

## Tesis Doctoral

# Comportamiento de oviposición de la avispa sierra del sauce *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae): el rol de los semioquímicos en la elección de plantas hospederas

Braccini, Celina Laura

2017-11-02

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

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

Cita tipo APA:

Braccini, Celina Laura. (2017-11-02). Comportamiento de oviposición de la avispa sierra del sauce *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae): el rol de los semioquímicos en la elección de plantas hospederas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Braccini, Celina Laura. "Comportamiento de oviposición de la avispa sierra del sauce *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae): el rol de los semioquímicos en la elección de plantas hospederas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-11-02.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Comportamiento de oviposición de la avispa sierra del sauce  
*Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae): el rol de los  
semioquímicos en la elección de plantas hospederas**

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

**Celina Laura Braccini**

Directora de Tesis: Dra. Patricia Carina Fernández

Consejera de Estudios: Dra. Gabriela Hermitte

Lugar de trabajo: Instituto de Recursos Biológicos, CNIA, INTA

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 2 de noviembre de 2017

## **Comportamiento de oviposición de la avispa sierra del sauce *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae): el rol de los semioquímicos en la elección de plantas hospederas**

*Nematus oligospilus* representa una amenaza para el cultivo de sauce debido a la intensa defoliación que generan sus larvas. La colonización de las plantas hospederas se inicia cuando las hembras colocan sus huevos en las hojas. Al nacer, las larvas poseen escasa movilidad y carecen de cuidado parental. Por lo tanto, la elección materna del sitio de oviposición resulta crucial para garantizar el éxito de la descendencia.

El objetivo general de este trabajo fue identificar las claves de la planta que intervienen en la orientación y elección del sitio de oviposición de *N. oligospilus*. En primer lugar, se determinaron los genotipos de sauce más susceptibles al ataque de la avispa mediante ensayos comportamentales en laboratorio. A continuación, se caracterizaron la anatomía foliar y el patrón de deposición de ceras cuticulares en su superficie, y se midieron propiedades físicas y químicas básicas de las hojas. Además, se analizaron los perfiles químicos de emisiones volátiles y de compuestos cuticulares de los genotipos de sauce más y menos preferidos por *N. oligospilus*, y se diseñaron ensayos comportamentales para evaluar su rol como claves de oviposición. Por último, se examinó la morfología externa de las antenas y del ovipositor de las hembras en busca de estructuras quimiosensoriales potencialmente involucradas en la elección de la planta hospedera.

*Salix nigra* (genotipo más preferido para oviponer) presentó la menor masa foliar específica y el mayor contenido y diversidad de glicósidos fenólicos. Sus emisiones volátiles totales fueron más del triple que las de *S. viminalis* (genotipo menos preferido por la avispa) y su perfil de ceras cuticulares resultó más complejo. En conjunto, los resultados sugieren que la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* es producto de un balance entre la estructura anatómica foliar, los niveles de nutrientes en las hojas y la presencia de metabolitos secundarios que actuarían como claves químicas. A distancia, las hembras se orientan en función al perfil de compuestos volátiles emitido por la planta hospedera. Una vez sobre la superficie foliar, la decisión de oviponer depende de la presencia de claves de contacto específicas que constituirían una “huella química” que proporciona al insecto las claves para reconocer al genotipo de sauce.

Los aportes de este trabajo resultan relevantes para programas de mejoramiento genético de sauce y contribuyen al desarrollo de herramientas de bajo impacto ambiental destinadas a la protección del cultivo.

Palabras clave: interacción insecto-planta, claves de oviposición, volátiles de planta, ceras cuticulares foliares, *Nematus oligospilus*, *Salix* spp., avispa sierra del sauce

**Oviposition behavior of the willow sawfly *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae): the role of semiochemicals in host plants selection**

*Nematus oligospilus* represents a threat to willow crop due to intense defoliation caused by larval feeding. Host plants colonization begins when females lay their eggs on the leaves. After hatching, larvae possess little mobility and lack of parental care. Thus, the maternal choice of the oviposition site is crucial to assure offspring success.

The aim of this work was to determine plant cues involved in orientation and selection of the oviposition site by *N. oligospilus*. First, susceptibility of willow genotypes was determined by means of behavioral bioassays in the laboratory. Then, leaf anatomy and patterns of cuticular waxes deposition were characterized, and basic physical and chemical leaf traits were measured. Besides, chemical profiles of volatile and cuticular compounds from different willow genotypes were analyzed, and behavioral bioassays were performed in order to evaluate their role as oviposition cues. Finally, external morphology of female antennae and ovipositor were examined in order to search for chemosensory structures possibly involved in host plant selection.

*Salix nigra* (the preferred genotype) showed the lowest specific leaf mass and the highest content and diversity of phenolic glycosides. Its total volatile emissions were more than three times than those by *S. viminalis* (the non-preferred genotype) and its cuticular waxes profile was more complex. Altogether, these results suggest that oviposition preference by *N. oligospilus* is determined by a balance among anatomical leaf structure, levels of nutrients and presence of secondary metabolites acting as chemical cues. From a distance, females orient to host plants by their volatile profile. Once on the plant surface, the decision whether to lay eggs is determined by the presence of contact cues that would represent a “chemical signature” allowing the insect to recognize the willow genotype.

The contributions of this work are relevant for willow genetic improvement programs and promote the development of alternative strategies aimed to protect this crop.

Key words: insect-plant interaction, oviposition cues, plant volatiles, leaf cuticular waxes, *Nematus oligospilus*, *Salix* spp., willow sawfly

## Agradecimientos

A mi directora de tesis, Patricia Fernández, quien desde el comienzo confió plenamente en mí para desarrollar este trabajo. Gracias Pato por acompañarme y guiarme en todas las etapas de la tesis, por tu enorme generosidad, por la dosis de optimismo que nos inyectás a los que trabajamos al lado tuyo, por tu constante motivación, y por tener siempre un plan B... ,y C..., y D...

A Andrea Vega, por su inmensa paciencia y dedicación, y por haberme introducido en el fabuloso mundo de la microscopía electrónica de barrido!

A las chicas de Biomoléculas, Dai, Cami, y Lucía. A Dai, por haberme hecho un lugarcito en la cámara durante la última etapa de la tesis. A Cami y Lucía, las expertas en HPLC, por su ayuda gigaaannnte en todo lo relacionado a ese tema. A todas, por los mates compartidos, las risas y los momentos de catarsis!

A Hugo Chludil, por estar siempre dispuesto a transmitir desinteresadamente sus conocimientos y disipar las dudas “químicas”.

A Norma Gorosito, por brindarme sus nidos de hormigas y enseñarme a trabajar con ellas sin morir en el intento!

A María Victoria Coll Aráoz, quien desde Tucumán hizo grandísimos aportes a este trabajo. Gracias Vic por tu entusiasmo contagioso y tu buena onda de siempre.

A Romina Barrozo, por tomarse el tiempo para enseñarme y ayudarme con la parte sensorial de este trabajo, y por sus valiosísimos aportes al respecto.

A Diego Segura y todo su grupo, por estar siempre dispuestos a darme una mano con lo que fuera necesario, y por recordarme que las puertas de su laboratorio siempre están abiertas. En especial, agradezco a Guille, quien más de una vez me sacó del apuro con sus préstamos.

A Teresa Cerrillo y Silvia Cortizo, por brindarme las primeras estacas de sauce, indispensables para poder comenzar este trabajo. Gracias Tere por tu buena predisposición de siempre.

A Juan Manuel García Conde, por ayudarme a coleccionar los primeros ejemplares de avispa sierra en el Delta, y permitirme volver por más cuantas veces fuera necesario.

A mi consejera de estudios, Gabriela Hermitte, por permitirme tomar cursos que realmente eran de mi interés.

Al Insituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, por darme la posibilidad de crecer profesionalmente.

A mi familia y amigos (“los de siempre”), que posiblemente nunca lean estas líneas pero siempre están presentes en mi vida. Gracias por acompañarme desde otro lugar, por compartir alegrías y tristezas y por motivarme a ser mejor persona. En especial, agradezco a mi hermana, Dani, por sus constantes palabras de aliento y por el aguante incondicional.

Y por último, quiero agradecer profundamente a Lucas, quien desde el inicio fue mi compañero inseparable en esta travesía. Por tus ganas infinitas de ayudarme, por tu motivación constante a lo largo de todos estos años y por tu paciencia en esta última etapa de escritura, te digo ¡¡GRACIAS!!

## Índice

Resumen .....	i
Abstract .....	ii
Agradecimientos .....	iii
<b>Capítulo 1. Introducción general .....</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción general .....	2
1.2 Objetivo general .....	9
1.3 Referencias .....	10
<b>Capítulo 2. Preferencia de oviposición de <i>Nematus oligospilus</i> sobre diferentes genotipos de sauce .....</b>	<b>15</b>
2.1 Introducción .....	16
2.2 Objetivos .....	18
2.3 Hipótesis .....	18
2.4 Materiales y Métodos .....	19
2.4.1 Material biológico .....	19
2.4.2 Preferencia de oviposición de <i>Nematus oligospilus</i> .....	21
2.4.3 <i>Performance</i> larval, fecundidad y preferencia de oviposición de individuos criados sobre diferentes genotipos de sauce .....	23
2.4.4 Características foliares de los distintos genotipos de sauce .....	23
2.4.5 Efecto de la planta hospedera sobre la supervivencia de larvas neonatas durante la fase de establecimiento en la hoja .....	25
2.4.6 Efecto de la dieta larval sobre la protección contra enemigos naturales generalistas .....	25
2.4.7 Efecto de la presencia de glicósidos fenólicos (i.e. salicina) sobre el comportamiento de alimentación enemigos naturales generalistas.....	27
2.4.8 Análisis de datos .....	28
2.5 Resultados .....	29
2.5.2 Preferencia de oviposición de <i>Nematus oligospilus</i> .....	29
2.5.3 <i>Performance</i> larval, fecundidad y preferencia de oviposición de individuos criados sobre diferentes genotipos de sauce .....	30
2.5.4 Características foliares de los distintos genotipos de sauce .....	33
2.5.5 Efecto de la planta hospedera sobre la supervivencia de larvas neonatas durante la fase de establecimiento en la hoja .....	34

2.5.6 Efecto de la dieta larval sobre la protección contra enemigos naturales generalistas .....	35
2.5.7 Efecto de la presencia de glicósidos fenólicos (i.e. salicina) sobre el comportamiento de alimentación de enemigos naturales generalistas.....	37
2.6 Discusión .....	38
2.7 Referencias .....	41

**Capítulo 3. El reconocimiento de la planta hospedera por *Nematus oligospilus* mediante claves volátiles y de contacto .....**

3.1 Introducción .....	45
3.2 Objetivos .....	47
3.3 Hipótesis .....	48
3.4 Materiales y Métodos .....	48
3.4.1 Material biológico .....	48
3.4.2 Elección en olfatometría .....	49
3.4.3 Recolección de volátiles de plantas de sauce y análisis químico .....	52
3.4.4 Rol de las claves de contacto en la preferencia de oviposición .....	54
3.4.5 Caracterización de la epicutícula foliar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	55
3.4.6 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en diclorometano) y análisis químico .....	56
3.4.7 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en metanol) y análisis químico .....	57
3.4.8 Análisis de datos .....	57
3.5 Resultados .....	58
3.5.2 Elección en olfatometría .....	58
3.5.3 Recolección de volátiles de plantas de sauce y análisis químico .....	59
3.5.4 Rol de las claves de contacto en la preferencia de oviposición .....	61
3.5.5 Caracterización de la epicutícula foliar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	62
3.5.6 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en diclorometano) y análisis químico .....	64
3.5.7 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en metanol) y análisis químico .....	65
3.6 Discusión .....	66
3.7 Referencias .....	70



<b>Capítulo 4. Comportamiento de <i>Nematus oligospilus</i> sobre distintas plantas hospederas. Receptores sensoriales de las hembras involucrados en el proceso de oviposición</b> .....	75
4.1 Introducción .....	76
4.2 Objetivos .....	78
4.3 Hipótesis .....	78
4.4 Materiales y Métodos .....	78
4.4.1 Material biológico .....	78
4.4.2 Caracterización del comportamiento de oviposición .....	79
4.4.3 Morfología de las antenas y ovipositor. Identificación de posibles receptores sensoriales .....	80
4.4.4 Análisis de datos .....	81
4.5 Resultados .....	81
4.5.2 Caracterización del comportamiento de oviposición .....	81
4.5.3 Morfología de las antenas y ovipositor. Identificación de posibles receptores sensoriales .....	84
4.6 Discusión .....	89
4.7 Referencias .....	91
<b>Capítulo 5. Conclusiones finales</b> .....	93
Conclusiones finales.....	94
Referencias.....	96
<b>Anexo I</b> .....	97
<b>Anexo II</b> .....	99

# **Capítulo 1**

## **Introducción general**

## 1.1 Introducción general

### La interacción planta-insecto

Las plantas y los insectos constituyen aproximadamente la mitad de todas las especies de organismos multicelulares conocidos y han evolucionado en conjunto por más de cien millones de años. Esta coevolución ha provocado relaciones mutualistas y antagonistas con distintos niveles de interacción (Schoonhoven et al. 2005). Dichas interacciones se dan a través de numerosas claves provenientes de distintas modalidades sensoriales (i.e. visuales, olfativas, gustativas, táctiles). En particular, las plantas y los insectos proveen una variedad de claves químicas que son explotadas por otros individuos para diferentes propósitos. Aquellos compuestos químicos que median la interacción entre organismos vivos, desencadenando en el receptor una respuesta fisiológica y/o comportamental, se conocen como semioquímicos (o infoquímicos) (Dicke y Sabelis 1988). Los semioquímicos pueden intervenir en la comunicación de individuos de una misma especie (feromonas), o bien de especies diferentes (aleloquímicos). A su vez, los aleloquímicos se clasifican en 3 categorías según le confieran un beneficio al emisor (alomonas), al receptor (kairomonas) o a ambos (sinomonas) (Karlson y Lüscher 1959, Brown et al. 1970). En el caso de las plantas, prácticamente cualquiera de sus órganos (i.e. hojas, tallos, raíces, flores, frutos) puede potencialmente convertirse en una fuente de claves químicas volátiles o no volátiles, mediando interacciones tan variadas como la localización del hábitat y del hospedero, la agregación, la búsqueda de pareja o la localización de presas (Pichersky et al. 2006, Reinecke y Hilker 2014).

La mayoría de las especies de insectos herbívoros tienen hábitos alimentarios especialistas y escogen meticulosamente la planta hospedera donde depositarán sus huevos. Dicha elección puede ocurrir no sólo a nivel de taxón vegetal, sino también sobre partes específicas de la planta o incluso tejidos (e.g. epidermis foliar, mesófilo foliar, xilema, floema) (Bernays y Chapman 1994, Schoonhoven et al. 2005). Tras la eclosión de los huevos, los estadios inmaduros comúnmente poseen movilidad limitada y escasas reservas energéticas, por lo que la elección materna de la planta adecuada es esencial para garantizar el desarrollo de la descendencia (Renwick 1989).

En ambientes naturales, las plantas hospederas normalmente crecen junto a otras no hospederas formando arreglos complejos de vegetación. Para los insectos especialistas, la habilidad de localizarlas y reconocerlas en ese contexto es crucial. La elección de la planta hospedera es un proceso catenario durante el cual los herbívoros responden a una serie de estímulos procedentes de la propia planta. El amplio repertorio de características

que éstas exhiben incluye tanto propiedades físicas como químicas. Los caracteres morfológicos de la planta pueden influir en su nivel de aceptación de forma directa, a través de claves visuales (e.g. tamaño, arquitectura, color), o bien indirectamente, al afectar la capacidad de adhesión del insecto al tejido. Las propiedades químicas no sólo brindan información sobre la concentración de nutrientes (i.e. reflejando el valor nutricional de la planta), sino que aportan claves fundamentales sobre la identidad e idoneidad de la planta de acuerdo a la presencia o ausencia de una gran variedad de metabolitos secundarios (Bernays y Chapman 1994).

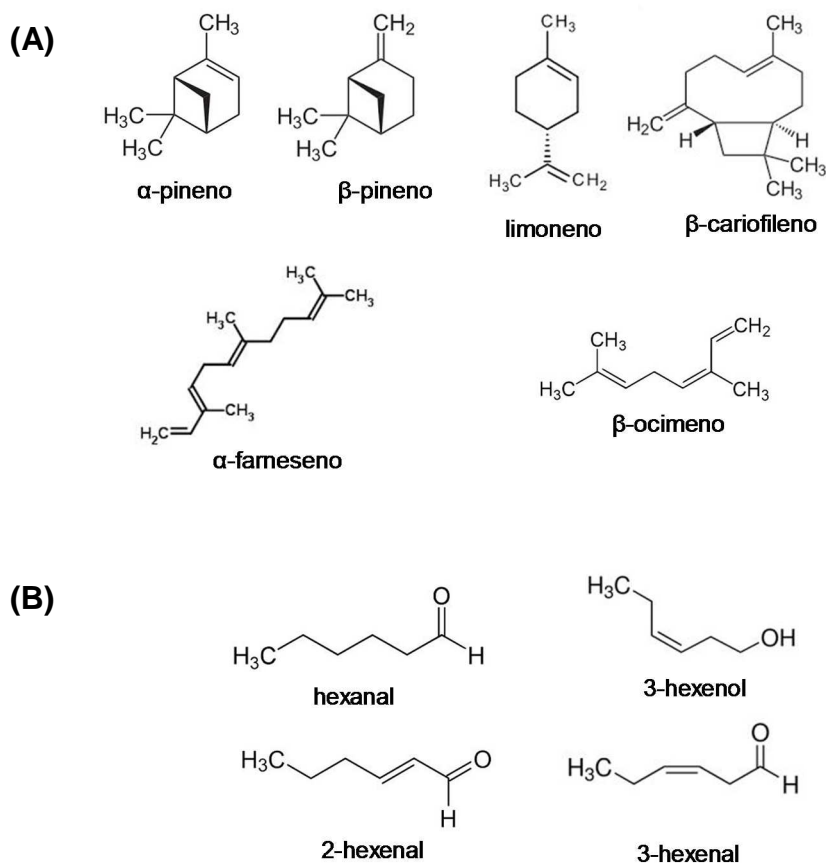
En el proceso de selección de la planta hospedera se distinguen 2 etapas principales, sucesivas, delimitadas por la decisión intermitente del insecto de mantenerse en contacto con la superficie de la misma: (1) la fase de búsqueda y (2) la evaluación de contacto. La primera culmina con el hallazgo de la planta, mientras que la segunda con su aceptación o rechazo. Durante la fase de búsqueda ocurre atracción a media o larga distancia a través de claves visuales, olfativas, o ambas. En cambio, la fase de evaluación sucede una vez que el insecto se posa sobre la superficie vegetal, y es comandada por claves de contacto (físicas y químicas) (Schoonhoven et al. 2005). Claves visuales como la forma y color de la planta suelen ser muy variables incluso dentro de una misma especie, por lo que generalmente median la atracción asociadas a algún otro estímulo (i.e. olfativo o gustativo) (Degen y Städler 1997). Los volátiles de la planta son fundamentales para la orientación por parte de los insectos, e incluyen mayormente una serie de compuestos orgánicos que abarcan a los terpenos y sus derivados, y a los llamados “volátiles de hojas verdes” (*green leaf volatiles*, GLVs por sus siglas en inglés), relativamente ubicuos en familias vegetales muy diferentes. Se trata de moléculas de 6 carbonos producto de la oxidación y clivaje de ácidos grasos poliinsaturados, que suelen liberarse al ambiente en cantidades apreciables. Por otro lado, también existen compuestos que resultan taxón-específicos (e.g. isotiocianatos de la familia Brassicaceae) (Bernays y Chapman 1994, Schoonhoven et al. 2005). La orientación hacia la planta hospedera puede darse por el reconocimiento de dichos compuestos característicos, o bien a través de la identificación de proporciones específicas en mezclas de compuestos constitutivos (Visser 1986). La evidencia experimental favorece este último escenario (Bruce et al. 2005), quedando demostrado que el valor de las claves está determinado por la composición de la mezcla como un todo, en lugar de la suma de claves de los componentes individuales (Webster et al. 2010). Una vez que el insecto se posa en la planta, despliega una serie de comportamientos que le permiten evaluar características físicas y químicas difíciles de percibir a distancia. Habitualmente, el comportamiento exploratorio incluye movimientos repetitivos de contacto con el sustrato a través de las antenas, patas, piezas bucales o

partes del ovipositor. La superficie vegetal constituye la interfase de contacto inicial del insecto con la planta, por lo que propiedades físicas tales como la presencia de tricomas, cristales de cera, el espesor y dureza de la hoja o su esclerotización pueden constituir barreras disuasivas. Por otro lado, la composición química de la cutícula es crucial en la evaluación de la planta como potencial hospedero, especialmente en aquellos casos donde las hembras no tienen acceso al contenido interno de las hojas. El balance entre los efectos estimulantes o disuasivos que generen las distintas claves provistas por la planta determinará el resultado final en el proceso de selección del hospedero, dando lugar a distintos grados de aceptación del mismo como sitio de oviposición o bien a su rechazo (Bernays y Chapman 1994, Schoonhoven et al. 2005).

### **Las plantas del género *Salix***

La familia Salicaceae comprende a los géneros *Salix* L. y *Populus* L., cuyas plantas se conocen vulgarmente como sauces y álamos. En particular, el género *Salix* incluye alrededor de 450 especies de árboles y arbustos distribuidas principalmente en el hemisferio Norte, con ejemplares que oscilan desde unos pocos centímetros hasta los 40 metros de altura (Argus 1997, Fang et al. 1999, Argus et al. 2010).

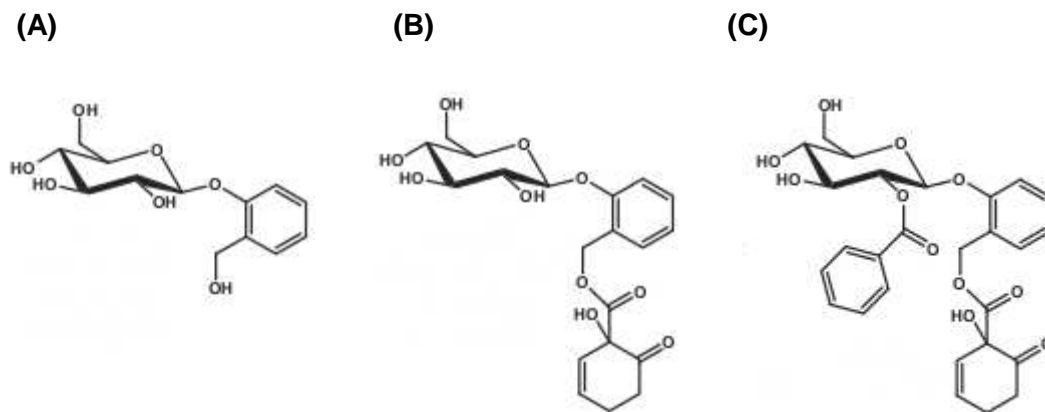
Las plantas de sauce emiten una variedad de compuestos volátiles, los cuales tienen un efecto sobre las comunidades de insectos asociadas (Peacock et al. 2001a, Inui et al. 2003, Yoneya et al. 2009, Lehrman et al. 2013, Yoneya y Takabayashi 2013). Si bien carecen de compuestos característicos particulares, algunos trabajos han demostrado que los perfiles de las distintas especies resultan significativamente diferentes como resultado de la composición de relativa de sus componentes, mayoritariamente terpenos y GLVs (Figura 1.1) (Peacock et al. 2001b, Fernandez et al. 2007). Un ejemplo es el caso de *Salix viminalis* L., cuyas distintas variedades emiten proporciones específicas de ciertos GLVs que resultan determinantes para la aceptación de la planta hospedera por parte de especies de crisomélidos (Coleoptera), lo que a su vez se refleja en un daño diferencial por herbivoría (Peacock et al. 2001b).



**Figura 1.1** Compuestos orgánicos volátiles comúnmente liberados por plantas del género *Salix*  
**(A)** Terpenos, **(B)** GLVs.

En este género, los glicósidos fenólicos (*phenolic glycosides*, PGs por sus siglas en inglés) representan el grupo dominante y más estudiado de metabolitos secundarios. Si bien pueden resultar muy abundantes en comparación con otros metabolitos secundarios, su distribución muestra una amplia variabilidad entre especies, e incluso algunas de ellas carecen de PGs por completo (Julkunen-Tiitto 1986, 1989). En sentido amplio, el término PGs hace referencia a cualquier molécula que contenga una unidad de azúcar unida a una aglicona presente en forma de fenol. Sin embargo, históricamente se los asocia a glicósidos de alcohol salicílico y sus derivados (salicinoides *sensu* Boeckler et al. 2011). La salicina representa el PG más simple que conforma la unidad elemental de alrededor de 20 PGs más complejos (Figura 1.2), y junto con la salicortina constituyen los compuestos con mayor presencia en las distintas especies de sauce (Boeckler et al. 2011). Numerosos trabajos han demostrado el efecto de los PGs sobre insectos herbívoros tanto generalistas como especialistas. La mayoría de ellos revelan que estos compuestos disuaden el comportamiento de alimentación y reducen el *fitness* de insectos generalistas (Tahvanainen et al. 1985, Lindroth y Peterson 1988, Lindroth et al. 1988). Sin embargo, pueden estimular

la alimentación (Kolehmainen et al. 1995) y la oviposición (Orians et al. 1997, Roininen et al. 1999) y beneficiar la *performance* de insectos especialistas (Matsuki y Maclean 1994). Al igual que otros metabolitos secundarios, los PGs pueden ser usados por herbívoros especialistas como compuestos de defensa. Ejemplo de ello son las larvas del crisomélido *Phratora vitellinae* L., que convierten la salicina proveniente de las hojas en salicilaldehído, el cual es almacenado en reservorios glandulares y excretado ante el ataque de enemigos naturales (Pasteels et al. 1983, Rowell-Rahier y Pasteels 1990).



**Figura 1.2** Estructura de los glicósidos fenólicos con mayor presencia en el género *Salix*.  
**(A)** Salicina, **(B)** Salicortina, **(C)** Tremulacina.

A nivel mundial, la importancia del género *Salix* radica en la variabilidad de sus aplicaciones, que incluyen no sólo la producción para usos sólidos (Ball et al. 2005), sino también la fitorremediación (Larsson 2001, Lindegaard et al. 2001), la restauración del paisaje en ecosistemas frágiles (Kuzovkina y Quigley 2005) y la generación de biomasa con fines energéticos (Volk et al. 2004, Smart et al. 2005). En Argentina, el principal destino de este cultivo es la industria del triturado, siendo la región del Delta del Río Paraná el mayor núcleo de producción de sauce del país.

### El cultivo de sauces en la región del Delta del Río Paraná

El Delta del Río Paraná constituye un extenso mosaico de humedales que se extiende a lo largo de 300 km, cubriendo una superficie aproximada de 17500 km<sup>2</sup> con características biogeográficas y ecológicas únicas en la Argentina (Bonfils 1962, Málvarez 1997, Bó 2006). En esta región, el sistema de producción predominante es la forestación con salicáceas, con alrededor de 80000 hectáreas implantadas de las cuales más del 80% corresponden a

saucos (Borodowski 2005, MPF 2010). El principal destino de la madera de *Salix* (~90% de la producción) es la industria del triturado (i.e. pasta de papel y tableros de partículas), seguida en menor medida por el aserrado y debobinado para usos sólidos (i.e. mueblería, cajonería, pallets, palillos, fósforos, lápices). A menor escala, ocurre el cultivo de sauce-mimbre en unidades familiares de pequeños productores, dando origen a la materia prima para la fabricación de cestería y mueblería liviana de larga tradición en la zona (Cerrillo 2009).

En la actualidad, las principales especies arbóreas de sauce cultivadas en la región corresponden a diferentes variedades de los genotipos *Salix babylonica* L., *S. babylonica* × *Salix alba* L., *Salix matsudana* Koidtz. × *S. alba* y *Salix nigra* Marsh., cuyo origen es asiático (*S. babylonica* y *S. matsudana*), europeo (*S. alba*) o norteamericano (*S. nigra*). El “saucos criollo” (*Salix humboldtiana* Willd.), única especie nativa del hemisferio Sur, se emplea activamente en cruzamientos controlados para el desarrollo de material mejorado (Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Salicáceas, Área de Mejoramiento Genético de Saucos, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA). En cuanto a las especies arbustivas (saucos-mimbre), sólo se cultivan unas pocas variedades de *S. viminalis*, especie originaria de Europa Central y Oriental (Cerrillo 2006, 2009).

### **La avispa sierra del saucos, *Nematus oligospilus***

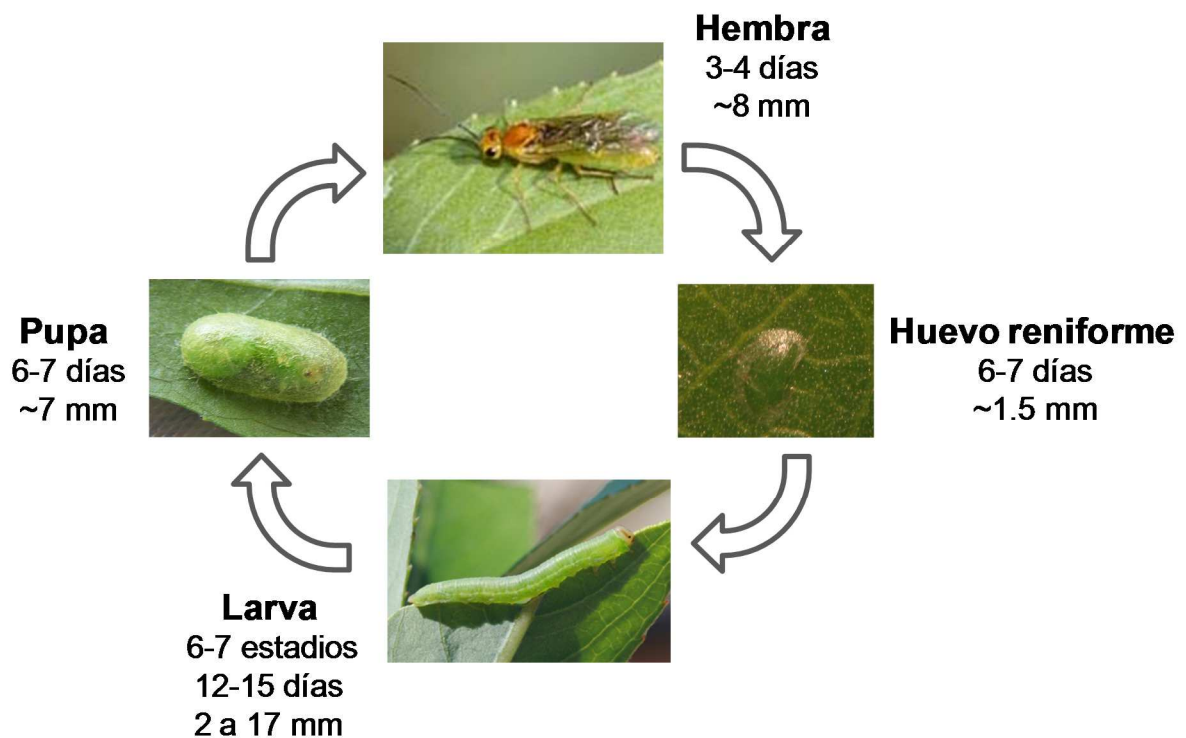
El término “avispa sierra” (*sawfly* en inglés) se refiere a un grupo de himenópteros primitivos del suborden Symphyta, característicos por su apariencia similar a dípteros (debido a la falta de constricción en la base del abdomen) y por la presencia de valvas denticuladas (i.e. aserradas) en el ovipositor de las hembras. A excepción de una única familia, todas las larvas de este suborden son herbívoras, y muchas de ellas adquieren importancia económica al resultar extremadamente perjudiciales para cultivos agrícolas, plantas ornamentales y forestaciones (Smith 1993).

En Argentina, una de las principales plagas que afecta a los saucos es la avispa sierra *Nematus oligospilus* Förster (= *Nematus desantisi* Smith) (Hymenoptera: Tenthredinidae: Nematinae), especie de origen Holártico (i.e. norte de América y Eurasia) ampliamente distribuida en dicha región. Su primera detección en el hemisferio Sur data de 1980, cuando fue reportada en la provincia de Chubut, Argentina, bajo el nombre de *N. desantisi* (De Santis 1981, Smith 1983, Dapoto y Giganti 1994). Posteriormente, se obtuvieron registros locales en Río Negro y Neuquén (Dapoto et al. 1983), Cuyo y Buenos Aires (De Santis y Sureda 1984), Delta del Río Paraná (Toscani 1992), Catamarca (Vattuone 1989), Jujuy (Quintana et al. 1991) y Tucumán (Ovruski 1991), con introducciones



sucesivas en Chile (Gonzalez et al. 1986), Sudáfrica (Urban y Eardley 1995), Nueva Zelanda (Berry 1997, Charles et al. 1998), Australia (Bruzzese y McFadyen 2006, Ede et al. 2007) y recientemente Colombia (Malagón-Aldana et al. 2017).

Se trata de un organismo solitario, de vida libre, cuyas larvas se alimentan exclusivamente de hojas de sauce. La reproducción es sexual en su rango nativo, aunque partenogenética fuera de él, por lo que en el hemisferio Sur no existen registros de machos y las poblaciones están conformadas únicamente por hembras (telitoquia apomíctica) (Urban y Eardley 1995, Koch y Smith 2000, Caron et al. 2013). El ciclo de vida tiene una duración aproximada de 27 días, que incluye los estados de huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras colocan sus huevos en hojas de sauce. Tras su eclosión, las larvas se alimentan del follaje a medida que atraviesan los sucesivos estadios larvales, produciendo la defoliación de la planta. Una vez alcanzado el último estadio, tejen un capullo donde mudan a pupas (Figura 1.3). A lo largo del año, esta especie muestra actividad durante los meses de primavera y verano en correspondencia con la época de crecimiento de los sauces, registrándose entre 6 y 7 generaciones superpuestas (i.e. especie multivoltina). Llegado el otoño, las larvas de la última generación descienden al suelo, se entierran y forman el capullo donde transcurrirán el invierno como prepupas invernantes hasta la siguiente primavera, momento en el que mudan a pupas y emergen las hembras adultas (Cabarcos 1995a, Alderete et al. 2010).



**Figura 1.3** Ciclo de vida de la avispa sierra del sauce, *Nematus oligospilus*, indicando la duración y tamaño aproximado de cada estado.

En su rango nativo, esta especie se mantiene a bajas densidades poblacionales. Sin embargo, su gran potencial reproductivo (dado por la partenogénesis en el rango invasor) permite que las poblaciones alcancen rápidamente altas densidades (Caron 2014). Reportes de nuestro país indican que las larvas de *N. oligospilus* alcanzan a consumir la totalidad del follaje de la planta, e incluso ocasionan la muerte de ejemplares jóvenes en ataques intensos y sucesivos durante una misma temporada de crecimiento de los árboles (Cabarcos 1995b, Giménez 2006). En Argentina, los principales registros de *N. oligospilus* corresponden al Valle de Tafí (Tucumán) y a la región del Delta del Río Paraná. En el Valle de Tafí, esta especie fue responsable de defoliaciones marcadas durante los años 1990 y 1994 sobre bosquecillos de salicáceas de importancia paisajística local (Alderete et al. 2004). En cambio, en el Delta del Río Paraná, las defoliaciones se producen año tras año afectando las plantaciones comerciales de sauce. En particular, aquellas de 1987, 1992, 1994 y 2008 resultaron especialmente intensas, perjudicando así a la principal actividad productiva de la región.

