Efecto de factores bióticos y abióticos en el comportamiento de llamada de hembras de *Pseudaletia adultera* (Lepidoptera: Noctuidae)

Guillermo Rehermann del Rio

Orientador Prof. Andrés González

Co-orientadora MSc. Paula Altesor

Tribunal: Bettina Tassino y Daniella Agrati

Tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Opción Etología

2012

"… comenzaría a andar descalzo a principios de la primavera y seguiría descalzo hasta concluir el otoño…"

J.L.B

Índice

Agradecimientos 8

Resumen 10

Introducción 12

Los insectos y la comunicación química 12

Comunicación en lepidópteros: Feromonas sexuales 13

Pseudaletia adultera 16

Hipótesis 18

Hipótesis 1: Efecto ambiental 18

Hipótesis 2: Efecto poblacional 18

Objetivos 18

Objetivo específico 1 18

Objetivo específico 2 18

Materiales y métodos 19

Insectos 19

Efecto ambiental: condiciones de cría 20

Efecto poblacional: hembras con-específicas 21

Comportamiento de llamada 21

Análisis estadístico 23

Resultados 24

Comportamiento de llamada 24

Efecto ambiental: condiciones de cría 24

Inicio del llamado 24

Llamado en función de la edad 26

Duración del llamado 26

Comp. de llamada en los tres primeros días de llamada 27

Efecto poblacional: hembras con-específicas 30

Inicio del llamado 30

Llamado en función de la edad 32

Duración del llamado 32

Comp. de llamada en los tres primeros días de llamada 33

Discusión 37

Conclusiones y Perspectivas 41

Bibliografía 42

Índice de figuras

Figura 1. A la izquierda hembra y a la derecha macho de *P.* adultera 16

Figura 2. Huevos de *P. adultera* 17

Figura 3. De izquierda a derecha: larva de 1er. estadio; larva de 3er. estadio; larva de 4to. estadio de *P. adultera* 17

Figura 4. Pupas hembra y macho de *P. adultera* 17

Figura 5. Cajas de cría de adultos y ovoposición 19

Figura 6. Izquierda: huevos de *P. adultera* ovipuestos en abanicos colocados en recipientes cubiertos con tul y derecha: larvas de *P. adultera* alimentándose de dieta artificial específica para noctuídeos 19

Figura 7. Cría de *P. adultera* en incubadora 20

Figura 8. Hembras marcadas 21

Figura 9. Observación del comportamiento de llamada de *P. adultera* durante la fase oscura, utilizando luz roja 22

Figura 10. Hembras vírgenes de *P. adultera* realizando el comportamiento de llamada. A la izquierda: hembra sin marcar y a la derecha: hembra marcada 24

Figura 11a. Edad (media ± error estándar) del adulto a la que inicia el comportamiento de llamada. Las hembras en condición de otoño (n = 19), comienzan a llamar en promedio a mayor edad que las criadas en condición de verano (n = 23) (Mann-Whitney; $P < 0.05$) 25

Figura 11b. Proporción de hembras vírgenes que inician el llamado sexual, según la edad del adulto expresada en días. Las primeras hembras que llaman, criadas tanto en "condición verano" (n = 23) como "condición otoño" (n = 19), lo hacen durante la 3era noche. Sin embargo, las proporciones en los subsecuentes días cambian de acuerdo al tratamiento 25

Figura 12. Proporción de hembras vírgenes que llaman en los primeros ocho días de edad. Se muestra que hembras criadas como larva y pupa en "condición otoño" (n = 19) llaman en menor proporción que las criadas en "condición verano" (n = 23). * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ para el día indicado (test de X^2) 26

Figura 13. Tiempo de llamada en minutos (media ± error estándar) para los primeros 8 días de edad de hembras vírgenes. Se encuentran diferencias en la duración de la llamada entre hembras criadas como larva y pupa en "condición otoño" (n = 19) y "condición verano (n = 23) (MLGmr; P < 0.05) 27

Figura 14. Tiempo de llamada en minutos (media ± error estándar) para las primeras tres noches de llamada de hembras vírgenes que llamaron de manera consecutiva. Hembras criadas como larva y pupa en "condición verano" (n = 19) y "condicón otoño" (n = 13). No se encuentran diferencias en la duración de la llamada entre hembras de distintas condiciones (GLMmr; P > 0.05), y se mantiene una tendencia a aumentar la duración de la llamada en los subsecuentes días 28

Figura 15. Proporción de hembras vírgenes llamando (media± desvío estándar) durante las primeras tres noches de llamada de manera consecutiva. Se muestran diferencias en la distribución de las proporciones a lo largo de la noche, en donde hembras criadas en condición de otoño (n = 13) presentaron un pico de llamada más tarde que aquellas criadas en condición de verano (n= 19) (ANOVA Factorial; P < 0.05) 29

Figura 16. Hora de inicio del comportamiento de llamada (media± error estándar) para las tres primeras noches de llamada de manera consecutiva. Hembras criadas como larva y pupa en "condición otoño" (n = 13) empiezan a llamar más tarde durante la noche que aquellas en "condición verano" (n = 19) (GLM; P < 0.05). Además, el inicio del comportamiento de llamada, no se ve afectado significativamente en las subsecuentes noches en niguno de los tratamientos (GLM; P > 0.05) 30

Figura 17a. Edad (media ± error estándar) del adulto a la que inicia el comportamiento de llamada. Las hembras agrupadas (n = 36, en grupos de 6) comienzan a llamar antes que las solitarias (n = 32), tanto las que llaman más jóvenes como las más tardías (Mann-Whitney; P < 0.001) 31

Figura 17b. Proporción de hembras vírgenes que inician el llamado sexual, según la edad del adulto expresada en días. Hembras agrupadas (n = 36, en grupos de 6) comienzan a llamar día antes que las solitarias (n = 32) 31

Figura 18. Proporción de hembras vírgenes que llaman en los primeros ocho días de edad. Hembras solitarias (n = 32) y agrupadas (n = 36, en grupos de 6). El análisis del conjunto de los datos muestra que las hembras agrupadas llaman en mayor cantidad que las solitarias. ** P < 0.01 para el día indicado (test de X^2) 32

Figura 19. Tiempo de llamada en minutos (media± error estándar) para los primeros ocho días de edad de hembras vírgenes solitarias (n = 32) y agrupadas (n = 36, en grupos de 6). La duración de la llamada fue significativamente mayor en hembras

agrupadas (GLM; P < 0.001), y se verifica un aumento en la duración de la llamada con la edad en ambos tratamientos (GLM; P < 0.001) 33

Figura 20. Tiempo de llamada en minutos (promedio ± error estándar) para las primeras 3 noches de llamada de hembras vírgenes que llamaron de manera consecutiva. Hembras solitarias (n = 19) y agrupadas (n = 28, en grupos de 6). La duración de la llamada fue significativamente mayor en hembras agrupadas (MLGmr; P < 0.01), y existió una tendencia a llamar más en los subsecuentes días de llamada en ambos tratamientos. Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0.01) en la duración de la llamada entre días (Test de Tukey) 34

Figura 21. Proporción de hembras vírgenes llamando (promedio ± desvío estándar) durante las primeras tres noches de llamada de manera consecutiva. Hembras solitarias (n = 19) y agrupadas (n = 28, en grupos de 6). Se observa una diferencia en el pico de llamada durante la fase oscura (ANOVA Factorial; P = 0.001). Hembras solitarias concentraron el llamado más temprano que las agrupadas 35

Figura 22. Hora de inicio del comportamiento de llamada (promedio ± error estándar) para las tres primeras noches de llamada de manera consecutiva. Hembras solitarias (n = 19) y agrupadas (n = 28, en grupos de 6). Las hembras de ambos tratamientos no difieren significativamente en la hora que inician el llamado (MLG; P > 0.05), y se observa de manera generalizada que el inicio del llamado es más temprano en los días subsecuentes (MLG; p < 0.01) 36

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar el proyecto de pasantía.

A la Facultad de Ciencias, porque a pesar de quedar a tras mano del mundo entero y ser un edificio poco ortodoxo, siempre me sentí como en casa. En particular, agradecer al segundo cubículo a mano izquierda del ala norte del piso 6, y a quién reposa sobre la silla alta del cubículo a lo diagonal del primero. Allí, además de ciencia se transmiten otras cosas lindas que tiene la vida.

A Carmen Rossini y Andrés González por abrirme las puertas del Laboratorio de Ecología Química. Por apostar a mi crecimiento académico y personal, por sentir su confianza, y por respetar mis tiempos.

A tod@s los compañeros del Laboratorio de Ecología Química. Quién imaginaría encontrar en el último rinconcito del sub-suelo de la Facultad de Química, gente con tan buena química y a la vez, curiosa de los bichos y las plantas!

A Andrés González. Hombre difícil de atrapar, pero que tiene la capacidad de subsanarlo con momentos de intercambio siempre placenteros. Por su sencillez y bondad. Por tuerto.

A Paula Altesor. Por estar en el día a día y ser mi punto de referencia en el Laboratorio. Por acercarme al mundo de las polillas y transmitirme el cariño por la Naturaleza. Por no escatimar en sonrisas.

