenanad y J. Lee. 2006. Monogynous and polygynous red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Burm (Hymenoptera: Formicidae), in Taiwan. *Environmental Entomology* 35: 167-172.
31. Chirino M. G., L. E. Gilbert y P. J. Folgarait. Oct. 2008. "Cuando las especies de *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) se reparten la comida (*Solenopsis invicta*, Hymenoptera: Formicidae)... ¿Unos ganan y otros pierden?" VII Congreso Argentino de Entomología. Huerta Grande, Córdoba, Argentina. Pág. 266.

32. Daniel W. W. 1990. Applied nonparametric statistics. PWS- Kent, Devon, United Kingdom.
33. Davis L. R., Jr. R. K. Vander Meer y S. D. Porter. 2001. Red imported fire ants expand their range across the West Indies. *Florida Entomologist* 84: 735-736.
34. DeHeer C. J. 2002. A comparison of the colony-founding potential of queens from single- and multiple-queen of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Animal Behaviour* 64: 655-661.
35. Disney R. H. L. 1990. Problem genera close to *Megaselia* (Diptera: Phoridae). *Brazilian Journal of Entomological Natural History* 3: 11- 22.
36. Disney R. H. L. 1994. Scuttle flies: The Phoridae. Chapman y Hall, London.
37. Dowell R. V., A. Gilbert y J. Sorensen. 1997. Red imported fire ant found in California. *California Plant Pest and Disease Report* 16: 50-55.
38. Dübendorfer A., M. Hediger, G. Burghardt y D. Bopp. 2002. *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *The International Journal of Developmental Biology* 46: 75-79.
39. Esperck T. y T. Tammaru. 2006. Determination of female-biased sexual size dimorphism in moths with a variable instar number: the role of additional instars. *European Journal of Entomology* 103: 575-586.
40. Estrada C., R. J. W. Patrock, P. J. Folgarait y L. E. Gilbert. 2006. Host specificity of four *Pseudacteon* spp. (Diptera: Phoridae), parasitoids of fire ants in Argentina (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist* 89: 462-468.
41. Fairbairn D. J. 1997. Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 659-687.
42. Feener D. Jr. 1987. Size selective oviposition in *Pseudacteon crawfordi* (Diptera: Phoridae), a parasite of fire ants. *Annals of the Entomological Society of America* 80: 148-151.
43. Feener D. Jr. y B. Brown. 1992. Reduced foraging of *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) in the presence of parasitic *Pseudacteon* spp. (Diptera: Phoridae). *Annals of the Entomological Society of America* 85: 80-84.
44. Folgarait P. J. y L. E. Gilbert. 1999. Phorid parasitoids affect foraging activity of *Solenopsis richteri* under different availability of food in Argentina. *Ecological Entomology* 24: 163-173.
45. Folgarait P. J., O. A. Bruzzone y L. E. Gilbert. 2002a. Development of *Pseudacteon cultellatus* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology* 31: 403-411.

46. Folgarait P. J., O. A. Bruzzone, R. J. W. Patrock y L. E. Gilbert. 2002b. Developmental rates and host specificity for *Pseudacteon* parasitoids (Diptera: Phoridae) of fire ants (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. *Journal of Economic Entomology* 95: 1151-1158.
47. Folgarait P. J., O. A. Bruzzone y L. E. Gilbert. 2003. Seasonal patterns of activity among species of black fire ant parasitoid flies (*Pseudacteon*: Phoridae) in Argentina explained by analysis of climatic variables. *Biological Control* 28:369-378.
48. Folgarait P. J., O. A. Bruzzone, S. D. Porter, M. A. Pesquero y L. E. Gilbert. 2005a. Biogeography and macroecology of phorid flies that attack fire ants in southeastern Brazil and Argentina. *Journal of Biogeography* 32: 353-367.
49. Folgarait P. J., M. G. Chirino, R. J. W. Patrock y L. E. Gilbert. 2005b. Development of *Pseudacteon obtusus* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology* 34: 308-316.
50. Folgarait P. J., M. G. Chirino y L. E. Gilbert. 2005c. Rasgos morfológicos asociados a la viabilidad de pupas en parasitoides del género *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 64: 13-22.
51. Folgarait P. J., R. J. W. Patrock y L. E. Gilbert. 2006. Development of *Pseudacteon nocens* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 99: 295-307.
52. Folgarait P. J., R. J. W. Patrock y L. E. Gilbert. 2007a. Associations of fire ant phorids and microhabitats. *Environmental Entomology* 36: 731-742.
53. Folgarait P. J., R. J. W. Patrock y L. E. Gilbert. 2007b. The influence of ambient conditions and space on the phenological patterns of a *Solenopsis* phorid guild in an arid environment. *Biological Control* 42:262-273.
54. Folgarait P. F., R. J. W. Patrock, G. Albioni-Montenegro, L. Saldúa y L. E. Gilbert. 2008. *Solenopsis invicta*: Evidence for recent internal immigration across provinces in Argentina. *Florida Entomologist* 91: 131-132.
55. Fox C. W. y M. E. Czesak. 2000. Evolutionary ecology of progenie size in arthropods. *Annual Review of Entomology* 45: 341-369.
56. Fritz G. N. y R. K. Vander Meer. 2003. Sympatry of polygyne and monogyne colonies of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 96: 86-92.
57. Fuková I., P. Nguyen y F. Marec. 2005. Codling moth cytogenetics: Karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* 48: 1083-1092.