En la actualidad, el manejo de esta plaga en la región del Delta del Río Paraná se basa en la aplicación de cipermetrina (insecticida piretroide de amplio espectro) de acuerdo a los niveles poblacionales de adultos monitoreados durante la temporada de crecimiento de los sauces mediante trampas adhesivas. Dicho método de control sólo resulta exitoso si se efectúa sobre la generación post-invernal (Cabarcos 1995a). Considerando que los semioquímicos son compuestos específicos que no generan resistencia y muestran baja toxicidad para organismos no blanco, el desarrollo de herramientas que puedan ser incorporadas en programas de manejo integrado resulta una alternativa más sustentable para la protección del cultivo de *Salix*.

## 1.2 Objetivo general

Estudiar el comportamiento de oviposición de la avispa sierra del sauce *N. oligospilus* desde el punto de vista de la ecología química con el fin de dilucidar los mecanismos de selección de la planta hospedera, contribuyendo a la búsqueda de semioquímicos que permitan un manejo más sustentable de esta plaga en nuestro país.

### Objetivos particulares

1. Evaluar en ensayos de laboratorio la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* sobre genotipos de *Salix* spp. de importancia comercial y/o experimental para la región del Delta del Río Paraná (Capítulo 2).

2. Evaluar el rol de las claves olfativas y gustativas durante la orientación y el reconocimiento de la planta hospedera en *N. oligospilus* (Capítulo 3).
3. Estudiar el comportamiento de oviposición en *N. oligospilus* analizando la posible participación de quimiorreceptores de contacto en la detección de la planta hospedera (Capítulo 4).

### 1.3 Referencias

- Alderete M, Fidalgo P, Liljestrom G. 2004. Situación actual de la población de *N. oligospilus* Foerster (= *N. desantisi* Smith) (Hym.: Tenthredinidae) en el valle de Tafí. Consideraciones futuras para otras regiones de la Argentina. *SAGPyA Forestal*, 32: 36-41.
- Alderete M, Liljestrom G, Fidalgo P. 2010. Bio-ecología y perspectivas para el manejo de la avispa sierra del sauce, *Nematus oligospilus*. En: Serie técnica "Manejo Integrado de plagas Forestales". Corley y Villacide (eds). Cuadernillo n°10. ISSN 1851-4103.
- Argus GW. 1997. Infrageneric classification of *Salix* (Salicaceae) in the New World. *Systematic Botany Monographs*, 52: 1-121.
- Argus GW, Eckenwalder JE, Kiger RW. 2010. Salicaceae. En: *Flora of North America* Editorial Committee (ed). *Flora of North America*. Oxford and New York: Oxford University Press.
- Ball J, Carle J, Del Lungo A. 2005. Contribution of poplars and willows to sustainable forestry and rural development. En: *Unasyva* - No. 221 - Poplars and willows. An international journal of forestry and forest industries - Vol. 56 2005/2. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Bernays EA, Chapman RF. 1994. *Host-plant selection by phytophagous insects*. Chapman and Hall, New York.
- Berry JA. 1997. *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae), a recently introduced sawfly defoliating willows in New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 20: 51-54.
- Bó R. 2006. Ecorregión Delta e Islas del Paraná. 587 pp. En: Brown A, Martínez Ortiz U, Acerbi M, Corcuera J (eds). *La situación ambiental Argentina*. Fundación Vida Silvestre, Buenos Aires.
- Boeckler GA, Gershenzon J, Unsicker, SB. 2011 Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry*, 72: 1497-1509.
- Bonfils C. 1962. *Los suelos del Delta del río Paraná "Factores generadores, clasificación y uso"*, Buenos Aires, Argentina.
- Borodowski ED, Suárez RO. 2005. *Caracterización forestal de la región del Delta del Paraná*. Documento NEF Delta - Proyecto Forestal de Desarrollo - SAGPyA. 8 pp.
- Brown WL, Eisner T, Whittaker RH. 1970. Allomones and kairomones: Transspecific chemical messengers. *Bioscience*, 20: 21.
- Bruce T, Wadhams L, Woodcock C. 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10(6): 269-74.

- Bruzzese E, McFadyen R. 2006. Arrival of the leaf-feeding willow sawfly *Nematus oligospilus* Förster in Australia - pest or beneficial. *Plant Protection Quarterly*, 21: 43-44
- Cabarcos PD. 1995a. Avances en el manejo integrado de la avispa sierra en el Delta del Paraná. Boletín de divulgación técnica n° 1 - Protección vegetal.
- Cabarcos PD. 1995b. Efectos sobre el crecimiento producidos por la defoliación de avispa sierra en una plantación comercial de sauces del Delta del Paraná. Informe de Beca de Iniciación, Exp. Agrop. INTA Delta del Paraná. 7 pp.
- Caron V, Norgate M, Ede F, Nyman T, Sunnucks P. 2013. Novel microsatellite DNA markers indicate strict parthenogenesis and few genotypes in the invasive willow sawfly *Nematus oligospilus*. *Bulletin of Entomological Research*, 103: 74-88.
- Caron V, Ede F, Sunnucks P, O'Dowd D. 2014. Distribution and rapid range expansion of the introduced willow sawfly *Nematus oligospilus* Förster (Hymenoptera: Tenthredinidae) in Australasia. *Austral Entomology*, 53:175-182.
- Cerrillo T. 2006. Mejoramiento genético de los sauces. Actas de las Jornadas de Salicáceas 2006. Argentina.
- Cerrillo T. 2009. Panorama de los sauces en Argentina: avances en el mejoramiento genético y en la identificación. Actas de las Jornadas de Salicáceas 2009. Argentina.
- Charles J, Allan D, Fung L. 1998. Susceptibility of willows to oviposition by the willow sawfly, *Nematus oligospilus*. *Proceedings of the 51st New Zealand Plant Protection Conference*, 230-234 pp.
- Dapoto G, Giganti H. 1994. Bioecología de *Nematus desantisi* Smith (Hymenoptera: Tenthredinidae: Nematinae) en las provincias de Río Negro y Neuquén (Argentina). *Bosque*, 15: 27-32.
- Dapoto G, Giganti H, Porley C. 1983. Severas defoliaciones en *Salix* .sp. causadas por *Nematus* sp. (Hym.: Tenthred.: Nematinae) en Río Negro y Neuquén. V Jornada Fitosanitaria Argentina. Rosario, 7-9 septiembre. Libro de resúmenes: 130.
- De Santis L. 1981. Estudio de una nueva plaga defoliadora del sauce criollo en la provincia de Chubut. *Novedades del Museo de La Plata* (1): 9.
- De Santis L, De Sureda AG. 1984. La falsa oruga de los sauces y álamos (*Nematus desantisi*). *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. Tomo XXXVIII (7): 1-22.
- Degen T, Städler E. 1997. Foliar form, colour and surface characteristics influence oviposition behaviour of the carrot fly. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83: 99-112.
- Dicke M, Sabelis M. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 2: 131-139.
- Ede FJ, Caron V, Clements D. 2007. Willow sawfly activity in Victoria: the 2006/07 season. Frankston, Victoria, Australia, Victorian Department of Primary Industries.
- Fang Z, Zhao S, Skvortsov AK. Salicaceae. 1999. En: Wu ZY, Raven PH, Hong DY (eds). *Flora of China*. Beijing & St. Louis: Science Press & Missouri Botanical Garden Press.
- Fernandez PC, Meiners T, Björkman C, Hilker M. 2007. Electrophysiological responses of the blue willow leaf beetle, *Phratora vulgatissima*, to volatiles of different *Salix viminalis* genotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 125 (2): 157-164.

- Giménez RA. 2006. Las plagas de las salicáceas: principales preocupaciones y técnicas de manejo disponibles. Actas jornadas de salicáceas, 125-129 pp.
- González RH, Barría G, Guerrero MA. 1986. *Nematus desantisi* Smith, a new species of forest importance in Chile (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Revista Chilena de Entomología*, 14: 13-15.
- Inui Y, Miyamoto Y, Ohgushi T. 2003. Comparison of volatile leaf compounds and herbivorous insect communities on three willow species. *Population Ecology*, 45: 41-46.
- Julkunen-Tiitto R. 1986. A chemotaxonomic survey of phenolics in leaves of salicacea species. *Phytochemistry*, 25(3): 663-667.
- Julkunen-Tiitto R. 1989. Constituents of *Salix*: a chemotaxonomic survey of further Finnish species. *Phytochemistry*, 28(8): 2115-2125.
- Karlson P, Lüscher M. 1959. 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183: 55-56.
- Koch F, Smith D. 2000. *Nematus oligospilus* Förster (Hymenoptera: Tenthredinidae), an introduced willow sawfly in the Southern Hemisphere. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 102: 292-300.
- Kolehmainen J, Julkunen-Tiitto R, Roininen H, Tahvanainen J. 1995. Phenolic glucosides as feeding cues for willow-feeding leaf beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 74(3): 235-243.
- Kuzovkina Y, Quigley M. 2005. Willows beyond wetlands: uses of *Salix* L. species for environmental projects. *Water, Air, and Soil Pollution*, 162: 183-204.
- Larsson S. 2001. Commercial varieties from the Swedish willow breeding programme. *Aspects of Applied Biology*, 15: 193-198.
- Lehrman A, Boddum T, Stenberg J, Orians C, Björkman C. 2013. Constitutive and herbivore-induced systemic volatiles differentially attract an omnivorous biocontrol agent to contrasting *Salix* clones. *AoB PLANTS* 5: plt005.
- Lindegaard KN, Parfitt RI, Donaldson G, Hunter T, Dawson WM, Forbes EGA, Carter MM, Whinney CC, Whinney JE, Larsson S. 2001. Comparative trials of elite Swedish and UK biomass willow varieties. *Aspects of Applied Biology*, 183-192.
- Lindroth R, Peterson S. 1988. Effects of plant phenols of performance of southern armyworm larvae. *Oecologia*, 75(2): 185-189.
- Lindroth R, Scriber J, Hsia M. 1988. Chemical ecology of the tiger swallowtail: mediation of host use by phenolic glycosides. *Ecology*, 69(3): 814-822.
- Malagón-Aldana LA, Serna F, Smith DR. 2017. On the natural history of the willow sawfly *Nematus oligospilus* (Hymenoptera, Tenthredinidae) inhabiting *Salix humboldtiana*, in Colombia. *Journal of Hymenoptera Research*, 55: 189-199.
- Malvárez I. 1997. Las comunidades vegetales del Delta del Río Paraná. Su relación con factores ambientales y patrones del paisaje. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Matsuki M, Maclean S. 1994. Effects of different leaf traits on growth rates of insect herbivores on willows. *Oecologia*, 100: 141-152.

- MPF. 2010. Mapa de Plantaciones Forestales del Delta. Área de Sistemas de Información Geográfica (SIG) e Inventario Forestal de la Dirección de Producción Forestal. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.
- Orians C, Huang C, Wild A, Dorfman K, Zee P, Dao M, Fritz R. 1997. Willow hybridization differentially affects preference and performance of herbivorous beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83(3): 285-294.
- Ovruski SM. 1991. Distribución geográfica de *Nematus desantisi* Smith (Hym.: Tenthredinidae), plaga de salicáceas. *Ciencia e Cultura (Brasil)*, 43(7): 36-37.
- Pasteels J, Rowell-Rahier M, Braekman J, Dupont A. 1983. Salicin from host plant as precursor of salicylaldehyde in defensive secretion of Chrysomelinae larvae. *Physiological Entomology*, 8: 313-314.
- Peacock L, Lewis M, Herrick S. 2001a. Factors influencing the aggregative response of the blue willow beetle, *Phratora vulgatissima*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98: 195-201.
- Peacock L, Lewis M, Powers S. 2001b. Volatile compounds from *Salix* spp. varieties differing in susceptibility to three willow beetle species. *Journal of Chemical Ecology*, 27 (10): 1943-1951.
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311: 808-811.
- Quintana de Q. SL, Amador CA, Vilte HA. 1991. Presencia de *Nematus desantisi* Smith (Hym.: Tenthredinidae) en sauces de la Quebrada de Humahuaca - Provincia de Jujuy. II Congreso Argentino de Entomología 3-6 diciembre. La Cumbre, Córdoba. Libro de resúmenes: 244.
- Reinecke A, Hilker M. 2014. Plant semiochemicals - Perception and behavioural responses by insects. En: *Annual Plant Reviews: Insect-plant interactions*, 47: 115-154.
- Renwick J. 1989. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia*, 45: 223-228.
- Roininen H, Price P, Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J. 1999. Oviposition stimulant for a gall-inducing sawfly, *Euura lasiolepis*, on willow is a phenolic glucoside. *Journal of Chemical Ecology*, 25(4): 943-953.
- Rowell-Rahier M, Pasteels JM. 1990. Phenolglucosides and interactions at three trophic levels: Salicaceae-herbivores-predators. En: Bernays EA (ed.), *Insect-Plant Interactions*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, 74-95 pp.
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Smart L, Volk T, Lin J, Kopp R, Phillips I, Cameron K, White E, Abrahamson L. 2005. Genetic improvement of shrub willow (*Salix* spp.) crops for bioenergy and environmental applications in the United States. *Unasylva* 221 vol. 56.
- Smith DR. 1983. The first record of *Nematus* Panzer from South America: A new species from Argentina (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 85: 260-262.
- Smith DR. 1993. Systematics, life history and distribution of sawflies. En: *Sawfly life history adaptations to woody plants*. Wagner M, Raffa KF (eds), 3-32 pp.

- Tahvanainen J, Julkunen-Tiito R, Kettunen J. 1985. Phenolic glycosides govern the food selection of willow feeding leaf beetles. *Oecologia*, 67: 52-56.
- Toscani H. 1992. La "avispa sierra" (*Nematus desantisi*), nueva plaga defoliadora de los sauces en el Delta del Paraná. Comunicación Técnica Prof. de Protección Vegetal. EEA Delta del Paraná, INTA, Campana (Bs. As.). 14 pp.
- Urban AJ, Eardley CD. 1995. A recently introduced sawfly, *Nematus oligospilus*, Förster (Hymenoptera: Tenthredinidae) that defoliates willows in South Africa. *African Entomology*, 3(1): 23-27.
- Vattuone EM. 1989. La falsa oruga de los sauces y álamos (*Nematus desantisi* Smith) en la provincia de Catamarca. *CIRPON, Rev. Invest. VII (1-4)*: 85.
- Visser JH. 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31: 121-144.
- Volk TA, Verwijst T, Tharakan PJ, Abrahamson LP, White EH. 2004. Growing fuel: a sustainability assessment of willow biomass crops. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2: 411-418.
- Yoneya K, Kugimiya S, Takabayashi J. 2009. Do adult leaf beetles (*Plagiodera versicolora*) discriminate between odors from intact and leaf-beetle-infested willow shoots? *Journal of Plant Interactions*, 4(2): 125-129.
- Yoneya K, Takabayashi J. 2013. Interaction-information networks mediated by plant volatiles: a case study on willow trees. *Journal of Plant Interactions*, 8(3): 197-202.
- Webster B, Bruce T, Pickett J, Hardie J. 2010. Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Animal Behaviour*, 79(2): 451-457.

## Capítulo 2

### Preferencia de oviposición de *Nematus oligospilus* sobre diferentes genotipos de sauce

Parte de este capítulo dio origen a la siguiente publicación:

Braccini CL, Vega AS, Chludil HD, Leicach SR, Fernandez PC. 2013. Host selection, oviposition behaviour and leaf traits in a specialist willow sawfly on species of *Salix* (Salicaceae). *Ecological Entomology*, 38: 617-626.



## 2.1 Introducción

En insectos herbívoros, la elección del sitio de oviposición resulta crucial para garantizar el éxito de la progenie, especialmente cuando ésta posee movilidad limitada para optar por su propio sitio de alimentación y carece de cuidado parental (Renwick 1989). La elección materna de la planta hospedera y el desempeño de la descendencia en ella suelen considerarse en el contexto de la hipótesis de *preference-performance* (PPH, por sus siglas en inglés). La PPH, también conocida como la teoría de la oviposición óptima o el principio “*mother knows best*”, establece que las hembras elegirán ovipositar en plantas que maximicen el desempeño (*performance*) de su cría (Jaenike 1978, Thompson 1988, Mayhew 1997).

La preferencia de oviposición se define como la deposición no aleatoria de huevos en recursos vegetales ofrecidos simultánea o secuencialmente, mientras que la *performance* se concibe en términos de supervivencia, crecimiento o reproducción de la progenie (Singer 1986, Thompson 1988). Muchos estudios han revelado una marcada correlación positiva entre la preferencia de oviposición de la madre y la *performance* de su descendencia (Craig et al. 1989, Craig y Ohgushi 2002, Wennström et al. 2010), mientras que otros han mostrado poca o ninguna correspondencia (Denno et al. 1990, Ferrier y Price 2004). Esto evidencia que prácticamente todas las relaciones posibles entre preferencia y *performance* han sido registradas, salvo la situación extrema de hembras que siempre coloquen sus huevos en hospederos letales para la progenie (Thompson 1988). En aquellos casos donde los insectos prefieren colocar sus huevos en plantas nutricionalmente subóptimas, explicaciones alternativas han sido propuestas. Un ejemplo es el de la avispa del pino *Neodiprion sertifer* Geoffroy, cuyas hembras ovipositan en árboles de menor valor nutricional pero que en condiciones naturales le confieren a la descendencia mayor protección contra enemigos naturales (Björkman et al. 1997).

La elección materna del sitio de oviposición puede darse a diferentes escalas, que van desde la especie vegetal hasta determinadas partes de la planta (e.g. raíces, tallos, superficie de la hoja) e incluso tejidos específicos. Existen diversos factores que, en conjunto, determinan la preferencia de los insectos herbívoros por ciertos hospederos como sitios de oviposición. Uno de ellos es la composición química de la planta, que incluye tanto a los compuestos primarios como a metabolitos secundarios. Los compuestos primarios (proteínas, hidratos de carbono y lípidos) participan en los procesos fisiológicos fundamentales de la planta y son los que definen su calidad nutricional (Schoonhoven et al. 2005). Para los insectos, las proteínas constituyen el requerimiento nutricional más importante que limita su crecimiento óptimo. Dado que la planta elegida por la madre suele

convertirse en la fuente de alimento de la progenie, su contenido de nitrógeno es fundamental para garantizar el desarrollo de ésta (Mattson 1980, Crawley 1989, Bernays y Chapman 1994). Los metabolitos secundarios están formados por una enorme variedad de familias químicas que normalmente se asocian a taxones vegetales particulares (Schoonhoven et al. 2005). Un ejemplo son los glucosinolatos, presentes principalmente en la familia Brassicaceae. Numerosos trabajos han puesto en evidencia el rol de estos compuestos como estimulantes de la oviposición (o alimentación) en más de 25 especies de coleópteros, lepidópteros y dípteros especialistas, o bien su efecto disuasorio en insectos generalistas (Hopkins et al. 2009, y sus referencias). Además de la composición química, existen propiedades físicas de la planta que afectan la preferencia de oviposición. Ciertas características como la presencia de tricomas, la microtextura de la epicutícula, la anatomía de la hoja y su dureza pueden dificultar la adhesión, movilidad y contacto de los insectos con la planta e incluso impedir la colocación de huevos (Schoonhoven et al. 2005).

Como se comentó en el Capítulo 1, los glicósidos fenólicos constituyen los metabolitos secundarios más abundantes y representativos de la familia Salicaceae, a pesar de que algunas especies carecen por completo de ellos (Palo 1984). Muchos trabajos sostienen que estos compuestos disuaden la alimentación por parte de insectos generalistas y reducen su *performance* (Lindroth y Peterson 1988, Lindroth et al. 1988, Tahvanainen et al. 1995), mientras otros revelan que estimulan la alimentación (Kolehmainen et al. 1995) y oviposición (Matsuki y Maclean 1994, Rank et al. 1998) en especialistas y benefician su desempeño.

Estudios previos sobre *N. oligospilus* reportan diferentes niveles de susceptibilidad a esta avispa según el genotipo de sauce (Charles et al. 1998) y el vigor de la planta hospedera (Carr et al. 1998), junto con la preferencia de oviposición por la cara adaxial de la hoja (Carr et al. 1998, Urban y Eardley 1995). En nuestro país, observaciones a campo en plantaciones comerciales de *Salix* del Delta del Río Paraná sugieren diferencias muy marcadas en la susceptibilidad de los genotipos allí cultivados (Cerrillo 2011). Sin embargo, no existen estudios de laboratorio que confirmen dichas diferencias ni expliquen las posibles razones.

## 2.2 Objetivos

### Objetivo general

Evaluar en ensayos de laboratorio la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* sobre genotipos de *Salix* de importancia comercial y/o experimental para la región del Delta del Río Paraná en el contexto de la PPH.

### Objetivos específicos

1. Analizar la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* sobre un grupo de genotipos de *Salix* de importancia comercial y/o experimental en ensayos de laboratorio.
2. Comparar la *performance* de cohortes de *N. oligospilus* criadas sobre diferentes genotipos de sauce y la preferencia de oviposición de sus hembras.
3. Caracterizar la anatomía foliar de los genotipos de *Salix* empleados en busca de estructuras y/o propiedades físicas que pudieran tener efecto sobre la oviposición.
4. Determinar la composición química foliar para comparar el valor nutricional de los diferentes genotipos de *Salix* y la presencia de metabolitos secundarios característicos.
5. Comparar la supervivencia de larvas neonatas durante su fase de establecimiento en hojas de *Salix* de diferentes genotipos.
6. Evaluar en laboratorio los niveles de predación por parte de la “hormiga de fuego” (*Solenopsis* spp.) sobre larvas de *N. oligospilus* de diferente procedencia (i.e. desarrolladas sobre genotipos de *Salix* con alta y baja concentración de glicósidos fenólicos).
7. Evaluar el efecto de un glicósido fenólico (i.e. salicina) sobre el comportamiento de alimentación de *Solenopsis* spp.

## 2.3 Hipótesis

1. La avispa sierra *N. oligospilus* prefiere oviponer sobre ciertos genotipos de sauce.
2. La *performance* de la descendencia es mejor en aquellos genotipos preferidos por las madres para colocar sus huevos.
3. La preferencia de oviposición de las hembras adultas depende del genotipo de sauce del cual se alimentaron siendo larvas.
4. Existen estructuras físicas en la superficie foliar que dificultan la oviposición de *N. oligospilus*.

5. Las hojas de los distintos genotipos *Salix* difieren en su composición química, la cual explica la preferencia de oviposición.
6. La etapa de establecimiento de las larvas neonatas resulta crítica para su supervivencia, registrándose altos niveles de mortalidad en los genotipos con mayor dureza foliar.
7. Las plantas con mayor contenido de glicósidos fenólicos protegen de la predación por enemigos naturales generalistas a las larvas de *N. oligospilus* que se alimentan de ellas.
8. Los glicósidos fenólicos (en particular, la salicina) actúan como compuestos disuasores de la alimentación en enemigos naturales generalistas.

## 2.4 Materiales y Métodos

### 2.4.1 Material biológico

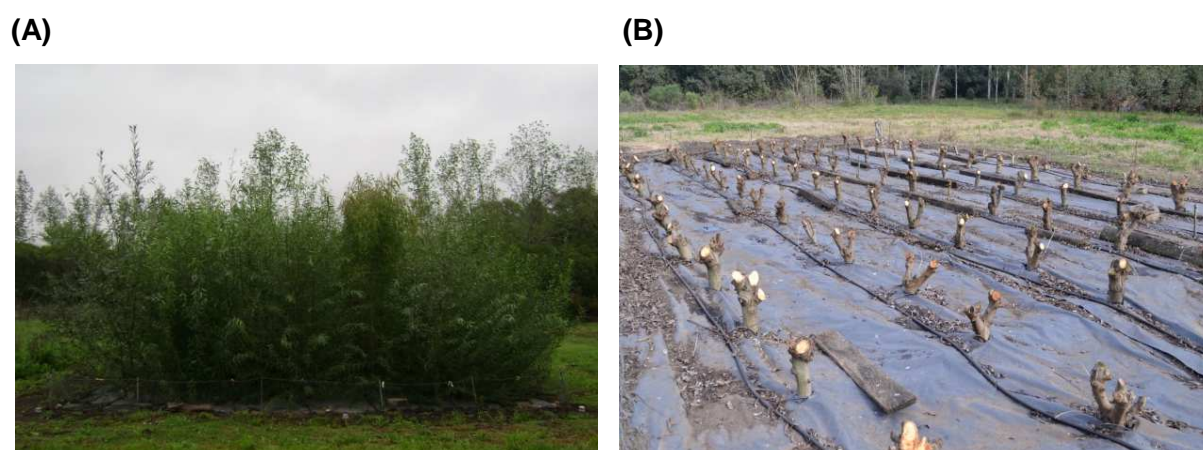
#### Plantas

Para llevar a cabo los experimentos, se seleccionaron 6 genotipos de sauce según su importancia económica y/o experimental para la región del bajo Delta del Río Paraná. El origen de los mismos corresponde a: *S. viminalis* (“Amarillo”), *S. babylonica* var. *Sacramenta* (“Soveny Americano”), *S. babylonica* × *S. alba* (“Ragonese 131-27 INTA”), *S. matsudana* × *S. alba* (“Barret 13-44 INTA”), *S. nigra* (“Alonzo nigra IV INTA”) y (*S. babylonica* × *S. humboldtiana*) × *S. matsudana* (híbrido experimental “Ed1” desarrollado por la Ing. Cerrillo, INTA). Además, un genotipo adicional de origen *S. alba* × *S. alba* (“genotipo de cría”) se empleó para mantener la cría de *N. oligospilus* en el laboratorio.

A fines del invierno de 2009 se plantó un estaquero<sup>1</sup> de sauce en el predio de INTA Castelar. Este contó con 7 filas (una por cada genotipo previamente mencionado) y 10 ejemplares por fila, plantados como estacas (30 cm de longitud) con un distanciamiento de 80 × 80 cm (distancia entre filas × distancia entre plantas de la misma fila). En el perímetro del estaquero se colocó alambrado para evitar el ataque de liebres y la superficie del suelo se cubrió con polietileno negro (previo a la plantación) para mantener la humedad y controlar las malezas. Además, se instaló un sistema de riego por goteo. A fines del invierno de 2011 se plantó un segundo estaquero, en el mismo predio y con características similares al primero aunque de mayores dimensiones (7 filas, 15 estacas por fila, distanciamiento de 100 × 80 cm). Ambos se sometieron a una poda completa anual luego de cada invierno (Figura 2.1 A, B). El producto de la poda se usó para originar ejemplares en maceta: se prepararon estacas (30 cm de longitud), se almacenaron en agua durante 2 días y luego se

<sup>1</sup> Estaquero: superficie destinada al cultivo de clones forestales para su multiplicación vegetativa. En este trabajo, el material vegetal procedente de los estaqueros se usó para sostener la cría de *N. oligospilus* en laboratorio, hacer experimentos comportamentales, efectuar análisis químicos y anatómicos foliares y generar plantas en maceta.

plantaron en macetas plásticas de 5 L con sustrato de tierra:perlita:turba (proporción 3:1:1). Las macetas se mantuvieron en vivero en condiciones ambientales, dentro de bateas con agua. Todas las plantas se protegieron del ataque de hormigas cortadoras mediante la aplicación de cebos granulados (Mirex Glex, Gleba ambiental, Argentina). La totalidad del material vegetal necesario para instalar ambos estaqueros fue aportado por el Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Salicáceas (Área de Mejoramiento Genético de Sauce, INTA).



**Figura 2.1** Estaquero de sauce plantado en julio de 2011 (7 filas, 15 estacas por fila, distanciamiento de 100 x 80 cm). Cada fila corresponde a un genotipo, de izquierda a derecha: *Salix alba* x *S. alba* (“genotipo de cría”), *Salix babylonica* var. Sacramento (“Soveny Americano”), *Salix matsudana* x *S. alba* (“Barret 13-44 INTA”), *S. babylonica* x *S. alba* (“Ragonese 131-27 INTA”), *Salix nigra* (“Alonzo nigra IV INTA”), (*S. babylonica* x *Salix humboldtiana*) x *S. matsudana* (“Ed1”) y *Salix viminalis* (“Amarillo”). **(A)** Estaquero brotado (diciembre de 2011), **(B)** Poda completa anual (julio de 2013).

## Insectos

Las hembras adultas de *N. oligospilus* usadas en los experimentos provinieron de la población establecida en el laboratorio. En todos los casos, se trató de hembras recién emergidas (i.e. de hasta 1 día de edad), evaluadas individualmente y por única vez.

Cada primavera se inició un nuevo ciclo de cría, sostenido hasta comienzos del otoño siguiente. Para ello, se colectaron larvas y pupas en plantaciones de sauce del bajo Delta del Río Paraná con antecedentes de infestación. Una vez en el laboratorio, las larvas se alimentaron con ramas frescas de sauce (“genotipo de cría”) colocadas en floreros con agua corriente, situados dentro de contenedores plásticos translúcidos (46 x 30 x 32 cm, largo x ancho x altura). Al alcanzar el estado de pupa, éstas se retiraron del contenedor y

se almacenaron en frascos hasta la emergencia de las hembras. Dichas hembras, junto a aquellas procedentes de pupas del campo, permitieron darle continuidad a la cría al oviponer sobre ramas frescas y así reiniciar el ciclo de vida. Durante cada ciclo de cría, la población de laboratorio fue renovada numerosas veces con material procedente del campo con el fin de minimizar la selección de insectos adaptados a las condiciones artificiales. Esta actividad se desarrolló en una cámara (“cámara de cría”) bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperíodo ( $25 \pm 2$  °C,  $60 \pm 10\%$  humedad relativa y 18-6 h de luz-oscuridad). Dichas condiciones se mantuvieron en todos los experimentos efectuados dentro de la misma.

Las “hormigas de fuego” (*Solenopsis* spp.) empleadas como predador generalista en el experimento de predación sobre larvas (2.4.6 Efecto de la dieta larval sobre la protección contra enemigos naturales generalistas) provinieron de un nido colectado en la Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná (Buenos Aires). Éstas fueron mantenidas bajo las condiciones controladas de la cámara de cría descriptas previamente, dentro de una bandeja (23 x 27 x 5 cm, largo x ancho x altura) con sus bordes recubiertos con maicena para evitar la fuga de individuos. Contaron con disponibilidad de agua y solución de sacarosa (30% p/p) *ad libitum* y fueron alimentadas suplementariamente con jamón una vez a la semana. Aquellas empleadas en siguiente experimento de predación (2.4.7 Efecto de la salicina sobre el comportamiento de alimentación de “hormigas de fuego”) provinieron de un nido colectado en la localidad de Castelar (Buenos Aires). Fueron mantenidas en las mismas condiciones que el caso anterior, pero su alimentación consistió únicamente en agua y jamón *ad libitum*.

#### 2.4.2 Preferencia de oviposición de *N. oligospilus*

Para analizar las preferencias de oviposición de *N. oligospilus* se llevaron a cabo experimentos con 3 diseños distintos:

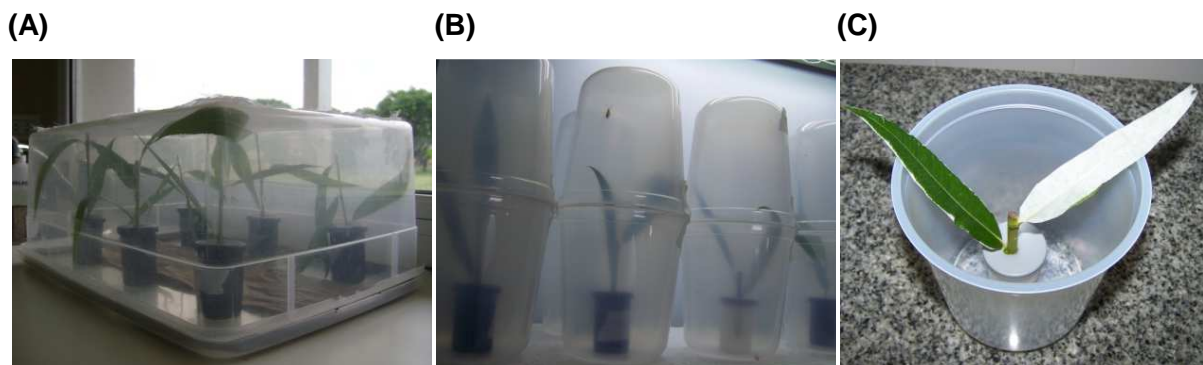
- (1) Diseño *multiple choice*: el objetivo fue evaluar la preferencia de oviposición entre los 6 genotipos de sauce antes mencionados, que fueron ofrecidos a cada hembra simultáneamente. La arena experimental consistió en un contenedor plástico translúcido (33 x 23 x 14 cm, largo x ancho x altura) donde se distribuyeron aleatoriamente 6 floreros (uno por cada genotipo). Cada florero contó con una rama de sauce fresca (10 cm de longitud, 3-4 hojas de la porción media de la rama) (Figura 2.2 A). Se registró el número de huevos colocados en cada genotipo. Se efectuaron 21 réplicas.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionaron 3 genotipos (*S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*) de los 6 originales para continuar con los experimentos.

(2) Diseño *dual choice*: el objetivo fue evaluar la preferencia de oviposición según la cara de la hoja disponible (i.e. superficie adaxial y abaxial), por lo que cada hembra tuvo acceso a ambas superficies de un único genotipo de sauce. La arena experimental fue un contenedor plástico translúcido, cilíndrico (10 × 24 cm, diámetro × altura) donde se colocó un florero con una rama de sauce fresca (2 hojas de la porción media de la rama) (Figura 2.2 B). Ambas caras se ubicaron de forma equivalente (i.e. girándolas cuidadosamente) con el fin de descartar efectos de posición. Se contabilizó el número de huevos colocados en cada superficie. Se efectuaron 12 réplicas por cada genotipo.

(3) Diseño *no choice*: su finalidad fue determinar el grado de aceptación de cada cara de la hoja cuando las hembras carecen de alternativas. Por ende, éstas tuvieron acceso a una única superficie del genotipo a evaluar. La arena experimental fue un contenedor plástico translúcido, cilíndrico (10 × 24 cm, diámetro × altura) donde se ubicó un florero con una rama de sauce fresca (2 hojas de la porción media de la rama), con una sola cara de la hoja disponible (i.e. la otra fue cubierta con cinta de papel) (Figura 2.2 C). Se registró el número de huevos colocados. Se efectuaron 12 réplicas para cada superficie de la hoja de los genotipos evaluados.

En los 3 diseños cada hembra se liberó en el centro de la arena y se le permitió oviponer hasta morir (en general, 3-4 días después de la eclosión).



**Figura 2.2** Arenas experimentales empleadas en ensayos de preferencia de oviposición con diseño (A) *Multiple choice*, (B) *Dual choice*, y (C) *No choice*, con la cara abaxial de la hoja cubierta con cinta de papel.