A Valeria Cal. Por aunar esfuerzos en el tedioso cuidado de la cría, y por las noches de "llamada".

A Bettina Tassino y Daniella Agrati por aceptar ser miembros de mi tribunal de tesis.

A los entrañables de la 13.

A la banda crandonena.

A los intrépidos y apasionados.

A los que un día empezaron a jugar conmigo a querer investigar y descubrir.

A los que me han enseñado a correr junto a la vida, y a los que la corren junto a mí. Al Pope.

A la familia. Al Popón!

A Franquita, con quien estoy bailando la vida.

Al tridente mágico: Fefito, El Big y Mina!

Le dedico la Tesis a Mina; Mi MADRE

Resumen

Los lepidópteros representan el segundo orden más diverso dentro de los insectos, con aproximadamente 150.000 especies descritas. Parte de su éxito evolutivo es atribuido a la habilidad de utilizar señales químicas para la comunicación intra-específica, denominadas feromonas. Las feromonas sexuales, en particular, participan en la comunicación entre los sexos para la reproducción. En la mayoría de los lepidópteros, las hembras inician la señalización química emitiendo compuestos volátiles para atraer machos durante el comportamiento reproductivo. La producción de la feromona sexual involucra glándulas especializadas donde ocurre la biosíntesis; mientras que la emisión está asociada a un comportamiento y posición conocidos como *llamada*. Este comportamiento, característico de cada especie, está sujeto a un ritmo circadiano que es ajustado por factores exógenos, tanto bióticos como abióticos. *Pseudaletia adultera* (Lepidopetra: Noctuidae) es una polilla de hábitos nocturnos con distribución regional, de importancia económica en Uruguay por ser plaga de gramíneas cultivadas como trigo y cebada. La feromona sexual de esta especie es objeto actual de estudio, observándose en un trabajo preliminar que la densidad de individuos puede influir en el comportamiento de llamada. Asimismo, en especies relacionadas la reproducción se ve retrasada con la llegada del otoño para migrar hacia ambientes con condiciones más favorables. Con estos antecedentes, en esta tesina se decidió estudiar los efectos de la presencia de hembras con-especiíficas y de distintas condiciones ambientales (temperatura y fotoperiodo) experimentadas durante los estados inmaduros, en el comportamiento de llamada de *P. adultera*. Para evaluar lo primero, las hembras fueron dispuestas de manera individual o en grupos de 6, y su comportamiento de llamada fue observado durante 8 noches consecutivas desde la emergencia del adulto. Las mismas observaciones se llevaron a cabo en hembras individuales criadas en dos condiciones distintas de temperatura y fotoperiodo simulando la estación de otoño (12:12 L:O; 15°C) y la estación de verano (16:8 L:O; 25°C). Este trabajo muestra que las interacciones intra-sexuales de hembras adultas y las condiciones ambientales durante el desarrollo afectan el comportamiento de llamada *P. adultera.* Hembras agrupadas comenzaron a llamar más jóvenes, llamaron en mayor proporción, y durante más tiempo que las solitarias. De forma similar, hembras criadas a menor temperatura y corto fotoperíodo (condición de otoño) retrasaron el llamado, llamaron en menor proporción, y empezaron a llamar más tarde durante la noche que aquellas criadas en condición de verano. Estos resultados indican que la interacción de hembras induce la señalización. El incremento en el comportamiento de llamada de hembras agrupadas podría ser una forma de competencia intra-sexual por el acceso a parejas, de manera que cada hembra, en presencia de otras, aumente los esfuerzos individuales de señalización para atraer hacia sí a los machos. A fin de evaluar esta hipótesis, sería interesante estudiar si existe una preferencia de los machos por el llamado “grupal” de las hembras y determinar el

rol del canal químico en las interacciones hembra-hembra. Por otra parte, condiciones ambientales como la temperatura y el fotoperíodo durante los estados inmaduros modulan el comportamiento de llamada, principalmente en las primeras noches. El retraso del llamado en hembras criadas a menor temperatura y fotoperíodo mas corto podría ser ventajoso si *P. adultera* tiene la posibilidad de migrar en búsqueda de condiciones más favorables para la reproducción previo a la llegada del invierno. Conclusiones al respecto necesitan una mayor información disponible y suponen diseños experimentales de campo a largo plazo.

Introducción

Los insectos y la comunicación química

Si bien no hay unanimidad en la definición de comunicación biológica, la misma es un proceso fundamental en las interacciones de los seres vivos en la Naturaleza. Wilson (1970) define a la comunicación como "una acción por parte de un organismo que altera el modelo probabilístico de comportamiento de otro organismo de manera adaptativa para uno o ambos participantes". Los animales, para comunicarse, emplean una gran diversidad de señales que emiten en función de estímulos internos y externos. Según la característica de la señal, esta puede trasmitirse por diferentes canales comunicativos como el acústico, visual, táctil, eléctrico, sísmico o químico; siendo este último, el más antiguo y compartido por una gran diversidad de organismos [1].

La comunicación química se basa en el flujo de sustancias, mayormente volátiles, desde el señalizador (emisor de la señal) hasta los órganos sensoriales del receptor. Los compuestos químicos que participan de la comunicación son denominados semioquímicos [2]. Los semioquímicos en general, tienen un bajo costo de producción, son capaces de perdurar en el tiempo, pueden recorrer largas distancias, sortear obstáculos sin modificar el mensaje y ser efectivos en pequeñas cantidades. Además, pueden ser utilizados en la oscuridad y ser altamente específicos, dificultando así su detección por depredadores [3,4]. Estas características han contribuido a que los semioquímicos actúen como mediadores en muchos aspectos de la vida de los organismos y sus interacciones ecológicas. El campo de La Ecología Química busca comprender dichas interacciones desde el punto de vista químico de la señal (semioquímico), así como desde el punto de vista ecológico-evolutivo de la interacción, es decir, cómo los organismos perciben las señales y modifican su comportamiento o fisiología, y el valor adaptativo de dicho proceso [5].

Los semioquímicos se clasifican en aleloquímicos o feromonas según participan en interacciones inter-específicas (organismos de distintas especies) o en comunicación intra-específica (organismos de la misma especie), respectivamente [6]. Los aleloquímicos a su vez, dependiendo del valor adaptativo del proceso comunicativo en el emisor y en el receptor, se clasifican en kairomonas, alomonas o sinomonas [7]. Las primeras son aquellos aleloquímicos que confieren una ventaja adaptativa al receptor y no necesariamente a quien las emite; incluyen atrayentes, fagoestimulantes y otras sustancias que son detectadas y utilizadas, en sentido amplio, por predadores, herbívoros o parásitos. Estas sustancias pueden cumplir otro rol en un contexto diferente, por ejemplo, una feromona de comunicación intersexual puede ser detectada por un parasitoide para encontrar su hospedero, en un fenómeno denominado "eavesdroping" o espionaje químico. Las alomonas, por su parte, son

sustancias químicas que afectan en forma negativa al receptor, confiriendo una ventaja adaptativa para el emisor. Ejemplos de alomonas incluyen sustancias tóxicas empleadas para la defensa contra depredadores, así como "trampas" químicas que atraen presas [6]. Por último, los aleloquímicos que benefician tanto al emisor como al receptor de la señal son las llamadas sinomonas, y participan en interacciones mutualistas como por ejemplo esencias florales que atraen a sus polinizadores [3].

Las feromonas son señales químicas emitidas por un organismo, y que afectan el comportamiento o fisiología de individuos de la misma especie, generalmente de manera adaptativa para ambos participantes. Las feromonas pueden mediar diversas interacciones, entre ellas, el encuentro de los sexos para la reproducción, la atracción de con-específicos para la explotación de un recurso, la alarma contra un peligro, el marcado de territorios o la organización social [5].

En los insectos, la comunicación intra-específica y la percepción general del entorno se basan en gran medida en el uso de señales químicas. Esto ha permitido a la Ecología Química un desarrollo particular para el manejo de insectos perjudiciales para el ser humano, tanto plagas agrícolas como vectores de enfermedades, con el objetivo de desarrollar métodos de manejo que racionalicen el uso de insecticidas, utilizando en su lugar sustancias modificadoras del comportamiento. Los tipos de interacciones químicas mayormente estudiados incluyen la atracción sexual a través de feromonas sexuales; la agregación mediante feromonas de agregación; y las interacciones entre niveles tróficos (planta-herbívoro-parasitoide/depredador) a través de sustancias químicas liberadas por plantas e insectos [8].