58. Fung J. C., W. F. Marshall, A. Dernbug, D. A. Agard y J. W. Sedat. 1998. Homologous chromosome pairing in *Drosophila melanogaster* proceeds through multiple independent initiations. *The Journal of Cell Biology* 141: 5-20.
59. Gilbert S. F. 1993. Developmental biology. Sinaver Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
60. Gilbert F. y M. Jervis. 1998. Functional, evolutionary and ecological aspects of feeding-related mouthpart specializations in parasitoid flies. *Biological Journal of the Linnean Society* 63:495-535.
61. Gilbert L. E. y L. W. Morrison. 1997. Patterns of host specificity in *Pseudacteon* parasitoids flies (Diptera: Phoridae) that attack *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biological Control* 26: 1149-1154.
62. Gilbert L. E. y R. J. W. Patrock. 2002. Phorid flies for the biological suppression of imported fire ant in Texas: region specific challenges, recent advances and future prospects. *Southwestern Entomologist* 25: 7-17.
63. Gilbert L. E., C. Barr, A. A. Calixto, J. L. Cook, B. M. Drees, E. G. LeBrun, R. J.W. Patrock, R. Plowes, S. D. Porter, and R.T. Puckett. 2008. Introducing phorid fly parasitoids of red imported fire ant workers from South America to Texas: Outcomes vary by region and by *Pseudacteon* species released. *Southwestern Entomology* 33: 15-29.
64. Godfray H. C. J. 1994. Parasitoids. Behavioral and Evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton, NJ.
65. Goodisman M. A. D. y K. G. Ross. 1997. Relationship of queen number and queen relatedness in multiple-queen colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Ecological Entomology* 22: 150-157.
66. Goodisman M. A. D. y K. G. Ross. 1998. A test of queen recruitment models using nuclear and mitochondrial markers in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Evolution* 52: 1416-1422.
67. Goodisman M. A. D., P. D. Mack, D. E. Pearse y K. G. Ross. 1999. Effects of a single gene on worker and male body mass in the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 92: 563-570.
68. Gotzek D. y K. G. Ross. 2007. Genetic regulation of colony social organization in fire ants: an integrative overview. *The Quarterly Review of Biology* 82: 201-226.
69. Graham L. C., S. D. Porter, R. M. Pereira, H. D. Dorough y A. T. Kelley. 2003. Field releases of the decapitating fly *Pseudacteon curvatus* (Diptera: Phoridae) for control of imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae) in Alabama, Florida and Tennessee. *Florida Entomologist* 86: 334-339.

70. Greenberg L., D. J. C. Fletcher y S. B. Vinson. 1985. Differences in worker size and mound distribution in monogynous and polygynous colonies of the fire ant *Solenopsis invicta* Buren. *Journal of Kansas Entomological Society* 58: 9-18.
71. He X. Z. y Q. Wang. 2006. Asymmetric size effect of sexes on reproductive fitness in an aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Biological Control* 36: 293-298.
72. Hediger M., M. Niessen, J. Müller-Navia y A. Dübendorfer. 1998. Distribution of heterochromatin on the mitotic chromosomes of *Musca domestica* L. in relation to the activity of male-determining factors. *Chromosoma* 107: 267-271.
73. Heitz E. 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbucher fur Wissenschaftliche Botanik* 69: 762-818.
74. Henne D. C. y S. J. Johnson. 2007. Zombie fire ants workers: Behaviour controlled by decapitating fly parasites. *Insectes Sociaux* 54: 150-153.
75. Henshaw M. T., N. Kunzmann, C. Vanderwoude, M. Sanetra y R. H. Croizer. 2005. Population genetics and history of the introduced fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), in Australia. *Australian Journal of Entomology* 44: 37-44.
76. Hölldobler B. y O. E. Wilson. 1990. The ants. Cambridge: Harvard University Press.
77. Howell W. M. y D. A. Black. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
78. Hufbauer R. A. y G. K. Roderick. 2005. Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and processes. *Biological Control* 35: 227-239.
79. Hurlbutt B. 1987. Sexual size dimorphism in parasitoid wasps. *Biological Journal of Linnean Society* 30: 63-89.
80. Jerome C. A., D. A. McInnes y E. S. Adams. 1998. Group defence by colonyfounding queens in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioural Ecology* 9: 301-308.
81. Keller L. y K. G. Ross 1993. Phenotypic plasticity and "cultural transmission" of alternative social organizations in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 33: 121-129.
82. Keller L. y K. G. Ross. 1998. Selfish genes: a green beard in the red fire ant. *Nature* 394: 573-575.
83. Keller L. y K. G. Ross. 1999. Major gene effects on the phenotype and fitness: the relative roles of Pgm-3 and Gp-9 in introduced populations of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 672-680.

84. King J. R. y W. R. Tschinkel. 2006. Experimental evidence that the introduced fire ant, *Solenopsis invicta*, does not competitively suppress co-occurring ants in a disturbed habitat. *Journal of Animal Ecology* 75: 1370-1378.
85. Komdeur J. 2003. Daughters on request: about helpers and egg sexes in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 3-11.
86. Krebs J. R. y N. B. Davies. 1987. An introduction to behavioural ecology. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
87. Krieger M. J. B. y K. G. Ross. 2002. Identification of a major gene regulating complex social behaviour. *Science* 295: 328-332.
88. Kronforst M. R., P. J. Folgarait, R. J. W. Patrock y L. E. Gilbert. 2007. Genetic differentiation between body size biotypes of the parasitoid fly *Pseudacteon obtusus* (Diptera: Phoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 1178-1184.
89. Krushelnycky P. D., D. A. Holway y E. G. LeBrun. 2010. Invasion processes and causes of success, pp. 245-260. En: L. Lach, C. L. Parr y K. L. Abbott [Eds.]. *Ant Ecology*. Oxford University Press, New York.
90. Lacadena J. R. 1996. Citogenética. Editorial Complutense S. A., Madrid.
91. Laugé G. 1985. Sex determination: genetic and epigenetic factors. En: Kerburt, G. A. & L. I. Gilbert (Eds.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pág. 295-318.
92. LeBrun E. G., C. V. Tillberg, A. V. Suarez, P. J. Folgarait, C. R. Smith y D. A. Holway. 2007. An experimental study of competition between red imported fire ants and Argentine ants in their native range. *Ecology* 88: 63-75.
93. LeBrun E. G., R. M. Plowes y L. E. Gilbert. 2008. Dynamic expansion in recently introduced populations of fire ant parasitoid (Diptera: Phoridae). *Biological Invasions* 10: 989-999.
94. LeBrun, E. G., R. M. Plowes y L. E. Gilbert. 2009. Indirect competition facilitates widespread displacement of one naturalized parasitoid of imported fire ants (Diptera: Phoridae: *Pseudacteon*) by another. *Ecology* 90: 1184-1194.
95. Levan A., K. Fredga y A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
96. Lofgren, C. S. 1986. History of imported fire ants in the United States. En: C. S. Lofgren and R. K. Vander Meer [Eds.]. *Fire ants and leaf cutting ants: biology and management*. Westview Press, Boulder, CO.
97. Macgregor H. C. 1993. An introduction to animal cytogenetics. Chapman & Hall, London, UK.
98. MacKay, W. P. y R. Fagerlund. 1997. Range expansion of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), into New Mexico and extreme