### 2.4.3 Performance larval, fecundidad y preferencia de oviposición de individuos criados sobre diferentes genotipos de sauce

Para evaluar si existe una relación entre el genotipo de planta hospedera (elegido por la madre al momento de oviponer) y la *performance* de su descendencia, larvas de *N. oligospilus* fueron criadas sobre diferentes genotipos de *Salix*. Cohortes de 83, 64 y 80 individuos se desarrollaron sobre *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra* respectivamente. Dado que la supervivencia de las larvas neonatas es muy baja luego de su manipulación, éstas fueron transferidas a dichos genotipos 2-3 días después de su nacimiento en el “genotipo de cría”. La cría se desarrolló en contenedores plásticos translúcidos (33 × 23 × 14 cm, largo × ancho × altura), que contenían floreros con material vegetal fresco renovado día por medio. Las variables analizadas fueron: supervivencia (medida como porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de pupa), tiempo de desarrollo (medido desde el nacimiento larval hasta empupar para el 50% de las larvas, y medido desde el nacimiento larval hasta la emergencia del 50% de las hembras), peso pupal y fecundidad de las hembras. La supervivencia de las larvas y la emergencia de las hembras adultas se registraron a diario. Al empupar, los individuos fueron asignados a alguno de los siguientes tratamientos:

- (1) peso pupal: las pupas fueron removidas del capullo y pesadas,
- (2) fecundidad: las hembras recién emergidas fueron expuestas hasta su muerte a ramas frescas del “genotipo de cría”, registrándose el número de huevos colocados,
- (3) preferencia de oviposición de la F1: fue evaluada mediante un diseño de tipo *dual choice*, donde los individuos tuvieron acceso a 2 genotipos de sauce simultáneamente. Las hembras procedentes de la cría en *S. viminalis* o *S. nigra* pudieron elegir entre dichos genotipos, mientras que aquellas criadas en *S. babylonica* lo hicieron entre *S. babylonica* y *S. nigra*. La arena experimental consistió en un contenedor plástico translúcido (33 × 23 × 14 cm, largo × ancho × altura) donde se ubicaron los 2 floreros, cada uno con una rama de sauce fresca (2 hojas de la porción media de la rama). Se registró el número de huevos colocados en cada genotipo. Se efectuaron 11, 8 y 12 réplicas para hembras criadas sobre *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*, respectivamente. Los experimentos se realizaron bajo las condiciones controladas de la cámara de cría. Cada hembra se liberó en el centro de la arena y pudo oviponer hasta morir.

### 2.4.4 Características foliares de los distintos genotipos de *Salix*

Con el fin de detectar propiedades físicas y químicas foliares que pudieran afectar el comportamiento de oviposición de *N. oligospilus*, se evaluaron diferentes propiedades de las hojas de los genotipos *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*. Para ello, se emplearon



hojas maduras, completamente expandidas e intactas, procedentes de la porción media de ramas de estaquero.

La anatomía foliar se caracterizó a partir de segmentos de la porción central de la lámina. El material fue embebido en parafina y seccionado con micrótopo rotatorio, deshidratado en una serie creciente de etanol y sometido a doble tinción de safranina-*fast green* (D'Ambrogio de Argüeso 1986). Las secciones transversales obtenidas fueron analizadas mediante microscopía óptica (Zeiss Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemania) y luego fotografiadas (cámara 35 mm Mot).

La masa foliar específica (MFE), índice definido como la relación entre la masa foliar seca y su área (Witkowski y Lamont 1991, Groom y Lamont 1999), se empleó como indicador de la dureza foliar. El área foliar se midió usando un escáner (Brother-DCP 8085DN) y un programa de procesamiento de imágenes (ImageJ versión 1.45 s, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Abramoff et al. 2004), sobre 17 hojas de cada genotipo de sauce. Posteriormente, éstas se secaron en estufa hasta alcanzar peso constante (a 70 °C durante 6 días) y se pesaron.

La composición química de las hojas se determinó a partir de extractos foliares de *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*. El contenido total de nitrógeno y proteínas, expresados como porcentaje en peso seco, se calcularon mediante el método oficial AOAC (AOAC International, 1995). Los compuestos fenólicos se extrajeron a partir de 0.1 g de hojas frescas con 1 ml de metanol en viales durante 1 h en baño de hielo antes de centrifugarse (5 min, 3000 g). El contenido total de compuestos fenólicos se determinó de acuerdo al método modificado de Swain y Hills (1959). Se tomaron 20 µl de cada extracto, se diluyeron en 4430 µl de agua destilada, se agregaron 50 µl 2 N del reactivo de Folin-Ciocalteu y finalmente 500 µl 1 N de solución de carbonato de sodio, alcanzando un volumen final de reacción de 5 ml. Cada solución se mantuvo a temperatura ambiente por 1 h y se midió su absorbancia a 725 nm en espectrofotómetro (HP/Agilent UV-Visible, Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Alemania). El contenido de fenólicos se expresó como mg de ácido clorogénico/g peso fresco, por extrapolación de la curva de correlación. Para estimar el contenido total de glicósidos fenólicos, los extractos metanólicos de las hojas fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, equipo Agilent Serie 1200 equipado con detecto de diodo G1365D y columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 4.6 × 150 mm, 5 µm. Agilent Technologies, Inc.). La detección se efectuó a 270 y 320 nm. El contenido de salicina y el total de glicósidos fenólicos se expresaron como µg de salicina/g peso fresco por extrapolación de la curva de correlación empleando estándares auténticos de salicina (Sigma Aldrich).

En base a los resultados obtenidos hasta este punto, se decidió continuar trabajando únicamente con 2 de los 6 genotipos de *Salix* originales, correspondientes a aquellos que mostraron mayor diferencia en la preferencia de oviposición, *performance* de la descendencia y composición química: *S. nigra* y *S. viminalis*.

#### **2.4.5 Efecto de la planta hospedera sobre la supervivencia de larvas neonatas durante la fase de establecimiento en la hoja**

Carr et al. (1998) sostienen que la mortalidad de las larvas neonatas de *N. oligospilus* es superior en determinados genotipos de sauce ya que, tras la eclosión de los huevos, éstas son incapaces de perforar el tejido foliar y generar el orificio inicial de alimentación. En base a ello, el objetivo de este experimento fue analizar si existen diferencias en la supervivencia larval durante la fase de establecimiento sobre hojas de *S. nigra* y *S. viminalis*. Las cohortes fueron monitoreadas hasta el quinto día posterior a su nacimiento sobre plantas en macetas, bajo las condiciones controladas de la cámara de cría. Para eso, se seleccionaron ramas de plantas a las que se les podaron los ápices (30 cm) y las ramas secundarias. Así, se delimitó la porción central de cada una (i.e. con hojas maduras completamente expandidas) como sitio disponible para la oviposición de las hembras. Cada rama fue encerrada dentro de mangas de mosquitero (40 x 20 cm, largo x ancho, malla plástica), donde se liberaron hembras durante 1 h 30 min. Pasado ese tiempo, éstas fueron removidas junto con las mangas y se contabilizó y mapeó la ubicación de los huevos colocados. Se registró el momento de la eclosión y la supervivencia larval durante los 5 días posteriores para 8 cohortes sobre cada genotipo de sauce (correspondientes a un total de 437 y 224 huevos colocados sobre *S. nigra* y *S. viminalis*, respectivamente).

#### **2.4.6 Efecto de la dieta larval sobre la protección contra enemigos naturales generalistas**

El objetivo de este experimento fue evaluar si larvas de *N. oligospilus* desarrolladas sobre distintos genotipos de sauce que difieren en su concentración de glicósidos fenólicos sufren predación diferencial por enemigos naturales generalistas. Mediciones previas cualitativas mostraron que extractos metanólicos totales de hojas de *S. nigra* poseían altas cantidades de salicina y salicortina, y bajas de tremulacina, mientras que extractos metanólicos totales de hojas de *S. viminalis* contenían cantidades bajas de salicina y salicortina y no detectables de tremulacina (Chludil, comunicación personal). Dado que algunos insectos secuestran glicósidos fenólicos de sus plantas hospederas para ser utilizados en su propia defensa, se midieron las cantidades de salicina, salicortina y tremulacina en extractos metanólicos de larvas alimentadas de ambos genotipos y en sus heces con el objeto de confirmar que la composición química de las mismas difirió según la dieta.

Para obtener a las larvas, se seleccionaron ramas de plantas en maceta a las que se les podaron los ápices (30 cm) y las ramas secundarias. Así, se delimitó la porción central de cada una (i.e con hojas maduras completamente expandidas) como sitio disponible para la oviposición de las hembras. Las ramas fueron encerradas dentro de mangas de mosquitero (40 x 20 cm, largo x ancho, malla plástica), donde se liberaron las hembras. Una vez que colocaron huevos, se efectuó el seguimiento de los mismos hasta que las larvas alcanzaran los 9-10 días de edad. En ese momento, una parte de ellas se destinó a los experimentos comportamentales y otra a la preparación de extractos.

En dichos experimentos, se empleó como modelo de enemigo natural generalista a la “hormiga de fuego” (*Solenopsis* spp.) (ver 2.4.1 Material biológico, sección Insectos). La arena experimental consistió en un contenedor plástico translúcido redondo (10 x 10 cm, diámetro x altura), con sus bordes cubiertos con maicena para evitar la fuga de las hormigas. Mediante un aspirador entomológico, se tomaron grupos de 10 obreras del nido de *Solenopsis* spp. Éstas se colocaron en la arena experimental por 1 min para su aclimatación. Luego, se ubicó una larva de *N. oligospilus* en el centro de la arena, sujeta a una porción de hoja de sauce (3 x 3 cm) del genotipo *S. alba* x *S. alba* (Figura 2.3). En ese momento se dio inicio al experimento, que duró 10 min y fue filmado (cámara digital Samsung S760, 7.2 megapíxeles). Posteriormente, en intervalos de 1 min, se registró la cantidad de hormigas en contacto (antenal o mandibular) con la larva. El diseño de este experimento fue de tipo *no choice*, con larvas alimentadas de *S. nigra* y *S. viminalis* (N=18, respectivamente). Tanto las larvas como los grupos de 10 hormigas se emplearon una única vez. Todo el experimento se llevó a cabo en las condiciones controladas de la cámara de cría.



**Figura 2.3** Arena experimental empleada en los ensayos de predación de larvas de *Nematus oligospilus* por parte de “hormigas de fuego” (*Solenopsis* spp.).

Para realizar los extractos larvales, grupos de 10-15 larvas fueron sumergidas en 4 ml de metanol y almacenadas a -20°C hasta su empleo. Dichos extractos se filtraron primero con papel (Whatman, Reino Unido) y se evaporaron bajo corriente de nitrógeno hasta alcanzar los 500 µl, a los que se les agregó 300 µl de agua destilada y 500 µl de cloroformo. Esta solución se centrifugó y el sobrenadante se filtró con filtro de nylon 0.2 µm. El primer análisis se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, equipo Agilent Serie 1200 con detector de diodo G1365D y columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 4.6 longitud × 150 mm, 5 µm. Agilent Technologies, Inc.) Los sistemas de elución acuosos fueron (A) 0.1% ácido acético y (B) 100% metanol. Las muestras fueron eluidas de acuerdo al siguiente gradiente: 0 min 80% (A), 20% (B); 25 min 30% (A), 70% (B); 40 min 100% (B) a 0.65 ml/min. Las corridas fueron monitoreadas a longitudes de onda de 220, 270 y 320 nm y comparadas con un estándar de salicina (Sigma Aldrich). La identificación final de salicina, salicortina y tremulacina en dichos extractos fue realizada por el equipo del Dr. Jonathan Gershenzon (Max Planck Institute for Chemical Ecology, Department of Biochemistry, Jena, Alemania) mediante cromatografía líquida de baja resolución acoplada a espectrometría de masa (LC-MS). Se efectuaron 9 extractos con 141 larvas alimentadas sobre *S. nigra* y 3 extractos con 44 larvas alimentadas sobre *S. viminalis*.

Las heces recolectadas durante los 10 días de alimentación de las larvas se sometieron al mismo procedimiento para la determinación cualitativa de salicina, salicortina y tremulacina en los extractos obtenidos.

#### **2.4.7 Efecto de la presencia de glicósidos fenólicos (i.e salicina) sobre el comportamiento de alimentación de enemigos naturales generalistas**

La salicina es la estructura base común a todos los glicósidos fenólicos y un producto de degradación de los mismos. La misma fue detectada diferencialmente sólo en aquellas larvas alimentadas de *S. nigra*, lo que da lugar a la hipótesis de que este compuesto puede estar actuando como disuasorio de la alimentación para los enemigos naturales generalistas. Dado que, a diferencia de otros glicósidos fenólicos, la salicina es un producto comercial fácilmente adquirible, se utilizó este compuesto para los ensayos comportamentales. Para evaluar si la salicina afecta el comportamiento de alimentación de las hormigas, se efectuaron ensayos con diseño *dual choice*, donde a cada grupo de predadores se les ofrecía solución azucarada (sacarosa 0.1 M, 10 µl) *versus* otra solución similar con agregado de salicina. Este ensayo se repitió empleando 2 concentraciones de salicina diferentes (S5: 0.043 ± 0.006 mg, concentración correspondiente a los niveles de salicina presentes en 5 larvas de *N. oligospilus* criadas sobre *S. nigra*; o S50: solución de salicina 10 veces más concentrada que la anterior) (Figura 2.4).

Como predador modelo de enemigo natural generalistas se empleó a la “hormiga de fuego” (*Solenopsis* spp.) (ver 2.4.1 Material biológico, sección Insectos). La arena experimental consistió en un contenedor plástico translúcido redondo (10 x 10 cm, diámetro x altura), con sus bordes cubiertos con maicena para evitar la fuga de las hormigas. Mediante un aspirador entomológico, se colocaron en la arena experimental grupos de 10 obreras procedentes del nido de *Solenopsis* spp. Se daba inicio al ensayo una vez que la primera hormiga contactara alguna de las soluciones disponibles. Cada ensayo duró 10 min y fue filmado (cámara digital Samsung S760, 7.2 megapíxeles). Se registró la cantidad de hormigas alimentándose de las soluciones en intervalos de 1 min. Se realizaron 10 réplicas para cada tratamiento. Cada grupo de 10 hormigas se empleó una única vez.



**Figura 2.4** Arena experimental empleada en ensayos de alimentación de “hormigas de fuego” (*Solenopsis* spp.) sobre sacarosa (0.1M) versus sacarosa (0.1M) con agregado de salicina.

#### 2.4.8 Análisis de datos

En los experimentos de preferencia de oviposición, el número de huevos colocados por genotipo (diseño *multiple choice*) se comparó usando la prueba de Friedman (Conover 1999) seguida de pruebas de comparaciones múltiples. En el diseño *dual choice* se empleó la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, mientras que en el diseño *no choice* se usó la prueba *U* de Mann-Whitney.

En cuanto a la *performance* de la progenie, el peso pupal y la fecundidad de individuos criados sobre diferentes genotipos de sauce se analizaron mediante ANOVA seguido de contrastes de Tukey. La preferencia de oviposición de las hembras de la F1 (diseño *dual choice*) se evaluó mediante la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. El análisis de la supervivencia de las larvas neonatas durante la fase de establecimiento en la hoja se efectuó empleando la prueba *U* de Mann-Whitney.

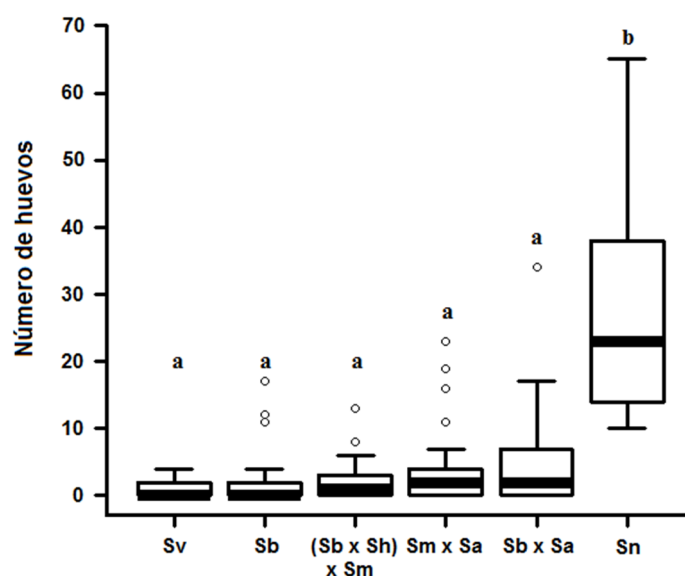
La MFE de los diferentes genotipos de *Salix* se comparó usando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de pruebas de comparaciones múltiples.

La predación de las larvas por parte de hormigas del género *Solenopsis* (diseño *no choice*) se comparó a través de la prueba *U* de Mann-Whitney. En los experimentos de alimentación de *Solenopsis* sobre soluciones azucaradas (diseño *dual choice*) se empleó la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. En todos los casos se usó el paquete R 2.15.1 para Windows (R Core Team 2012).

## 2.5 Resultados

### 2.5.2 Preferencia de oviposición de *N. oligospilus*

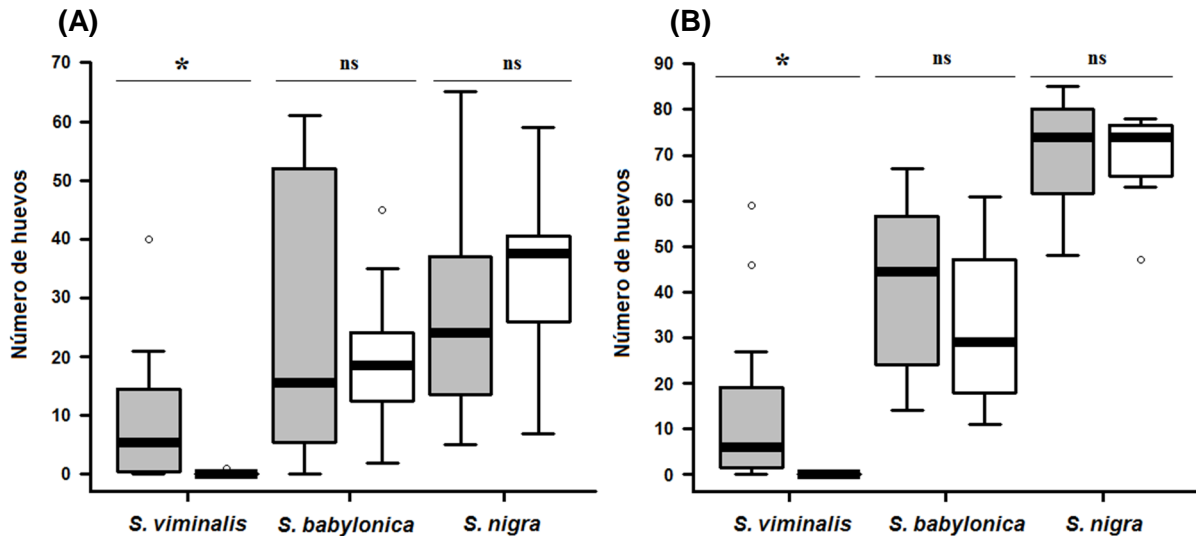
Los experimentos con diseño *multiple choice* revelaron que el número de huevos colocados por las hembras difiere según el genotipo de sauce, siendo *S. nigra* el más preferido para oviponer (Prueba de Friedman  $\chi^2=47.8997$ ,  $gl=5$ ,  $N=21$ ,  $p<0.001$  seguida de pruebas de comparaciones múltiples) (Figura 2.5).



**Figura 2.5** Preferencia de oviposición de *Nematus oligospilus* sobre 6 genotipos de sauce diferentes en un experimento con diseño *multiple choice*. Las cajas representan el primer y tercer cuartil, la mediana se observa como una línea horizontal que atraviesa cada caja. Los bigotes indican el rango.

Los círculos muestran valores atípicos. Prueba de Friedman  $\chi^2=47.8997$ ,  $gl=5$ ,  $N=21$ ,  $p<0.001$  seguida de pruebas de comparaciones múltiples. Letras distintas indican diferencias significativas a  $p<0.05$ . Sv=*Salix viminalis*, Sb=*Salix babylonica*, (Sb x Sh) x Sm=(*S. babylonica* x *Salix humboldtiana*) x *Salix matsudana*, Sm x Sa=*S. matsudana* x *Salix alba*, Sn=*Salix nigra*.

Los experimentos con diseño *dual choice* mostraron que la preferencia de oviposición de las hembras fue similar entre caras de la hoja para los genotipos *S. nigra* y *S. babylonica*. Sin embargo, el número de huevos colocados fue significativamente inferior en la cara abaxial de *S. viminalis* (Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=12, ns y  $p < 0.05$ , respectivamente) (Figura 2.6 A). El mismo patrón se registró en el diseño *no choice* (Prueba *U* de Mann-Whitney, N=12) (Figura 2.6 B).



**Figura 2.6** Preferencia de oviposición de *Nematus oligospilus* según la cara de la hoja en experimentos con diseño (A) *Dual choice*. Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=12 para cada genotipo de sauce, y (B) *No choice*. Prueba *U* de Mann-Whitney, N=12 para cada genotipo evaluado. Las comparaciones se realizan entre las caras adaxial (■) y abaxial (□) de la hoja del mismo genotipo. \* corresponde a diferencias significativas a  $p < 0.05$ , ns indica diferencias no significativas.

### 2.5.3 Performance larval, fecundidad y preferencia de oviposición de individuos criados sobre diferentes genotipos de sauce

Del total de larvas criadas sobre *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*, el 85.5%, 87.5% y 87.5% alcanzaron el estadio de pupa, respectivamente, lo que indicaría que *N. oligospilus* es capaz de desarrollarse en cualquiera de los 3 genotipos de sauce.

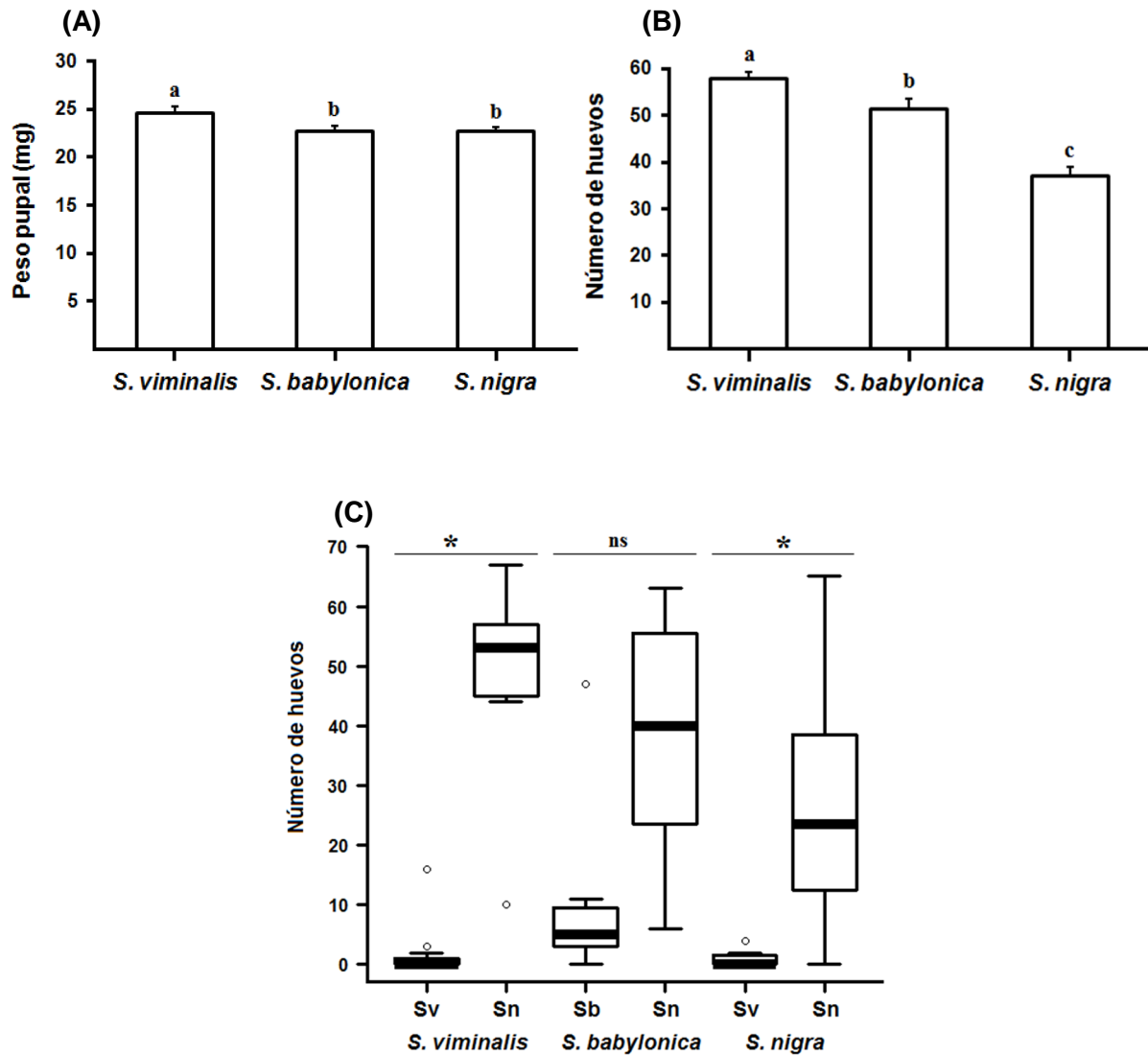
El tiempo transcurrido desde que nacieron las larvas hasta que el 50% de éstas empuparon fue menor sobre *S. viminalis* (12, 14 y 15 días para larvas criadas sobre *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*, respectivamente). El mismo patrón se obtuvo al medir el

tiempo desde el nacimiento larval hasta la emergencia del 50% de los adultos (19, 21 y 21 días para individuos criados sobre *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*, respectivamente).

El peso pupal fue significativamente superior en las larvas que completaron su desarrollo sobre *S. viminalis* (ANOVA:  $gl=2$ ,  $F=4.2686$ ,  $p<0.05$ ,  $N=12$ , 14 y 15 para *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*, respectivamente, seguido de contrastes de Tukey:  $p<0.05$ ) (Figura 2.7 A). En términos de fecundidad, se observó un patrón similar: las hembras que crecieron sobre *S. viminalis* colocaron mayor cantidad de huevos, seguidas de aquellas criadas en *S. babylonica* y por último en *S. nigra* (ANOVA:  $gl=2$ ,  $F=35.375$ ,  $p<0.001$ ,  $N=36$ , 31 y 33, respectivamente, seguido de contrastes de Tukey:  $p<0.05$ ) (Figura 2.7 B).

En cuanto a la experiencia previa, en general las hembras ovipusieron más en *S. nigra* independientemente del genotipo del sauce del cual se alimentaron siendo larvas (Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas,  $N=11$ , 8 y 12 para hembras criadas en *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*, respectivamente,  $p<0.05$ ) (Figura 2.7 C). Esto demuestra que la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* no se modificó según su experiencia previa de alimentación durante los sucesivos estadios larvales, fortaleciendo la hipótesis que explica la oviposición en función de propiedades químicas y/o físicas de la planta.





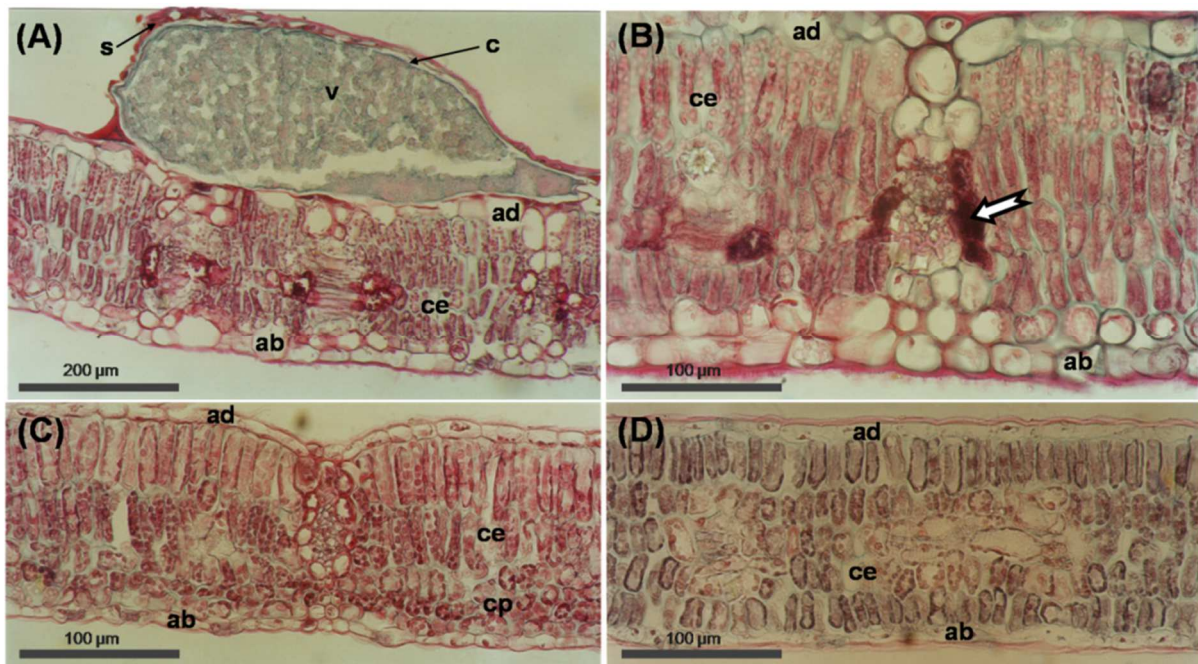
**Figura 2.7 (A)** Peso pupal (media  $\pm$  EE) de hembras criadas sobre *Salix viminalis* (N=12), *Salix babylonica* (N=14) y *Salix nigra* (N=15). Letras distintas indican diferencias significativas. ANOVA:  $gl=2$ ,  $F=4.2686$ ,  $p<0.05$  seguido de contrastes de Tukey:  $p<0.05$ . **(B)** Fecundidad de hembras criadas sobre *S. viminalis* (N=36), *S. babylonica* (N=31) y *S. nigra* (N=33), medida como número de huevos colocados (media  $\pm$  EE) sobre el genotipo de cría *Salix alba*  $\times$  *S. alba*. Letras distintas indican diferencias significativas. ANOVA:  $gl=2$ ,  $F=35.375$ ,  $p<0.001$  seguido de contrastes de Tukey:  $p<0.05$ .

**(C)** Preferencia de oviposición de hembras criadas sobre distintos genotipos de sauce en experimentos con diseño *dual choice* (genotipo de cría indicado en cursiva). Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=11, 8 y 12 para hembras criadas sobre *S. viminalis*, *S. babylonica* y *S. nigra*, respectivamente. \* corresponde a diferencias significativas a  $p<0.05$ , ns indica diferencias no significativas. Sv=*S. viminalis*, Sn=*S. nigra*, Sb=*S. babylonica*.

### 2.5.4 Características foliares de los distintos genotipos de *Salix*

Los estudios anatómicos revelaron que *N. oligospilus* coloca sus huevos en la epidermis foliar, o entre ésta y la capa subyacente de clorénquima (cuyas células se mantienen intactas), evidenciándose el contacto estrecho entre la oviposición y la hoja en todos los genotipos estudiados (Figura 2.8 A).

Los cortes transversales de las hojas mostraron diferencias en la estructura anatómica foliar entre genotipos de sauce. Tanto las láminas de *S. babylonica* como las de *S. nigra* tienen una estructura de tipo isolaral (i.e. clorénquima en empalizada por debajo de la epidermis adaxial y abaxial) (Figura 2.8 B, D), mientras que las de *S. viminalis* son de tipo dorsiventral (i.e. clorénquima en empalizada y esponjoso por debajo de la epidermis adaxial y abaxial, respectivamente) (Figura 2.8 C). Además, se registraron diferencias en el grosor: las hojas de *S. viminalis* y *S. nigra* presentaron, aproximadamente, la mitad del espesor con respecto a las de *S. babylonica*. Ninguno de los 3 genotipos evidenció caracteres típicamente esclerófilos (como una gran proporción de tejido mecánico, paredes celulares rígidas o gruesas, cutícula engrosada o tejidos multicapa).



**Figura 2.8** Fotografías de microscopía óptica correspondientes a láminas foliares de *Salix* en corte transversal. Lámina foliar de **(A)** *Salix babylonica* con oviposición de *Nematus oligospilus* en la cara adaxial (200x), **(B)** *S. babylonica* (400x), **(C)** *Salix viminalis* (400x) y **(D)** *Salix nigra* (400x).

ab=epidermis abaxial, ad=epidermis adaxial, c=corion del huevo, ce=clorénquima en empalizada, s=secreción de la hembra, cp=clorénquima esponjoso, v=vitelo del huevo, ⇔=compuestos tánicos en la vaina del haz.

La masa foliar específica, indicador de la dureza de la hoja, mostró valores similares para *S. viminalis* y *S. babylonica*, y significativamente inferiores para *S. nigra*, genotipo con las hojas mas blandas (Prueba de Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 30.4142$ , N=17, gl=2,  $p < 0.05$  seguida de prueba de comparaciones múltiples) (Tabla 2.1).

En cuanto a su composición química, las hojas de *S. viminalis* presentaron mayor contenido total de nitrógeno y de proteínas, lo que indica un mayor valor nutricional en relación a los demás genotipos. Contrariamente, *S. nigra* mostró el menor contenido de nitrógeno y proteínas y el mayor de compuestos fenólicos y glicósidos fenólicos (Tabla 2.1). En particular, los niveles de salicina fueron altos en *S. nigra*, intermedios en *S. babylonica* y directamente no detectables en *S. viminalis*.

**Tabla 2.1** Principales características foliares de 3 genotipos de *Salix*. Masa foliar específica (MFE, media  $\pm$  EE) y contenido total de nitrógeno, proteínas, compuestos fenólicos, glicósidos fenólicos y salicina en hojas.

	<i>Salix viminalis</i>	<i>Salix babylonica</i>	<i>Salix nigra</i>
MFE ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ )	80.55 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	79.79 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>	62.55 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>
Nitrógeno (% peso seco)	2.40	2.36	1.43
Proteínas (% peso seco)	15.03	14.72	8.92
Compuestos fenólicos (mg/g peso fresco)	6.78	6.10	19.13
Glicósidos fenólicos ( $\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco)	686	788	4175
Salicina ( $\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco)	nd	27.7	44.8

Para la MFE, letras distintas indican diferencias significativas a  $p < 0.05$ . Prueba de Kruskal-Wallis ( $\chi^2 = 30.4142$ , N=17, gl=2) seguida de prueba de comparaciones múltiples. nd corresponde a compuesto no detectado.

### 2.5.5 Efecto de la planta hospedera sobre la supervivencia de larvas neonatas durante la fase de establecimiento en la hoja

Este experimento es distinto al planteado anteriormente (2.4.3 *Performance* larval, fecundidad y preferencia de oviposición de individuos criados sobre diferentes genotipos de sauce) ya que las larvas nacieron directamente sobre los genotipos de interés (plantas en maceta de *S. nigra* o *S. viminalis*), en lugar de ser transferidas a floreros 2-3 días posteriores a su eclosión.

Al comparar la duración del estado huevo, el porcentaje de eclosión y la supervivencia larval durante la fase de establecimiento en la hoja, no se registraron

diferencias entre las cohortes criadas en *S. nigra* y *S. viminalis*. En ambos casos, las larvas fueron capaces de perforar el tejido foliar y generar el orificio de inicio de la defoliación.

**Tabla 2.2** Fase de establecimiento de larvas neonatas de *N. oligospilus*. Duración del estado huevo, porcentaje de eclosión y supervivencia larval al quinto día de desarrollo (media  $\pm$  EE) de cohortes de *N. oligospilus* criadas sobre 2 genotipos de *Salix*.

	<i>Salix nigra</i>	<i>Salix viminalis</i>	p
Duración del estado huevo (días)	4.63 $\pm$ 0.18	4.63 $\pm$ 0.26	ns
Eclosión larval (%)	71.85 $\pm$ 8.39	72.63 $\pm$ 5.13	ns
Supervivencia larval (%)	69.82 $\pm$ 9.24	73.78 $\pm$ 12.65	ns

ns corresponde a diferencias no significativas. Prueba *U* de Mann-Whitney, N=8 cohortes para cada genotipo de sauce.