Comunicación en lepidópteros: Feromonas sexuales

Los lepidópteros constituyen uno de los grupos más diversos dentro de los insectos, con aproximadamente 150.000 especies descritas. Su éxito evolutivo es atribuido a diversos factores, entre los que se destaca un ciclo de vida corto; el desarrollo holometábolo, con una etapa larval especializada en la alimentación y acumulación de energía, y una etapa adulta cuya actividad principal consiste en la dispersión y reproducción. Asimismo, los lepidópteros tienen la habilidad de sobrevivir en pequeñas densidades, lo cual es posible, al menos en parte, por un sistema de comunicación muy eficiente para el encuentro con fines reproductivos, basado en feromonas volátiles [9,10]. Las feromonas asociadas a la comunicación entre los sexos para la reproducción se denominan feromonas sexuales. En lepidópteros diurnos, el empleo de feromonas sexuales generalmente está acotado al cortejo, prevaleciendo los estímulos visuales para el encuentro de la pareja. En los nocturnos, comúnmente llamados polillas, el encuentro de los sexos depende casi exclusivamente del uso de feromonas [3]. Estas señales son de gran importancia para el reconocimiento

específico, ya que debido a su alta especificidad son fácilmente discriminadas por los receptores y permiten la coexistencia de especies relacionadas en un mismo hábitat [10]. Asimismo, mediante el uso de feromonas sexuales, los individuos podrían obtener información honesta acerca de la calidad de sus parejas [11] teniendo así un importante rol en la selección sexual [7].

En la mayoría de las polillas, son las hembras las que inician la señalización química emitiendo compuestos volátiles durante el comportamiento reproductivo, mientras que los machos detectan la feromona, utilizando su sistema olfatorio altamente especializado, y se orientan por anemotaxis positiva (a contraviento) para poder localizar a la hembra con-específica que señaliza [10]. Quién señaliza y quién responde, así como la evolución del sistema comunicativo para encontrar pareja, dependerán de los costos asociados, y pueden explicarse como una consecuencia de la inversión diferencial entre los sexos para la reproducción [12,13,14]. La asimetría entre los sexos, sugiere que los machos, en general, aumentan su éxito reproductivo aumentando el número de apareamientos, mientras que las hembras, para maximizar su éxito reproductivo, deben maximizar el número de huevos fértiles que producen y uno o pocos apareamientos son suficientes [15,16]. En este contexto, las polillas hembras serían el sexo limitante, por lo que deberían emplear estrategias que optimicen la supervivencia de su progenie, invertir menos que los machos en encontrar pareja y ser más selectivas [14]. Cardé y Baker (1984) demostraron que los costos en producción y emisión de la feromona por parte de las hembras resultan menores que aquellos que asume el macho, el cual debe detectar pequeñas concentraciones de feromona a largas distancias y rápidamente navegar a través de la pluma de olor en busca de la fuente, con alto riesgo de depredación [17].

Un aspecto importante durante la comunicación para la reproducción es cuándo y cómo se emiten las señales. La producción de la feromona sexual en lepidópteros involucra glándulas especializadas presentes en el extremo terminal del abdomen, donde ocurre la biosíntesis [10]. La emisión de la feromona está a su vez asociada a un comportamiento y posición conocidos como *llamada.* Este comportamiento consiste generalmente en la protrusión del ovipositor, y en la realización de un aleteo característico que colabora con la dispersión de los compuestos volátiles en el ambiente, aumentando la probabilidad de atraer machos para la cópula [10,18]. Este comportamiento está sujeto a un ritmo circadiano y es intrínseco a cada individuo; sin embargo, factores exógenos pueden modular su expresión [19].

Los factores ambientales pueden afectar la expresión de comportamientos intrínsecos del insecto. Hembras de varios lepidópteros modifican el comportamiento de llamada en respuesta a cambios en la temperatura [20], la duración del día [21] o la humedad relativa [22]. Por ejemplo, en una especie relacionada a *Pseudaletia adultera*

(Lepidoptera: Noctuidae), especie utilizada en este estudio, el comportamiento de llamada es modulado por factores exógenos como el fotoperíodo y la temperatura. La flexibilidad en la expresión del comportamiento de llamada en hembras de *Pseudaletia unipuncta* (especie norteamericana), se observa cuando el adulto es expuesto a distintas condiciones de temperatura y fotoperíodo [23], pero también cuando esta exposición ocurre durante la etapa de pupa [24]. Hembras sometidas a menor temperatura y fotoperíodo más largo generalmente inician el llamado a mayor edad y más temprano durante la noche. Las condiciones ambientales afectan de esta manera factores intrínsecos del insecto como la edad a la que las hembras empiezan a llamar [24], el ritmo circadiano de la llamada [25], y hasta la cantidad de feromona sexual liberada [23]. Se ha propuesto que esta flexibilidad en la expresión del comportamiento de llamada es de carácter adaptativo, y que está vinculado al comportamiento migratorio de *P. unipuncta*. Cuando llega el invierno, esta especie migra hacia zonas con mejores condiciones climáticas para la supervivencia y reproducción, por lo que el retraso en la madurez sexual, y en particular en el llamado de machos para la cópula, podría demorarse hasta el establecimiento en la nueva región [23].

Interacciones con-específicas pueden también afectar la expresión de comportamientos intrínsecos a un individuo. Estudios en distintas familias de lepidópteros muestran que la presencia de hembras con-específicas y/o de la feromona sexual, inciden en la expresión del comportamiento de llamada de las hembras [26,27,28,29]. Por ejemplo, en *Utethesia ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae), se ha determinado que grupos de hembras expresan el comportamiento de llamada más temprano que aquellas que se encuentran aisladas. Se han planteado dos hipótesis al respecto; la primera, que existe competencia intra-sexual cuando las hembras están agrupadas, resultando en que cada hembra dentro del grupo aumenta los esfuerzos de señalización de modo que su probabilidad de apareamiento aumente frente a la de sus vecinas. La segunda hipótesis parte de observaciones en el campo, donde se comprobó que las hembras naturalmente se agrupan en su planta hospedera, por lo que aumentar los esfuerzos de señalización podría ser una forma de cooperar con las vecinas de modo que el grupo aumente las probabilidades de atraer machos con respecto a otros grupos de hembras [30]. Observaciones preliminares de *P. adultera* en cautiverio sugieren que un efecto poblacional similar podría ocurrir en esta especie (Paula Altesor, com. pers.).

Pseudaletia adultera

La oruga militar, *P. adultera*, es un insecto polífago que se alimenta en su fase de larva, principalmente de gramíneas cultivadas como trigo, avena, cebada, centeno y maíz, así como de gramíneas de praderas naturales [31]. Esta especie se distribuye en el norte de Argentina, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay [32].

Los adultos de ambos sexos, similares en tamaño y aspecto, son de color pardo ceniza claro y presentan en el centro del ala anterior un punto blanco sobre una banda oscura. Miden aproximadamente 25 mm de longitud y 30 a 40 mm de expansión alar (fig. 1). El adulto vive entre 7 y 27 días, dependiendo del sexo, de la alimentación y de las condiciones ambientales. Inmediatamente de ser fecundadas, las hembras depositan huevos en el transcurso de la noche y en noches subsecuentes. Durante este período de aproximadamente 11 días, pueden llegar a depositar más de 1000 huevos. Estos son de color blanco cremoso y generalmente puestos en las hojas inferiores del cultivo, adheridos y protegidos por una sustancia pegajosa que las hembras secretan (fig. 2). El estado de huevo tiene una duración de 4 a 6 días. Las larvas al nacer tienen una longitud de 2 mm, alcanzando los 25 mm previo a la formación de la pupa. Las larvas recién emergidas se alimentan del corion, para pasar luego, durante los siguientes diez días, al parénquima foliar sin dañar las nervaduras. Cuando alcanzan los 15 mm comen toda hoja indiscriminadamente (fig. 3). El estado larval tiene una duración promedio de 25 días. El estado de pupa se desarrolla en el suelo, y tiene una duración que varía entre los 9 y 16 días (fig. 4). En nuestro país se desarrollan entre 3 y 4 generaciones anuales, apareciendo los primeros adultos de la última generación al inicio de la primavera [33].

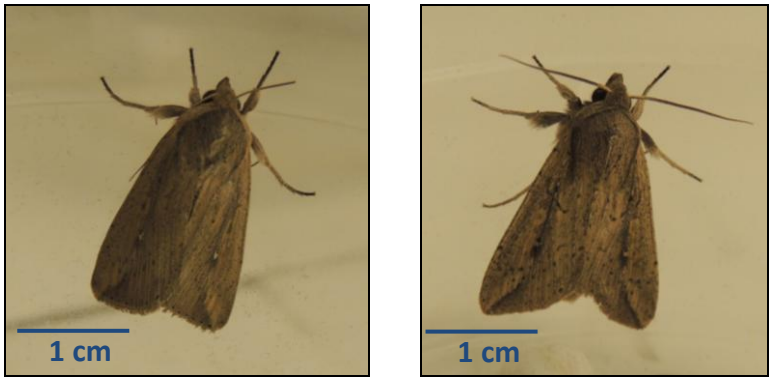

Figura 1. A la izquierda hembra y a la derecha macho de *P. adultera*.