- western Texas. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 99: 757-758.
99. Macom T. E. y S. D. Porter. 1996. Comparison of polygyne and monogyne red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) population densities. *Annals of the Entomological Society of America* 89: 535-543.
 100. Mainx F. 1964. The genetics of *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae): a new type of sex determination in diptera. *American Naturalist* 98: 415-430.
 101. Marín I. Y B. S. Bruce. 1998. The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* 281: 1990-1994.
 102. Markin G. P., J. H. Dillier y H. L. Collins. 1973. Growth and development of colonies of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Annals of the Entomological Society of America* 66: 803-808.
 103. McCubbin, K. y J. Weiner. 2002. Fire ants in Australia: a new medical and ecological hazard. *The Medical Journal of Australia* 176: 518-519.
 104. McKee B. D. 2004. Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1677: 165-180.
 105. Mescher M. C., K. G. Ross, D. D. Shoemaker, L. Keller y M. J. B. Krieger. 2003. Distribution of the two social forms of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) in the native South American range. *Annals of the Entomological Society of America* 96: 810-817.
 106. Mirenda, J. T. y S. B. Vinson. 1981. Division of labor and specification of castes in the red imported fire-ant *Solenopsis invicta* Buren. *Animal Behaviour* 29: 410-420.
 107. Morel L., R. K. Vander Meer y C. S. Lofgren. 1990. Comparison of nestmate recognition between monogyne and polygyne populations of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 83: 642-647.
 108. Morrison L. W. 1999. Indirect effects of phorid fly parasitoids on the mechanisms of interspecific competition among ants. *Oecologia* 121:113-122.
 109. Morrison L. W. y L. E. Gilbert. 1998. Parasitoid-host relationships when host size varies: the case of *Pseudacteon* flies and *Solenopsis* fire ants. *Economical Entomology* 23: 409-416.
 110. Morrison L. W. y L. E. Gilbert. 1999. Host specificity in two additional *Pseudacteon* spp. (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist* 82: 404-409.
 111. Morrison L. W. y J. R. King. 2004. Host location behavior in a parasitoid of imported fire ants. *Journal of Insect Behavior* 17: 367-383.

112. Morrison L. W. y S. D. Porter. 2005a. Phenology and parasitism rates in introduced populations of *Pseudacteon tricuspis*, a parasitoid of *Solenopsis invicta*. *BioControl* 50: 127-141.
113. Morrison L. W. y S. D. Porter. 2005b. Testing for population- level impacts of introduced *Pseudacteon tricuspis* flies, phorid parasitoids of *Solenopsis invicta* fire ants. *Biological Control* 33: 9-19.
114. Morrison L. W. y S. D. Porter. 2006. Post-release host-specificity testing of *Pseudacteon tricuspis*, a phorid parasitoid of *Solenopsis invicta* fire ants. *Biocontrol* 51: 195-205.
115. Morrison L. W., C. G. Dall'Aglio-Holvorcem y L. E. Gilbert. 1997. Oviposition behavior and development of *Pseudacteon* flies (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology* 26: 716-724.
116. Morrison L. W., S. D. Porter y L. E. Gilbert. 1999. Sex ratio as a function of host size in *Pseudacteon* flies (Diptera: Phoridae) parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Linnean Society* 66: 257-267.
117. Mottern J. L., K. M. Keinz y P. J. Ode. 2004. Evaluating biological control of fire ants using phorid flies: effects on competitive interactions. *Biological Control* 30: 566-583.
118. Nijhout H. F. 2003. Development and evolution of adaptative polyphenisms. *Evolutionary Development* 5: 9-18.
119. Obin M. S. y R. K. Vander Meer. 1988. Sources of nestmate recognition in the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Animal Behaviour* 36: 1361-1370.
120. Obin M. S., L. Morel y R. K. Vander Meer. 1993. Unexpected, well-developed nestmate recognition in laboratory colonies of polygyne imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behavior* 6: 579-589.
121. Orr M. R., S. H. Seike, W. W. Benson y L. E. Gilbert. 1995. Flies suppress fire ants. *Nature* 373: 292-293.
122. Orr M. R., S. H. Seike y L. E. Gilbert. 1997. Foraging ecology and patterns of diversification in dipteran parasitoids of fire ants in South Brazil. *Ecological Entomology* 22: 305-314.
123. Parker J. y L. Johnston. 2006. The proximate determinants of insect size. *The Journal of Biology* 5: 15.
124. Pascoe A. 2002. Strategies for managing incursions of exotic animals to New Zealand. *Micronesica* 6: 129-135.

125. Passera L. 1994. Characteristics of tramp species, pp. 23-43. En: D. F. Williams [Eds.]. *Exotic Ants: Biology, impact, and control of introduced species*. Boulder, CO, Westview Press.
126. Parise-Maltempi P. P. y R. M. P. Avancini. 2000. Cytogenetics of the neotropical flesh fly *Pattonella intermutans* (Diptera: Sarcophagidae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 563-567.
127. Parise-Maltempi P. P. y R. M. P. Avancini. 2001. C-banding and FISH in chromosomes of the blow flies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 371-377.
128. Patrock R. J. W., S. D. Porter, L. E. Gilbert y P. J. Folgarait. 2009. Distributional patterns of *Pseudacteon* associated with the *Solenopsis saevissima* complex in South America. *Journal of Insect Science* 9: 60.
129. Pereira R. M. y S. D. Porter. 2006. Range expansion of the fire ant decapitating fly, *Pseudacteon tricuspis*, eight to nine years after releases in North America. *Florida Entomologist* 89: 536-538.
130. Pike T. T. y M. Petrie. 2003. Potential mechanisms of avian sex manipulation. *Biological Review* 78: 553-574.
131. Pitts J. P. 2002. A cladistic analysis of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae). Ph. D. dissertation, University of Georgia, Athens, GA.
132. Pitts J. P., J. V. McHugh y K. G. Ross. 2005. Cladistic analysis of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae). *Zoologica Scripta* 34: 493-505.
133. Porter S. D. 1992. Frequency and distribution of polygyne fire ants (Hymenoptera: Formicidae) in Florida. *Florida Entomologist* 75: 248-257.
134. Porter S. D. 1993. Stability of polygyne and monogyne fire ant populations (Hymenoptera: Formicidae: *Solenopsis invicta*) in the United States. *Journal of Economic Entomology* 86: 1344-1347.
135. Porter S. D. 1998. Biology and behavior of *Pseudacteon* decapitating flies (Diptera: Phoridae) that parasitize *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist* 81: 292-308.
136. Porter S. D. 2000. Host specificity and risk assessment of releasing the decapitating fly *Pseudacteon curvatus* as a classical biocontrol agent for imported fire ants. *Biological Control* 19: 35-47.
137. Porter S. D. y W. R. Tschinkel. 1985. Fire ant polymorphism (Hymenoptera: Formicidae): factors affecting worker size. *Annals of the Entomological Society of America* 78: 381-386.