### 2.5.6 Efecto de la dieta larval sobre la protección contra enemigos naturales generalistas

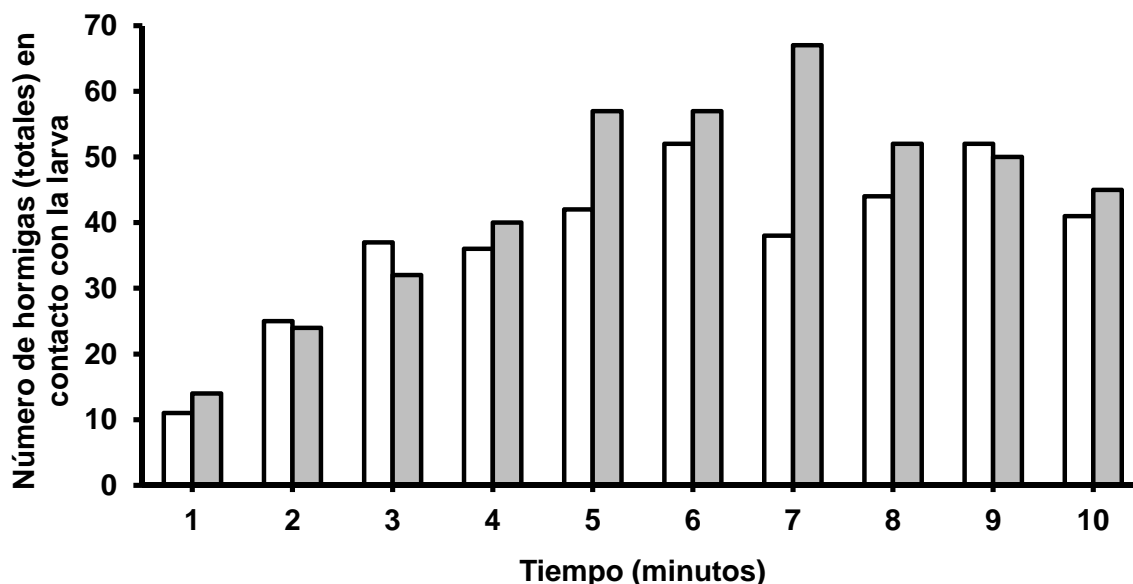
Los análisis de extractos larvales revelaron que la composición química de las larvas varía según su dieta: aquellas que se desarrollaron sobre *S. nigra*, genotipo con alto contenido de glicósidos fenólicos, presentaron salicina y salicortina en su composición. La tremulacina proveniente de las hojas no fue detectada, lo que sugiere su total degradación. Ninguno de los glicósidos fenólicos analizados fue detectado en las larvas alimentadas de *S. viminalis*. Las heces correspondientes también mostraron diferencias, detectándose salicina (producto de degradación de los glicósidos fenólicos) sólo en aquellas larvas criadas sobre *S. nigra* y ausencia de los 3 glicósidos fenólicos analizados en aquellas alimentadas de *S. viminalis*. (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3** Glicósidos fenólicos presentes en extractos metanólicos de larvas (y sus heces) criadas sobre 2 genotipos de *Salix*.

Compuesto	Larvas		Heces	
	<i>Salix nigra</i>	<i>Salix viminalis</i>	<i>Salix nigra</i>	<i>Salix viminalis</i>
Salicina (mg)	0.043 ± 0.006	nd	+	-
Salicortina (mg)	0.032 ± 0.004	nd	-	-
Tremulacina (mg)	nd	nd	-	-

En las larvas, las concentraciones (expresadas como equivalente de 5 larvas) se expresan como media ± EE. La concentración de salicortina se expresa por extrapolación de la curva de correlación del estándar de salicina. nd corresponde a compuestos no detectados. En las heces, + indica presencia, - indica ausencia.

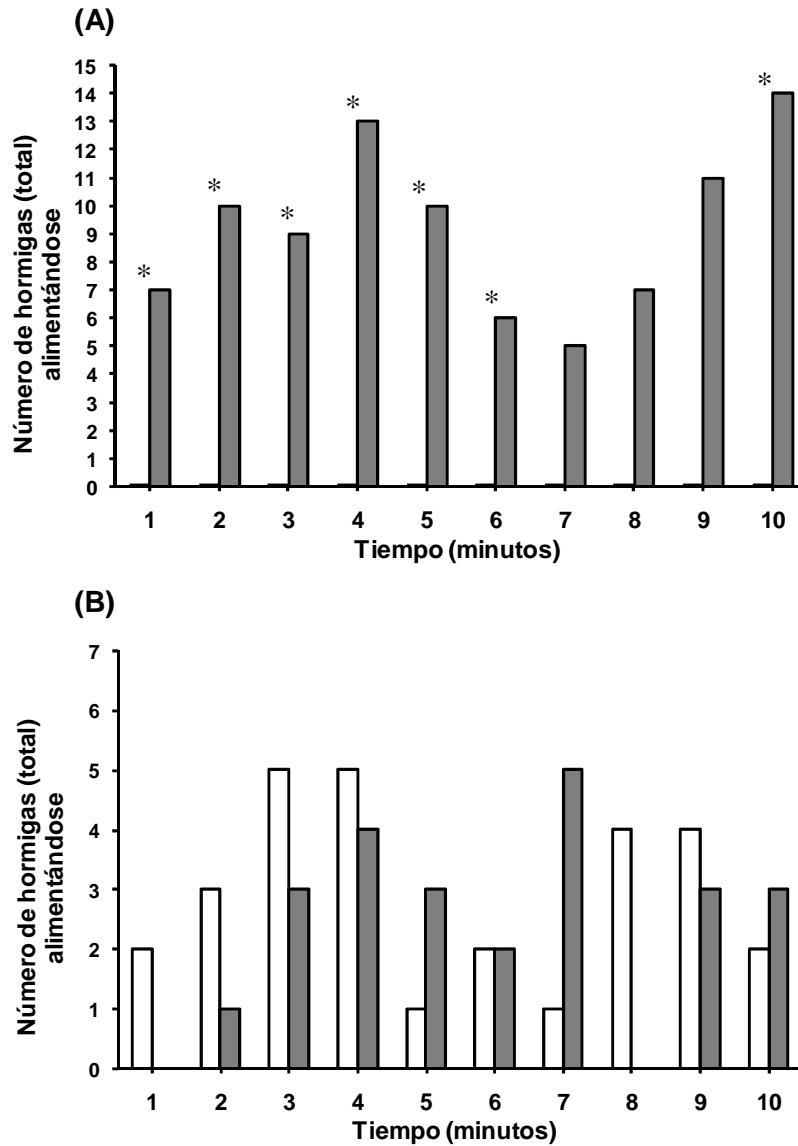
La Figura 2.9 muestra la sumatoria de hormigas estableciendo contacto (antenal o mandibular) con la larva previamente alimentada de *S. nigra* o *S. viminalis*. Dichas observaciones fueron realizadas una vez por minuto (durante 10 min) para cada larva diferente. Estos experimentos no revelaron diferencias significativas al ser evaluados de a pares para cada minuto de observación. Sin embargo, a lo largo de todo el experimento se observa que en 7 de 10 oportunidades hubo una menor cantidad de hormigas en contacto con las larvas criadas sobre *S. nigra*, cuya composición presenta salicina y salicortina.



**Figura 2.9** Número de hormigas (totales) contactando la larva, evaluadas cada 1 minuto durante 10 minutos. Prueba *U* de Mann-Whitney, N=18 para cada tratamiento. Diferencias no significativas en todos los casos. (□) larvas criadas sobre *S. nigra*, (■) larvas criadas sobre *S. viminalis*

### 2.5.7 Efecto de la presencia de glicósidos fenólicos (i.e salicina) sobre el comportamiento de alimentación de enemigos naturales generalistas

Los resultados de estos experimentos revelaron que, durante todo el ensayo, las hormigas evitaron alimentarse de la solución azucarada con la mayor concentración de salicina (Figura 2.10 A), comportamiento que no se observa cuando la concentración de este compuesto se reduce a la equivalente a 5 larvas (Figura 2.10 B).



**Figura 2.10** Efecto de la salicina sobre el comportamiento de alimentación de hormigas del género *Solenopsis*, en experimentos con diseño *dual choice*. Número de hormigas (total) alimentándose de cada solución, observadas 1 vez por minuto durante 10 minutos. Los tratamientos consisten en sacarosa (0.1M) *versus* (A) S50 (salicina correspondiente a 50 larvas en sacarosa 0.1M) y *versus* (B) S5 (salicina correspondiente a 5 larvas en sacarosa 0.1M). Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. \* corresponde a diferencias significativas. N=10. (■) sacarosa, (□) sacarosa con salicina (S50 o S5).

## 2.6 Discusión

El experimento de preferencia de oviposición que da inicio al capítulo reveló que existe un efecto del genotipo de sauce sobre el número de huevos colocados por las hembras, siendo *S. nigra* el más elegido. Estos resultados se corresponden con hallazgos previos a campo en estaqueros experimentales situados en el Delta del Río Paraná<sup>2</sup>, donde se registró un alto nivel de defoliación larval sobre *S. nigra*, uno muy bajo sobre *S. viminalis* y uno intermedio sobre los 4 genotipos restantes (Cerrillo et al. 2011). En conjunto, esto sugiere que el patrón de daño observado a campo es producto de la preferencia de oviposición de las hembras, tal como fue propuesto por Carr et al. (1998) para la misma especie en el hemisferio Norte.

A continuación, se evaluó la preferencia de oviposición sobre las diferentes superficies de la hoja (i.e. adaxial y abaxial) en 3 de los 6 genotipos originales: *S. nigra* (i.e. genotipo más preferido), *S. babylonica* (i.e. genotipo de preferencia intermedia) y *S. viminalis* (i.e. genotipo menos preferido). En el diseño *dual choice*, la cantidad de huevos colocados fue similar en ambas caras de la hoja, tanto en *S. nigra* como en *S. babylonica*. Sin embargo, resultó significativamente inferior en la cara abaxial de *S. viminalis*, donde se registró un único huevo a lo largo de todos los experimentos de este capítulo. Este mismo patrón se repitió en los experimentos con diseño *no choice*, en los que las hembras tenían acceso a una única superficie donde oviponer. Contrariamente, Urban y Eardley (1990) hallaron que el 90% de las oviposiciones de *N. oligospilus* ocurrían sobre la superficie adaxial de *S. babylonica* en observaciones hechas a campo. Estas enormes diferencias entre resultados podrían deberse a un efecto de posición de las hojas. En el laboratorio, los ensayos *dual choice* y *no choice* se diseñaron de manera tal que las caras de la hoja resultaran igualmente accesibles para *N. oligospilus*. En las cajas de cría fue habitual verlas caminar hacia arriba, presumiblemente orientadas hacia la luz. Dicho comportamiento, sumado a la disposición natural de las hojas en el campo, explicarían las diferencias entre ambos estudios.

Esta serie de experimentos sugiere también que *S. nigra* y *S. babylonica* poseen claves de oviposición similares dentro de cada especie (al no detectarse diferencias en la oviposición entre superficies foliares del mismo genotipo) pero diferentes entre especies, dado que *S. babylonica* siempre recibió menos huevos independientemente del diseño experimental. En el caso de *S. viminalis*, los resultados muestran que las hembras prácticamente evitan oviponer en ese genotipo, tal como lo reportaran Charles et al. 1998. Al ser disecadas inmediatamente tras su emergencia, las hembras poseen cerca de 60

<sup>2</sup> Estaqueros Experimentales de sauce del Programa de Mejoramiento Genético, situados en la Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná (INTA).

huevos maduros en sus ovarios. Sin embargo, el promedio de oviposiciones en estos experimentos fue de  $7.97 \pm 2.37$  huevos sobre *S. viminalis* y  $39.89 \pm 3.54$  huevos sobre *S. babylonica*, por lo que en ambos casos las avispas murieron sin haber colocado la totalidad de sus huevos. En cambio, la oviposición promedio sobre *S. nigra* correspondió a  $66.94 \pm 2.34$  huevos. En conclusión, el genotipo de *Salix* no solo determina la probabilidad de ser elegido planta hospedera sino también la carga de huevos recibida por parte de *N. oligospilus*.

Las cohortes de larvas criadas sobre *S. nigra*, *S. babylonica* y *S. viminalis* mostraron niveles similares de supervivencia (~87%) hasta alcanzar el estado de pupa. Esto indicaría que *N. oligospilus* es capaz de desarrollarse en cualquiera de los 3 genotipos evaluados, posiblemente porque todos ellos aportan niveles suficientes de nutrientes, tal como proponen Price et al. (1999) para otros tentredínidos. De esta manera, los resultados sugieren que el espectro de alimentación de las larvas es más amplio que el de oviposición de las hembras, como señalan Roininen y Tahvanainen (1989) en otras especies del género *Nematus*. Notablemente, el tiempo de desarrollo fue levemente inferior (i.e. más rápido) sobre *S. viminalis*, y el peso pupal y la fecundidad de las hembras criadas en dicho genotipo fueron superiores, lo que sugiere una mejor *performance* de la progenie sobre el genotipo menos preferido por la madre para colocar sus huevos.

Carr et al. (1998) sostienen que *N. oligospilus* exhibe una preferencia de oviposición marcada y relativamente inflexible. En concordancia, los experimentos de este capítulo mostraron que *S. nigra* siempre resulta el genotipo más elegido por las hembras para colocar sus huevos, independientemente de las otras alternativas presentes y de la experiencia de alimentación de los estadios larvales que preceden al adulto.

En cuanto a sus propiedades físicas, las hojas de *S. nigra* presentaron la menor masa foliar específica, lo que explicaría parcialmente la preferencia de oviposición por este genotipo. El ovipositor de las hembras es una estructura muy delicada que puede resultar dañada por los movimientos de flexión efectuados al insertar el huevo en el sustrato (Benson 1963, Smith 1968). Por eso, en otras especies de avispa sierra esta propiedad juega un rol crítico en la oviposición (Ferrier y Price (2004)

Al cuantificar el contenido de compuestos fenólicos (totales y glicósidos), los mayores niveles se registraron en las hojas de *S. nigra*. En particular, la concentración de salicina fue alta en dicho genotipo, intermedia en *S. babylonica* y directamente no detectable en *S. viminalis*, en correspondencia con la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* observada en los experimentos. Dado que la salicina es un producto de degradación de los glicósidos fenólicos, estos resultados sugieren que la presencia de alguno de estos compuestos podría constituir una clave de oviposición para esta avispa.

Como se comentó en la introducción, la elección materna del sitio de oviposición y el



éxito de su descendencia suelen enmarcarse en la hipótesis de *preference-performance*, la cual establece que las hembras elegirán oviponer en plantas hospederas que maximicen el desempeño de la progenie (Jaenike 1978, Thompson 1988, Mayhew 1997). Evidencia de esta asociación fue reportada en otras especies de tentredínidos (Craig et al. 1989), incluyendo a *N. oligospilus* (Carr et al. 1998). Contrariamente, los resultados de este capítulo sugieren una asociación negativa entre la elección materna y la *performance* de la progenie, como proponen otros autores. Por ejemplo, Ferrier y Price (2004) sostienen que hembras del género *Euura* colocan sus huevos preferentemente en ramas vigorosas de *Salix scouleriana* Barratt a pesar de que la descendencia no necesariamente se establece ni se desarrolla mejor en ellos. De la misma manera, Björkman et al. (1997) postulan que *Neodiprion sertifer* Geoffroy prefiere oviponer en genotipos de pino de menor calidad nutricional dado que allí las larvas resultan menos vulnerables al ataque de parasitoides. En el caso de *N. oligospilus*, el experimento con predadores generalistas (i.e. hormigas de fuego) muestra que la composición química larval depende de la dieta y que las larvas podrían secuestrar glicósidos fenólicos que les conferirían protección frente a predadores al tornarse menos palatables, tal como ocurre con las larvas de algunas especies de crisomélidos (Pasteels et al. 1983, Köpf et al. 1998) y lepidópteros (Prudic et al. 2007) que se alimentan de sauces. Sin embargo, los resultados de este trabajo no son contundentes dado que las hormigas contactaron a las larvas de manera similar, y la salicina presentada en solución azucarada sólo resultó disuasiva en concentraciones elevadas. De todos modos, estos resultados deberían ser confirmados con más experimentos ya que los ensayos de predación con larvas fueron realizados en condiciones *no choice* con predadores generalistas muy agresivos, lo que reduce la probabilidad de encontrar diferencias. Por otro lado, el metabolismo de los glicósidos fenólicos da como resultado otros compuestos tóxicos o repelentes para insectos, tales como el catecol o el ácido benzoico (Boeckler et al. 2016). Se espera entonces que, además de la salicina, las larvas alimentadas de *S. nigra* posean otros metabolitos secundarios que podrían producir un efecto sinérgico tóxico sobre los enemigos naturales (i.e. el ácido benzoico, producto de degradación de la tremulacina, actúa como disuasivo en bajas concentraciones para *Solenopsis* spp.; Dávila, comunicación personal).

En conjunto, los resultados de este capítulo revelan que la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* estaría determinada por un balance entre la estructura foliar, los niveles de nutrientes y la presencia de ciertos metabolitos secundarios en la hoja que constituyen claves químicas determinantes. Por un lado, el contenido de nitrógeno de *S. viminalis* garantiza la *performance* de la descendencia. Sin embargo, los bajos niveles de glicósidos fenólicos indicarían la ausencia de claves químicas que estimulen la oviposición en este genotipo. Si bien *S. babylonica* mostró niveles similares a *S. viminalis* en términos de

nutrientes y dureza foliar, la presencia de salicina (u otro glicósido fenólico) junto con un mayor contenido de glicósidos fenólicos proporcionarían la clave química que explicaría la mayor oviposición en el primero. Por último, la preferencia por *S. nigra* sería producto de su menor dureza foliar y de la presencia y abundancia de glicósidos fenólicos que actuarían como claves de oviposición para *N. oligospilus*. Para terminar, no debe descartarse la posibilidad de que las larvas incorporen metabolitos secundarios propios de la planta hospedera y los empleen para su propia defensa.

## 2.7 Referencias

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11: 36-42.
- AOAC International. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edn, Vol 2. Association of Analytical Communities, Arlington, Virginia.
- Benson RB. 1963. Wear and damage of sawfly saws (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Notulae Entomologicae*, 43: 137-138.
- Bernays EA, Chapman RF. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, New York, New York.
- Björkman C, Larsson S, Bommarco R. 1997. Oviposition preferences in pine sawflies: a trade-off between larval growth and defence against natural enemies. *Oikos*, 79(1): 45-52.
- Boeckler GA, Paetz C, Feibicke P, Gershenzon J, Unsicker SB. 2016. Metabolism of poplar salicinoids by the generalist herbivore *Lymantria dispar* (Lepidoptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 78: 39-49.
- Carr TG, Roininen H, Price PW. 1998. Oviposition preference and larval performance of *Nematus oligospilus* (Hymenoptera: Tenthredinidae) in relation to host plant vigor. *Environmental Entomology*, 27(3): 615-625.
- Cerrillo T, Braccini CL, Martínez R, Chludil HD, Leicach SR, Fernández PC. 2011. Susceptibilidad de distintos genotipos experimentales de *Salix* spp. a la avispa sierra *Nematus oligospilus*. Evaluación de daños a campo y estudios de preferencia en laboratorio. Proceeding of the 3rd International Congress of the Salicaceae. Neuquén, Argentina.
- Charles J, Allan D, Fung L. 1998. Susceptibility of willows to oviposition by the willow sawfly, *Nematus oligospilus*. Proceedings of the 51st New Zealand Plant Protection Conference, 230-234 pp.
- Conover WJ. 1999. Practical nonparametric statistics. John Wiley and Sons. New York, New York.
- Craig TP, Itami JK, Price PW. 1989. A strong relationship between oviposition preference and larval performance in a shoot-galling sawfly. *Ecology*, 70(6): 1691-1699.
- Craig TP, Ohgushi T. 2002. Preference and performance are correlated in the spittlebug *Aphrophora pectoralis* on four species of willow. *Ecological Entomology*, 27: 529-540.

- Crawley MJ. 1988. Insect herbivores and plant population dynamics. *Annual Review of Entomology*, 34: 531-564.
- D'Ambrogio de Argüeso A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Denno RF, Larsson S, Olmstead K. 1990. Role of enemy free space and plant quality in host-plant selection by willow beetles. *Ecology*, 71(1): 124-137.
- Ferrier SM, Price PW. 2004. Oviposition preference and larval performance of a rare bud-galling sawfly (Hymenoptera: Tenthredinidae) on willow in Northern Arizona. *Environmental Entomology*, 33(3): 700-708.
- Groom PK, Lamont BB. 1999. Which common indices of sclerophylly best reflect differences in leaf structure? *Ecoscience*, 6(3): 471-474.
- Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJA. 2009. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology*, 54: 57-83.
- Jaenike J. 1978. On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theoretical Population Biology*, 14: 350-56.
- Kolehmainen J, Julkunen-Tiitto R, Roininen H, Tahvanainen J. 1995. Phenolic glucosides as feeding cues for willow-feeding leaf beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 74: 235-243.
- Köpf A, Rank NE, Roininen H, Julkunen-Tiitto R, Pasteels JM, Tahvanainen J. 1998. Ecology and evolution of host plant use and larval secretions in the leaf beetle genus *Phratora* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Evolution*, 52(2): 517-528.
- Lindroth RL, Peterson SS. 1988. Effects on plant phenols on performance of southern armyworm larvae. *Oecologia*, 75: 185-189.
- Lindroth RL, Scriber JM, Hsia MT. 1988. Chemical ecology of the tiger swallowtail: mediation of host use by phenolic glycosides. *Ecology*, 69: 814-822.
- Matsuki M, MacLean S. 1994. Effects of different leaf traits on growth rates on insect herbivores on willows. *Oecologia*, 100: 141-152.
- Mattson W. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11: 119-161.
- Mayhew 1997. Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects. *Oikos*, 79(3): 417-428.
- Palo RT. 1984. Distribution of birch (*Betula* spp.), willow (*Salix* spp.), and poplar (*Populus* spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 10(3): 499-520.
- Pasteels JM, Rowell-Rahier M, Braekman JC, Dupont A. 1983. Salicin from host plant as precursor of salicylaldehyde in defensive secretion of Chrysomeline larvae. *Physiological Entomology*, 8: 307-314.
- Price PW, Roininen H, Ohgushi T. 1999. Comparative plant-herbivore interactions involving willows and three gall-inducing sawfly species in the genus *Pontania* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Ecoscience*, 6: 41-51.

- Prudic KL, Khera S, Sólyom A, Timmermann BN. 2007. Isolation, identification, and quantification of potential defensive compounds in the viceroy butterfly and its larval host-plant, Carolina willow. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 1149-1159.
- Rank NE, Köpf A, Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J. 1998. Host preference and larval performance of the salicylate-using leaf beetle *Phratora vitellinae*. *Ecology*, 79(2): 618-631.
- Roininen H, Tahvanainen J. 1989. Host selection and larval performance of two willow-feeding sawflies. *Ecology*, 70(1): 129-136.
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Singer M. 1986. The definition and measurement of oviposition preference in plant-feeding insects. En: *Insect-plant interactions*. Miller JR et al. (eds.). Springer Science+Business Media, New York.
- Smith EL. 1968. Biosystematics and morphology of Symphyta. I. Stem-galling Euura of the California region and a new female genitalic nomenclature. *Annals of the Entomological Society of America*, 61: 1389-1407.
- Swain T, Hills WE. 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10: 63-68.
- R Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Renwick JAA. 1989. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia*, 45: 223-228.
- Tahvanainen R, Julkunen-Tiitto R, Kettunen J. 1985. Phenolic glycosides govern the food selection pattern of willow feeding leaf beetles. *Oecologia*, 67: 52-56.
- Thompson JN. 1988. Coevolution and alternative hypotheses on insect/plant interactions. *Ecology*, 69(4): 893-895.
- Urban AJ, Eardley CD. 1995. A recently introduced sawfly, *Nematus oligospilus*, Förster (Hymenoptera: Tenthredinidae) that defoliates willows in South Africa. *African Entomology*, 3(1): 23-27.
- Wennström A, Hjulström LN, Hjältén J, Julkunen-Tiitto R. 2010. Mother really knows best: host choice of adult phytophagous insect females reflects a within-host variation in suitability as larval food. *Chemoecology*, 20: 35-42.
- Witkowski ETF, Lamont BB. 1991. Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia*, 88: 486-493.

## Capítulo 3

### **El reconocimiento de la planta hospedera por *Nematus oligospilus* mediante claves volátiles y de contacto**

Este capítulo dio origen a la siguiente publicación:

Braccini CL, Vega AS, Coll Aráoz MV, Teal PE, Cerrillo T, Zavala JA, Fernandez PC. 2015. Both volatiles and cuticular plant compounds determine oviposition of the willow sawfly *Nematus oligospilus* on leaves of *Salix* spp. (Salicaceae). *Journal of Chemical Ecology*, 41: 985-996.

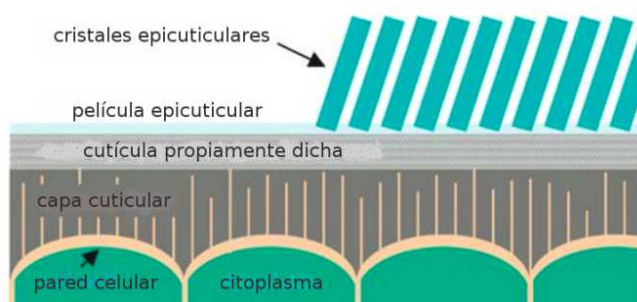
### 3.1 Introducción

Los insectos herbívoros habitan ambientes naturales donde la vegetación se dispone formando arreglos complejos. Localizar a la planta hospedera es un proceso crucial que depende, entre otros factores, de la integración de claves provistas por ésta. Como se comentó en el Capítulo 1, dicho proceso puede dividirse en 2 etapas consecutivas: la fase de búsqueda y la evaluación de contacto. Inicialmente, los insectos se mueven aleatoriamente en el ambiente. Al percibir claves visuales y/u olfativas propias de la planta, responden acercándose a la fuente. Una vez que establecen contacto físico, examinan la superficie y finalmente toman la decisión de aceptarla (desencadenándose la oviposición o alimentación) o rechazarla (abandonándola). A medida que el insecto se aproxima a la planta, se produce un aumento en la cantidad e intensidad de las claves, lo que a su vez puede incrementar la intensidad y modalidad de la información sensorial colectada (Renwick y Chew 1994, Schoonhoven et al. 2005). En general, la búsqueda de la planta hospedera está comandada por claves olfativas (i.e. volátiles, de medio a largo alcance), mientras que en su evaluación intervienen claves de contacto (i.e. físicas y químicas, de corto alcance) (Bernays y Chapman 1994).

Existen dos teorías sobre la utilización de claves volátiles que median la orientación a la planta hospedera (Visser 1986). La primera postula el reconocimiento de compuestos volátiles especie-específicos. Si bien la evidencia que la sostiene es escasa, existe por ejemplo una variedad de crisomélidos, curculiónidos y lepidópteros que son atraídos por isotiocianatos, compuestos específicos de las plantas crucíferas que constituyen su fuente de alimento (Feeny et al. 1970, Free y Williams 1978) o sitio de oviposición (Gupta y Thorsteinson 1960). La segunda teoría, en cambio, se basa en la identificación de proporciones particulares de componentes volátiles ubicuos, y cuenta con mayor evidencia experimental (Bruce et al. 2005). Los compuestos orgánicos volátiles de plantas incluyen a los terpenos (y sus derivados) y a los denominados “volátiles de hojas verdes” (*green leaf volatiles*, GLVs por sus siglas en inglés). Los GLVs son moléculas de 6 carbonos (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres) producto de la oxidación y clivaje de ácidos grasos poliinsaturados, que suelen liberarse al ambiente en cantidades apreciables. Las cantidades relativas de terpenos y GLVs dan lugar a mezclas únicas, que resultan características de cada especie vegetal (Visser 1986, Schoonhoven et al. 2005, Baldwin 2010). En particular, algunos trabajos sobre plantas del género *Salix* han demostrado que los perfiles de volátiles emitidos por distintos genotipos carecen de compuestos distintivos pero resultan significativamente diferentes en términos de composición relativa, y a su vez atraen

diferencialmente a insectos herbívoros y predadores (Peacock et al. 2001, Inui et al. 2003, Yoneya et al. 2009, Lehrman et al. 2013).

Una vez que el insecto se posa sobre la planta, la cutícula vegetal representa la zona de contacto inicial. Si bien el rol primario de la cutícula es actuar como barrera de permeabilidad (evitando la pérdida de vapor de agua de los tejidos), su composición química especie-específica y la variabilidad morfológica de sus cristales sugieren otras posibles funciones ecológicas que incluyen mediar las interacciones de la planta con otros organismos (Eigenbrode y Espelie 1995, Müller y Hilker 2001, Riederer 2006). Estructuralmente, la cutícula se divide en 3 partes, depositadas en la matriz extracelular más externa de la epidermis: la capa cuticular forma la base donde se inserta la cutícula propiamente dicha, que a su vez se halla recubierta de ceras epicuticulares (Figura 3.1). Químicamente, su composición general consta de cutina (en mayor medida) y ceras. La cutina, biopoliéster de 2 familias de ácidos grasos, constituye la matriz insoluble que brinda soporte estructural (Kolattukudy 1981). Las ceras están formadas por una mezcla de compuestos lipofílicos, mayoritariamente ácidos grasos de cadena muy larga y sus derivados (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres). Éstas se hallan embebidas en la matriz de cutina (i.e. ceras intracuticulares) o bien depositadas en el exterior en forma de película o cristales (i.e. ceras epicuticulares) (Holloway 1982, Jetter et al. 2006). Las últimas exhiben una gran diversidad micromorfológica que abarca desde cubiertas ultra delgadas hasta incrustaciones de cristaloides, gránulos, placas y túbulos (Barthlott et al. 1998), definiendo el microrrelieve de la superficie foliar (Eigenbrode y Espelie 1995, Müller y Riederer 2005, Nawrath 2006, Müller 2008). La combinación de distintos métodos de extracción (e.g. remoción mecánica, lavados con diferentes solventes variando la temperatura y tiempo de exposición) reveló que la carga y composición de ceras cuticulares pueden diferir tanto entre caras de la hoja (Eigenbrode y Espelie 1995, Jetter et al. 2000) como entre las fracciones intra y epicuticulares (Buschhaus et al. 2007, Buschhaus y Jetter 2011).



**Figura 3.1** Esquema de las diferentes capas que conforman la cutícula vegetal (Müller y Riederer 2005).

Las especies del género *Salix* muestran una gran variabilidad en la carga total y composición química de sus ceras cuticulares (Hietala et al. 1995, Hietala et al. 1997, Cameron et al. 2002). En cuanto a la morfología, las ceras suelen disponerse formando cubiertas lisas, de aspecto homogéneo. Sin embargo, algunas especies muestran patrones de deposición únicos en la cara abaxial de la hoja, donde los filamentos se fusionan apicalmente dando lugar a estructuras conicoides (Tomaszewski 2004, Szafranek et al. 2008).

Además de las ceras, la cutícula foliar presenta componentes no lipídicos, tales como polisacáridos (Chamel et al. 1991, Domínguez y Heredia 1999) y compuestos fenólicos (Hunt y Baker 1980, Luque et al. 1995, Domínguez et al. 2011). En general, dichos componentes pueden depositarse en la superficie de la planta mediante difusión, y asociarse a ceras o almacenarse en tricomas glandulares (Bargel et al. 2004). En particular, los fenólicos se encuentran unidos covalentemente a la matriz de cutina, asociados en grupos o formando parte de las ceras cuticulares (Laguna et al. 1999). Muchos resultan prácticamente ubicuos, como los flavonoides y derivados del ácido cinámico que confieren protección frente a la radiación UV (Krauss et al. 1997, Bargel et al. 2006). Otros metabolitos secundarios, en sinergismo con componentes lipofílicos epicuticulares, pueden actuar como estimulantes de la oviposición (Müller 2006, y sus referencias). Por ejemplo, existen trabajos que señalan a flavonoides, ácido clorogénico, glucosinolatos y azúcares en superficie como principios activos en el reconocimiento de la planta hospedera (Brooks et al. 1996, Derridj et al. 1996, Spencer et al. 1999, Shroff et al. 2015). Como se mencionó en el Capítulo 1, los glicósidos fenólicos constituyen los metabolitos secundarios más abundantes y representativos de la familia Salicaceae, alcanzando concentraciones de hasta un 30% del peso seco de la planta (Palo 1984, Donaldson et al. 2006). Dado que estos compuestos estimulan la oviposición sobre plantas del género *Salix* en insectos especialistas (Orians et al. 1997, Roininen et al. 1999), su posible presencia en la epicutícula foliar sugeriría un rol en el reconocimiento de la planta hospedera por parte de *N. oligospilus*.

## 3.2 Objetivos

### Objetivo general

Evaluar el rol de las claves olfativas y gustativas durante la orientación y el reconocimiento de la planta hospedera en *N. oligospilus*.



### Objetivos específicos

1. Evaluar la orientación de las hembras hacia los genotipos de sauce más y menos preferido para oviponer mediante claves volátiles.
2. Comparar los perfiles químicos de compuestos volátiles emitidos por dichos genotipos.
3. Analizar la importancia de las ceras epicuticulares foliares en la elección del sitio de oviposición por parte de las hembras.
4. Comparar la micromorfología y composición química de las ceras cuticulares de los genotipos de sauce antes mencionados.

### 3.3 Hipótesis

1. Las hembras de *N. oligospilus* emplean claves volátiles propias de la planta hospedera que les permiten orientarse hacia ella a distancia.
2. Los genotipos de sauce más y menos preferidos por las hembras para oviponer emiten perfiles de compuestos volátiles diferentes.
3. Las ceras epicuticulares foliares poseen claves de contacto que determinan la oviposición de *N. oligospilus*.
4. Los genotipos de sauce con alta y baja preferencia de oviposición muestran diferencias en la micromorfología y composición química de sus ceras cuticulares.

### 3.4 Materiales y Métodos

#### 3.4.1 Material biológico

##### Plantas

En función de los resultados obtenidos en los experimentos del capítulo 2, se decidió continuar trabajando únicamente con los genotipos de sauce más y menos preferidos por las hembras de *N. oligospilus* para oviponer: *S. nigra* y *S. viminalis*, respectivamente.

Para la recolección de compuestos volátiles se emplearon plantas en maceta de 3 meses de edad de dichos genotipos. Éstas se originaron a partir de material procedente de estaquero, y se mantuvieron en vivero en condiciones ambientales hasta el momento de su uso tal como se explica en el Capítulo 2 (2.4.1 Material biológico, sección Plantas). Dos horas antes del inicio de la recolección, las plantas eran colocadas en el interior de la cámara de cría, bajo las condiciones controladas ya descritas.

Para los análisis químicos se emplearon hojas recién cortadas, maduras, completamente expandidas e intactas, procedentes de la porción media de ramas de sauces de estaquero.

## Insectos

Las hembras adultas de *N. oligospilus* usadas en los experimentos provinieron de la población establecida en el laboratorio. En todos los casos, se trató de hembras recién emergidas (i.e. de hasta 1 día de edad), evaluadas individualmente y por única vez tal como se explica en el Capítulo 2 (2.4.1 Material biológico, sección Insectos).