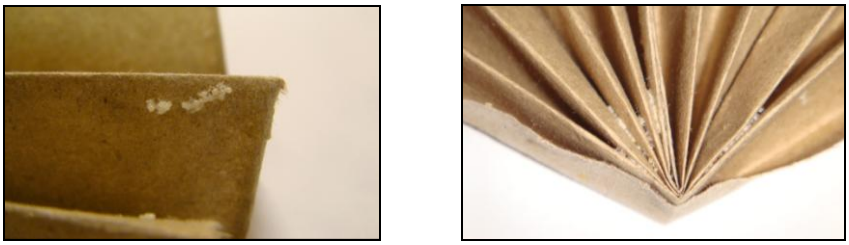

Figura 2. Huevos de *P. adultera.*

Figura 3. De izquierda a derecha: larva de 2do. estadio; larva de 3er. estadio; larva de 4to. estadio de *P. adultera.*

Figura 4. A la izquierda pupa hembra y a la derecha pupa macho de *P. adultera.*

Las plantas sobre las que se alimenta ocupan una importante área en la región agrícola-ganadera uruguaya. Los ataques son frecuentes y causan importantes daños, por lo que este insecto es considerado plaga y para su control se hace necesario el uso regular de insecticidas [31]. Conocer más acerca de la biología reproductiva de la especie contribuiría a determinar su dinámica poblacional, permitiendo así optimizar estrategias alternativas como el uso de feromonas para un manejo sustentable de la plaga.

En el marco de un estudio general de la comunicación química reproductiva en *P. adultera*, el cual incluye la caracterización de la feromona sexual, se estudió el efecto de factores ambientales estacionales (fotoperiodo y temperatura) y de interacciones intra-sexuales (presencia de hembras con-específicas) en la expresión del comportamiento de llamada de hembras vírgenes de *P. adultera*. El estudio se llevo a cabo en el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química.

Hipótesis

Hipótesis 1: Efecto ambiental

Existe un efecto de los factores ambientales estacionales, temperatura y fotoperíodo, en la expresión del comportamiento de llamada de hembras vírgenes de *Pseudaletia adultera.* Individuos criados durante su desarrollo en condiciones que simulan el otoño (15 °C, 12:12 h L:O) demorarán más en iniciar el comportamiento de llamada que aquellos criados en condiciones que simulan el verano (25 °C, 16:8 h L:O), retrasando la madurez sexual.

Hipótesis 2: Efecto poblacional

En un contexto de posible competencia intra-sexual, donde varios individuos se disponen juntos, las hembras modifican su comportamiento de llamada, de modo de maximizar sus probabilidades de apareamiento.

Objetivos

Objetivo general:

Estudiar el efecto de los factores ambientales estacionales, temperatura y fotoperíodo, y de las interacciones intre-sexuales (presencia de hembras con-específicas) en el comportamiento de llamada en hembras de *Pseudaletia adultera.*

Objetivo específico 1:

Estudiar la expresión del comportamiento de llamada de hembras mantenidas durante sus estadios inmaduros en dos condiciones distintas de fotoperíodo y temperatura simulando condiciones de “otoño” y “verano”.

Objetivo específico 2:

Estudiar el efecto de la presencia de hembras con-específicas en la expresión del comportamiento de llamada de *P. adultera*.

Materiales y métodos

Insectos

Los individuos utilizados en los experimentos se obtuvieron de una colonia permanente del Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química, originalmente colectada en INIA La Estanzuela (34˚19´ S, 57˚43´ O). Esta colonia es mantenida con fotoperíodo invertido controlado (14:10 h Luz: Oscuridad) a temperatura y humedad relativa estables (21 ± 1 ˚C; 60 ± 10%). Los adultos emergidos son colocados en cajas de madera cúbicas (30 cm de lado) y alimentados *ad libitum* con una dieta artificial a base de agua destilada y miel al 10%. En las cajas se colocan abanicos de papel para que efectúen las posturas (fig. 5). Los huevos se colocan en recipientes (35 x 15 x 10 cm) y se los cubre con tul permitiendo el pasaje de luz y aire. Las larvas son alimentadas con una dieta específica para noctuídeos, basada en porotos de manteca, germen de trigo y sémola de maíz (fig. 6).

Figura 5. Cajas de cría de adultos y ovoposición.

Figura 6. Izquierda: huevos de *P.adultera* ovipuestos en abanicos colocados en recipientes cubiertos con tul y derecha: larvas de *P. adultera* alimentándose de dieta artificial específica para noctuídeos.

Experimento 1

Efecto ambiental: condiciones de cría

Huevos de un día de edad fueron obtenidos de la colonia y mantenidos en incubadora en dos condiciones distintas de temperatura y fotoperíodo hasta la emergencia del adulto: "condición de verano" a 25 ± 1 °C, 65 ± 5% HR bajo un fotoperíodo 16:8 h L:O, y "condición de otoño" a 15 ± 1 °C, 65 ± 5% HR bajo un fotoperíodo 12:12 h L:O (fig. 7). Las larvas de cada condición fueron alimentadas con dieta artificial, y las pupas obtenidas fueron separadas diariamente y mantenidas en las respectivas condiciones. Al sexto día de formadas, las pupas fueron pesadas y separadas por sexo en base a la morfología del extremo del segmento terminal del abdomen, de modo que machos y hembras adultos no tuvieron contacto.

A continuación, hembras de un día de emergidas de cada condición fueron dispuestas de manera individual en cajas plásticas transparentes (24 x 24 x 16 cm) cubiertas con vidrio, y provistas con dieta artificial *ad libitum* a base de agua destilada y miel al 10%, a 21 ± 1 ˚C, 60 ± 10% HR, y un fotoperíodo de 14:10 h L:O. Estas condiciones para el mantenimiento de las hembras adultas de ambos tratamientos, se utilizó de modo que cualquier diferencia observada en el comportamiento de llamada respondiera a las condiciones experimentadas durante los estadios inmaduros, y no al momento de realizar el llamado. Se obtuvieron un total de 24 hembras en "condición verano" y 23 en "condición otoño", con las cuales se realizaron las observaciones.

Figura 7. Cría de *P. adultera* en incubadora.

Experimento 2

Efecto intra-sexual: hembras con-específicas

Para evaluar el efecto de la presencia de hembras con-específicas en el comportamiento de llamada, se comparó la llamada de hembras dispuestas de manera individual (solitarias) y agrupadas. Para ello, a partir del día de emergidas, hembras vírgenes de la colonia, pertenecientes a la misma generación, fueron dispuestas de forma solitaria o en grupos de 6 hembras, en cajas plásticas transparentes (24 x 24 x 16 cm) cubiertas con vidrio de manera de evitar el intercambio de estímulos químicos o mecánicos entre cajas. Para identificar cada hembra, y así poder obtener información individual del comportamiento de llamada, se utilizó un código de marcado en las alas (fig. 8). Las marcas fueron realizadas con un marcador permanente de base alcohol antes de disponer las hembras en las cajas experimentales, y se mantuvieron hasta el final del experimento. Como control de manipulación, todas las hembras "solitarias" también fueron marcadas, utilizando el mismo código de manera aleatoria. Durante todo el experimento, las hembras recibieron dieta artificial *ad libitum* a base de agua destilada y miel al 10%. Se observaron en total 34 hembras solitarias y 36 hembras agrupadas (en 6 grupos), utilizando las mismas condiciones ambientales en que es mantenida la colonia: 21 ± 1 ˚C, 60 ± 10% HR, fotoperíodo de 14:10 h L:O.

Figura 8. Hembras agrupadas de *P. adultera* marcadas.

Comportamiento de llamada

El comportamiento de llamada fue observado mediante un muestreo de barrido [34], en intervalos de 15 minutos durante la fase oscura, en noches consecutivas desde el primer día de emergencia de las hembras hasta el octavo día (inclusive). Si una hembra se observaba en postura de llamada durante dos períodos consecutivos de observación, se consideró que estuvo llamando durante 30 minutos.

Sin embargo, si una hembra fue observada llamando sólo en un período de dos observaciones consecutivas, se consideró que la hembra llamó durante 15 minutos. Con esta información, se determinó a qué edad la hembra llama por primera vez desde su emergencia, la hora a la que inicia el llamado durante la fase oscura, el tiempo que emplea llamando. Para todas las observaciones se utilizó una luz roja Philip PAR38 E (fig. 9).

Figura 9. Observación del comportamiento de llamada de *P. adultera* durante la fase oscura, utilizando luz roja.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para estudiar el comportamiento de llamada entre los tratamientos se realizó en forma análoga en ambos experimentos.

Para evaluar el efecto en el día de inicio de la llamada, se aplicó un test de Mann-Whitney (ajustado por empates) utilizando el paquete estadístico Minitab 12.

Para evaluar el efecto en la cantidad de hembras que llamaron en función de la edad, el número de hembras llamando en ambos tratamientos fue comparado para cada día mediante un test de Chi-cuadrado.

Para estudiar la duración de la llamada a lo largo de los 8 días de observación, así como para los primeros tres días de llamada, se utilizo el Modelo Lineal General de medidas repetidas (GLMmr), previa transformación del tiempo llamado ($\sqrt{(x+0.5)}$) para normalizar los datos. El análisis de la duración de la llamada durante los 8 días del experimento consideró a los días como variables intra-sujetos y al tratamiento como un factor inter-sujeto. Mientras tanto, para los primeros tres días de llamada, se consideró como factor intrer-sujetos al tratamiento, y como variables intra-sujetos a los días de llamada. Cuando el tratamiento fue un factor significativo en la duración de la llamada, se compararon los días de llamada por pares aplicando el Test de Tukey. Este modelo también fue utilizado cuando se analizó la hora de inicio de llamada para los tres primeros días de llamada. Para estos análisis se consideró el paquete estadístico SPSS.