138. Porter, S. D. y D. A. Savignano. 1990. Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community. *Ecology* 71: 2095-2106.
139. Porter S. D. y J. A. Briano. 2000. Parasitoid-host matching between the little decapitating fly *Pseudacteon curvatus* from Las Flores, Argentina and the black fire ant *Solenopsis richteri*. *Florida Entomologist* 83: 422-427.
140. Porter S. D. y M. A. Pesquero. 2001. Illustrated key to *Pseudacteon* decapitating flies (Diptera: Phoridae) that attack *Solenopsis saevissima* complex fire ants in South America. *Florida Entomologist* 90:135-138.
141. Porter S. D. y L. E. Gilbert. 2004. Assessing host specificity and field release potential of fire ant decapitating flies (Phoridae: Pseudacteon), pp. 152-176. En R.G. Van Driesche and R. Reardon [Eds.]. *Assessing Host Range for Parasitoids and Predators Used for Classical Biological Control: a Guide to Best Practice*. Morgantown, West Virginia, United States Department of Agriculture and Forest Service.
142. Porter, S. D., B. Van Eimeren y L. E. Gilbert. 1988. Invasion of red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae): microgeography of competitive replacement. *Annals of the Entomological Society of America* 81: 913-918.
143. Porter S. D., A. Bhatkar, R. Mulder, S. B. Vinson y D. Clair. 1991. Distribution and density of polygyne fire ants (Hymenoptera: Formacidae) in Texas. *Journal of Economic Entomology* 54: 866-874.
144. Porter S. D., H. G. Fowler y W. P. Mackay. 1992. Fire ant mound densities in the United States and Brazil (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 85: 1154-1161.
145. Porter S. D., H. G. Fowler, S. Campiolo y M. A. Pesquero. 1995a. Host specificity of several *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) parasites of fire ants (Hymenoptera: Formicidae) in South America. *Florida Entomologist* 78: 70-75.
146. Porter S. D., M. A. Pesquero, S. Campiolo y H. G. Fowler. 1995b. Growth and development of *Pseudacteon* phorid fly maggots (Diptera: Phoridae) in the heads of *Solenopsis* fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology* 24: 475-479.
147. Porter S. D., D. F. Williams, R. S. Patterson y H. G. Fowler. 1997. Intercontinental differences in the abundance of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae): Escape of natural enemies? *Environmental Entomology* 26: 373-384.
148. Porter S. D., L. A. Nogueira de Sá y L. W. Morrison. 2004. Establishment and dispersal of the fire ant decapitating fly *Pseudacteon tricuspis* in North Florida. *Biological Control* 29: 179-188.

149. Rafael M. S. y W. P. Tadei. 1998. Metaphase Karyotypes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A. (N.) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 351-354.
150. Rebagliati P, A. G. Papeschi y L. M. Mola. 2003. Meiosis and fluorescent banding in *Edessa mediatubunda* and *E. rufomarginata* (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). *European Journal of Entomology* 100: 11-18.
151. Reeve J. P. y D. J. Fairbairn. 1999. Change in sexual size dimorphism as a correlated response to selection on fecundity. *Heredity* 83: 697-706.
152. Ross K. G. 1993. The breeding system of the fire ant *Solenopsis invicta*: effects on colony genetic structure. *American Naturalist* 141: 554-576.
153. Ross K. G. 1997. Multilocus evolution in fire ants: Effects of selection, gene flow and recombination. *Genetics* 145: 961-974.
154. Ross K. G. y J. C. Trager. 1990. Systematic and population genetics of fire ants (*Solenopsis saevissima* complex) from Argentina. *Evolution* 44: 2113-2134.
155. Ross K. G. y J. M. Carpenter. 1991. Phylogenetic analysis and the evolution of queen number in eusocial Hymenoptera. *Journal of Evolutionary Biology* 4: 117-130.
156. Ross, K. G. y L. Keller. 1995. Ecology and evolution of social organization: insights from fire ants and other highly eusocial insects. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 26: 631-656.
157. Ross K. G. y L. Keller. 1998. Genetic control of social organization in a fire ant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14232-14237.
158. Ross K. G. y L. Keller. 2002. Experimental conversion of colony social organization by manipulation of worker genotype composition in fire ants (*Solenopsis invicta*). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 51: 287-295.
159. Ross K. G. y D. D. Shoemaker. 2005. Species delimitation in native South American fire ants. *Molecular Ecology* 14: 3419-3438.
160. Ross K. G., R. K. Vander Meer, D. J. C. Fletcher y E. L. Vargo. 1987a. Biochemical phenotypic and genetic studies of two introduced fire ants in their hybrid (Hymenoptera: Formicidae). *Evolution* 41: 280-293.
161. Ross K. G., E. L. Vargo y D. J. C. Fletcher. 1987b. Comparative biochemical genetics of three fire ant species in North America, with special reference to the two social forms of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Evolution* 41: 979-990.