## CLAVES VOLÁTILES

### 3.4.2 Elección en olfatometría

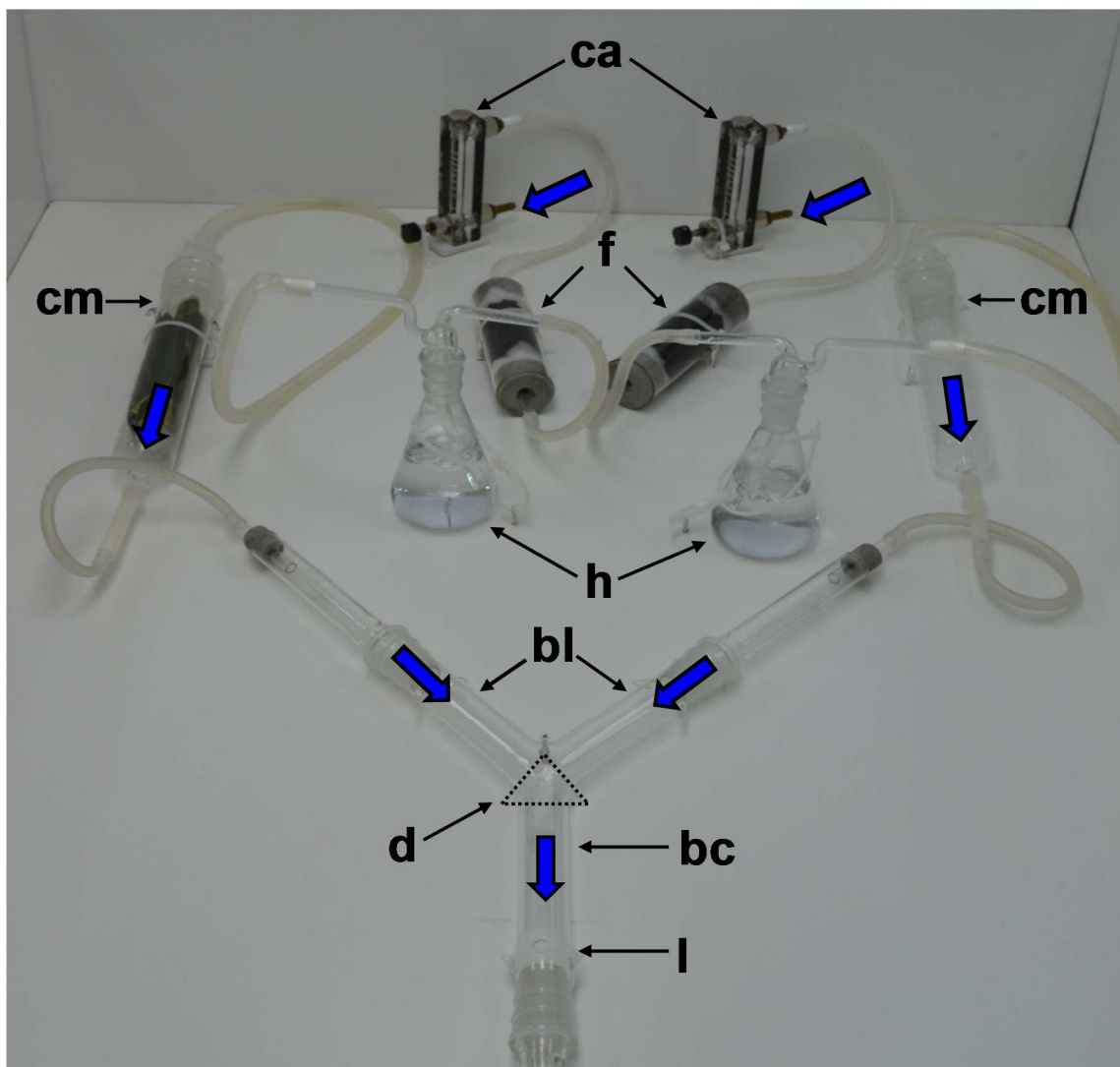
Para evaluar el rol de los compuestos volátiles de sauce como claves olfativas para *N. oligospilus* se efectuaron ensayos comportamentales en un olfatómetro de vidrio tipo Y. Las piezas que conformaron este dispositivo, ordenadas desde el extremo distal, fueron las siguientes (Figura 3.2):

- Caudalímetros (2 unidades, modelo MB60V-B, Bruno Schilling SA, Argentina). Permiten regular el flujo de aire que ingresa al sistema, que en este caso fue fijado en 0.2 L/min.
- Filtros de carbón activado (2 unidades). Fueron armados empleando tubos de vidrio Pyrex (15 cm de longitud, 4.5 cm de diámetro interno). En su interior se coloca carbón activado granulado (100 g), rodeado de guata. Su función es purificar el aire que ingresa al dispositivo. Su contenido fue reemplazado semanalmente.
- Humidificadores (2 unidades). Se trata de erlenmeyers con cabezales de piseta (todo de vidrio Pyrex), conteniendo agua destilada (200 ml). Cuando el aire los atraviesa, se carga de humedad. El agua de los mismos fue renovada a diario.
- Cámaras cilíndricas (2 unidades). Consisten en cilindros de vidrio Pyrex (32 cm de longitud, 4.5 cm de diámetro interno) donde se ubican las fuentes de olor (o aire).
- Tubo en "Y". Construido en vidrio Pyrex, está formado por un brazo central (15 cm de longitud, 3 cm de diámetro interno) y 2 brazos laterales (30 cm de longitud, 3 cm de diámetro interno) separados por un ángulo de 60°. En la base del brazo central hay un orificio, que se usa para introducir a las hembras en el dispositivo y luego se cubre con Parafilm.
- Bomba de vacío (Air Cadet Vacuum/Pressure Pump, Barnat Company, USA). Se trata de una bomba de succión continua responsable de la circulación de aire desde las cámaras cilíndricas hacia los brazos del tubo en "Y". Se ubica en el suelo, sobre una base de goma espuma, para evitar transmitir las vibraciones a la mesa donde se ubica el dispositivo.

Las piezas del olfatómetro se conectan por un sistema de tapones perforados de goma atóxica (DGH SRL, Córdoba, Argentina), atravesados por un tubo de vidrio Pyrex donde encastran mangueras de silicona curada con platino (Dow Corning SRL). Este material está diseñado para aplicaciones que requieren la transferencia de fluidos con alto grado de pureza sin contaminación (i.e. medicina, fabricación de productos farmacéuticos y biotecnológicos), por lo que no emite ni absorbe sabores ni olores.

Todo el sistema (a excepción de la bomba de vacío) se situó sobre una mesa blanca, cuyos laterales fueron cubiertos con placas blancas (*foambord* de 30 cm de altura) para evitar efectos visuales. Por el mismo motivo, las cámaras cilíndricas con las fuentes de olor fueron envueltas en papel blanco. Los experimentos se realizaron dentro de la cámara de cría, en las condiciones controladas ya mencionadas. Antes del inicio, el dispositivo fue lavado por completo: las piezas de vidrio pasaron por una secuencia de agua hirviendo, acetona, etanol y secado en estufa, mientras que los tapones y mangueras pasaron por agua hirviendo, etanol y secado a temperatura ambiente. Entre repeticiones, el tubo en “Y” se lavó con etanol.

Para efectuar los ensayos, el tubo en “Y” fue dividido en 4 zonas: el brazo central (desde su base hasta la bifurcación), la bifurcación (zona de decisión para el insecto, corresponde al triángulo definido por la porción distal del brazo central y la base de los brazos laterales) y los 2 brazos laterales (derecho e izquierdo) (Figura 3.2). Cada fuente de olor consistió en 3 ramas frescas de sauce (25 cm de longitud cada una) con sus extremos envueltos en Parafilm. Se emplearon hembras recién emergidas, procedentes de la población del laboratorio, testeadas individualmente y por única vez. Cada hembra fue liberada en la base de la Y. Una vez aclimatada (i.e. al observársela caminar y mover las antenas normalmente) se encendía la bomba de vacío dando inicio al ensayo. El tiempo de permanencia en cada zona del dispositivo se cronometró utilizando el programa JWatcher versión 1.0 (Blumstein y Daniel 2007) durante 10 minutos. También se registró el primer brazo elegido por las hembras. Se evaluó la atracción relativa de *S. nigra* y *S. viminalis* al presentarlos simultáneamente como fuentes de olor, y la atracción absoluta de cada uno frente al aire limpio. La ubicación de los estímulos se alternó entre los brazos laterales para evitar efectos de posición. Se realizaron 23 réplicas de *S. nigra* frente a *S. viminalis* y *S. viminalis* frente al aire, y 25 de *S. nigra* frente al aire.



**Figura 3.2** Olfatómetro de vidrio tipo Y, con detalle de las partes que lo componen. bc=brazo central, bl=brazo lateral (derecho e izquierdo), ca=caudalímetro, cm=cámara con fuentes de olor (o aire), d=zona de decisión (bifurcación de la Y), f=filtro de carbón activado, h=humidificador, l=zona de liberación de la hembra, ➡=sentido de circulación del aire.

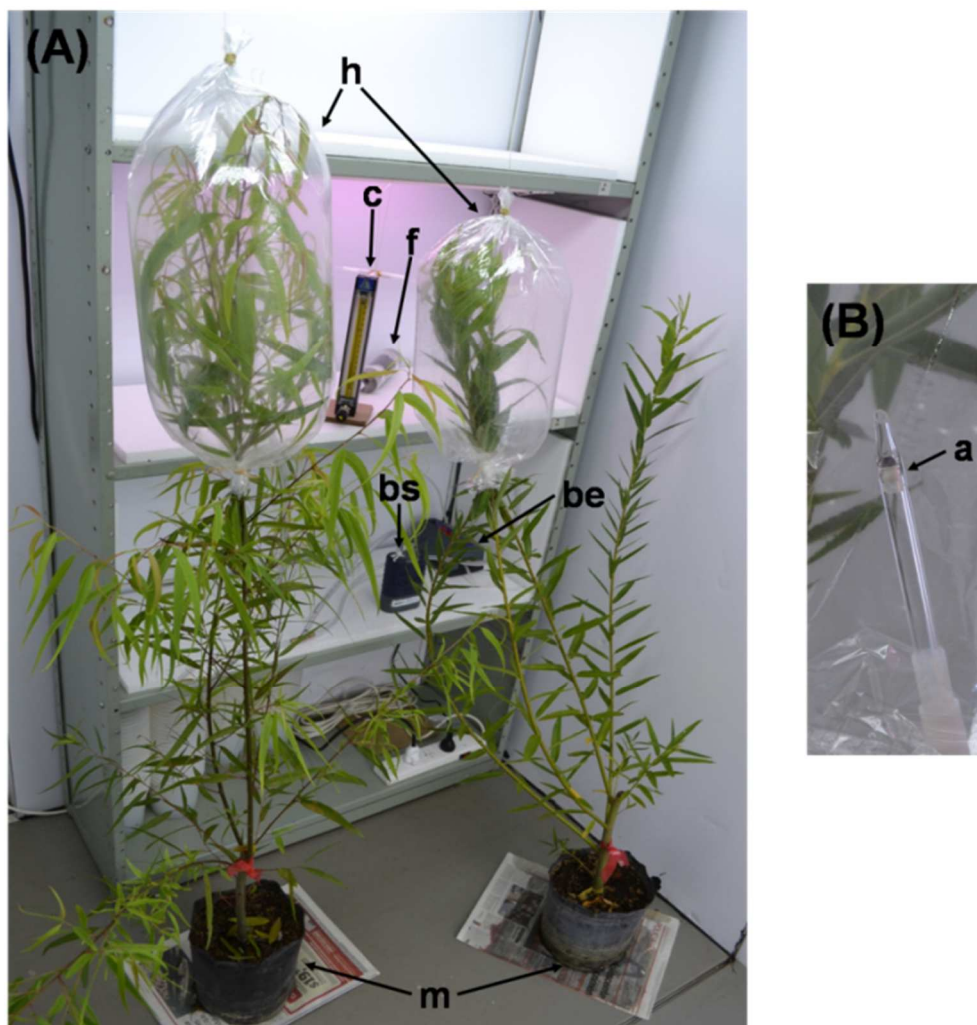
### 3.4.3 Recolección de volátiles de plantas de sauce y análisis químico

Con el objetivo de caracterizar los perfiles de compuestos volátiles emitidos por las plantas, se colectaron los volátiles del *headspace*<sup>3</sup> de sauces en maceta de 3 meses de edad, correspondientes a los genotipos *S. viminalis* y *S. nigra*. Las partes que conformaron el sistema fueron las siguientes (Figura 3.3):

- Bomba de empuje (modelo AT-703, Atman, China). Se trata de una bomba de acuario que llena de aire el *headspace*.
- Filtro de carbón activado. Consiste en un tubo de vidrio Pyrex (19.5 cm de longitud, 4.5 cm de diámetro interno) dentro del cual se coloca carbón activado granulado (120 g) rodeado de guata. Su función es purificar el aire que ingresa al dispositivo. Su contenido fue renovado semanalmente.
- Caudalímetro (modelo 112-02-A, Aalborg Instruments, Orangeburg, Nueva York, Estados Unidos). Permite regular el flujo de aire que ingresa al sistema, fijado en 0.9 L/min.
- *Headspace*. Es el espacio de cabeza de cada planta. Se definió encerrando los 50 cm apicales de la misma dentro de una bolsa de polietileno (PET, bolsas para horno marca Toppits, Minden, Alemania).
- Cartucho (trampa de recolección de volátiles). Dispositivo diseñado para la recolección de compuestos orgánicos volátiles. Es un tubo de vidrio Pyrex (7.5 cm longitud, 4 mm diámetro interno) que contiene 30 mg de adsorbente HayeSep Q (Grace, Deerfield, Illinois, Estados Unidos), sujetos por una malla de acero inoxidable (malla mesh 400, acero inoxidable T316), lana de vidrio y 2 tapones de teflon (PTFE). Se ubica en el interior del *headspace*, colectando los volátiles del mismo a medida que la corriente de aire generada por las bombas lo atraviesa.
- Bomba de succión (modelo Standard, Tuff, Bedford, Reino Unido). Aspira el aire del *headspace*, obligándolo a pasar por el cartucho.
- Tubería de teflón (PTFE). Se empleó para conectar todas las piezas del dispositivo por donde circula aire limpio (i.e. desde la salida del filtro de carbón activado hasta la entrada al *headspace*).
- Tubería tipo cristal. Conecta las piezas del sistema por donde circula aire sin filtrar (i.e. desde la salida de la bomba de empuje hasta la entrada al filtro de carbón activado, y desde la salida del *headspace* hasta la entrada a la bomba de succión).

---

<sup>3</sup> Colecta de volátiles del *headspace* (o espacio de cabeza): técnica no destructiva, portátil y libre de solventes usada para recolectar compuestos volátiles emitidos por las plantas, entre otros.



**Figura 3.3 (A)** Sistema de recolección de volátiles del *headspace* de sauces en maceta (*Salix nigra* a la izquierda, *Salix viminalis* a la derecha), **(B)** Detalle del cartucho, ubicado en el interior del *headspace*. a=adsorbente (30 mg de HayeSep Q), bs=bomba de succión, be=bomba de empuje, c=caudalímetro, f=filtro de carbón activado, h=*headspace*, m=plantas en maceta.

Las colectas se efectuaron en las condiciones controladas de la cámara de cría, empleando cada planta una única vez. Media hora previa al inicio, la bomba de empuje se encendía para garantizar que las bolsas se llenaran de aire. Posteriormente, se prendía la bomba de succión y se daba comienzo a la recolección. Las colectas duraron 6 h (entre las 10:00 y las 16:00 h). Una vez finalizadas, los cartuchos se guardaron envueltos en cinta de teflón y papel aluminio a -20 °C. Como blancos, se emplearon bolsas vacías. Se realizaron 8, 10 y 4 réplicas sobre *S. nigra*, *S. viminalis* y blancos, respectivamente.

Los compuestos volátiles se eluyeron de los cartuchos con 150  $\mu$ l de diclorometano conteniendo 5 ng de tetradecano como estándar interno. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, equipo

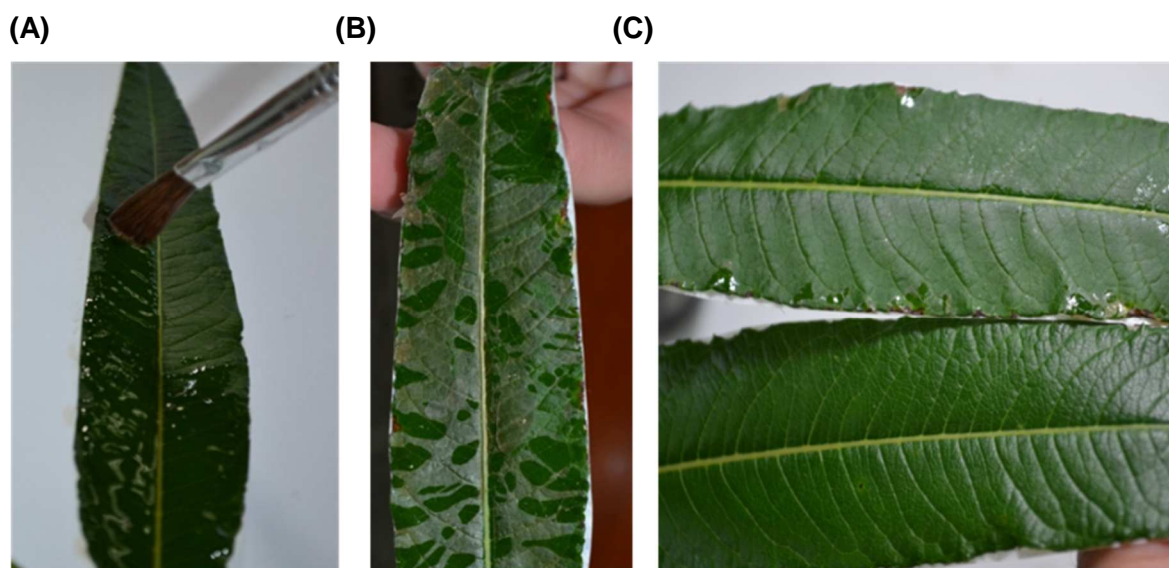
Agilent 6890 acoplado a detector selectivo de masas Agilent 5973, Agilent Technologies, Inc.). Se empleó una columna capilar J&W HP1-MS (30 m longitud × 0.25 mm diámetro interno × 0.25 µm espesor de película). Las muestras (1 µl) fueron inyectadas a 240 °C en modo *splitless*. El gas portador (gas *carrier*) fue helio con un flujo de 0.7 ml/min (presión de entrada 20.48 kPa). El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 35 °C por 1 min, luego 35-230 °C a 10 °C/min, finalmente 230 °C por 15 min. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus espectros de masa con aquellos provistos por la biblioteca NIST y por bibliotecas de productos naturales desarrollados por la Chemistry Research Unit CMAVE-USDA, y también por comparación de los tiempos de retención con los de estándares auténticos. Los estándares auténticos incluyeron 2-hexanona, hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenol, α-pineno, limoneno, salicilaldehído, (Z) y (E)-β-ocimeno, β-cariofileno, (E-E)-α-farneseno (Sigma-Aldrich) de la colección de compuestos CMAVE-USDA (Gainesville, Estados Unidos). Los compuestos fueron cuantificados relacionando el área bajo los picos con aquellas del estándar interno, y expresados como equivalente en masa del estándar interno (ng/µl). Previamente, se restaron los blancos de todas las muestras.

## CLAVES DE CONTACTO

### 3.4.4 Rol de las claves de contacto en la preferencia de oviposición

Para evaluar el rol de las ceras epicuticulares como claves de contacto, se desarrollaron ensayos de preferencia de oviposición sobre hojas cuyas ceras epicuticulares habían sido mecánicamente removidas *versus* hojas intactas del mismo genotipo de sauce. Se prepararon floreros de *S. viminalis* y *S. nigra* (4 hojas de la porción media de la rama) donde sólo las caras adaxiales se hallaban disponibles (i.e. las superficies abaxiales estaban cubiertas con cinta de papel). Para remover mecánicamente la capa de ceras epicuticulares, 2 de las 4 caras adaxiales fueron tratadas con goma arábiga (Biopack Productos Químicos, Argentina), metodología descrita por Jetter y Schäffer (2001). Se preparó una solución acuosa 50% p/p de este polisacárido, que se aplicó con pincel sobre la superficie adaxial de la hoja. Al cabo de 1 hora, la solución se secó formando una película delgada, que era despegada cuidadosamente dejando las hojas físicamente intactas (i.e. sin daños en el tejido epidérmico) y libres de ceras epicuticulares (Figura 3.4 A-C). Los experimentos se desarrollaron en contenedores plásticos translúcidos (33 × 23 × 14 cm, largo × ancho × altura) conteniendo un florero de sauce, bajo las condiciones controladas de la cámara de cría. Cada hembra recién emergida se liberaba en el centro de la arena y se mantenía allí durante 24 h. Se registró el número de huevos colocados en la superficie de cada genotipo a evaluar. Finalizado el experimento, las hembras expuestas a *S. viminalis* fueron a su vez expuestas al genotipo de cría por otras 24 h para asegurar su capacidad normal de

oviposición (dado que normalmente evitan colocar huevos sobre *S. viminalis*). Se efectuaron 18 y 24 réplicas para *S. nigra* y *S. viminalis*, respectivamente.



**Figura 3.4** Remoción mecánica de las ceras epicuticulares de la cara adaxial de la hoja (en *Salix viminalis*) mediante tratamiento con goma arábica en solución acuosa (50% p/p). **(A)** Aplicación de la solución con pincel, **(B)** Secado de la solución y formación de cristales, **(C)** Comparación de la cara adaxial tratada (arriba) y no tratada (abajo).

### 3.4.5 Caracterización de la epicutícula foliar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para evaluar la presencia de claves físicas en la superficie foliar, se tomaron fotografías de MEB de ambas caras de la hoja de los genotipos de sauce de interés. A finales de la primavera, se colectaron hojas maduras completamente expandidas de la porción media de ramas de *S. nigra* y *S. viminalis* procedentes de estaquero. Éstas se dejaron secar al aire (tapadas con papel de diario) y luego se cortaron fragmentos (2 mm × 2 mm) de la porción central. Dichos fragmentos se montaron en tacos de aluminio (portamuestras de 12.7 mm de diámetro, espiga de 3.1 mm), se metalizaron con una aleación de oro-paladio (40-60%, metalizador Termo VG Scientific SC 7620, West Sussex, Inglaterra) y se observaron mediante MEB (microscopio electrónico de barrido Philips XL 30, Eindhoven, Holanda) en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. Como resultado, se obtuvieron microfotografías de ambas caras de la hoja para *S. nigra* y *S. viminalis*.



### 3.4.6 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en diclorometano) y análisis químico

Con el objetivo de caracterizar la fracción lipofílica de la cutícula de cada cara de la hoja, se extrajeron por separado las ceras abaxiales y adaxiales de los genotipos *S. nigra* y *S. viminalis*. A principios del verano, se colectaron hojas maduras completamente expandidas e intactas de la porción media de ramas de *S. nigra* y *S. viminalis* procedentes de estaquero, que fueron almacenadas en bolsas plásticas a -20 °C hasta su uso. La extracción de ceras cuticulares solubles en diclorometano fue selectiva (i.e. discriminada según la cara de la hoja), en base al protocolo descrito por Jetter et al. 2000. Cada hoja se ubicó sobre una "alfombra" de goma, con la cara a analizar hacia arriba. Sobre ella, se posó un cilindro de vidrio Pyrex (10 mm diámetro interno) lleno con 1 ml de diclorometano. Dicho solvente se agitó por 30 seg bombeando con una pipeta Pasteur. Cada muestra consistió en los lavados obtenidos al repetir este procedimiento en 75 hojas. Si durante el proceso se producía alguna filtración de solvente entre el cilindro de vidrio y la superficie de la hoja, entonces ese lavado era descartado. Las muestras fueron secadas primero con sulfato de sodio anhidro para remover el agua, filtradas con papel (Whatman, Reino Unido), y luego evaporado el exceso de solvente bajo corriente de nitrógeno hasta alcanzar peso seco constante. En ese momento fueron pesadas y resuspendidas en diclorometano usando 25 µl de solvente/mg de muestra con agregado de 10 µg de estándar interno. Su análisis se efectuó mediante GC-MS (equipo Agilent 7890 A acoplado a detector selectivo de masas Agilent 5977). Se empleó una columna capilar J&W HP-5MS (5% fenilmetilsiloxano, 30 m longitud × 0.25 mm diámetro interno × 0.25 µm espesor de película). Las muestras (1 µl) fueron inyectadas a 250 °C en modo *splitless*. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 60-200 °C a 10 °C/min, luego 200-300 °C a 4 °C/min, finalmente 300 °C por 15 min. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus espectros de masa con aquellos provistos por bibliotecas comerciales (NBS 75 K, NIST 1999, McLafferty y Stauffer 1994) y por la literatura (Hietala et al. 1995). Los compuestos ácido palmítico, pentacosano, heptacosano, nonacosano y triacontano fueron identificados por coinyección de estándares auténticos de la colección de compuestos de INQUINOA-CONICET. La cuantificación de los mismos se efectuó relacionando sus áreas con las de los estándares internos de eicosano y dodecano, expresada como equivalente en masa del estándar interno (µg/µl). Se obtuvieron 7 muestras de ceras extraídas de la cara adaxial y 6 de la abaxial para cada genotipo de sauce.

### 3.4.7 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en metanol) y análisis químico

Se realizaron extractos metanólicos con el fin de detectar glicósidos fenólicos posiblemente asociados a las ceras epicuticulares. En enero de 2014, se colectaron hojas maduras completamente expandidas e intactas de la porción media de ramas de 5 plantas de *S. nigra* y *S. viminalis* procedentes de estaquero, que fueron almacenadas en bolsas plásticas a -20 °C hasta su uso. Aproximadamente 40 gr de hojas fueron sumergidas en 100 ml de metanol durante 20 seg y agitadas suavemente en el solvente con ayuda de una varilla de vidrio. Los extractos se filtraron primero con papel (Whatman, Reino Unido), luego con filtro de nylon 0.2 µm y por último se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno hasta alcanzar peso constante. El primer análisis se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, equipo Agilent Serie 1200 con detector de diodo G1365D y columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 4.6 longitud x 150 mm, 5 µm. Agilent Technologies, Inc.) Los sistemas de elución acuosos fueron (A) 0.1% ácido acético y (B) 100% metanol. Las muestras fueron eluidas de acuerdo al siguiente gradiente: 0 min 80% (A), 20% (B); 25 min 30% (A), 70% (B); 40 min 100% (B) a 0.65 ml/min. Las corridas fueron monitoreadas a longitudes de onda de 220, 270 y 320 nm y comparadas con un estándar de salicina (Sigma Aldrich). La identificación final de glicósidos fenólicos en dichos extractos fue realizada por el equipo del Dr. Jonathan Gershenzon (Max Planck Institute for Chemical Ecology, Department of Biochemistry, Jena, Alemania) mediante cromatografía líquida de baja resolución acoplada a espectrometría de masa (LC-MS). Se efectuaron 5 extractos metanólicos de cada genotipo.

### 3.4.8 Análisis de datos

En los experimentos de olfatometría, la proporción de tiempo transcurrida en cada brazo del dispositivo se comparó mediante la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. La primera elección de las hembras se evaluó a través de la prueba de  $\chi^2$ .

Los datos correspondientes a la recolección de volátiles se sometieron a la prueba *U* de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los compuestos individuales y los volátiles totales emitidos por *S. nigra* y *S. viminalis*. La concentración de ácido clorogénico en extractos metanólicos de la cutícula foliar se comparó de la misma manera.

Los resultados de los experimentos de preferencia de oviposición con remoción de ceras cuticulares fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas con el fin de evaluar las diferencias en el número de huevos colocados.

Todos los análisis estadísticos previamente mencionados se efectuaron empleando el paquete R 2.15.1 para Windows (R Core Team 2012).

Las diferencias en la composición química de las ceras cuticulares de los distintos genotipos fueron evaluadas a través de un análisis discriminante (programa XLSTAT 2015.2.02.17945), con el genotipo de sauce y la superficie de la hoja como factores independientes y las concentraciones químicas como factores dependientes.

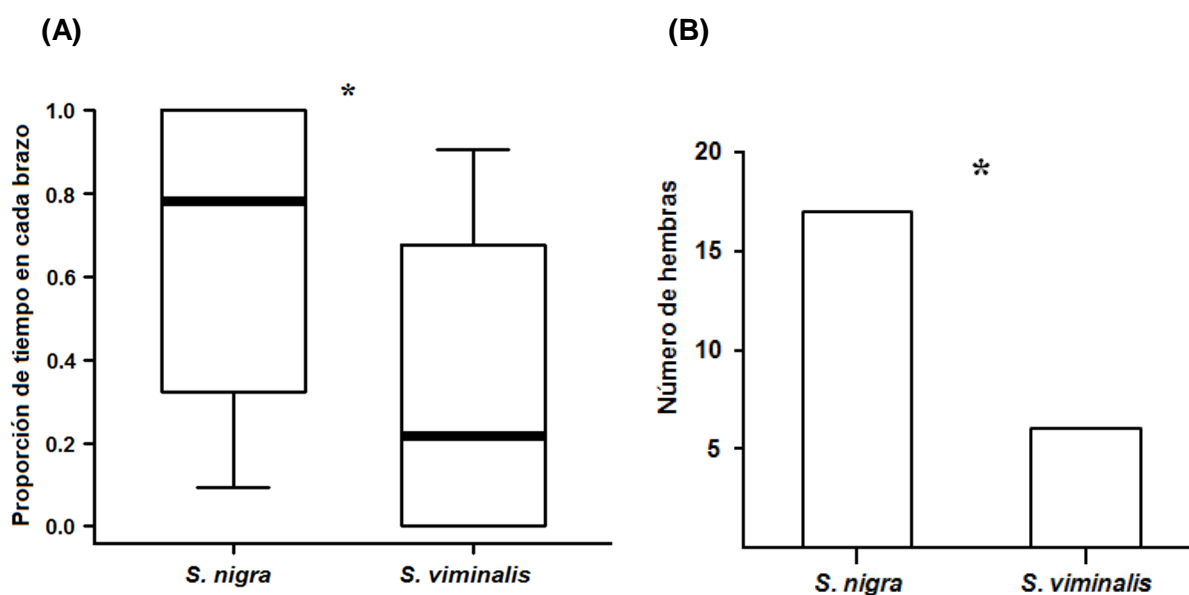
### 3.5 Resultados

#### CLAVES VOLÁTILES

##### 3.5.2 Elección en olfatometría

Al evaluar la atracción de los volátiles de sauce *versus* el aire limpio, las hembras no mostraron preferencia por ninguno de los genotipos ofrecidos (Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=25, p=0.1693 para *S. nigra* frente al aire, y N=23, p=0.1918 para *S. viminalis* frente al aire). Tampoco se registraron diferencias en la primera elección de las hembras entre el brazo del olfatómetro con olor *versus* aquel con aire limpio, en ninguno de los 2 casos (Prueba de  $\chi^2$ , N=25, p=0.8415 para *S. nigra* frente al aire, y N=23, p=0.2971 para *S. viminalis* frente al aire).

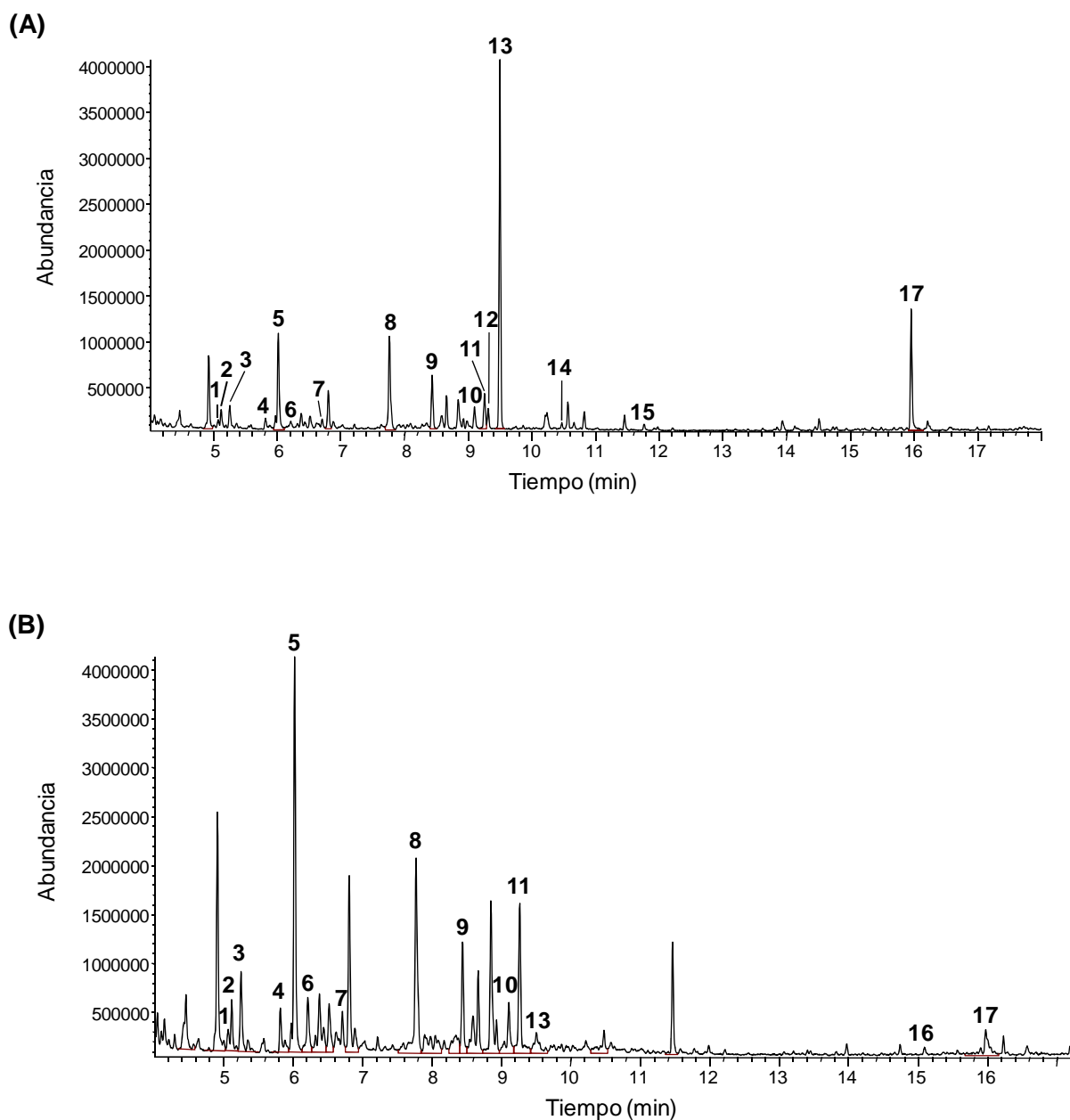
Sin embargo, al analizar la atracción relativa de *S. nigra* en comparación con *S. viminalis* se observó que *N. oligospilus* pasa significativamente más tiempo en el brazo del olfatómetro conectado a *S. nigra* (Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=23, p<0.05) (Figura 3.6 A). Un patrón similar se registró al evaluar la primera elección: significativamente más hembras optaron primero por el brazo del equipo conectado a *S. nigra* (Prueba de  $\chi^2$ , N=23, p<0.05) (Figura 3.5 B).



**Figura 3.5** Experimentos de atractividad relativa de *Nematus oligospilus* frente a volátiles de *Salix nigra* y *Salix viminalis* presentados en un olfatómetro de vidrio tipo Y. **(A)** Proporción de tiempo que pasan las hembras en cada brazo del olfatómetro en relación al total de tiempo transcurrido en ambos brazos. Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=23. \* indica diferencias significativas a  $p < 0.05$ . **(B)** Número de hembras cuya primera elección es el brazo del olfatómetro con *S. nigra* o con *S. viminalis*. Prueba de  $\chi^2$ , N=23. \* indica diferencias significativas a  $p < 0.05$ .