Por último, la proporción de hembras llamando a lo largo de la fase oscura, considerando los tres primeros días de llamada, se analizó mediante un ANOVA de dos factores (datos transformados según arcoseno $\sqrt{x}$), con los distintos intervalos de tiempo de la fase oscura y los tratamientos como factores.

Resultados

Comportamiento de llamada

La llamada de una hembra es fácilmente reconocible pues despliega sus alas y realiza un aleteo característico, mientras protruye el ovipositor. Dicha protrusión parece tener un patrón discontinuo, y muchas veces es acompañada de una curvatura abdominal hacia adentro con la cual la hembra ¨pinta¨ las paredes del recipiente durante la liberación de la feromona sexual (fig. 10).

Figura 10. Hembras vírgenes de *P. adultera* realizando el comportamiento de llamada. A la izquierda: hembra sin marcar y a la derecha: hembra marcada.

Las variables estudiadas en la expresión del comportamiento de llamada para hembras en ¨condición de otoño¨ y ¨condición de verano¨, así como para hembras ¨agrupadas¨ y hembras ¨solitarias¨, fueron las mismas. Cabe recodar que la observación del comportamiento de llamada para ambos experimentos se realizó a 21 ± 1 ˚C, 60 ± 10% HR, y un fotoperíodo de 14:10 h L:O.

Efecto ambiental: condiciones de cría

Inicio del llamado

Al comparar la edad a la que las hembras inician el llamado entre los tratamientos donde los estados inmaduros fueron mantenidos en “condiciones de otoño” y “condiciones de verano”, se observa una diferencia importante en la proporción de hembras comenzando a llamar la tercera noche. El patrón general del inicio de llamada fue significativamente afectado por las condiciones de cría, resultando en que las hembras en “condición de verano” comienzan a llamar antes que las hembras en “condición de otoño” (Mann-Whitney W = 518, P = 0.004) (fig. 11a).

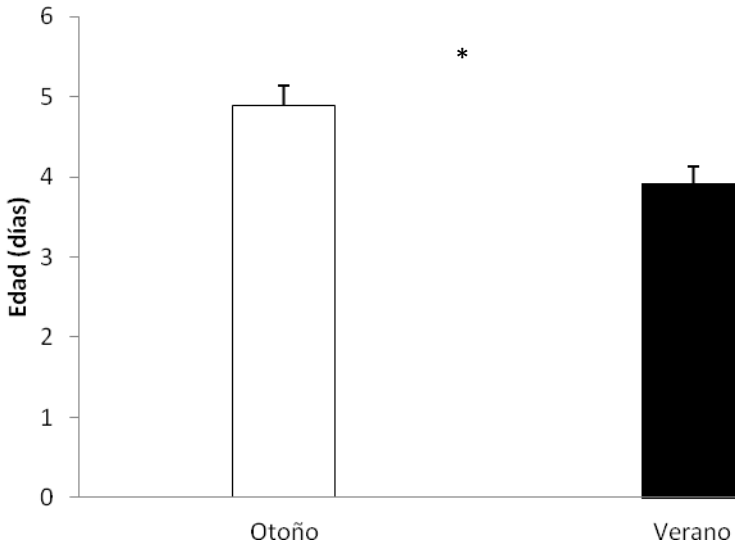

Figura 11a. Edad (media ± error estándar) del adulto a la que inicia el comportamiento de llamada. Las hembras en condición de otoño (n = 19), comienzan a llamar en promedio a mayor edad que las criadas en condición de verano (n = 23) (Mann-Whitney; $P < 0.05$).

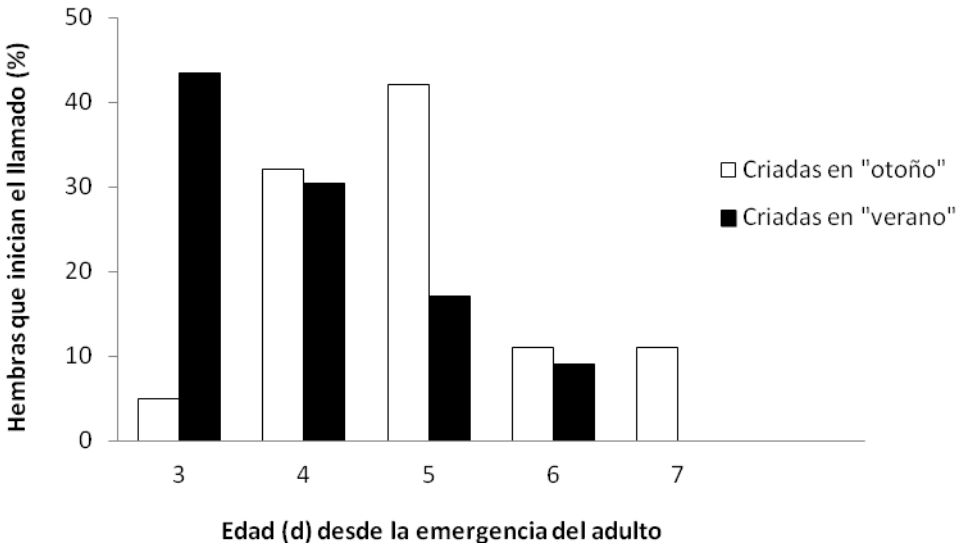

Figura 11b. Proporción de hembras vírgenes que inician el llamado sexual, según la edad del adulto expresada en días. Las primeras hembras que llaman, criadas tanto en "condición verano" (n = 23) como "condición otoño" (n = 19), lo hacen durante la 3era noche. Sin embargo, las proporciones en los subsecuentes días cambian de acuerdo al tratamiento.

Llamado en función de la edad

Al considerar la proporción de hembras que llaman durante los ocho días experimentales, los resultados muestran que las hembras criadas en "condición de otoño" llaman en general menos que las hembras criadas en "condiciones de verano". Los días que presentaron diferencias entre los tratamientos fueron el día 3, el día 4, el día 7 y el día 8 (X^2 = 7.860, P < 0.01; X^2 = 6.019, P < 0.05; X^2 = 3.911, P < 0.05 y X^2 = 9.911, P < 0.05, respectivamente) (fig. 12).

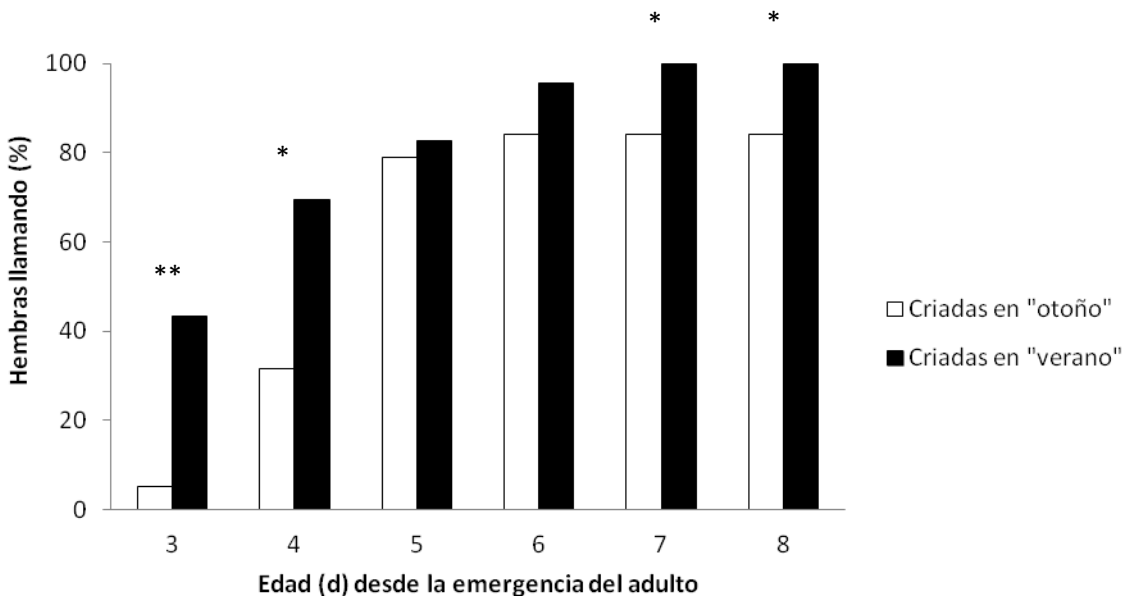

Figura 12. Proporción de hembras vírgenes que llaman en los primeros ocho días de edad. Se muestra que hembras criadas como larva y pupa en "condición otoño" (n = 19) llaman en menor proporción que las criadas en "condición verano" (n = 23). * P < 0.05 y ** P < 0.01 para el día indicado (test de X^2).