162. Ross K. G., E. L. Vargo, L. Keller y J. C. trager. 1993. Effect of a founder event on variation in the genetic sex-determining system of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Genetics* 135: 843-854.
163. Ross K. G., E. L. Vargo y L. Keller. 1996a. Social evolution in a new environment: the case of introduced fire ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 3021-3025.
164. Ross K. G., E. L. Vargo y L. Keller. 1996b. Simple genetic basis for important social traits in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Evolution* 50: 2387-2399.
165. Ross K. G., M. J. B. Krieger, D. D. Shoemaker, E. L. Vargo y L. Keller. 1997. Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from three classes of molecular markers. *Genetics* 147: 643-655.
166. Ross K. G., M. J. B. Krieger, L. Keller y D. D. Shoemaker. 2007. Genetic variation and structure in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta*: evolutionary and demographic implications. *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 541-560.
167. Ross K. G., M. J. B. Krieger, L. Keller y D. D. Shoemaker. 2008. Genetic variation and structure in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta*: evolutionary and demographic implications. *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 541-560.
168. Schütt C. y R. Nöthiger. 2000. Structure, function and evolution of sex determining systems in dipteran insects. *Development* 127: 667-677.
169. Selivon D. y A. L. P. Perondini. 1997. Evaluation of techniques for C and ASG banding of the mitotic chromosomes of *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 651-654.
170. Selivon D., A. L. P. Perondini & L. S. Rocha. 2005. Karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology* 34: 273-279.
171. Shoemaker D. D., K. G. Ross, L. Keller, E. L. Vargo y J. H. Werren. 2000. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). *Insect Molecular Biology* 9: 661-673.
172. Shoemaker D. D., G. Keller y K. G. Ross. 2003. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ants species. *Molecular Ecology* 12: 1757-1771.
173. Shoemaker D. D., M. Ahrens y K. G. Ross. 2006a. Molecular phylogeny of fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 200-215.
174. Shoemaker D. D., C. J. Deheer, M. J. B. Krieger y K. G. Ross. 2006b. Population genetics of the invasive fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) in the USA. *Annals of the Entomological Society of America* 99: 1213-1233.

175. Siqueira Gazal e Silva V., O. Bailez, A. M. Viana-Bailez y A. Tonhasca Jr. 2007. Effect of the size of workers of *Atta sexdens rubropilosa* on the attack behavior of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae). *Sociobiology* 50: 35-44.
176. Smith C. R. y L. E. Gilbert. 2003. Differential attraction of a parasitoid to dead host ants. *Florida Entomologist* 86: 479-480.
177. Sokal R. y F. J. Rohlf. 1969. Biometry. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA.
178. Stern D. L. y D. J. Emlen. 1999. The developmental basis of allometry in insects. *Development* 126: 1091-1101.
179. Stillwell R. C. y C. W. Fox. 2007. Environmental effects on sexual size dimorphism of a seed- feeding beetle. *Oecologia* 153: 273-280.
180. Sumner A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
181. Taber S. W. 2000. Fire Ants. Texas A&M University Press.
182. Teder T. y T. Tammaru. 2005. Sexual size dimorphism within species increases with body size in insects. *Oikos* 108: 321-334.
183. Thead L. G., J. T. Vogt y D. A. Streett. 2005. Dispersal of the fire ant decapitating fly, *Pseudacteon curvatus* (Diptera: Phoridae) in northeast Mississippi. *Florida Entomologist* 88: 214-216.
184. Tonhasca Jr. A., M. A. L. Braganca y Jr. M. Erthal. 2001. Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to it host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux* 48: 154-158.
185. Trager J. C. 1991. A revision of the fire ants, *Solenopsis geminata* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). *Journal of the New York Entomological Society* 99: 141-198.
186. Traut W. 1994. Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics* 136: 1097-1104.
187. Traut W. 1999. The evolution of sex chromosomes in insects: differentiation of sex chromosomes in flies and moths. *European Journal of Entomology* 96: 227-235.
188. Traut W. y B. Wollert. 1998. An X/Y DNA segment from an early stage of sex chromosome differentiation in the fly *Megaselia scalaris*. *Genome* 41: 289-294.
189. Traut W. y U. Willhoeft. 1990. A jumping sex determining factor in the fly *Megaselia scalaris*. *Chromosoma* 99: 407-412.
190. Traut W., N. Khuong y S. Schneider. 1990. Karyotypes of *Megaselia scalaris* (Diptera) wild-type and translocation strains. *Genetica* 83: 77-84.

191. Traut W., K. Sahara, T. D. Otto y F. Marec. 1999. Molecular differentiation of sex chromosome probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173-180.
192. Tschinkel W. R. 1988a. Colony growth and the ontogeny of worker polymorphism in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 22: 103-115.
193. Tschinkel W. R. 1988b. Social control of egg-laying rate in queens of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Physiological Entomology* 13: 327-350.
194. Tschinkel W. R. 1993. Sociometry and sociogenesis of colonies of the fire ant *Solenopsis invicta* during one annual cycle. *Ecological Monographs* 63: 425-457.
195. Tschinkel W. R. 1998. The reproductive biology of fire ant societies. *Bioscience* 48: 593-605.
196. Tschinkel W. R., E. S. Adams y T. Macom. 1995. Territory area and colony size in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of Animal Ecology* 64: 473-480.
197. Tschinkel W. R., A. S. Mikheyev y S. R. Storz. 2003. Allometry of workers in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Science* 3. 2: 11.
198. Tsutsui N. D. y A. V. Suarez. 2002. The colony structure and population biology of invasive ants. *Conservation Biology* 17: 48-58.
199. Valles S. M. y S. D. Porter. 2003. Identification of polygyne and monogyne fire ant colonies (*Solenopsis invicta*) by multiplex PCR of Gp-9 alleles. *Insectes Sociaux* 50: 199-200.
200. Valles S. M., D. H. Oi, O. P. Perera y D. F. Williams. 2002. Detection of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia: Thelohaniidae) in *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) by multiplex PCR. *Journal of Invertebrate Pathology* 81: 196-201.
201. Van den Assem J., J. J. A. Van Iersel y R. L. Los-den Hartogh. 1989. Is being more important for female than for male parasitic wasps? *Behaviour* 108: 160-195.
202. Vander Meer R. K., C. A. Preston y A. Hefetz. 2008. Queen regulates biogenic amine level and nestmate recognition in workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Naturwissenschaften* 95: 1155-1158.
203. Vazquez R. J., S. D. Porter y J. A. Briano. 2004. Host specificity of a biotype of the fire ant decapitating fly *Pseudacteon curvatus* (Diptera: Phoridae) from northern Argentina. *Environmental Entomology* 33:1436-1441.
204. Vinson S. B. 1997. Invasion of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): spread, biology, and impact. *American Entomologist* 43: 23-29.
205. Vogt J. T. y D. A. Streett. 2003. *Pseudacteon curvatus* (Diptera: Phoridae) laboratory parasitism, release and establishment in Mississippi. *Journal of Entomological Sciences* 38: 317-320.