### 3.5.3 Recolección de volátiles de plantas de sauce y análisis químico

En total, se identificaron 16 y 14 compuestos volátiles en el *headspace* de plantas de *S. nigra* y *S. viminalis*, respectivamente (Figura 3.6). En *S. nigra*, la cantidad de volátiles totales emitida fue más del triple que en *S. viminalis* (Prueba *U* de Mann-Whitney, N=8 y N=10 para *S. nigra* y *S. viminalis*, respectivamente,  $p < 0.05$ ). Entre otros compuestos, los perfiles de volátiles de ambos genotipos incluyeron mono y sesquiterpenos tales como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, (Z)- $\beta$ -ocimeno, (E)- $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -farneseno, y volátiles de hojas verdes como hexanal, (E)-2-hexenal y (Z)-3-hexenol. La presencia de (Z)- $\beta$ -ocimeno, undecano y decanal solo se detectó en *S. nigra*, mientras que  $\beta$ -cariofileno solo estuvo presente en *S. viminalis*. Además, se registraron cantidades significativamente superiores de (E)- $\beta$ -ocimeno en *S. nigra* (Prueba *U* de Mann-Whitney, N=8 y N=10 para *S. nigra* y *S. viminalis*, respectivamente,  $p < 0.05$ ). Si bien se observa una tendencia de mayor cantidad de  $\alpha$ -farneseno en *S. nigra*, no se detectaron diferencias significativas entre genotipos, posiblemente debido a la variabilidad de los datos (Tabla 3.1).



**Figura 3.6** Perfiles cromatográficos obtenidos al coleccionar durante 6 h los volátiles del *headspace* de plantas de **(A)** *Salix nigra* (N=8) y **(B)** *Salix viminalis* (N=10). Los compuestos indicados corresponden a: (1) 1,8 nonadienol, (2) 2-hexanona, (3) hexanal, (4) 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, (5) (E)-2-hexenal, (6) (Z)-3-hexenol, (7) 2-heptanona, (8)  $\alpha$ -pineno, (9)  $\beta$ -pineno, (10) salicilaldehído, (11) limoneno, (12) (Z)- $\beta$ -ocimeno, (13) (E)- $\beta$ -ocimeno, (14) undecano, (15) decanal, (16)  $\beta$ -cariofileno, (17)  $\alpha$ -farneseno.

**Tabla 3.1** Compuestos volátiles registrados en el *headspace* de plantas en maceta de *Salix nigra* y *Salix viminalis*.

Tiempo de retención	Compuesto	<i>Salix nigra</i>		<i>Salix viminalis</i>		p
		Media	EE	Media	EE	
5.06	1,8 nonadienol	0.02	0.02	0.04	0.02	ns
5.11	2-hexanona	0.08	0.04	0.05	0.02	ns
5.25	Hexanal	0.19	0.08	0.14	0.03	ns
5.81	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	0.08	0.03	0.08	0.02	ns
6.01	(E)-2-hexenal	0.52	0.27	0.37	0.16	ns
6.21	(Z)-3-hexenol	0.05	0.03	0.06	0.03	ns
6.70	2-heptanona	0.03	0.02	0.02	0.01	ns
7.77	$\alpha$ -pineno	0.37	0.13	0.53	0.19	ns
8.43	$\beta$ -pineno	0.17	0.06	0.30	0.11	ns
9.10	Salicilaldehído	0.09	0.04	0.04	0.02	ns
9.25	Limoneno	0.23	0.11	0.19	0.07	ns
9.31	(Z)- $\beta$ -ocimeno	0.17	0.06	-	-	*
9.50	(E)- $\beta$ -ocimeno	4.71	2.01	0.15	0.06	*
10.47	Undecano	0.07	0.06	-	-	*
11.77	Decanal	0.03	0.01	-	-	*
15.09	$\beta$ -cariofileno	-	-	0.03	0.01	*
15.97	$\alpha$ -farneseno	1.07	0.50	0.22	0.05	ns
Volátiles totales		7.88	3.45	2.23	0.80	*

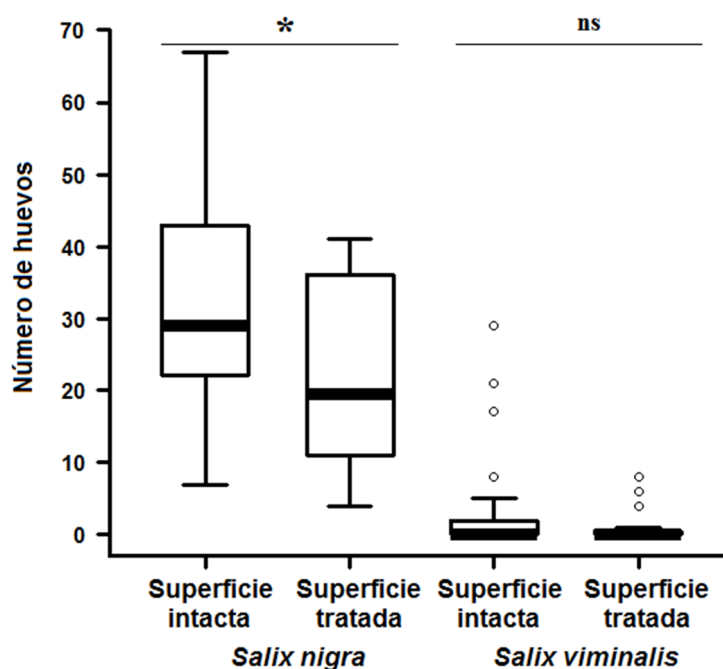
El tiempo de retención de cada compuesto se expresa en minutos.

La cantidad de volátiles emitidos por los 50 cm apicales de plantas en maceta de los genotipos *S. nigra* (N=8) y *S. viminalis* (N=10) durante 6 h se expresa como ng/ $\mu$ l. Prueba *U* de Mann-Whitney. \* corresponde a diferencias significativas a  $p < 0.05$ , ns indica diferencias no significativas.

## CLAVES DE CONTACTO

### 3.5.4 Rol de las claves de contacto en la preferencia de oviposición

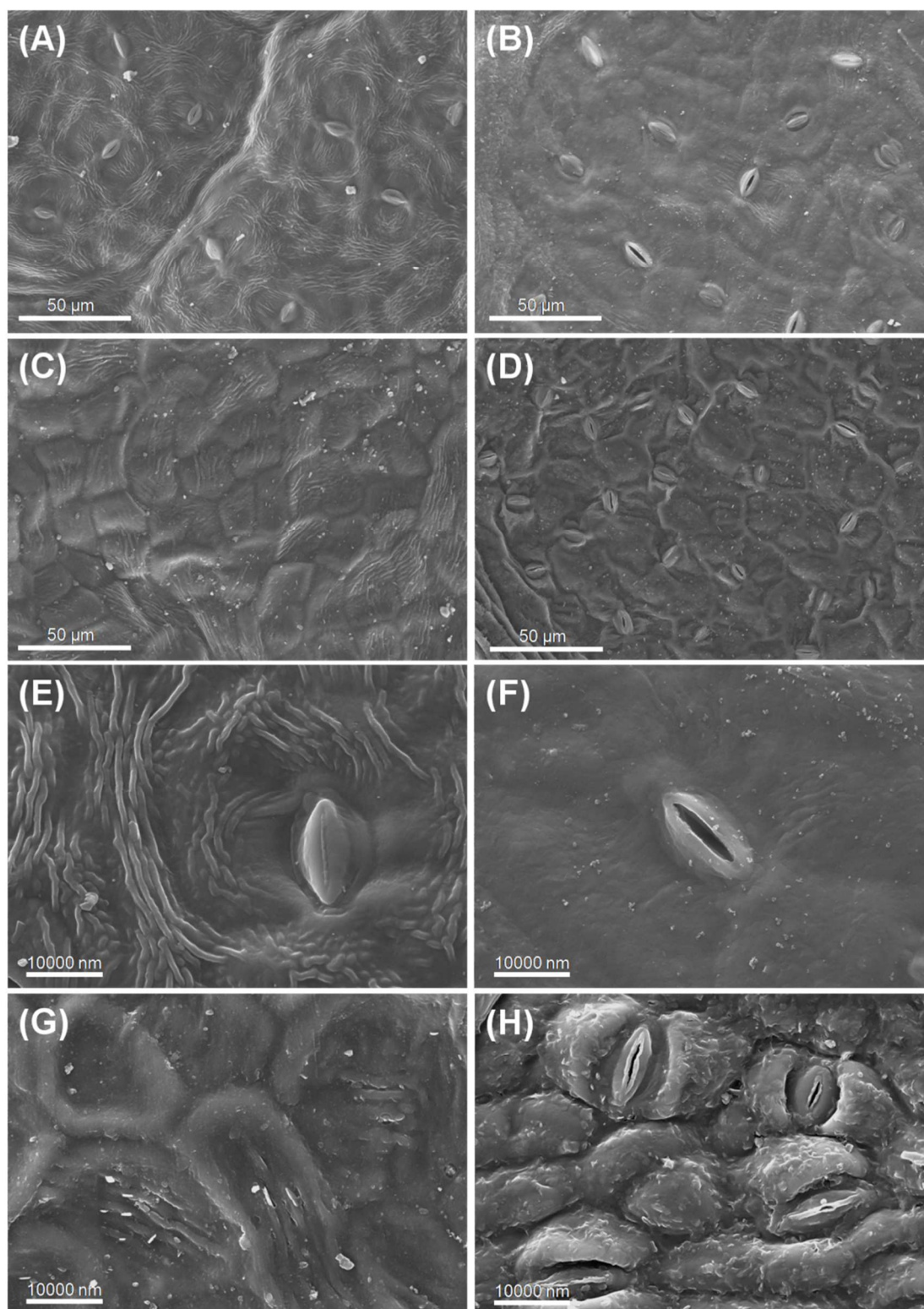
Los resultados de este experimento revelaron que las hembras colocan significativamente menos huevos en la superficie de la hoja de *S. nigra* tratada con goma arábica (i.e. la superficie foliar sin ceras epicuticulares). Si bien se observa una tendencia, no se registraron diferencias en *S. viminalis* (Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=18,  $p < 0.05$  y N=24,  $p = 0.058$ , respectivamente) (Figura 3.7). Por otro lado, tampoco se evidenció un incremento en el número de huevos colocados por las hembras en *S. viminalis*, lo que sugeriría la ausencia de compuestos repelentes entre las ceras epicuticulares de este genotipo.



**Figura 3.7** Número de huevos colocados sobre la superficie adaxial de hojas intactas y tratadas de *Salix nigra* y *Salix viminalis*. En las hojas tratadas, las ceras epicuticulares fueron removidas mecánicamente aplicando goma arábiga. Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, N=18 y N=24 para *S. nigra* y *S. viminalis*, respectivamente. \* corresponde a diferencias significativas a  $p < 0.05$ , ns indica diferencias no significativas

### 3.5.5 Caracterización de la epicutícula foliar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las fotografías de MEB revelaron que la cara adaxial (Figura 3.8 A, C, E, G) y abaxial (Figura 3.8 B, D, F, H) de la hoja de ambos genotipos se encuentra cubierta por una delgada capa homogénea de ceras. En la superficie adaxial de *S. nigra*, las ceras se distribuyen formando tubos (Figura 3.8 A, E). En ninguno de los 2 genotipos se observan tricomas.



**Figura 3.8** Fotografías de microscopía electrónica de barrido correspondientes a la epidermis foliar.

Vista general de (A) *Salix nigra*, cara adaxial, (B) *S. nigra*, cara abaxial, (C) *Salix viminalis*, cara adaxial, (D) *S. viminalis*, cara abaxial. Detalle de (E) *S. nigra*, cara adaxial, (F) *S. nigra*, cara abaxial, (G) *S. viminalis*, cara adaxial, (H) *S. viminalis*, cara abaxial.



### 3.5.6 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en diclorometano) y análisis químico

El análisis selectivo de la composición química de ceras cuticulares según la cara de la hoja mostró diferencias tanto entre los 2 genotipos como entre las caras del mismo genotipo de sauce (Tabla 3.2). *Salix nigra*, el genotipo preferido por las hembras para oviponer, mostró un perfil complejo en ambas superficies de la hoja, que incluyó ácidos grasos, alcoholes, ésteres, esteroides y  $\beta$ -amirina. En contraste, el perfil de *S. viminalis* resultó menos rico en cuanto a familias de compuestos. Sus componentes mayoritarios fueron alcanos alifáticos de cadena impar, representando cerca del 84% y 90% de la superficie adaxial y abaxial, respectivamente. La superficie abaxial de la hoja de *S. viminalis*, donde las hembras prácticamente nunca colocan huevos, presentó la menor diversidad de compuestos en sus ceras.

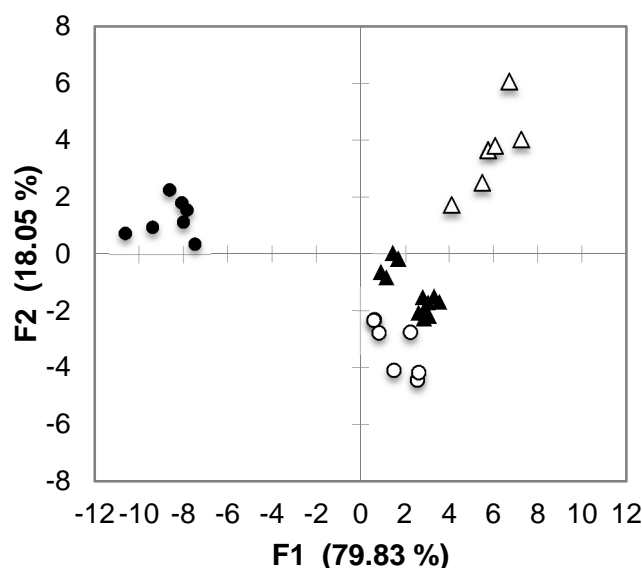
**Tabla 3.2** Ceras cuticulares de *Salix nigra* y *Salix viminalis*: compuestos detectados en la fracción soluble en diclorometano según la cara de la hoja.

TR	Compuesto	<i>Salix nigra</i>				<i>Salix viminalis</i>			
		Adaxial		Abaxial		Adaxial		Abaxial	
		Media	EE	Media	EE	Media	EE	Media	EE
7.80	Alcohol salicílico	tr		tr		-	-	-	-
9.96	Ácido trans-cinámico	tr		tr		-	-	-	-
16.20	Ácido palmítico	3.31	1.90	1.68	0.94	0.63	0.37	tr	
17.19	Ácido esteárico	tr		tr		tr		-	-
19.05	Ácido eicosanoico	tr		tr		-	-	-	-
24.60	Pentacosano	0.51	0.21	1.23	0.38	1.07	0.40	4.88	0.80
28.05	Heptacosano	13.83	2.69	27.64	1.79	30.03	0.72	50.01	1.90
31.38	Nonacosano	24.09	3.00	43.16	2.60	53.77	2.10	39.27	2.25
33.53	Probable alqueno	0.50	0.24	1.92	0.67	1.62	0.94	tr	
34.50	Triacotano	1.61	0.76	7.50	3.09	4.88	0.86	1.99	0.59
35.11	Alcohol terminal	6.74	3.33	3.94	2.20	-	-	tr	
37.86	Estigmasterol/sitosterol	3.57	2.42	5.55	2.39	tr		-	-
38.46	$\beta$ -amirina	14.72	2.91	3.16	1.19	4.27	1.40	tr	
41.79	Éster alifático de cadena larga	28.58	1.48	3.21	1.18	3.02	1.17	tr	

El tiempo de retención (TR) de cada compuesto se expresa en minutos.

La cantidad de compuestos presentes en la fracción soluble en diclorometano, correspondientes a ceras cuticulares de las caras adaxial (N=7) y abaxial (N=6) de *S. nigra* y *S. viminalis*, se expresa como  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . tr indica trazas. Los espectros de masa de algunos de los compuestos identificados se muestran en el Anexo I.

Los datos cuantitativos del análisis de ceras fueron sometidos a un análisis discriminante como técnica multivariada para la discriminación de genotipos. Los resultados mostraron que no sólo se separaron los distintos genotipos según su composición de ceras cuticulares, sino que también se diferenciaron las caras de la hoja. El primer y el segundo factor explicaron el 97.87% de la varianza (Figura 3.9). Los autovalores correspondientes fueron 35.1 y 7.9 para los factores 1 y 2, respectivamente.



**Figura 3.9** Factores 1 y 2 del análisis discriminante mostrando la separación de genotipos de sauce y caras de la hoja en función de los compuestos cuticulares presentes. La extracción selectiva de ceras se efectuó empleando un cilindro de vidrio dentro del cual se bombeaba el solvente (diclorometano). El porcentaje de varianza explicado por cada eje se indica entre paréntesis. Los datos corresponden a ambas caras de la hoja de 2 genotipos de sauce: *Salix nigra* adaxial (●) (N=7), *S. nigra* abaxial (▲) (N=6), *Salix viminalis* adaxial (○) (N=7), *S. viminalis* abaxial (△) (N=6).

### 3.5.7 Extracción de ceras cuticulares de sauce (fracción soluble en metanol) y análisis químico

Los análisis de extractos metanólicos de cutícula de *S. nigra* y *S. viminalis* revelaron diferencias en la composición de compuestos fenólicos (Tabla 3.3). La superficie foliar de *S. nigra*, genotipo preferido para oviponer, presentó salicina, salicortina, tremulacina (glicósidos fenólicos ausentes en *S. viminalis*) y ácido clorogénico. En *S. viminalis*, la concentración de ácido clorogénico fue significativamente superior (Prueba *U* de Mann-Whitney, N=5,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 3.3** Ceras cuticulares de *Salix nigra* y *Salix viminalis*: compuestos fenólicos detectados en la fracción soluble en metanol.

Tiempo de retención	Compuesto	<i>Salix nigra</i>		<i>Salix viminalis</i>		p
		Media	EE	Media	EE	
7.2	Salicina	0.93	0.13	-	-	
10.3	Ácido clorogénico	0.11	0.02	0.62	0.10	*
15.8	Salicortina	4.79	0.83	-	-	
28.2	Tremulacina	7.67	0.91	-	-	

El tiempo de retención de cada compuesto, según análisis por HPLC, se expresa en minutos.

La cantidad de compuestos presentes en la fracción soluble en metanol de las ceras cuticulares de *S. nigra* y *S. viminalis* (N=5 para cada genotipo), según análisis por LC-MS, se expresa como mg/g (mg de analito/peso del extracto final). Prueba *U* de Mann-Whitney. \* corresponde a diferencias significativas a  $p < 0.05$ .

Los espectros de masa de los compuestos identificados se muestran en el Anexo II.

### 3.6 Discusión

Este capítulo se inició con bioensayos de elección en olfatometría con el fin de analizar el rol de los compuestos volátiles de sauce como claves olfativas para *N. oligospilus*. Los resultados de estos experimentos revelaron que las hembras se orientan hacia los volátiles de *S. nigra*, genotipo más preferido para la oviposición, al colocar ambos estímulos olfativos (i.e. ramas de *S. nigra* y de *S. viminalis*) en el dispositivo.

El análisis de compuestos del *headspace* de plantas intactas reveló que *S. nigra*, genotipo preferido por las hembras para oviponer, emite más del triple de compuestos volátiles totales que *S. viminalis*, y la abundancia de (Z) y (E)- $\beta$ -ocimeno, undecano y decanal es significativamente superior. En cambio, en *S. viminalis* fue superior la abundancia de  $\beta$ -cariofileno. Mientras que el  $\beta$ -ocimeno dominó la mezcla de volátiles de *S. nigra* (representando alrededor del 62%), constituyó solo el 6% del perfil de *S. viminalis*. Al alcanzar el último estadio, las larvas de *N. oligospilus* normalmente empupan en las hojas o tallos de la planta o, especialmente las invernantes, enterradas en el suelo. Las claves volátiles de la planta hospedera serían especialmente relevantes en aquellas hembras que emergen del suelo y deben buscar la planta hospedadora donde colocar sus huevos. Una mayor concentración de volátiles *per se* (tal como se observó en *S. nigra*) podría determinar una clave olfativa más intensa que atraiga a las hembras de esta especie. Además, algunos de los compuestos volátiles registrados en los perfiles de *Salix* fueron cruciales en otras especies de avispa sierra para determinar la idoneidad de su planta hospedera. Tanto

Piesik et al. (2008) como Buteler y Weaver (2012) sostienen que la presencia  $\beta$ -ocimeno es clave para que *Cephus cinctus* Norton coloque sus huevos en tallos de trigo de ciertos cultivares. Por otro lado, Kehl et al. (2010) registraron actividad electroantenográfica para  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -farneseno en *Pontania proxima* Serville, sugiriendo que ambos compuestos actuarían como claves de orientación de largo alcance. Ensayos comportamentales empleando compuestos individuales y mezclas de proporciones definidas, en conjunto con registros electroantenográficos, son necesarios para comprender cuáles son las claves volátiles específicas involucradas en la orientación de *N. oligospilus* hacia su planta hospedera.

El hecho de no observar ninguna preferencia al evaluar cada fuente de olor *versus* aire limpio puede explicarse de 2 maneras: por la falta de contraste, y por la falta de "claves del hábitat". Además de resultar atraídos por compuestos de la planta hospedera, los insectos especialistas tienden a ser más disuadidos que los generalistas por los metabolitos secundarios de plantas no hospederas. Así, Bernays (2001) propone que los especialistas se benefician del contraste entre claves "positivas" y "negativas", situación que no se dio en esos ensayos. Por otro lado, en los últimos años aumentó la evidencia sobre la importancia de las llamadas "claves del hábitat" en la localización del hospedero por parte de insectos de gremios muy variados (Webster y Cardé 2017, y sus referencias). Dichas claves comprenden una cantidad de volátiles generales que aportan información del sitio donde podría hallarse el hospedero, y su empleo favorecería la eficiencia de forrajeo de los insectos de diferentes formas (e.g. direccionando su desplazamiento, incrementando la velocidad de sus movimientos, reforzando su sensibilidad a las claves del hospedero). Lamentablemente, el empleo de claves de hábitat no fue considerado en esta serie de experimentos.

Inmediatamente después de posarse en la planta, las hembras despliegan una serie de comportamientos sobre la hoja que indicarían su evaluación como potencial sitio de oviposición (tema a discutir en el Capítulo 4). Esto refuerza la hipótesis de que existen claves de contacto en la superficie foliar que son cruciales para disparar la deposición de huevos. Si bien la micromorfología de las ceras epicuticulares de *S. nigra* y *S. viminalis* es similar (tanto entre caras de la hoja de un mismo genotipo, como entre genotipos), existen casos donde los patrones de deposición son marcadamente diferentes. Un ejemplo son aquellos sauces empleados en el Capítulo 2 de esta tesis (i.e. *S. babylonica* var. Sacramenta, *S. babylonica* × *S. alba*, *S. matsudana* × *S. alba*, [*S. babylonica* × *S. humboldtiana*] × *S. matsudana*), que presentan cantidades conspicuas de depósitos cristalinos (estructuras conicoides) únicamente en la superficie abaxial de la hoja, responsables de su aspecto glauco. La micromorfología de la epicutícula puede interferir

en la adhesión y locomoción de los insectos en la hoja, sobre todo si existen depósitos cristalinos de ceras cubriendo la superficie (Eigenbrode 2004, Borodich et al. 2010). Como se comentó antes, las hojas maduras de *S. nigra* y *S. viminalis* carecen de tricomas y muestran una disposición uniforme de ceras epicuticulares formando una capa delgada. Por ende, las enormes diferencias en la preferencia de oviposición no se relacionarían con barreras físicas, como sí sucede en otros insectos (Calatayud et al. 2008). Contrariamente, estarían ligadas a claves químicas de contacto, tal como fue propuesto para lepidópteros (Renwick et al. 1992, Udayagiri y Mason 1995, 1997, Li y Ishikawa 2006, Juma et al. 2016), dípteros (Städler y Buser 1984, Hopkins et al. 1997), coleópteros (Parr et al. 1998, Müller y Hilker 2001) e incluso otros tentredínidos (Kolehmainen et al. 1994, Roininen et al. 1999).

Los análisis de extractos foliares de la fracción soluble en diclorometano revelaron que las hojas de *S. nigra* poseen mayor diversidad química en su superficie, incluyendo alcoholes, ácidos grasos, esteroides, triterpenoides y ésteres además de alcanos. En *S. viminalis*, menos del 11% de su composición corresponde a compuestos diferentes a alcanos. A su vez, la cara adaxial de este genotipo es químicamente más compleja que la abaxial, superficie donde *N. oligospilus* evita oviponer (resultados del Capítulo 2). Existen numerosos ejemplos de compuestos lipofílicos presentes en la cutícula foliar que actúan como claves de contacto responsables del reconocimiento y la oviposición sobre la planta hospedera. Para la polilla barrenadora del tallo *Busseola fusca* Fuller, la presencia de nonacosano y ciertos triterpenoides (i.e.  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina) constituye la clave química que explica la preferencia de oviposición en sorgo (Juma et al. 2016). Similarmente, alcanos presentes en la epicutícula de hojas de maíz (i.e. hexacosano, heptacosano, octacosano, nonacosano y triacontano) determinan la oviposición del barrenador de maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner (Udayagiri y Mason 1997). Por último, la mezcla de alcanos y ácidos grasos libres, propios de la epicutícula foliar, desencadenan la oviposición de *Ostrinia latipennis* Warren en su planta hospedera (Li y Ishikawa 2006).

Los análisis de una fracción más polar de la cutícula foliar mediante lavados con metanol revelaron la presencia de ciertos glicósidos fenólicos en *S. nigra*, genotipo preferido por las hembras de *N. oligospilus*, y su ausencia en *S. viminalis*. Dichos compuestos podrían estar actuando como claves inequívocas de oviposición, observación que se apoya en trabajos previos que sugieren la presencia de metabolitos secundarios en la superficie foliar actuando como kairomonas (Müller 2006, y sus referencias). Sin embargo, a pesar de muchos años de investigación, continúa siendo difícil establecer protocolos para determinar inequívocamente qué compuestos se hallan en la superficie de la planta y cuáles en los tejidos subyacentes (Shroff et al. 2015). En general, la química foliar se ha investigado sumergiendo las hojas en solventes (Buschhaus y Jetter 2011) o mediante diferentes

métodos de adhesión usando agua congelada y glicerol (Ensikat et al. 2000), acetato de celulosa (Müller y Hilker 2001) o goma arábiga (Jetter y Schäffer 2001). Si bien la mayoría de los trabajos en salicáceas describen la presencia de glicósidos fenólicos sin determinar su localización en la hoja (Julkunen-Tiitto 1985, 1986, 1989, Nyman y Julkunen-Tiitto 2005), recientemente Snyder et al. (2015) confirmaron la presencia de salicortina en la superficie foliar de *Populus* mediante la técnica de ionización por *electrospray* de las hojas acoplada a espectrometría de masa, observación que apoya la hipótesis de que los glicósidos fenólicos podrían estar actuando en superficie como claves de oviposición para las hembras de *N. oligospilus*.

En algunos sistemas, los lípidos cuticulares junto con componentes más polares conforman una huella química que determina el reconocimiento de la planta hospedera (Müller y Riederer 2005), actuando sinérgicamente como estimulantes de la oviposición una vez que el insecto se posa sobre la planta (Müller 2006, y sus referencias). En el capítulo anterior se postuló la asociación entre el contenido de salicina de la hoja y el número de huevos colocados por *N. oligospilus*, siendo *S. nigra* el genotipo con mayores niveles de este compuesto y el más preferido por las hembras para oviponer. Los resultados de este capítulo revelan que *S. nigra* poseen mayor variedad de lípidos en su cutícula foliar presumiblemente asociados a glicósidos fenólicos, lo que podría constituir la huella química que determina el reconocimiento de la hoja en las hembras de *N. oligospilus*. De esta manera, las ceras cuticulares foliares resultarían críticas para la oviposición y, junto con los glicósidos fenólicos de superficie, determinarían la preferencia observada. Un perfil simple de alcanos, además de la ausencia de glicósidos fenólicos, inhibiría por completo la colocación de huevos tal como fue observado en la superficie abaxial de *S. viminalis*, presumiblemente debido a la falta de claves de reconocimiento de este genotipo como potencial hospedero. Un perfil más complejo de ceras cuticulares, con compuestos diferentes a alcanos pero aún en ausencia de glicósidos fenólicos, explicaría las pocas oviposiciones registradas en la cara adaxial de las hojas de *S. viminalis*. Por último, la mayor proporción de compuestos no alcanos en la cutícula, junto con la presencia de glicósidos fenólicos, determinaría la preferencia de oviposición de *N. oligospilus* sobre ambas caras de la hoja del genotipo *S. nigra*.

### 3.7 Referencias

- Bernays EA, Chapman RF. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, New York.
- Baldwin IT. 2010. Plant volatiles. *Current Biology*, 20(9): 392-397.
- Bargel H, Barthlott W, Koch K, Schreiber L, Neinhuis C. 2004. Plant cuticles: multifunctional interfaces between plant and environment, pp. 171-194. En: Hemsley AR y Poole I (eds.). *The evolution of plant physiology*. Elsevier Academic Press, London.
- Bargel H, Koch K, Cerman Z, Neinhuis C. 2006. Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes - a smart material? *Functional Plant Biology*, 33: 893-910.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126: 237-260.
- Bernays EA. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology*, 46: 703-727.
- Blumstein DT, Daniel JC. 2007. *Quantifying behavior the JWatcher way*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Borodich FM, Gorb EV, Gorb SN. 2010. Fracture behaviour of plant epicuticular wax crystals and its role in preventing insect attachment: a theoretical approach. *Applied Physics A*, 100: 63-71.
- Brooks JS, Williams EH, Feeny P. 1996. Quantification of contact oviposition stimulants for black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, on the leaf surfaces of wild carrot, *Daucus carota*. *Journal of Chemical Ecology*, 22(12): 2341-2357.
- Bruce TJA, Wadhams LJ, Woodcock CM. 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10(6): 69-274.
- Buschhaus C, Herz H, Jetter R. 2007. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Annals of Botany*, 100: 1557-1564.
- Buschhaus C, Jetter R. 2011. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany*, 62(3): 841-853.
- Buteler M, Weaver D. 2012. Host selection by the wheat stem sawfly in winter wheat and the role of semiochemicals mediating oviposition preference. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143: 138-147.
- Calatayud PA, Ahuya PO, Wanjoya A, Le Rü B, Silvain J, Frérot B. 2008. Importance of plant physical cues in host acceptance for oviposition by *Busseola fusca*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126(3): 233-243.
- Cameron KD, Teece MA, Bevilacqua E, Smart LB. 2002. Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry*, 60: 715-725.
- Chamel A, Pineri M, Escoubes M. 1991. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell and Environment*, 14: 87-95.
- Djerrid S, Wu BR, Stammitti L, Garrec JP, Derrien A. 1996. Chemicals on the leaf surface, information about the plant available to insects. *Ecologia Experimentalis et Applicata*, 80: 197-201.

- Domínguez E, Heredia A. 1999. Water hydration in cutinized cell walls: a physico-chemical analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426: 168-176.
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A. 2011. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytologist*, 189: 938-949.
- Donaldson JR, Stevens MT, Barnhill HR, Lindroth RL. 2006 Age-related shifts in leaf chemistry of clonal Aspen (*Populus tremuloides*). *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1415-1429.
- Eigenbrode SD. 2004. The effects of plant epicuticular waxy blooms on attachment and effectiveness of predatory insects. *Arthropod Structure & Development*, 33: 91-102.
- Eigenbrode SD, Espelie KE. 1995. Effects on plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annual Review of Entomology*, 40: 171-194.
- Enskat H, Neinhuis C, Barthlott W. 2000. Direct access to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method. *International Journal of Plant Sciences*, 161(1): 143-148.
- Feeny P, Paauwe K, Demong N. 1970. Flea beetles and mustard oils: host plant specificity of *Phyllotreta cruciferae* and *P. striolata* adults (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 63(3): 832-841.
- Free J, Williams I. 1978. The responses of the pollen beetle, *Meligethes aeneus*, and the seed weevil, *Ceuthorrhynchus assimilis*, to oil-seed rape, *Brassica napus*, and other plants. *Journal of Applied Ecology*, 15(15): 761-774.
- Gupta P, Thorsteinson A. 1960. Food plant relationships of the diamond-back moth (*Plutella maculipennis* (Curt.)) - II. Sensory regulation of oviposition of the adult female. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 3: 305-314.
- Hietala T, Mozes N, Genet MJ, Rosenqvist H, Laakso S. 1995. Surface lipids and their distribution on willow (*Salix*) leaves: a combined chemical, morphological and physicochemical study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 8: 205-215.
- Hietala T, Laakso S, Rosenqvist H. 1997. Epicuticular waxes of *Salix* species in relation to their overwintering survival and biomass productivity. *Phytochemistry*, 40(1): 23-27.
- Holloway PJ. 1982. En: *The plant cuticle* (Cutler DF, Alvin KL y Price CE, Eds.) Academic Press, New York.
- Hopkins R, Birch A, Griffiths D, Baur R, Städler E, Mckinlay R. 1997. Leaf surface compounds and oviposition preference of turnip root fly *Delia floralis*: the role of glucosinolate and nonglucosinolate compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 23(3): 629-643.
- Hunt G, Bakere E. 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry*, 19: 1415-1419.
- Inui Y, Miyamoto Y, Ohgushi T. 2003. Comparison of volatile leaf compounds and herbivorous insect communities on three willow species. *Population Ecology*, 45: 41-46.
- Jetter R, Schäffer S, Riederer M. 2000. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell and Environment*, 23: 619-628.



- Jetter R, Schäffer S. 2001. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology*, 126(4): 1725-1737.
- Jetter R, Kunst L, Samuels AL. 2006. Composition of plant cuticular waxes. En: *Biology of the plant cuticle*. Riederer M, Müller C (eds). Annual Plant Reviews, 23. Oxford, UK: Blackwell Publishing: 145-181.
- Juma G, Clément G, Ahuya P, Hassanali A, Derridj S, Gaertner C, Linard R, Le Ru B, Frérot B, Calatayud P. 2016. Influence of host-plant surface chemicals on the oviposition of the cereal stemborer *Busseola fusca*. *Journal of Chemical Ecology*, 42(5): 394-403.
- Julkunen-Tiitto R. 1985. Chemotaxonomical screening of phenolic glycosides in northern willow twigs by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 324: 129-139
- Julkunen-Tiitto R. 1986. A chemotaxonomic survey of phenolics in leaves of salicacea species. *Phytochemistry*, 25(3): 663-667.
- Julkunen-Tiitto R. 1989. Constituents of *Salix*: a chemotaxonomic survey of further Finnish species. *Phytochemistry*, 28(8): 2115-2125.
- Kehl A, Dötterl S, Aas G, Rambold G. 2010. Is flower scent influencing host plant selection of leaf-galling sawflies (Hymenoptera, Tenthredinidae) on willows? *Chemoecology*, 20(3): 215-221.
- Kolattukudy P. 1981. Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology*, 32: 539-67.
- Kolehmainen J, Roininen H, Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J. 1994. Importance of phenolic glycosides in host selection of shoot galling sawfly *Euura amerinae* on *Salix petandra*. *Journal of Chemical Ecology*, 20(9): 2455-2466.
- Krauss P, Markstadter C, Riederer M. 1997. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant, Cell and Environment*, 20: 1079-1085.
- Laguna L, Casado C, Heredia A. 1999. Flavonoid biosynthesis in tomato fruit cuticles after in vivo incorporation of 3 H-phenylalanine precursor. *Physiologia Plantarum*, 105: 491-498.
- Li G, Ishikawa Y. 2006. Leaf epicuticular wax chemicals of the Japanese knotweed *Fallopia japonica* as oviposition stimulants for *Ostrinia latipennis*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(3): 595-604.
- Lehrman A, Boddum T, Stenberg J, Orians C, Björkman C. 2013. Constitutive and herbivore-induced systemic volatiles differentially attract an omnivorous biocontrol agent to contrasting *Salix* clones. *AoB PLANTS*, 5: plt005.
- Luque P, Bruque S, Heredia A. 1995. Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(2): 417-422.
- McLafferty FW, Stauffer DB. 1994. Wiley registry of mass spectral data. Sixth ed., Mass Spectrometry Library Research Systema, Bench-Top PBM Version 3.10 Palisades Newfield.
- Müller C, Riederer M. 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 31(11): 2621-2651.
- Müller C. 2006. Plant-insect interactions on cuticular surfaces. En: *Biology of the plant cuticle*. Riederer M, Müller C (eds). Annual Plant Reviews, 23. Oxford, UK: Blackwell Publishing: 398-422.