Duración del llamado

Analizando la duración de la llamada en hembras criadas como larva y pupa en distintas condiciones de temperatura y fotoperíodo, se encuentra una diferencia significativa entre ambos tratamientos (MLG de medidas repetidas $F_{1,40}$ = 7,829, P = 0.008), llamando por más tiempo las hembras criadas en condición de verano. Además, existe para ambos tratamientos, una tendencia general a llamar por más tiempo en las noches subsecuentes (fig. 13).

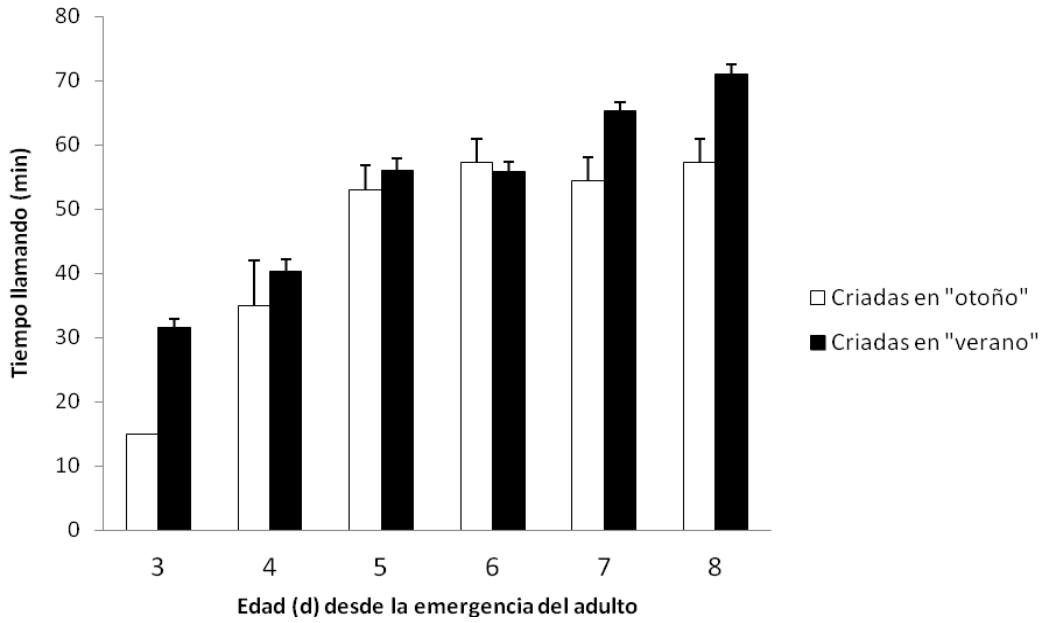

Figura 13. Tiempo de llamada en minutos (media ± error estándar) para los primeros 8 días de edad de hembras vírgenes. Se encuentran diferencias en la duración de la llamada entre hembras criadas como larva y pupa en "condición otoño" (n = 19) y "condición verano (n = 23) (MLGmr; $P < 0.05$).

Comportamiento de llamada en los primeros tres días

El análisis de las características temporales del llamado se realizó también tomando en cuenta las tres primeras noches de llamada de cada hembra, de manera independiente a la edad de las mismas. Se tomaron en cuenta únicamente hembras que llamaron en tres noches consecutivas, y se analizó la duración de la llamada, el patrón temporal de llamada durante la noche, y la hora de inicio.

i) Duración de la llamada

Para las hembras criadas en distintas condiciones los resultados fueron análogos a los encontrados anteriormente. El tiempo de llamada entre los tratamientos no fue significativamente diferente (Modelo Lineal General de medidas repetidas $F_{1,30} = 0.002$, $P = 0.961$) y se mantuvo la tendencia de que las llamaron por más tiempo en días subsecuentes (fig. 14).

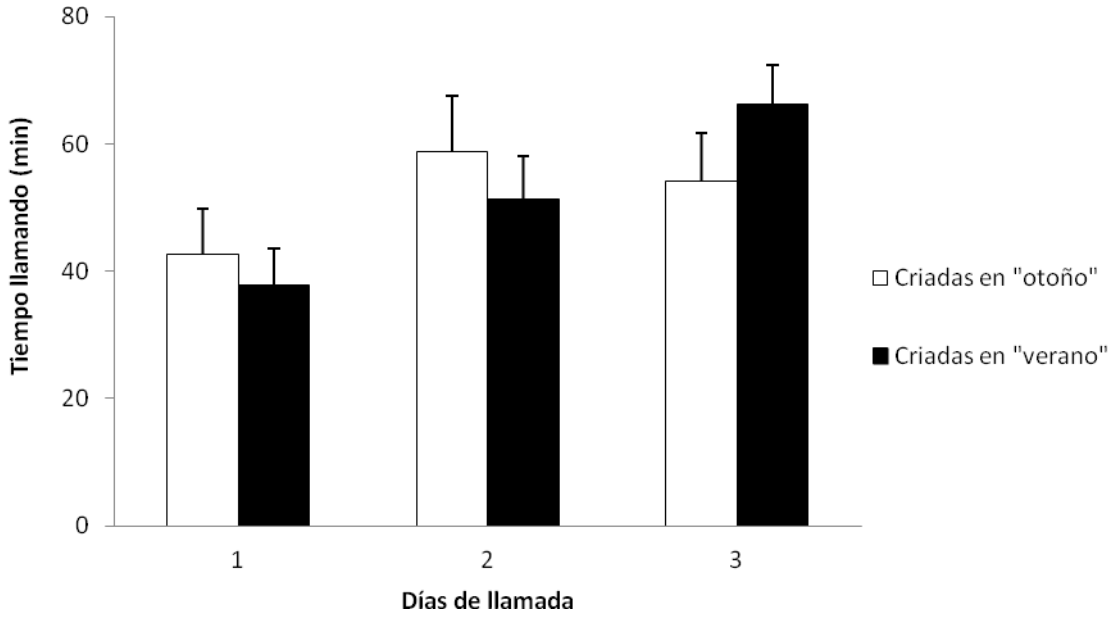

Figura 14. Tiempo de llamada en minutos (media ± error estándar) para las primeras tres noches de llamada de hembras vírgenes que llamaron de manera consecutiva. Hembras criadas como larva y pupa en "condición verano" (n = 19) y "condicón otoño" (n = 13). No se encuentran diferencias en la duración de la llamada entre hembras de distintas condiciones (GLMmr; P > 0.05), y se mantiene una tendencia a aumentar la duración de la llamada en los subsecuentes días.

ii) Patrón temporal de llamada

Se encontró una diferencia en la proporción de hembras llamando en los distintos intervalos de la noche (ANOVA Factorial F = 5.00, P = 0.001). Hembras criadas durante los estados inmaduros en condición de "otoño" presentan un pico de llamada más tarde y dejan de llamar antes que aquellas criadas en condición de "verano" (fig. 15).

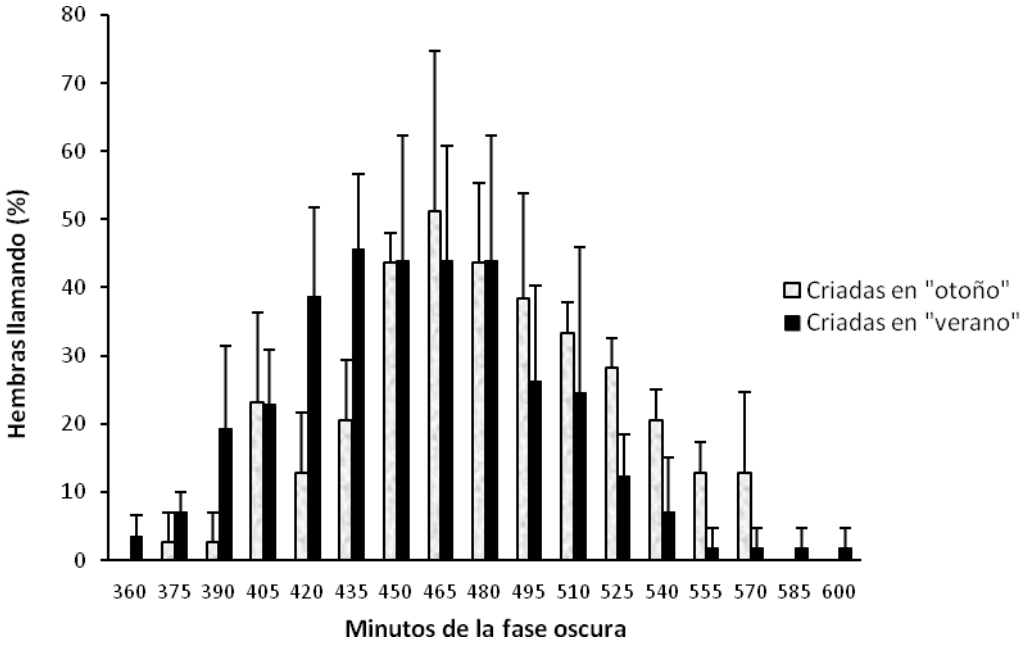

Figura 15. Proporción de hembras vírgenes llamando (media± desvío estándar) durante las primeras tres noches de llamada de manera consecutiva. Se muestran diferencias en la distribución de las proporciones a lo largo de la noche, en donde hembras criadas en condición de otoño (n = 13) presentaron un pico de llamada más tarde que aquellas criadas en condición de verano (n= 19) (ANOVA Factorial; $P < 0.05$).

iii) Hora de inicio

Finalmente, las hembras criadas en distintas condiciones sí mostraron diferencias en la hora de inicio de llamada en función del tratamiento (General Linear Model $F_{1,89} = 4.23$, $P = 0.043$), observándose claramente que en promedio las hembras criadas en condiciones de "otoño" demoran más en iniciar el comportamiento de llamada durante la noche. A su vez, si bien también existió una tendencia a que inicien la llamada más temprano en los días de llamada subsecuente, esta diferencia no fue significativa (General Linear Model $F_{2,89} = 2.90$, $P = 0.06$). Tomando en cuenta las distintas edades a la que las hembras iniciaron la llamada, no se observaron diferencias significativas en la hora de inicio de llamada (General Linear Model $F_{3,89} = 2.70$, $P = 0.051$) (fig. 16).