206. Weeks R. D. Jr., L. T. Wilson, S. B. Vinson y W. D. James. 2004. Flow of carbohydrates, lipids, and protein among colonies of polygyne red imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 97: 105-110.
207. Wheeler D. E. 1990. The developmental basis of worker polymorphism in fire ants. *Journal of Insect Physiology* 36: 315-322.
208. Wheeler D. E. 1991. The developmental basis of worker caste polymorphism in ants. *American Naturalist* 138: 1218-1238.
209. White M. J. D. 1973. Animal cytology and evolution. University Press, Cambridge.
210. Williams D. F., H. L. Collins y D. H. Oi. 2001. The imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): an historical perspective of treatment programs and the development of chemical baits for control. *American Entomologist* 47: 146-159.
211. Williams D. F., D. H. Oi, S. D. Porter, R. M. Pereira y J. A. Briano. 2003. Biological control of imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *American Entomologist* 49: 144-155.
212. Willhoeft U. 1997. Fluorescence in situ hybridization of ribosomal DNA to mitotic chromosomes of tsetse flies (Diptera: Glossinidae: *Glossina*). *Chromosome Research* 5: 262-267.
213. Willhoeft U. y W. Traut. 1990. Molecular differentiation of the homomorphic sex chromosomes in *Megaselia scalaris* (Diptera) detected by random DNA probes. *Chromosoma* 99: 237-242.
214. Willhoeft U. y W. Traut. 1994. The sex-determining region of the *Megaselia scalaris* (Diptera) Y chromosome. *Chromosome Research* 3: 59-65.
215. Wilson E. O. 1953. The origin and evolution of polymorphism in ants. *The Quarterly Review of Biology* 28: 136-156.
216. Wilson E. O. 1971. The Insect Societies. Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge.
217. Wojcik D. P. 1983. Comparison of the ecology of red imported fire ants in North and South America. *Florida Entomologist* 66: 101-111.
218. Wojcik D., C. R. Allen, R. J. Brenner, E. A. Forsy, D. Jouvenaz y R. S. Lutz. 2001. Red imported fire ants: impact on biodiversity. *American Entomologist* 47: 16-23.
219. Wolf K. W., A. Mitchell y G. Liu. 1996. Centromere- like elements in *Megaselia spiracularis* (Diptera: Phoridae): a fine-structure and cytogenetic study. *Hereditas* 124: 203-209.
220. Wood L. A. y W. R. Tschinkel. 1981. Quantification and modification of worker size variation in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Insectes Sociaux* 28: 117-128.

221. Woods H. A., W. Makino, J. B. Cotner, S. E. Hobbie, J. F. Harrison, K. Acharya y J. J. Elser. 2003. Temperature and the chemical composition of poikilothermic organisms. *Functional Ecology* 17: 237-245.
222. Wuellner C. T., C. G. Dall'Agio-Holverocem, W. W. Benson y L. E. Gilbert. 2002. Phorid fly (Diptera: Phoridae) oviposition behavior and fire ant (Hymenoptera: Formicidae) reaction to attack differs according to phorid species. *Annals of the Entomological Society of America* 95: 257-26.
223. Yang C. C., D. D. Shoemaker, W. J. Wu y C. J. Shih. 2008. Population genetic structure of the imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in Taiwan. *Insectes Sociaux* 55: 54-65.

Notas

Capítulo 2

* Chirino M. G., L. E. Gilbert y P. J. Folgarait. Behavioural differences between social forms of fire ants in their native range: a protocol for their discrimination. *Animal Behaviour*. Enviado.

¹ Peso que determina diferentes patrones entre ambas FS por valores que caen por arriba y por debajo del mismo.

² Tipo de conducta iniciada al mismo tiempo por las obreras *M* y *P* de *S. invicta* en interacción.

Capítulo 3

* Chirino M. G., L. E. Gilbert y P. J. Folgarait. 2009. Behavior and development of *Pseudacteon curvatus* (Diptera: Phoridae) varies according to the social form of its host *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) in its native range. *Environmental Entomology* 38: 198-206.

Capítulo 4

* Chirino M. G., L. E. Gilbert y P. J. Folgarait. *Pseudacteon tricuspis*: Its behavior and development according to the social form of its host, and the role of interference competition among females. *Journal of Economic Entomology*. 2° Revisión.

Capítulo 6

* Chirino M. G., P. J. Folgarait, L. E. Gilbert, S. Lanzavecchia y A. G. Papeschi. 2009. Cytogenetic analysis of three species of *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) parasitoids of the fire ants using standard and molecular techniques. *Genetics and Molecular Biology* 32: 740-747.

Anexos

Protocolo de Extracción de ADN (modificado de Valles *et al.* 2002):

1. Colocar 20 hormigas por “eppendorf”. Agregar 150 µl del buffer de lisis (Tris-HCl 50 Mm, pH 8, SDS 4% y 2-mercaptoetanol 5%) y homogeneizar por 1 min.
2. Incubar las muestras a 100 °C durante 15 min.
3. Poner las muestras en hielo por 1 min.
4. Adicionar 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1).
5. Invertir la mezcla 5 veces y centrifugar a 14.000 *rpm* por 5 min.
6. Remover el sobrenadante midiendo el volumen extraído y pasarlo a otro “eppendorf”.
7. Poner las muestras en el hielo y agregar 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío.
8. Colocar las muestras a – 80 °C por 2 h.
9. Centrifugar las muestras a 14.000 *rpm* por 10 min.
10. Descartar el alcohol, agregar 200 µl de etanol 70% y centrifugar por 5 min. a 14.000 *rpm*.
11. Repetir lavado anterior.
12. Extraer el etanol y secar a 37 °C hasta que se seque el “pellet”.
13. Disolver y resuspender el “pellet” en 20 µl de H₂O bidestilada.

Tabla 2.A. Medidas características de los nidos de ambas FS de *S. invicta* muestreados en Chaco (CH) y en San Javier (SJ).

Sitio	FS	Nido focal	Altura (cm)	Radio (cm)	Perímetro (cm)	Volumen (m ³)	Distancia al nido más cercano (cm)
CH	M	2	13,5	47,65	162,0	0,032	531,0
		3	18,0	34,50	130,0	0,023	531,1
		6	15,0	28,50	131,0	0,013	116,0
		7	10,0	42,5	141,0	0,019	265,3
		11	18,7	33,55	113,4	0,022	430,9
		12	21,8	45,00	135,2	0,046	536,0
	P	1	10,0	46,00	156,0	0,022	83,2
		4	22,0	44,75	164,2	0,046	126,3
		5	10,5	27,00	134,0	0,008	91,0
		8	11,3	30,7	94,9	0,011	112,3
		9	27,6	33,40	160,0	0,032	160,5
		10	24,6	32,95	217,3	0,028	211,8
SJ	M	1	17,9	36,10	163,5	0,024	382,5
		3	11,7	21,00	98,0	0,005	126,1
		7	13,4	34,80	148,2	0,017	160,1
		8	12,5	38,10	144,6	0,019	346,8
		11	18,9	20,00	96,0	0,008	326,0
		12	14,4	31,60	120,0	0,015	510,9
	P	2	19,1	58,95	204,2	0,007	66,1
		4	9,8	52,80	203,8	0,029	99,6
		5	20,8	46,90	192,7	0,048	32,0
		6	17,4	34,30	130,7	0,021	126,1
		9	15,9	31,70	142,9	0,017	51,1
		10	12,7	24,35	104,6	0,0079	64,2

Tabla 2.B. Peso individual de las obreras de *S. invicta* obtenido por regresión lineal considerando sitio de muestreo, FS y subcasta.