- Müller C. 2008. Resistance at the plant cuticle. En: Induced plant resistance to herbivory. Schaller A (ed). Springer Science+Business Media B.V. 2008
- Müller C, Hilker M. 2001. Host finding and oviposition behavior in a chrysomelid specialist - The importance of host plant surface waxes. *Journal of Chemical Ecology*, 27(5): 985-993.
- Nawrath C. 2006. The biopolymers cutin and suberin. *The Arabidopsis Book*, 1-14 pp.
- Nyman T, Julkunen-Tiitto R. 2005. Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry*, 66(24): 2836-2843.
- Orians C, Huang C, Wild A, Dorfman K, Zee P, Dao M, Fritz R. 1997. Willow hybridization differentially affects preference and performance of herbivorous beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83(3): 285-294.
- Palo R. 1984. Distribution of birch (*Betula* spp.), willow (*Salix* spp.), and poplar (*Populus* spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 10(3): 499-520.
- Parr M, Tran B, Simmonds M, Kite G, Credland P. 1998. Influence of some fatty acids on oviposition by the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 24(10): 1577-1593.
- Peacock L, Lewis M, Powers S. 2001. Volatile compounds from *Salix* spp. varieties differing in susceptibility to three willow beetle species. *Journal of Chemical Ecology*, 27(10): 1943-1951.
- Piesik D, Weaver D, Runyon J, Buteler M, Peck G, Morrill W. 2008. Behavioural responses of wheat stem sawflies to wheat volatiles. *Agricultural and Forest Entomology*, 10(3): 245-253.
- R Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Renwick J, Radke C, Sachdev-Gupta K, Städler E. 1992. Leaf surface chemicals stimulating oviposition by *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) on cabbage. *Chemoecology*, 3: 33-38.
- Renwick J, Chew F. 1994. Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 39: 377-400.
- Riederer M. 2006. Introduction: Biology of the plant cuticle. En: Biology of the plant cuticle. Riederer M, Müller C (eds). *Annual Plant Reviews*, 23. Oxford, UK: Blackwell Publishing: 1-10 pp.
- Roininen H, Price P, Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J. 1999. Oviposition stimulant for a gall-inducing sawfly, *Euura lasiolepis*, on willow is a phenolic glucoside. *Journal of Chemical Ecology*, 25(4): 943-953.
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Shroff R, Schramm K, Jeschke V, Nemes P, Vertes A, Gershenzon J, Svatoš. 2015. A quantification of plant surface metabolites by matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry imaging: glucosinolates on *Arabidopsis thaliana* leaves. *The Plant Journal*, 81: 961-972.
- Snyder D, Schilling M, Hochwender C, Kaufman A. 2015. Profiling phenolic glycosides in *Populus deltoides* and *Populus grandidentata* by leaf spray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7: 870-876.

- Spencer J, Pillai S, Bernays E. 1999. Synergism in the oviposition behavior of *Plutella xylostella*: sinigrin and wax compounds. *Journal of Insect Behavior*, 12(4): 483-500.
- Städler E, Buser H. 1984. Defense chemicals in leaf surface wax synergically stimulate oviposition by a phytophagous insect. *Experientia*, 40: 1157-1159.
- Szafranek B, Tomaszewski D, Pokrzywińska, Gołębiowski M. 2008. Microstructure and chemical composition of leaf cuticular waxes in two *Salix* species and their hybrid. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(2): 49-54.
- Tomaszewski D. 2004. The wax layer and its morphological variability in four European *Salix* species. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(4): 320-326.
- Udayagiri S, Mason C. 1995. Host plant constituents as oviposition stimulants for a generalist herbivore: European corn borer. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76: 59-65.
- Udayagiri S, Mason C. 1997. Epicuticular wax chemicals in *Zea mays* influence oviposition in *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7): 1675-1687.
- Visser J. 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31: 121-44.
- Webster B, Cardé R. 2017. Use of habitat odour by host-seeking insects. *Biological Reviews*, 44: 92(2): 1241-1249.
- Yoneya K, Kugimiya S, Takabayashi J. 2009. Do adult leaf beetles (*Plagioderma versicolora*) discriminate between odors from intact and leaf-beetle-infested willow shoots? *Journal of Plant Interactions*, 4(2): 125-129.

## **Capítulo 4**

**Comportamiento de *Nematus oligospilus* sobre distintas plantas hospederas. Receptores sensoriales de las hembras involucrados en el proceso de oviposición**

## 4.1 Introducción

La localización de la planta hospedera es crucial para que los insectos herbívoros satisfagan sus necesidades nutricionales y encuentren sitios de oviposición adecuados. Esta tarea resulta compleja en hábitats naturales, que representan un mosaico diverso de vegetación, y requiere la utilización de diferentes sistemas sensoriales. La combinación de claves visuales, olfativas y gustativas provistas por la planta hospedera orientan a los insectos hacia ella (Bernays y Chapman 1994, Schoonhoven et al. 2005). Dichas claves no solo aportan información a diferentes escalas espaciales (i.e. largo, medio y corto alcance), sino que además pueden variar en la precisión que brindan y el costo de evaluarlas (Fawcett y Johnstone 2003, Heisswolf et al. 2007). En ambientes con vegetación compleja, las claves visuales suelen ser difíciles de percibir (Rausher 1981, Endler 1993). Las olfativas, inmersas en el olor propio del hábitat, aportan mayor precisión sobre la localización de la planta hospedera (Bruce et al. 2005, Bruce y Pickett 2011). Sin embargo, la evaluación final de su idoneidad suele efectuarse mediante quimiorrecepción de contacto una vez que el insecto se posa sobre la planta. Allí, la combinación de estímulos físicos y químicos presentes en la misma desencadenan su aceptación (e.g. produciéndose la oviposición o alimentación) o rechazo (Renwick 1989).

El cuerpo de los insectos se encuentra cubierto de estructuras sensoriales especializadas llamadas sensilias, las cuales les permiten detectar estímulos externos de origen mecánico, térmico y químico (Snodgrass 1935, Schneider 1964). En el último caso, dependiendo del medio donde estén disueltos los compuestos (acuoso o aire), serán percibidos por sensilias gustativas (de contacto) u olfativas (Zacharuk 1980). La estructura básica de la sensilia consiste en la cubierta cuticular, uno o varias neuronas y células accesorias (Snodgrass 1935). Dichas estructuras exhiben una amplia diversidad morfológica (e.g. cerdas, pelos, conos, placas, escamas, domos), y resultan particularmente abundantes en las antenas y piezas bucales, aunque en algunos casos también son numerosas en los tarsos y ovipositor (Calatayud et al. 2008, Zhang et al. 2012, Polidori y Nieves-Aldrey 2014, Hao et al. 2016). Estructuralmente, las sensilias olfativas y gustativas muestran diferencias. En las primeras, toda la superficie de la cutícula se halla perforada por numerosos poros pequeños (i.e. condición multiporo), cuyos diámetros oscilan entre los 10 y 50 nm. Por el contrario, las sensilias gustativas poseen un único poro de tamaño mayor (de 200 a 400 nm de diámetro), usualmente localizado en la punta de la estructura (Zacharuk 1980, Bernays y Chapman 1994, Schoonhoven et al. 2005).

Una vez sobre la planta, los insectos despliegan una serie de comportamientos que les permiten muestrear la información química disponible en la superficie a través de sus

sensilias de contacto. Los más clásicos involucran anteneo y palpación con los tarsos o piezas bucales (Renwick 1989, Renwick y Chew 1994), aunque también hay casos de sondeo con el ovipositor (Calatayud et al. 2008). Por ejemplo, algunas especies de lepidópteros realizan “golpeteos” rápidos y sucesivos con el primer par de patas, movimiento que expone los quimiorreceptores ventrales de los tarsos a los compuestos presentes en la superficie (Brooks et al. 1996). Otras, emplean el segundo par de patas y las antenas (Baur et al. 1998), y algunas directamente barren el sustrato con el ovipositor (Oyeyele y Zalucki 1990, Calatayud et al. 2008), efectuando pequeños cortes en la superficie que les permiten percibir claves químicas de la hoja (Calatayud et al. 2006).

Antes de oviponer, *N. oligospilus* camina golpeando ligeramente la superficie con sus antenas. Eventualmente se detiene, arquea el abdomen en forma de “coma” y toca la hoja. Al hallar el sitio adecuado, se inclina y baja el ovipositor, empujando la epidermis foliar con el extremo punzante de la lanza e impulsando la sierra dentro de la hendidura, lo que da lugar a una pequeña cavidad (“bolsillo”) reniforme donde coloca el huevo. La vaina del ovipositor, táctil y protectora, no atraviesa los tejidos foliares. En cada penetración, la hembra deposita un único huevo. Una vez colocado, el abdomen se eleva y el ovipositor se retira del sustrato mediante movimientos breves. La abertura de la incisión se cubre presumiblemente con fluido coleterial exudado de glándulas accesorias, tal como sucede en otras especies de tentredínidos (e.g. avispas formadoras de agallas del género *Euura*) (Smith 1972).

La deposición de huevos de *N. oligospilus* implica un contacto estrecho entre las diferentes partes del ovipositor y la hoja. Tal como se mostró en el Capítulo 2, las hembras colocan sus huevos en la epidermis foliar, o entre ésta y la capa subyacente de clorénquima (ver Capítulo 2, Figura 2.8 A). Durante el proceso, exploran la superficie de la hoja usando las antenas y el extremo del abdomen, lo que sugiere la presencia de quimiorreceptores de contacto asociados al reconocimiento de la planta hospedera en dichas estructuras.

Como se postuló en el Capítulo 3, en la huella química constituida por los compuestos lipofílicos y glicósidos fenólicos de la cutícula, estos últimos resultarían claves de contacto cruciales para *N. oligospilus* a la hora de oviponer. En este capítulo se abordó la importancia de dichas claves desde el punto de vista comportamental y morfológico. Se analizó la secuencia de acciones que las hembras desarrollan sobre los genotipos de sauce más y menos preferidos para colocar huevos, y se estudió la morfología externa del ovipositor y antenas en busca de potenciales sensilias gustativas.

## 4.2 Objetivos

### Objetivo general

Estudiar el comportamiento de oviposición en *N. oligospilus* analizando la posible participación de quimiorreceptores de contacto en la detección de la planta hospedera.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar la secuencia de comportamientos de las hembras sobre la superficie foliar de los genotipos de sauce más y menos preferidos para oviponer.
2. Examinar la morfología externa de las antenas y ovipositor de *N. oligospilus*. Documentar la presencia y morfología de sensilias, con énfasis en aquellas que pudieran actuar como quimiorreceptores de contacto.

## 4.3 Hipótesis

1. La observación directa de la secuencia de comportamientos desplegados por las hembras antes oviponer revela cuáles son los apéndices empleados durante la elección de la planta hospedera, presumiblemente las antenas y el ovipositor.
2. En dichos apéndices, existen estructuras quimiosensoriales cuya morfología externa correspondería a aquella de las sensilias de contacto.

## 4.4 Materiales y Métodos

### 4.4.1 Material biológico

#### Plantas

El material vegetal usado para caracterizar el comportamiento de oviposición de *N. oligospilus* sobre diferentes genotipos de *Salix* fueron hojas recién cortadas, maduras, completamente expandidas e intactas procedentes de la porción media de ramas de sauces de estaquero. Los genotipos empleados fueron *S. nigra* y *S. viminalis*, por ser respectivamente el más y el menos preferido por las hembras para oviponer.

## Insectos

Las hembras adultas de *N. oligospilus* usadas en los experimentos provinieron de la población establecida en el laboratorio. En todos los casos, se trató de avispas recién emergidas (i.e. de hasta 1 día de edad), evaluadas individualmente y por única vez tal como se explica en el Capítulo 2 (2.4.1 Material biológico, sección Insectos).

La procedencia de los individuos disecados para caracterizar las antenas y el ovipositor fue la misma, manteniéndose los ejemplares en etanol 96% hasta su uso.

### 4.4.2 Caracterización del comportamiento de oviposición

Para evaluar el uso de las antenas y/o del ovipositor durante la elección del sitio de oviposición, se analizó la secuencia de acciones de las hembras que conducen a la colocación de huevos o al rechazo de la hoja sobre 2 genotipos de *Salix*. La arena experimental consistió en una caja de Petri (14 cm diámetro) donde se ubicaron 2 hojas del mismo genotipo de sauce (*S. nigra* o *S. viminalis*, diseño *no choice*), quedando expuestas (i.e. hacia arriba) una cara adaxial y una cara abaxial (Figura 4.1). Cada hembra se liberó individualmente en la arena y se observó durante los 5 minutos posteriores al contacto con alguna de las superficies foliares. En ese lapso, se registró el tiempo de permanencia sobre la hoja y la duración de los diferentes comportamientos desplegados en ella. Los comportamientos registrados sobre la hoja fueron:

- Movimiento antenal al caminar (A): la hembra camina mientras realiza movimientos rápidos de contacto (golpeteo) sobre la superficie con sus antenas, su marcha es rápida.
- Barrido abdominal (B): la hembra arquea el abdomen hacia abajo de forma marcada, arrastrando el ovipositor en la superficie mientras continúa la marcha (más lenta) moviendo las antenas.
- Oviposición (O): el insecto se queda inmóvil con el ovipositor inserto en la hoja colocando el huevo, las antenas se mantienen quiescentes y elevadas.
- Aleteo (*fanning*) (F): movimiento rápido de las alas, sin vuelo.
- Reposo (R): el insecto se mantiene quiescente.
- Acicalamiento (*grooming*) (G): las antenas son frotadas con el primer par de patas.

Al finalizar las observaciones, se contabilizó el total de hembras que desplegó los diferentes comportamientos en cada genotipo de sauce.

Además, se caracterizaron secuencias comportamentales estereotipadas sobre los diferentes genotipos de sauce. El movimiento antenal al caminar fue la acción a partir de la cual se originaron las demás conductas, por lo que todas las secuencias definidas se iniciaron con ella. En cada genotipo, se calculó la frecuencia relativa de las distintas



secuencias observadas en función al total de secuencias registradas<sup>4</sup>. Estas incluyeron al movimiento antenal al caminar seguido de:

- Abandono de la hoja, (A) - (L)
- Barrido abdominal, (A) - (B)
- Barrido abdominal y oviposición, (A) - (B) - (O)
- Aleteo, (A) - (F)
- Barrido abdominal y reposo, (A) - (B) - (R)
- Acicalamiento, (A) - (G)

Para efectuar los registros se empleó el programa JWatcher versión 1.0 (Blumstein y Daniel 2007). Se realizaron 12 observaciones sobre cada genotipo de sauce, renovándose el material vegetal en cada oportunidad.



**Figura 4.1** Arena experimental usada para caracterizar los diferentes comportamientos desplegados por *Nematus oligospilus* sobre hojas de *Salix nigra* y *Salix viminalis* durante 5 minutos.

#### 4.4.3 Morfología de las antenas y del ovipositor. Identificación de posibles receptores sensoriales

Con el fin de identificar estructuras quimiosensoriales potencialmente involucradas en la elección del sitio de oviposición, se inspeccionó visualmente la superficie completa de las antenas y ovipositor de *N. oligospilus* empleando la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB).

---

<sup>4</sup> La frecuencia relativa de cada secuencia "X" observada sobre las hojas de los diferentes genotipos de *Salix* se calculó como:  $\frac{\text{Número de secuencias "X"}}{\text{Número de secuencias totales registradas}} * 100$

La porción distal del abdomen y las antenas de hembras recién emergidas se disecaron bajo microscopio estereoscópico (Olympus SZ61, Tokio, Japón), se dejaron secar al aire y se montaron sobre cinta bifaz adherida a tacos de aluminio (portamuestras de 12.7 mm de diámetro, espiga de 3.1 mm). Posteriormente, se metalizaron con una aleación de oro-paladio 40-60% o platino (metalizadores Termo VG Scientific SC 7620, West Sussex, Inglaterra y Sputter Coater, Cressington Scientific Instruments, Reino Unido, respectivamente) y se observaron mediante MEB en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” y en el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN, UBA) (microscopios electrónicos de barrido Philips XL 30, Eindhoven, Holanda y Zeiss Supra 40, Alemania, respectivamente). Como resultado, se obtuvieron microfotografías de las estructuras presentes y se identificaron sensilias posiblemente mecanorreceptoras y quimiorreceptoras (volátiles y gustativas) en base a los caracteres morfológicos descriptos por Schneider 1964 y Zacharuk 1980.

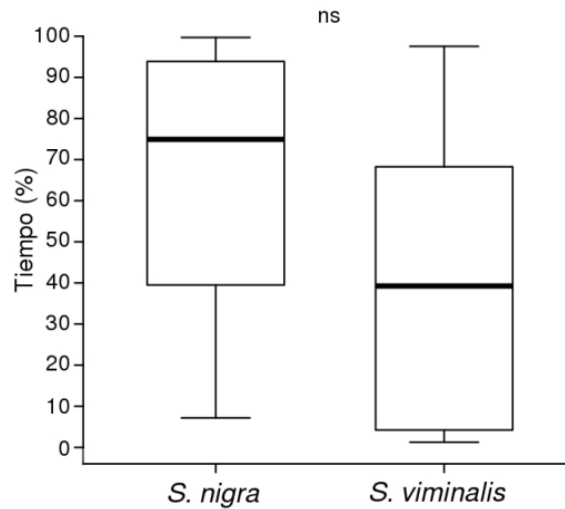
#### 4.4.4 Análisis de datos

El tiempo de permanencia sobre la hoja de cada genotipo se comparó a través de la prueba *U* de Mann-Whitney, al igual que la duración de los diferentes comportamientos desplegados en ellas. La cantidad de hembras que efectuó cada acción se evaluó a través de la prueba de  $\chi^2$ . En todos los casos, se usó el paquete R 2.15.1 para Windows (R Core Team 2012).

### 4.5 Resultados

#### 4.5.2 Caracterización del comportamiento de oviposición

Si bien parece haber una tendencia que indicaría que las hembras pasan mayor cantidad de tiempo sobre las hojas de *S. nigra*, la variabilidad observada es alta y no se encontraron diferencias significativas entre el tiempo transcurrido sobre las hojas de *S. nigra* y *S. viminalis* (Prueba *U* de Mann-Whitney, N=12 para cada genotipo evaluado, p=0.089) (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Porcentaje de tiempo que las hembras de *Nematus oligospilus* permanecieron efectivamente sobre las hojas de *Salix nigra* y *Salix viminalis*, en ensayos de 5 minutos de duración. Prueba *U* de Mann-Whitney, N=12 hembras para cada genotipo de sauce. ns indica diferencias no significativas.

Sin embargo, una vez sobre la hoja, 10 de las 12 hembras evaluadas sobre *S. nigra* barrieron la superficie con su abdomen (Prueba de  $\chi^2$ ,  $p < 0.05$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el número de hembras que realizaron movimiento antenal al caminar en ambos genotipos (Prueba de  $\chi^2$ , ns) (Tabla 4.1). Las oviposiciones se registraron exclusivamente en las hojas de *S. nigra*, donde la mayoría de las hembras evaluadas colocaron huevos.

Al evaluar la duración relativa de cada comportamiento desplegado sobre la hoja, se observa que las hembras dedican significativamente más tiempo al movimiento antenal cuando se hallan sobre *S. viminalis*, genotipo menos preferido para oviponer (Prueba *U* de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4.1) y a la oviposición en *S. nigra*.

Los comportamientos de aleteo, reposo y acicalamiento fueron observados en tan baja frecuencia que no se analizaron estadísticamente.

**Tabla 4.1** Comportamiento de búsqueda de sustrato para la oviposición de *Nematus oligospilus* sobre distintos genotipos de sauce. Número de hembras desplegando diferentes comportamientos en la superficie foliar de *Salix nigra* y *Salix viminalis*, y porcentaje de tiempo invertido en cada uno de ellos.

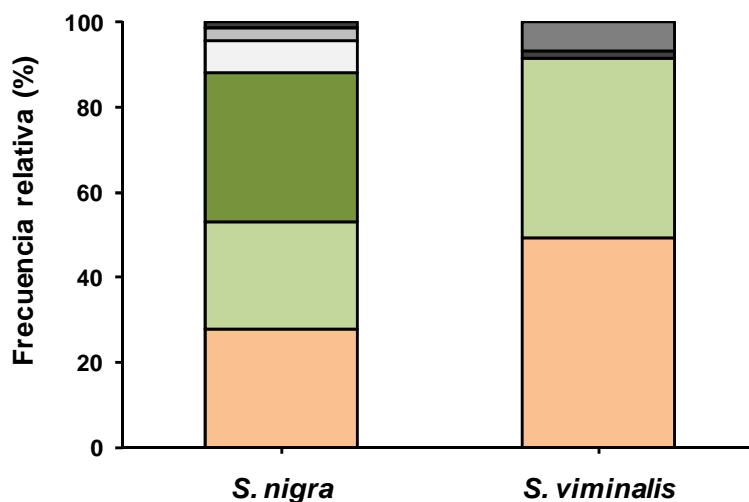
Comportamiento desplegado sobre la hoja	Número de hembras		p	Porcentaje de tiempo invertido (media + EE)		p
	<i>Salix nigra</i>	<i>Salix viminalis</i>		<i>Salix nigra</i>	<i>Salix viminalis</i>	
Movimiento antenal al caminar	12	11	ns	26.70 ± 5.89	59.82 ± 10.86	*
Barrido abdominal	10	5	*	43.31 ± 9.87	60.13 ± 9.77	ns
Oviposición	10	0	*	37.31 ± 9.51	-	-
Aleteo	2	0	-	30.64 ± 1.53	-	-
Reposo	3	3	-	3.45 ± 1.28	72.16 ± 14.51	-
Acicalamiento	2	1	-	0.85 ± 0.25	24.78	-

El tiempo de cada acción desplegada sobre la hoja se expresa en porcentaje en base al total de hembras que efectivamente realizaron el comportamiento durante los 5 minutos de observación. El número de hembras efectuando cada comportamiento sobre los distintos genotipos se analizó mediante la prueba de  $\chi^2$ , mientras que el tiempo dedicado se evaluó usando la prueba *U* de Mann-Whitney. \* corresponde a diferencias significativas a  $p < 0.05$ , ns indica diferencias no significativas. N=12 hembras observadas en cada genotipo de sauce.

Al analizar las secuencias comportamentales desplegadas sobre las hojas se pudieron describir un total de 68 secuencias sobre *S. nigra* y 59 sobre *S. viminalis*. En este análisis, el movimiento antenal al caminar fue la acción a partir de la cual se originaron las demás conductas. La exploración de la superficie foliar de esta forma, seguida del abandono de la hoja (49.15%) o del contacto abdominal con la superficie (42.37%) fueron las secuencias más repetidas por las hembras sobre *S. viminalis*, sin concretarse oviposiciones durante los 5 minutos de observación en ese genotipo. Por el contrario, en *S. nigra* la sucesión movimiento antenal-abandono de la hoja correspondió sólo al 27.94% del total de secuencias, mientras que el ~60% de las mismas (i.e. la suma de barras verdes en la Figura 4.3) incluyeron arquear el abdomen, con posterior oviposición en un 35% de las veces (Figura 4.3).

En menor medida, se registraron otras acciones inmediatamente posteriores al anteneo inicial, que incluyeron el aleteo (7.35% de las secuencias en *S. nigra*), acicalamiento (menos del 2% de las secuencias en tanto en *S. nigra* como en *S. viminalis*) y reposo (6.78% de las secuencias en *S. viminalis*). Nunca se observó la inserción del ovipositor en la hoja sin previo contacto de la superficie foliar empleando las antenas o el abdomen. El barrido abdominal, que consiste en frotar el extremo del mismo sobre la hoja,

es un comportamiento que puede durar varios minutos hasta que la hembra elige el sitio adecuado para insertar la sierra de su ovipositor. Una vez insertado, puede permanecer así durante varios minutos más hasta que el huevo es depositado en la hoja. Finalizada la oviposición, la sierra es removida de la hoja y la hembra reanuda su movimiento antenal mientras camina por la superficie foliar.



**Figura 4.3** Frecuencia relativa de las diferentes secuencias comportamentales iniciadas con movimiento antenal al caminar (A), registradas durante 5 minutos de observación de *Nematus oligospilus* sobre hojas de *Salix nigra* (N=68 secuencias, 12 hembras) y *Salix viminalis* (N=59 secuencias, 11 hembras) durante 5 minutos.

■: (A) - salida de la hoja, ■: (A) - barrido abdominal, ■: (A) - barrido abdominal - oviposición, □: (A) - aleteo, □: (A) - barrido abdominal - reposo, ■: (A) - reposo, ■: (A) - acicalamiento.

#### 4.5.3 Morfología de las antenas y del ovipositor. Identificación de posibles receptores sensoriales.

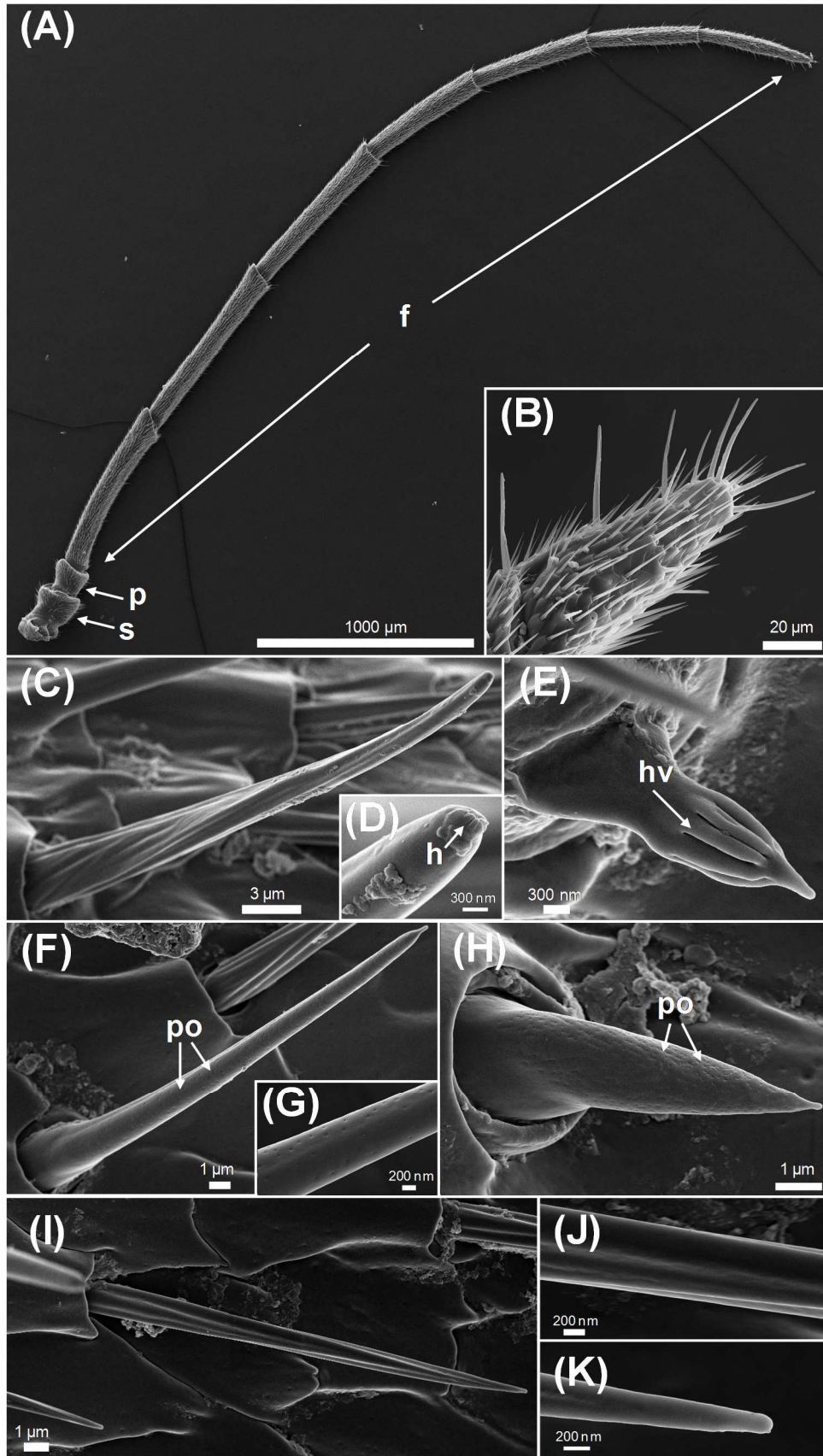
##### ANTENAS

Las antenas de *N. oligospilus* son de tipo filiforme y están compuestas (de proximal a distal) por un escapo ancho, un pedicelo corto y triangular y un flagelo formado por 7 flagelómeros cuyas longitudes decrecen gradualmente hacia el extremo distal (Figura 4.4 A, B). En la superficie del flagelo se identificaron 5 tipos morfológicos de sensilias: 4 con posible función quimiosensorial y 1 potencialmente mecanorreceptora (Figura 4.4).

Entre las sensilias con posible función quimiosensorial, se identificó un tipo denominado **sensilia quética**, que presenta una base articulada y una longitud aproximada

de 26  $\mu\text{m}$ , y cuya pared es estriada. En su extremo distal, se observa un poro o hendidura terminal, lo que morfológicamente sugiere una función relacionada a la detección de compuestos por contacto (Figura 4.4 C, D). Además, se identificaron otros 2 tipos sensiliares, ambos presentando numerosos poros en sus paredes cuticulares. El primero de ellos, llamado **sensilia tricoidea**, posee una base articulada y una longitud cercana a 22  $\mu\text{m}$  (Figura 4.4 F, G). El segundo, de tipo **sensilia basicónica**, es de menor tamaño, con base articulada y un largo que oscila los 13  $\mu\text{m}$  (Figura 4.4 H). En los 2 casos, la presencia de múltiples poros sugiere una función olfativa. Por otra parte, se registró una sensilia de estructura cónica con hendiduras verticales o surcos externos en su extremo más distal, que se denominó **sensilia basicónica con surcos**. A diferencia de las anteriores, esta no muestra una base articulada, y su longitud resulta considerablemente menor (del orden de los 3  $\mu\text{m}$ ) (Figura 4.4 E). Si bien se desconoce su función, posiblemente se trate de un quimiorreceptor olfativo.

En cuanto a la presencia de sensilias potencialmente mecanorreceptoras en la antena, se evidenció un tipo morfológico presente tanto en el flagelo como en el pedicelo. Se trata de una sensilia llamada **cerda estriada**, cuya base es articulada y su largo alcanza los 17  $\mu\text{m}$ . Dicha sensilia carece de poros cuticulares y posee estrías en su superficie (Figura 4.4 I-K).

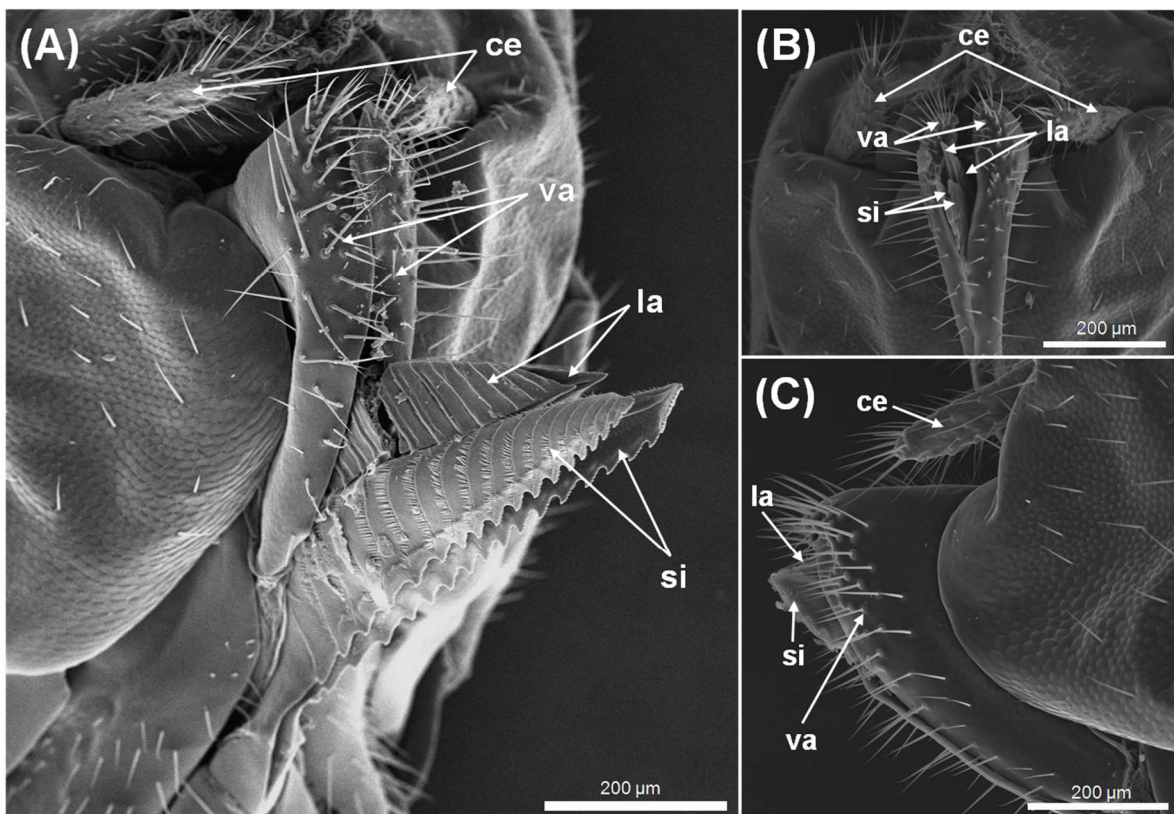


**Figura 4.4** Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la antena de *Nematus oligospilus*. **(A)** Morfología general de la antena filiforme, **(B)** Detalle del flagelómero distal, **(C)** Sensilia quética,

con estrías longitudinales en la superficie, **(D)** Detalle del extremo distal de la sensilia quética, con una hendidura o poro terminal, **(E)** Sensilia basicónica con surcos, correspondientes a hendiduras verticales en la pared cuticular, **(F)** Sensilia tricoidea, con poros múltiples en la pared, **(G)** Detalle de los poros en la pared de la sensilia tricoidea, **(H)** Sensilia basicónica, con poros múltiples en la pared, **(I)** Sensilia cerda estriada con base articulada y pared estriada, **(J)** Detalle de la pared sin poros de dicha sensilia, **(K)** Detalle de la punta sin poro ni hendidura terminal de dicha sensilia. f=flagelo, h=hendidura, hv=hendidura vertical, s=escapo, p=pedicelo, po=poro.

## OVIPOSITOR

El ovipositor de las hembras de *N. oligospilus* consta de 3 pares de valvas (de ventral a dorsal): un par de gonapófisis VIII y IX (denominados sierra y lanza, respectivamente) y un par de gonostilos IX (vaina), tal como se observa en la Figura 4.5 (A-C).