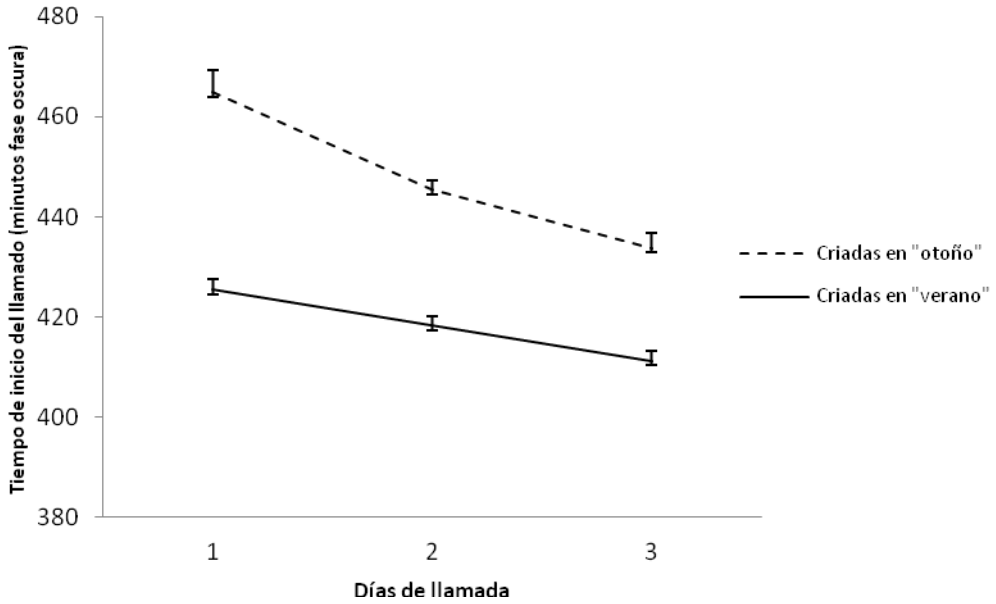

Figura 16. Hora de inicio del comportamiento de llamada (media± error estándar) para las tres primeras noches de llamada de manera consecutiva. Hembras criadas como larva y pupa en "condición otoño" (n = 13) empiezan a llamar más tarde durante la noche que aquellas en "condición verano" (n = 19) (GLM; $P < 0.05$). Además, el inicio del comportamiento de llamada, no se ve afectado significativamente en las subsecuentes noches en niguno de los tratamientos (GLM; $P > 0.05$).

Efecto poblacional: hembras con-específicas

Inicio del llamado

Mientras algunas hembras agrupadas comenzaron a llamar en la segunda noche, ninguna de las hembras solitarias fue observada en postura de llamada hasta la tercera noche. Asimismo, las hembras agrupadas que comenzaron a llamar más tardíamente lo hicieron durante la sexta noche, mientras que algunas hembras solitarias llamaron por primera vez durante la noches séptima y octava. En general, el patrón temporal del inicio de llamada fue afectado por la presencia de hembras con-específicas, de modo de acelerar el inicio del llamado (Mann-Whitney $W = 1368.5$, $P < 0.001$) (fig. 17a).

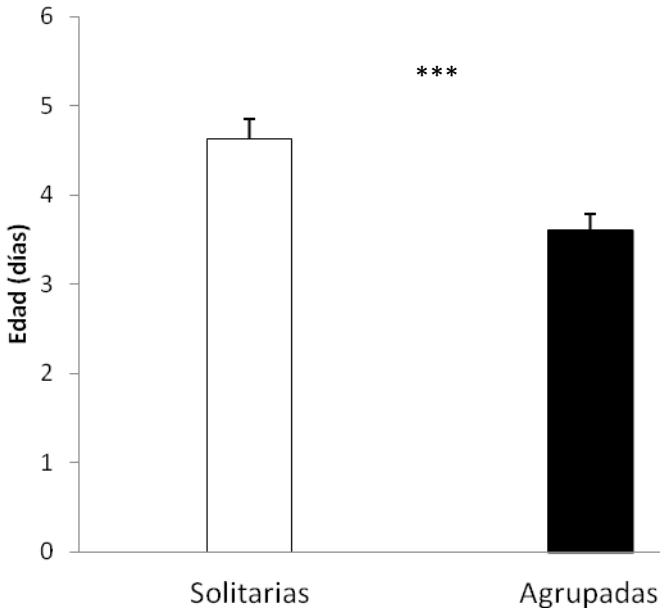

Figura 17a. Edad (media ± error estándar) del adulto a la que inicia el comportamiento de llamada. Las hembras agrupadas (n = 36, en grupos de 6) comienzan a llamar antes que las solitarias (n = 32), tanto las que llaman más jóvenes como las más tardías (Mann-Whitney; $P < 0.001$).

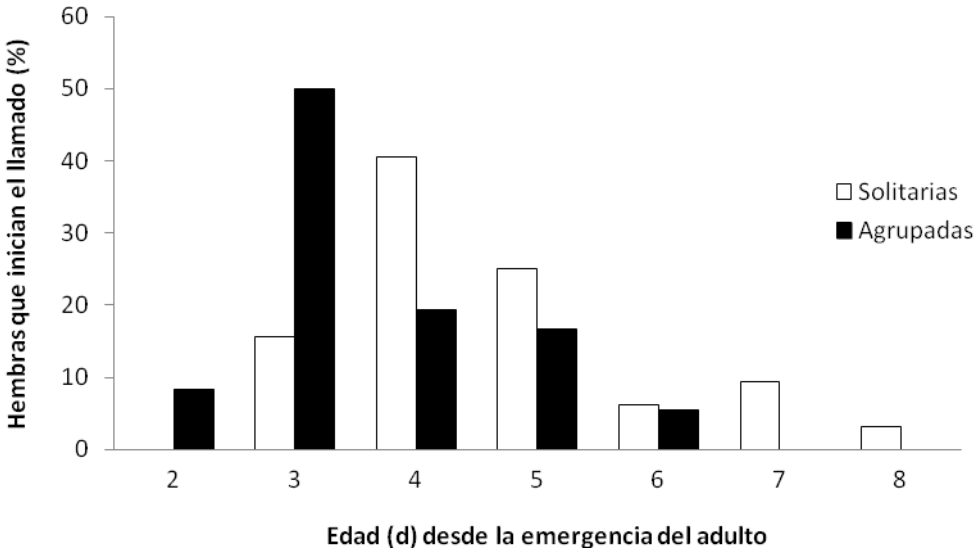

Figura 17b. Proporción de hembras vírgenes que inician el llamado sexual, según la edad del adulto expresada en días. Hembras agrupadas (n = 36, en grupos de 6) comienzan a llamar día antes que las solitarias (n = 32).

Llamado en función de la edad

Tomando en cuenta la proporción de hembras que llaman en cada noche, las hembras agrupadas llaman en mayor proporción que las solitarias durante los ocho días experimentales. Esta diferencia es más notoria a edades tempranas, y luego hay una tendencia a equipararse. Comparando cada día en forma independiente, los días que presentaron diferencias entre los tratamientos fueron el día 3 y el día 6 (X^2 = 11.619, P < 0.001 y X^2 = 7.285, P < 0.05, respectivamente) (fig. 18).