Chaco									
<i>Monoginia</i>					<i>Poliginia</i>				
Colonia	Casta	R ²	DE	Peso (g)	Colonia	Casta	R ²	DE	Peso (g)
2	Ma	1,00	0,004	0,0024	1	Ma	1,00	0,007	0,0024
	G	1,00	0,007	0,0026		G	1,00	0,005	0,0018
	M	1,00	0,007	0,0015		M	0,99	0,005	0,0009
	P	1,00	0,005	0,0009		P	0,99	0,006	0,0008
	Me	1,00	0,006	0,0005		Me	1,00	0,005	0,0005
3	Ma	0,98	0,005	0,0018	4	Ma	1,00	0,005	0,0025
	G	0,99	0,003	0,0015		G	1,00	0,007	0,0022
	M	0,99	0,004	0,0013		M	1,00	0,006	0,0012
	P	1,00	0,007	0,0006		P	1,00	0,006	0,0006
	Me	1,00	0,005	0,0004		Me	1,00	0,005	0,0005
6	Ma	1,00	0,003	0,0020	5	Ma	1,00	0,006	0,0025
	G	1,00	0,002	0,0017		G	1,00	0,009	0,0019
	M	1,00	0,002	0,0006		M	1,00	0,005	0,0009
	P	1,00	0,001	0,0006		P	1,00	0,003	0,0008
	Me	1,00	0,001	0,0003		Me	1,00	0,006	0,0006
7	Ma	1,00	0,004	0,0020	8	Ma	1,00	0,002	0,0022
	G	1,00	0,004	0,0020		G	1,00	0,002	0,0019
	M	0,93	0,008	0,0011		M	1,00	0,004	0,0007
	P	1,00	0,006	0,0007		P	1,00	0,001	0,0006
	Me	1,00	0,006	0,0006		Me	1,00	0,001	0,0004
11	Ma	0,99	0,002	0,0020	9	Ma	1,00	0,005	0,0020
	G	1,00	0,001	0,0012		G	1,00	0,004	0,0019
	M	1,00	0,001	0,0007		M	1,00	0,004	0,0007
	P	0,95	0,005	0,0004		P	1,00	0,002	0,0005
	Me	1,00	0,001	0,0003		Me	1,00	0,003	0,0004
12	Ma	1,00	0,003	0,0023	10	Ma	1,00	0,004	0,0020
	G	1,00	0,004	0,0022		G	1,00	0,004	0,0019
	M	1,00	0,008	0,0013		M	1,00	0,003	0,0007
	P	1,00	0,003	0,0009		P	1,00	0,001	0,0006
	Me	1,00	0,002	0,0005		Me	1,00	0,001	0,0003

San Javier									
<i>Monoginia</i>					<i>Poliginia</i>				
Colonia	Casta	R ²	DE	Peso (g)	Colonia	Casta	R ²	DE	Peso (g)
1	Ma	1,00	0,002	0,0031	2	Ma	0,99	0,005	0,0021
	G	1,00	0,006	0,0025		G	1,00	0,005	0,0021
	M	1,00	0,004	0,0014		M	1,00	0,005	0,0013

	<i>P</i>	1,00	0,005	0,0008		<i>P</i>	0,99	0,005	0,0007
	<i>Me</i>	1,00	0,005	0,0005		<i>Me</i>	0,99	0,004	0,0003
3	<i>Ma</i>	1,00	0,003	0,0035	4	<i>Ma</i>	0,99	0,005	0,0024
	<i>G</i>	1,00	0,005	0,0029		<i>G</i>	1,00	0,005	0,0020
	<i>M</i>	1,00	0,007	0,0017		<i>M</i>	1,00	0,005	0,0010
	<i>P</i>	1,00	0,006	0,0006		<i>P</i>	1,00	0,003	0,0006
	<i>Me</i>	1,00	0,004	0,0004		<i>Me</i>	0,99	0,008	0,0004
7	<i>Ma</i>	0,98	0,006	0,0023	5	<i>Ma</i>	0,99	0,005	0,0026
	<i>G</i>	1,00	0,003	0,0018		<i>G</i>	0,99	0,006	0,0021
	<i>M</i>	0,99	0,003	0,0010		<i>M</i>	0,93	0,011	0,0006
	<i>P</i>	0,98	0,003	0,0006		<i>P</i>	0,99	0,005	0,0005
	<i>Me</i>	0,97	0,004	0,0004		<i>Me</i>	0,98	0,004	0,0003
8	<i>Ma</i>	1,00	0,004	0,0024	6	<i>Ma</i>	1,00	0,004	0,0028
	<i>G</i>	0,99	0,007	0,0016		<i>G</i>	1,00	0,006	0,0021
	<i>M</i>	1,00	0,005	0,0012		<i>M</i>	1,00	0,005	0,0011
	<i>P</i>	1,00	0,004	0,0007		<i>P</i>	1,00	0,005	0,0006
	<i>Me</i>	1,00	0,002	0,0004		<i>Me</i>	1,00	0,004	0,0004
11	<i>Ma</i>	0,99	0,003	0,0021	9	<i>Ma</i>	0,99	0,004	0,0025
	<i>G</i>	1,00	0,002	0,0020		<i>G</i>	1,00	0,004	0,0017
	<i>M</i>	1,00	0,002	0,0012		<i>M</i>	0,99	0,003	0,0008
	<i>P</i>	0,97	0,003	0,0006		<i>P</i>	0,99	0,004	0,0004
	<i>Me</i>	0,99	0,002	0,0003		<i>Me</i>	0,98	0,006	0,0003
12	<i>Ma</i>	1,00	0,001	0,0018	10	<i>Ma</i>	1,00	0,001	0,0025
	<i>G</i>	0,99	0,005	0,0016		<i>G</i>	0,99	0,003	0,0018
	<i>M</i>	0,99	0,003	0,0011		<i>M</i>	0,99	0,003	0,0012
	<i>P</i>	0,99	0,004	0,0006		<i>P</i>	0,99	0,003	0,0005
	<i>Me</i>	0,98	0,003	0,0004		<i>Me</i>	0,99	0,004	0,0003