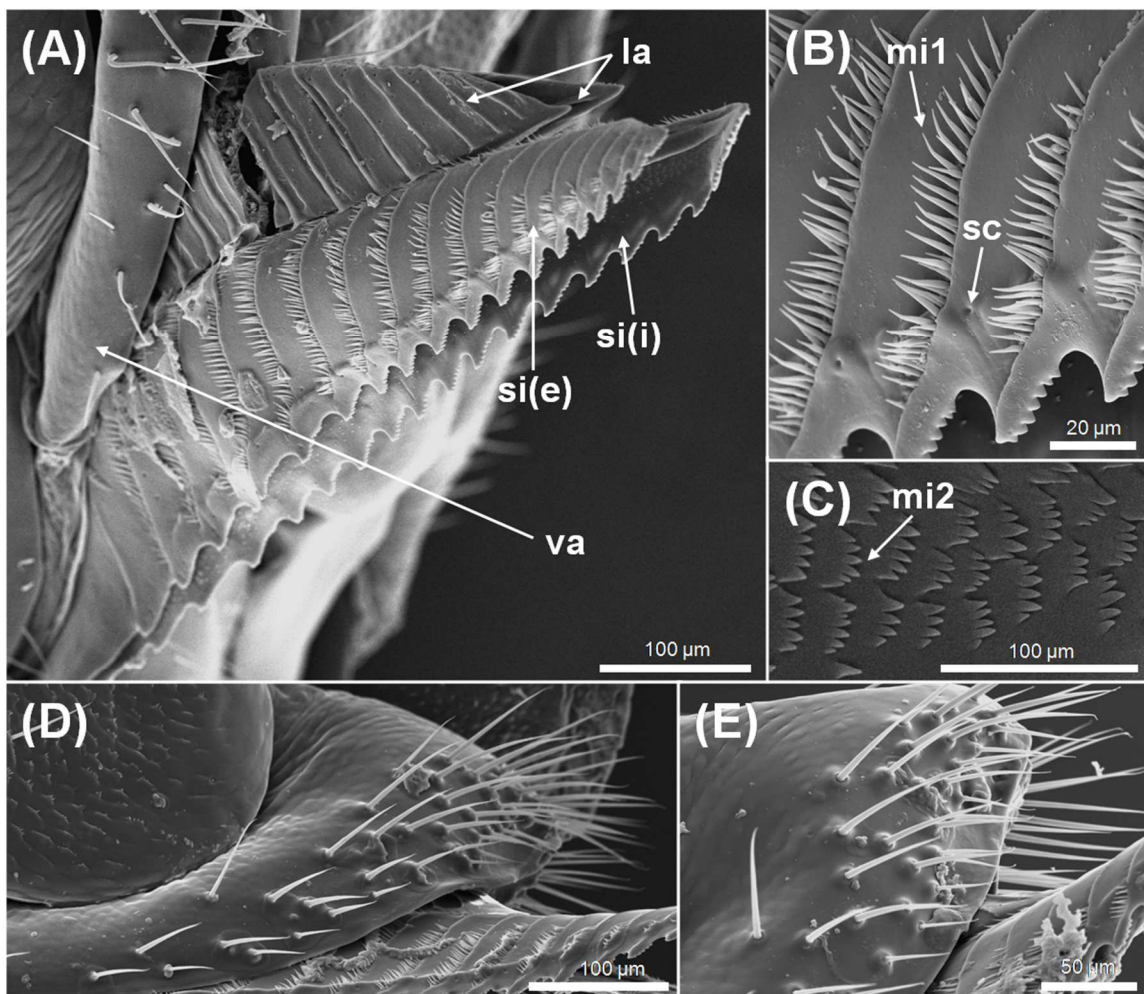


**Figura 4.5** Morfología del ovipositor de *Nematus oligospilus* visualizada mediante microscopía electrónica de barrido. **(A)** Vista ventrolateral, con sierra y lanza al descubierto, **(B)** Vista posterior, **(C)** Vista lateral, con sierra y lanza protegidas dentro de la vaina. ce=cercos, la=lanza (gonapófisis IX), si=sierra (gonapófisis VIII), va=vaina (gonostilos IX).



En la cara externa de la sierra se detectan **sensilias campaniformes**, que posiblemente revelen la posición de la misma dentro del tejido vegetal, y **microtriquias tipo 1**, alineadas en filas de forma compacta (Figura 4.6 A, B). En la cara interna se observan **microtriquias tipo 2** (Figura 4.6 A, C), de aspecto escamiforme, que indicarían la localización del huevo a medida que desciende por el canal.

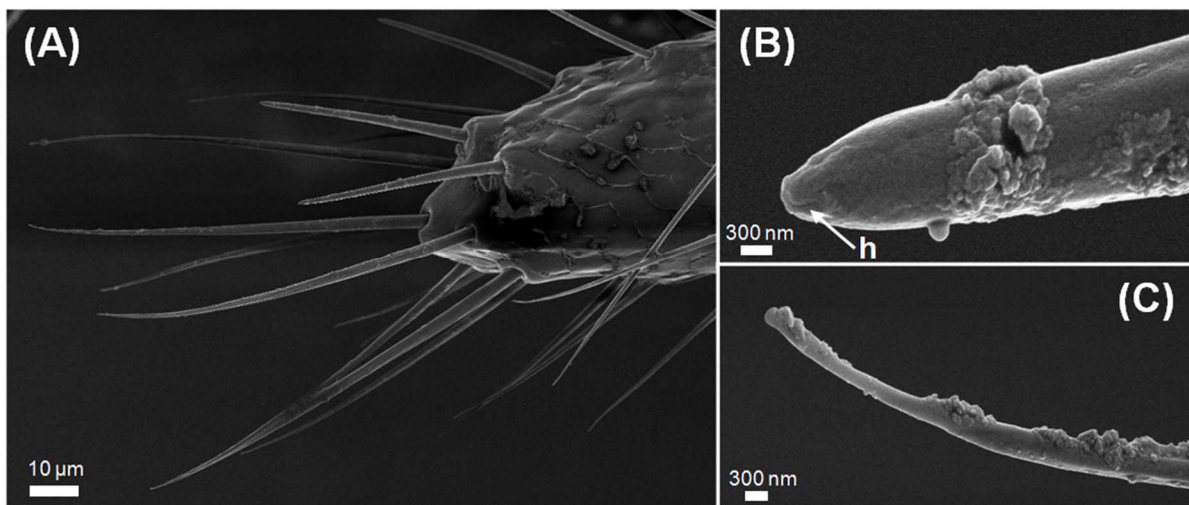
Si bien en otras especies de tentredínidos la mayor parte de las sensilias gustativas se localizan en la vaina del ovipositor (Smith 1972), en el caso de *N. oligospilus* no se detectaron sensilias uniporosas en esa estructura, aunque no se descarta su presencia. En ella, fueron registradas sensilias de tipo **cerda** con base articulada (Figura 4.6 D, E).



**Figura 4.6** Estructura general del ovipositor y sus sensilias, visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido. **(A)** Morfología de la sierra y lanza en vista ventrolateral, **(B)** Cara externa de la sierra, con sensilias campaniformes y microtriquias tipo 1, **(C)** Cara interna de la sierra, con microtriquias tipo 2, **(D, E)** Detalle de la vaina en vista ventrolateral, con sensilias con aspecto de cerdas con base articulada. sc=sensilia campaniforme, la=lanza, mi1=microtriquia tipo 1, mi2=microtriquia tipo 2, si(e)=cara externa de la sierra, si(i)=cara interna de la sierra, va=vaina.

## CERCOS

La inspección visual de la superficie de los cercos (Figura 4.7 A), apéndices abdominales articulados del décimo tergo, reveló la presencia de 2 tipos morfológicos de sensilias. Por un lado, se detectaron sensilias de tipo **quética** (45  $\mu\text{m}$  de longitud) con un poro apical (Figura 4.7 B), a la cual se le podría atribuir una función quimiorreceptora de contacto. Por otro lado, se denominaron sensilias de tipo **cerdas del cerco** (Figura 4.7 C) a aquellas extendidas por toda la superficie, que no revelaron poros ni hendiduras en su pared, posiblemente asociadas a la mecanorrecepción de estímulos.



**Figura 4.7** Morfología general de los cercos y sus sensilias, visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido. **(A)** Vista general de la porción distal del cerco, **(B)** Sensilia quética, con hendidura terminal, **(C)** Sensilia tipo cerda del cerco, sin hendidura ni poros en su pared.

h=hendidura.

## 4.6 Discusión

Los compuestos químicos (no volátiles) presentes en la superficie foliar suelen ser fundamentales para los insectos herbívoros al momento de elegir dónde colocar sus huevos. La secuencia de acciones que conducen a la oviposición o al rechazo de la potencial planta hospedera incluye pasos que permiten a los quimiorreceptores gustativos de los apéndices relevar la información química disponible en la superficie (Renwick y Chew 1994).

Cuando las hembras de *N. oligospilus* se posan en una hoja, caminan por toda la superficie mientras mueven rápidamente sus antenas, contactando el sustrato con la punta de las mismas. Ocasionalmente se detienen, arquean el abdomen y frotan su extremo en la hoja, lo que puede o no conllevar a la colocación del huevo. Dado que no existe evidencia de daño foliar durante dicho proceso exploratorio, esta etapa de selección del sitio estaría determinada por metabolitos secundarios de la planta localizados en la superficie.

Los apéndices de los insectos normalmente están recubiertos de sensilias, órganos sensoriales capaces de detectar estímulos de diferente origen. Puesto que esta definición es estrictamente morfológica, en ausencia de evidencia experimental la anatomía solo permite sugerir alguna función sensorial (Schneider 1964). La caracterización de la morfología externa de las antenas y ovipositor mediante MEB reveló el equipamiento sensorial de *N. oligospilus*. En las antenas, las hembras cuentan con 5 tipos morfológicos de sensilias, 4 de ellos potencialmente quimiosensoriales debido a la presencia de poros y/o hendiduras en su superficie. En el abdomen, tanto el ovipositor como los cercos presentaron sensilias. En su mayoría, aquellas del ovipositor posiblemente cumplan funciones mecanosensoriales, sensando la posición del huevo a medida que desciende por el ovipositor y se introduce en la hoja. En los cercos, habría sensilias tanto mecano como quimiorreceptoras. Estas últimas reflejarían la especificidad de *N. oligospilus* con su planta hospedera, tal como fuera sugerido por Smith (1972) para tentredínidos especialistas del género *Euura*, cuyo mayor complemento sensorial se localiza en los cercos.

El comportamiento diferencial de *N. oligospilus* sobre las hojas de los distintos genotipos de *Salix* sustenta la importancia de las claves de contacto en la identificación de la planta hospedera. Primeramente, estas claves serían relevadas por las antenas, que determinarían la decisión de las hembras de abandonar la hoja o mantenerse sobre ella. En ese caso, intervendrían a continuación los cercos y el ovipositor, desencadenándose la colocación del huevo tras percibir claves químicas de contacto dispuestas en la superficie foliar. Los glicósidos fenólicos presentes en la superficie podrían estar asociados a la elección de la planta hospedera por parte de esta avispa dado que sólo fueron detectados en el genotipo de sauce preferido por las hembras para oviponer, tal como se evidenció en el Capítulo 3 de esta tesis. Estudios preliminares de electrofisiología de sensilia única realizados sobre las sensilias quéticas de las antenas y los cercos confirman una función de quimiorrecepción de contacto (Barrozo, comunicación personal).

*Nematus oligospilus* pertenece a una familia primitiva dentro de los himenópteros. La corta vida adulta de esta avispa determina que la elección del sitio de oviposición debería suceder inmediatamente después del nacimiento de las hembras, las cuales eclosionan con sus huevos ya maduros. Durante este breve período, las hembras no requieren alimentarse

ni buscar pareja dado que, en el hemisferio Sur, se reproducen partenogenéticamente. Estas características particulares, sumadas al rango limitado de plantas hospederas para oviponer, indicarían que las hembras no requieren un amplio repertorio de receptores ni procesamiento sensorial sofisticado. Por lo tanto, un pequeño número de quimiorreceptores con gran sensibilidad a unos pocos compuestos específicos del hospedero, determinantes en la elección del mismo, podrían cumplimentar eficientemente los requerimientos de *N. oligospilus*, tal como lo sugiere Bernays (2001) para insectos especialistas.

#### 4.7 Referencias

- Baur R, Haribal M, Renwick A, Stadler E. 1998. Contact chemoreception related to host selection and oviposition behaviour in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *Physiological Entomology*, 23: 7-19.
- Bernays EA. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology*, 46: 703-727.
- Bernays EA, Chapman RF. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, New York.
- Blumstein DT, Daniel JC. 2007. Quantifying behavior the JWatcher way. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Brooks JS, Williams EH, Feeny P. 1996. Quantification of contact oviposition stimulants for black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, on the leaf surfaces of wild carrot, *Daucus carota*. *Journal of Chemical Ecology*, 22(12): 2341-2357.
- Bruce TJA, Wadhams LJ, Woodcock CM. 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10(6): 69-274.
- Bruce TJA, Pickett JA. 2011. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects - Finding the right mix. *Phytochemistry*, 72: 1605-1612.
- Calatayud P, Chimtawi M, Tauban D, Marion-Poll F, Le Rü B, Silvain J, Frérot B. 2006. Sexual dimorphism of antennal, tarsal and ovipositor chemosensilla in the African stemborer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 42(3-4): 403-412.
- Calatayud PA, Ahuya PO, Wanjoya A, Le Rü B, Silvain J, Frérot B. 2008. Importance of plant physical cues in host acceptance for oviposition by *Busseola fusca*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126(3): 233-243.
- Endler J. 1993. The color of light in forests and its implications. *Ecological Monographs*, 63(1): 1-27.
- Fawcett T, Johnstone R. 2003. Optimal assessment of multiple cues. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 279: 1637-1643.

- Hao Y, Dietrich C, Dai W. 2016. Structure and sensilla of the mouthparts of the spotted lanternfly *lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoromorpha: Fulgoridae), a polyphagous invasive planthopper. *PLoS ONE*, 1(6): 1-22.
- Heisswolf A, Gabler D, Obermaier E, Müller C. 2007. Olfactory versus contact cues in host plant recognition of a monophagous chrysomelid beetle. *Journal of Insect Behavior*, 20(2): 247-266.
- Oyeyele S, Zalucki M. 1990. Cardiac glycosides and oviposition by *Danaus plexippus* on *Asclepias fruticosa* in south-east Queensland (Australia), with notes on the effect of plant nitrogen content. *Ecological Entomology*, 15: 177-185.
- Polidori C, Nieves-Aldrey J. 2014. Diverse filters to sense: great variability of antennal morphology and sensillar equipment in gall-wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *PLoS ONE*, 9(7): 30-33.
- R Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rausher M. 1981. The effect of native vegetation on the susceptibility of *Aristolochia reticulata* (Aristolochiaceae) to herbivore attack. *Ecology*, 62(5): 1187-1195.
- Renwick J. 1989. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia*, 45: 223-228.
- Renwick J, Chew F. 1994. Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 39: 377-400.
- Schneider D. 1964. Insect antennae. *Annual Review of Entomology*, 103-122.
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Smith E. 1972. Biosystematics and Morphology of Symphyta - III External genitalia of *Euura* (Hymenoptera: Tenthredinidae): sclerites, sensilla, musculature, development and oviposition behavior. *Internacional Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1(4): 321-365.
- Snodgrass RE. 1935. *Principles of insect morphology*. McGraw-Hill Book Company, inc.
- Zacharuk R. 1980. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annual Review of Entomology*, 25: 27-47.
- Zhang G, Hu F, Dou W, Wang J. 2012. Morphology and distribution of sensilla on tarsi and ovipositors of six fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2): 319-327.

# **Capítulo 5**

## **Conclusiones finales**

## Conclusiones finales

A lo largo de esta tesis se evaluó el comportamiento de oviposición de la avispa sierra del sauce, *Nematus oligospilus*, haciendo hincapié en las características foliares, tanto físicas como químicas, involucradas en el proceso de orientación y elección de la planta hospedera, junto con sus posibles mecanismos de detección. A modo de resumen, los principales resultados de este trabajo son:

1. Las hembras de *N. oligospilus* muestran una preferencia de oviposición diferencial sobre los distintos genotipos de sauce evaluados, siendo *Salix nigra* el más elegido para colocar sus huevos, y *Salix viminalis* prácticamente evitado.
2. Si bien la preferencia de oviposición de la madre resulta muy marcada, la descendencia es capaz de desarrollarse sobre todos los genotipos de sauce evaluados, incluso aquel que es evitado por las hembras.
3. El balance entre los niveles de nutrientes de la hoja, su anatomía y la presencia de ciertos metabolitos secundarios determinarían la preferencia de oviposición de las hembras.
4. La composición química de las larvas revela que incorporan metabolitos secundarios de los sauces de los cuales se alimentan, que podrían ser empleados como compuestos de defensa frente a la predación.
5. A la distancia, la orientación de *N. oligospilus* a su planta hospedera estaría comandada por claves olfativas, en respuesta al perfil característico de compuestos volátiles emitidos por la propia planta.
6. Una vez sobre la hoja, las hembras despliegan una serie de comportamientos que indican la evaluación cuidadosa de la superficie foliar como potencial sitio de oviposición.
7. La composición de ceras cuticulares, junto a la presencia de glicósidos fenólicos en la superficie foliar, podría constituir una huella química determinante en la decisión final de las hembras de colocar sus huevos.
8. Las antenas y el ovipositor de *N. oligospilus* presentan receptores sensoriales cuya morfología sugiere funciones vinculadas a la percepción de estímulos mecánicos y químicos (tanto de compuestos volátiles como no volátiles). La posible función olfativa de determinadas sensillas, y la gustativa de otras, debería ser confirmada a través de registros electrofisiológicos.

Los resultados de esta de tesis constituyen un gran avance en la comprensión de la ecología química de himenópteros tentredínidos, especialmente en aspectos relacionados

con los mecanismos de elección de la planta hospedera por parte de las hembras de *N. oligospilus*. Además, el análisis químico detallado de distintas familias de metabolitos secundarios junto con el análisis morfológico de los genotipos estudiados, constituyen en sí mismos un aporte al estudio del género *Salix*, particularmente de aquellos genotipos utilizados en el Delta del Río Paraná con fines comerciales o experimentales. Por último, el hallazgo de estructuras con posible función sensorial, descriptas al estudiar la morfología externa de las antenas y del ovipositor de esta avispa, abre la posibilidad de iniciar estudios electrofisiológicos, hasta el momento inexistentes en esta familia de himenópteros primivos

Asimismo, los resultados de este trabajo resultan relevantes no sólo desde una perspectiva ecológica sino también en el marco de la protección del cultivo. *Nematus oligospilus* representa una amenaza relevante para el cultivo de sauce en la región del Delta del Río Paraná, el humedal más grande de la Argentina que a su vez constituye el principal núcleo de producción de salicáceas de nuestro país. Si bien los niveles poblacionales de esta plaga habitualmente son monitoreados mediante trampas adhesivas, su control es exclusivamente químico a través de la aplicación de insecticidas sintéticos de amplio espectro (i.e. cipermetrina), que pueden producir contaminación ambiental y generar resistencia (Casida y Quistad 1998, Caseres Collaso et al. 2000). En este contexto, la implementación de prácticas de manejo alternativas, de mayor selectividad y menor efecto residual, sería altamente recomendable. Ciertas estrategias, tales como la utilización de cultivos trampa y el manejo basado en semioquímicos, han demostrado ser prometedoras como métodos de protección de los cultivos para avispas sierra (Morrill et al. 2001). El conocimiento detallado de las propiedades cuantitativas y cualitativas de las kairomonas en las especies de plantas y cultivares es esencial para definir sus roles en la atracción y la oviposición de los insectos dentro de un sistema de cultivo trampa diseñado científicamente (Hokkanen 1991). Por lo tanto, los resultados de esta tesis podrían ayudar a mejorar el monitoreo y control de *N. oligospilus* mediante la utilización de compuestos volátiles particularmente atractivos para esta especie.

Por otro lado, identificar claves de oviposición de contacto (no volátiles) presentes en la cutícula foliar resulta una herramienta relevante para el Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Salicáceas. Dicho programa tiene una larga tradición en el desarrollo de material vegetal mejorado, contando con una amplia base de genotipos experimentales que reúnen diversas características de crecimiento, sanidad, propiedades de la madera y aptitud para situaciones ecológicas específicas. Determinar la presencia y abundancia de ciertos metabolitos secundarios en la cutícula foliar, asociados a la preferencia de oviposición de *N. oligospilus*, permitirá contribuir con la detección temprana de susceptibilidad a esta avispa en genotipos de interés experimental.



## Referencias

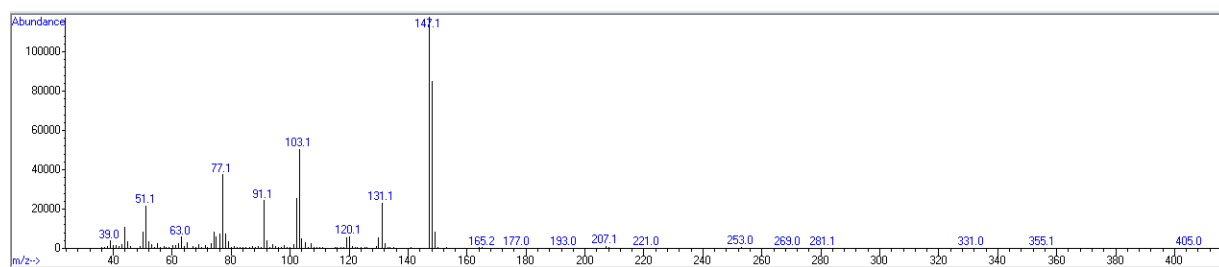
- Casida JE, Quistad G. B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review of Entomology*, 43: 1-16.
- Caseres Collaso B, Caffarini BP, Clemente S, Della Penna AB, Etiennot AE, Jiménez RA, Moya MC, Panzardi S, Perez A, Verdejo J.A. 2000. *Biología de las plagas, enfermedades y malezas. Terapéutica Vegetal*, 109-110 pp.
- Hokkanen HMT. 1991. Trap cropping in pest management. *Annual Review of Entomology*, 39: 119-138.
- Morrill WL, Weaver DK, Johnson GD. 2001. Trap strip and field border modification for management of the wheat stem sawfly (Hymenoptera: Cephidae). *Journal of Entomological Science*, 36: 34-45.

## Anexo I

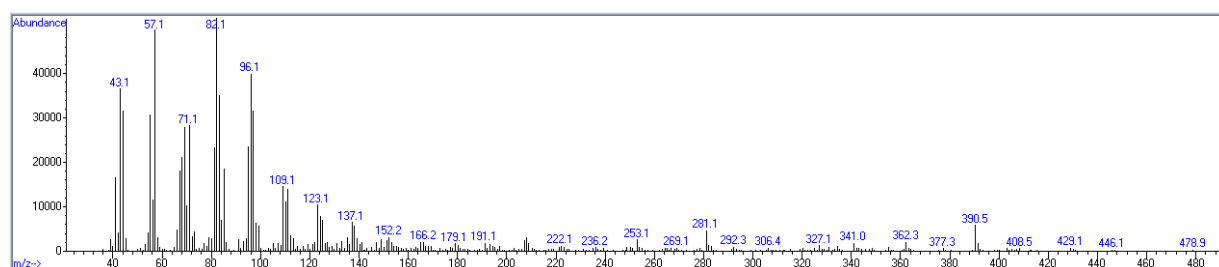
Espectros de masa de compuestos detectados en las ceras cuticulares foliares (fracción soluble en diclorometano).

TR indica el tiempo de retención (minutos).

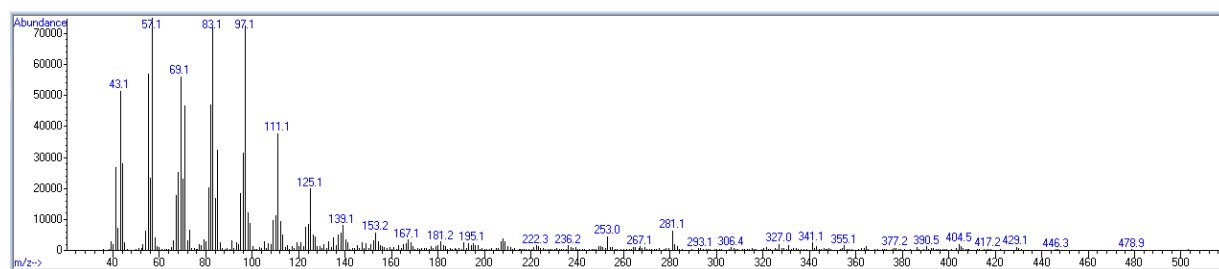
### Ácido trans-cinámico (TR=9.96)



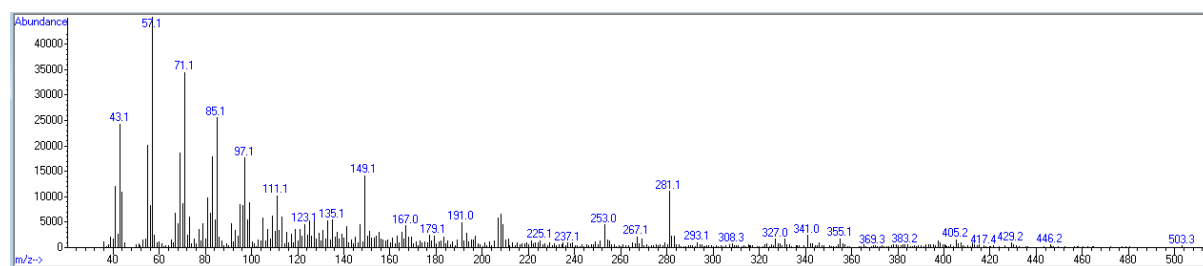
### Probable alqueno (TR=33.53)



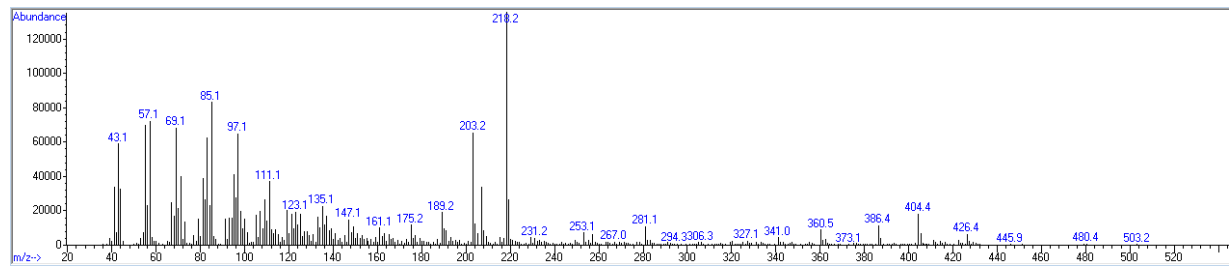
### Alcohol terminal (TR=35.11)



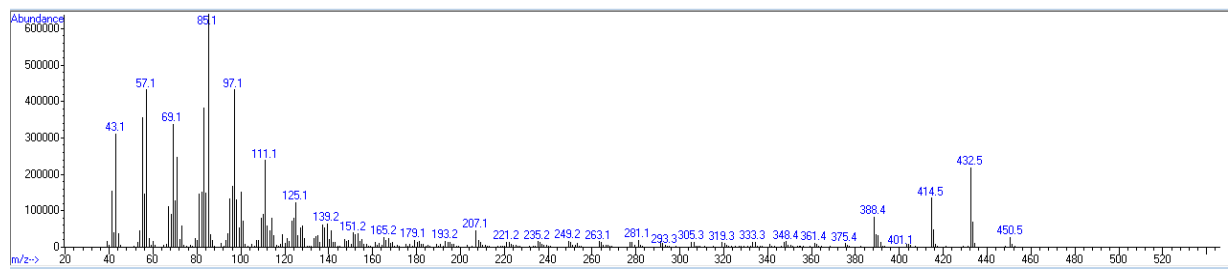
### Estigmasterol/sitosterol (TR=37.86)



### $\beta$ -amirina (TR=38.46)



### Éster alifático de cadena larga (TR=41.79)

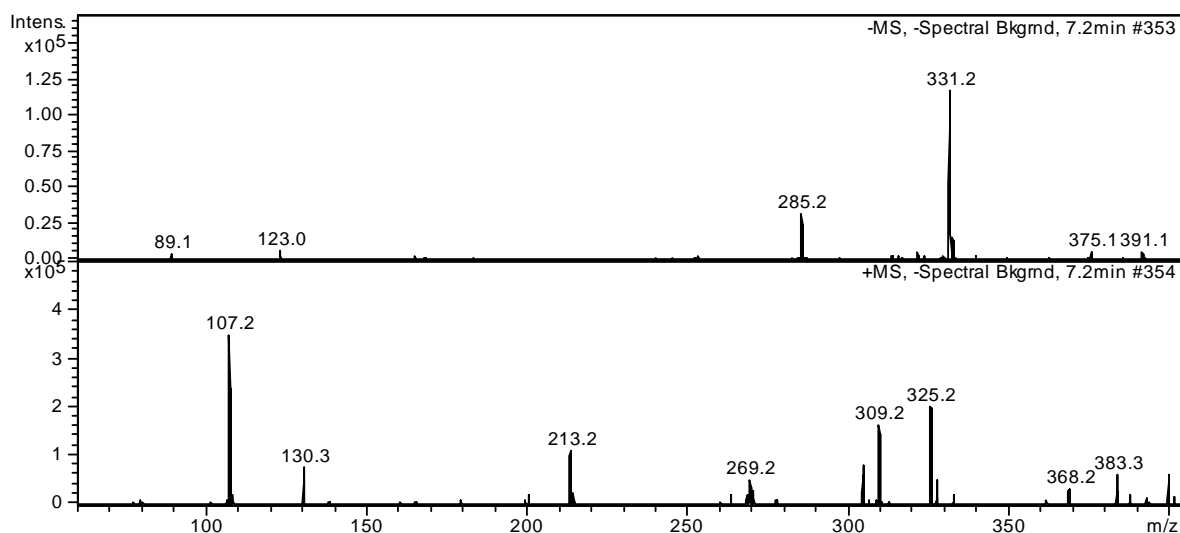


## Anexo II

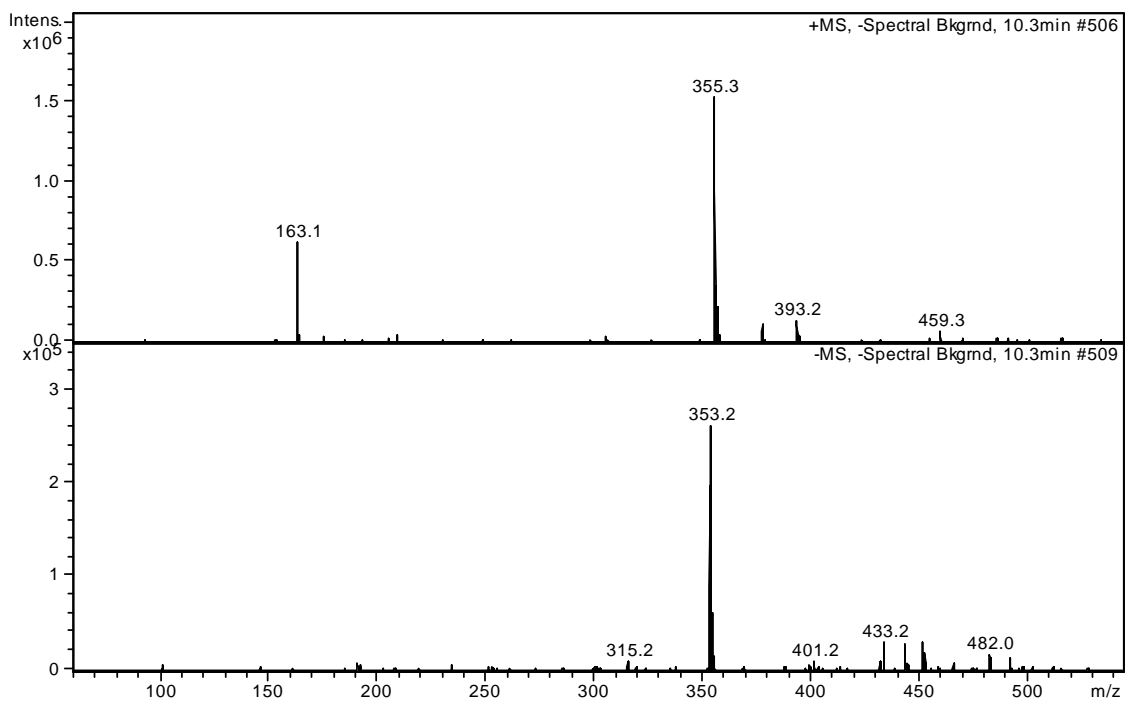
Espectros de masa de compuestos fenólicos detectados en extractos metanólicos de ceras cuticulares foliares.

TR indica el tiempo de retención (minutos).

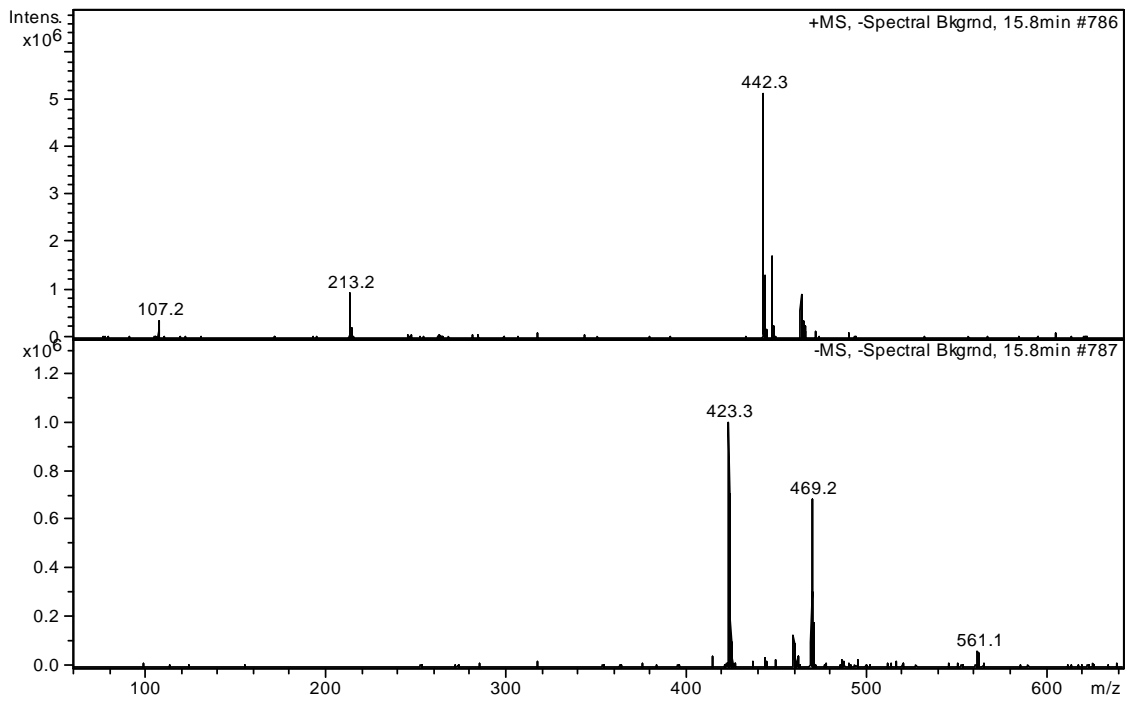
### Salicina (TR=7.2)



### Ácido clorogénico (TR=10.3)



### Salicortina (TR=15.8)



### Tremulacina (TR=28.2)