Obtención de las preparaciones cromosómicas mediante método de dispersión (a partir de ejemplares vivos)

HCL 1 %

HCl 0,5 ml

EtOH 96 % 50 ml

1. Disolver 0,5 ml de HCl en 50 ml de etanol 96 %.

Solución fisiológica para insectos

0,02 % NaHCO₃ 0,2 g

0,9 %	NaCl	9 g
0,0 42%	KCl	0,42 g
0,025 %	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,33 g

1. Disolver el NaHCO₃ en 100 ml de agua bidestilada.
2. Disolver el NaCl, KCl y CaCl₂.2H₂O en 800 ml de agua bidestilada.
3. Mezclar ambas soluciones en un matraz de 1.000 ml y llevar a volumen.
4. Esterilizar en autoclave y conservar a 4 °C.

Solución hipotónica para suspensión celular

0,075M ClK	0,5592g
------------------	---------

1. Disolver 0,56 g de ClK en 100 ml de agua bidestilada

Solución de Carnoy (etanol: cloroformo: ácido acético glacial) 6:3:1

EtOH 96 %	6 ml
Cloroformo	3 ml
Ácido acético glacial	1 ml

Técnicas de bandas cromosómicas

HCl 0,2 N

5 N HCl	4 ml
H ₂ O _d	96 ml

Ba(OH)₂ 5 %

Ba(OH) ₂	5 g
H ₂ O _d	100 ml

1. Disolver 5 g de Ba(OH)₂ en 100 ml de agua destilada.
2. Colocar la solución en agitación hasta que se homogenice durante 10-15 min.
3. Filtrar la solución en un coplin de 80 ml y cuando el recipiente se llene cubrirlo con un vidrio para evitar el contacto con el aire.

2xSSC

20% SSC	10 ml
---------------	-------

H₂O_d 90 ml

Buffer fosfato para bandas C

Solución A

Na₂HPO₄·2H₂O 9,46g
H₂O bidestilada 1.000 ml

Solución B

KH₂PO₄ 9,07g
H₂O bidestilada 1.000 ml

Solución de Giemsa 4 %

Buffer fosfato Sol. A 58 ml
Buffer fosfato Sol. B 42 ml
Solución de Giemsa 4 ml

1. Mezclar 58 ml de la solución A con 42 ml de la solución B.
2. Eliminar 4 ml de la mezcla de soluciones.
3. Incorporar 4 ml de solución de Giemsa.
4. Agitar con varilla de vidrio para homogeneizar la solución.

Solución stock de 4' 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, SIGMA Co., cat. D9542)

Solución stock (200 µg/ml)

DAPI 1mg

1. Disolver el DAPI en 5ml de agua bidestilada.
2. Conservar la solución a 4°C en oscuridad.

Medio de montaje para fluorescencia

DABCO (1,4-diazabicyclo (2.2.2) octane) 0,233g
1M Tris/HCl pH 8,0..... 200µl
Glicerol (MERCK, cat. 1-12011, anhidro) 9ml

1. Disolver DABCO en 800 µl de H₂O bidestilada.
2. Agregar Tris/HCl y glicerol.

Solución de 1M Tris/HCl pH 8,0

Tris Base 121,12g

1. Disolver Tris Base en 800 ml de H₂O bidestilada.
2. Ajustar a pH 8,0 con HCl concentrado (aproximadamente 42 ml).
3. Llevar a volumen 1.000 ml con H₂O bidestilada.
4. Conservar a 4 °C.

Buffer Mc Ilvaine

Solución A

0,1M ácido cítrico monohidratado 2,101g

1. Disolver en 100 ml de agua bidestilada.

Solución B

Na₂HPO₄ 28,4 g

o Na₂HPO₄.2H₂O 35,6 g

o Na₂HPO₄.12H₂O 71,6 g

1. Disolver en 1.000 ml de agua bidestilada.
2. Mezclar en el momento de usar 8,8 ml de la solución A con 41,2 ml de la solución B.
3. Conservar cada solución a 4°C.

Cromomicina A₃ (CMA₃)

Solución colorante (0,6 mg/ml) en Buffer B

CMA₃ 6 mg

Buffer B 10 ml

1. Poner CMA₃ en un erlenmeyer pequeño forrado con papel de aluminio.
2. Agregar el volumen de Buffer B con cuidado. NO AGITAR.
3. Guardar en la heladera sin moverlo mucho.
4. Dejar estacionar como mínimo 1 semana antes de usar.

Buffer B

1. Mezclar 10 ml de Buffer Mc Ilvaine con 10 ml de agua bidestilada y 0,1 ml de Cl₂Mg.6H₂O 1M

Cloruro de magnesio

1M Cl₂Mg.6H₂O 5,07g

1. Disolver el $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de agua bidestilada.
2. Calentar durante 2-3 minutos hasta que hierva.
3. Conservar a 4°C .

PBS

0.15M ClNa	8,76g
0.05M NaH_2PO_4	6,89g

1. Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 7,4 y llevar a volumen 1.000 ml.

Solución de gelatina de origen porcino (SIGMA Co. cat. G2500)

2% Gelatina en polvo	0,5 g
Ácido fórmico	0,25 ml

1. Disolver la gelatina en polvo en 25 ml de agua destilada por agitación.
2. Agregar el ácido fórmico para ajustar a pH 3,5 y como preservante.
3. Conservar en frasco de color caramelo en la heladera.

Esta solución es estable hasta por 2 semanas.

Solución acuosa de nitrato de plata

50% AgNO_3	0,5g
---------------------------	------

1. Disolver 0,5 g de AgNO_3 en 1 ml de agua destilada.

Esta solución se hace en el momento antes de ser usada.

Para citar este documento

Chirino, Mónica (2015). Variación interespecífica, dimorfismo sexual en el tamaño adulto y mecanismo de determinación sexual en los parasitoides del género *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) desarrollados sobre *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: <http://ridaa.demo.unq.edu.ar>