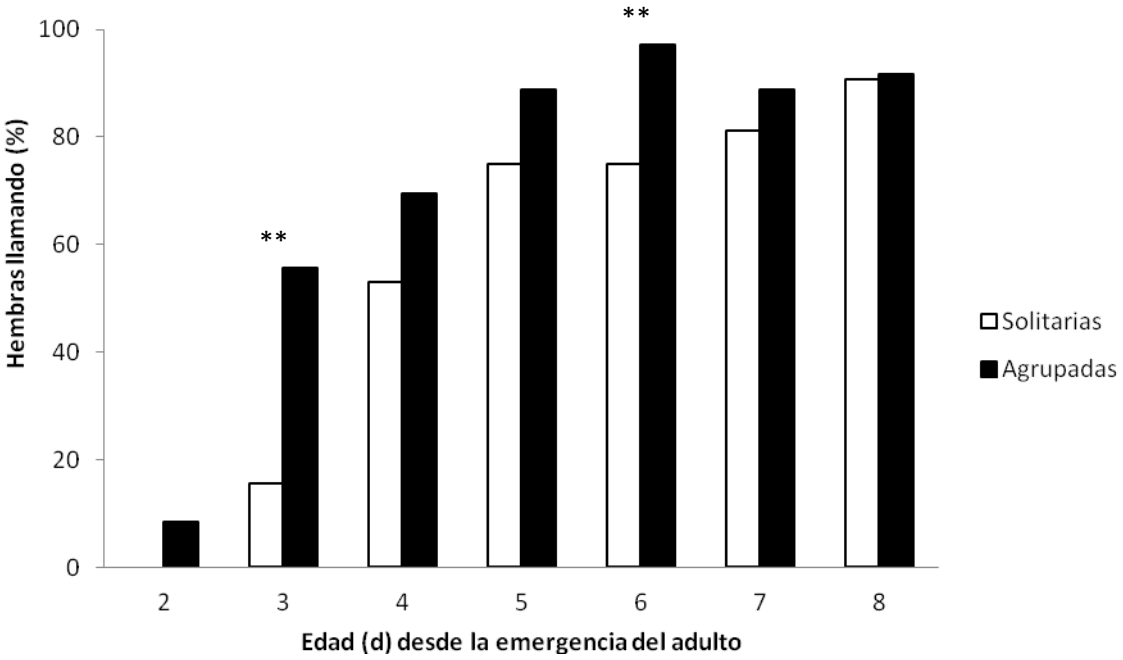

Figura 18. Proporción de hembras vírgenes que llaman en los primeros ocho días de edad. Hembras solitarias (n = 32) y agrupadas (n = 36, en grupos de 6). El análisis del conjunto de los datos muestra que las hembras agrupadas llaman en mayor cantidad que las solitarias. ** P < 0.01 para el día indicado (test de X^2).

Duración del llamado

La duración del llamado en cada noche muestra un aumento en el tiempo que las hembras llaman con el correr de los días. Al comparar ambos tratamientos, se observa que las hembras agrupadas expresan el comportamiento de llamada durante más tiempo que las solitarias (MLGmr $F_{1,66}$ = 30,106, P = 0.000) (fig. 19).

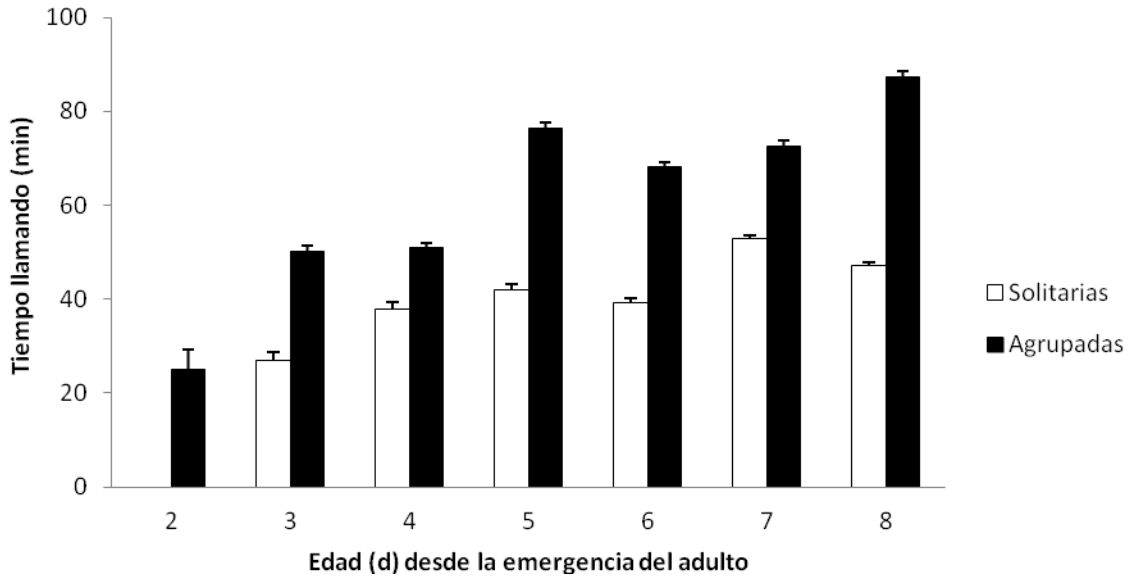

Figura 19. Tiempo de llamada en minutos (media± error estándar) para los primeros ocho días de edad de hembras vírgenes solitarias (n = 32) y agrupadas (n = 36, en grupos de 6). La duración de la llamada fue significativamente mayor en hembras agrupadas (GLM; $P < 0.001$), y se verifica un aumento en la duración de la llamada con la edad en ambos tratamientos (GLM; $P < 0.001$).

Comportamiento de llamada en los primeros tres días

Al igual que para el estudio de los *efectos ambientales*, el análisis de las características temporales del llamado se realizó también tomando en cuenta las tres primeras noches de llamada de cada hembra, de manera independiente a la edad de las mismas. Para ello, se tomaron en cuenta únicamente hembras que llamaron en tres noches consecutivas, y se analizó la duración de la llamada, el patrón temporal de llamada durante la noche, y la hora de inicio.

i) Duración de la llamada

Tomando en cuenta los tres primeros días de llamada de cada hembra, se observa el mismo resultado que se describió anteriormente; las hembras agrupadas llaman por más tiempo que las solitarias (MLGmr $F_{1,45} = 10{,}975$, $P < 0.01$), y el tiempo de llamada aumenta en noches subsecuentes para ambos tratamientos. Analizando cada día de llamada en forma independiente, se encontraron diferencias significativas entre los días 1 y 3 (Test de Tukey $T = 3.59$, $P < 0.001$) (fig. 20).

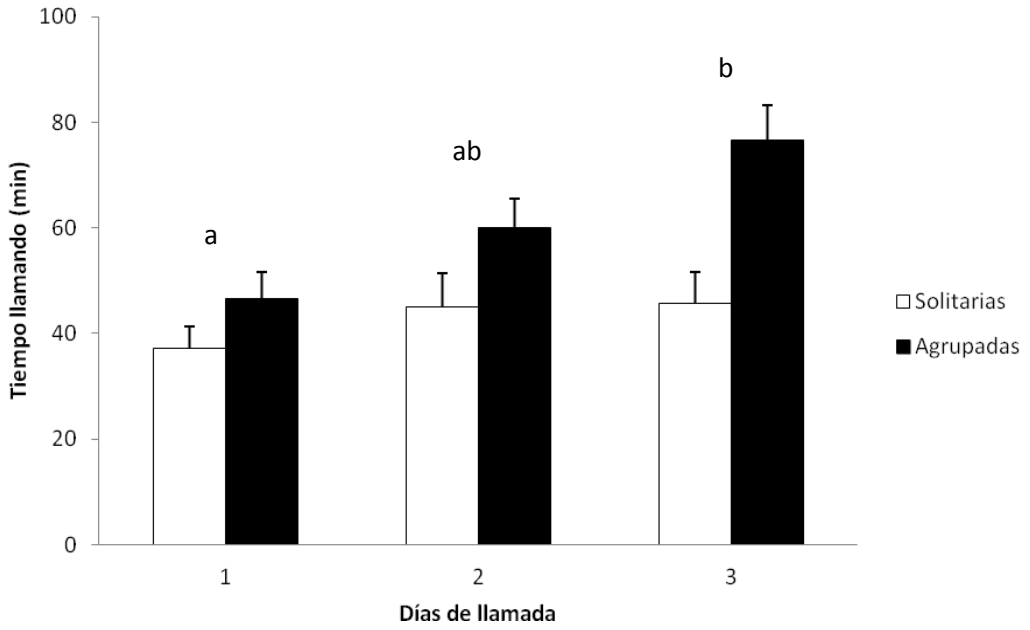

Figura 20. Tiempo de llamada en minutos (promedio ± error estándar) para las primeras 3 noches de llamada de hembras vírgenes que llamaron de manera consecutiva. Hembras solitarias (n = 19) y agrupadas (n = 28, en grupos de 6). La duración de la llamada fue significativamente mayor en hembras agrupadas (MLGmr; $P < 0.01$), y existió una tendencia a llamar más en los subsecuentes días de llamada en ambos tratamientos. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.01$) en la duración de la llamada entre días (Test de Tukey).

ii) Patrón temporal de llamada

Cuando se analizó el promedio de los tres días de la proporción de hembras llamando en los distintos intervalos de tiempo de la fase oscura, se observaron diferencias significativas (ANOVA Factorial $F = 8.69$, $P < 0.001$); las hembras solitarias concentraron el llamado más temprano que aquellas dispuestas en grupos de 6 (fig. 21).

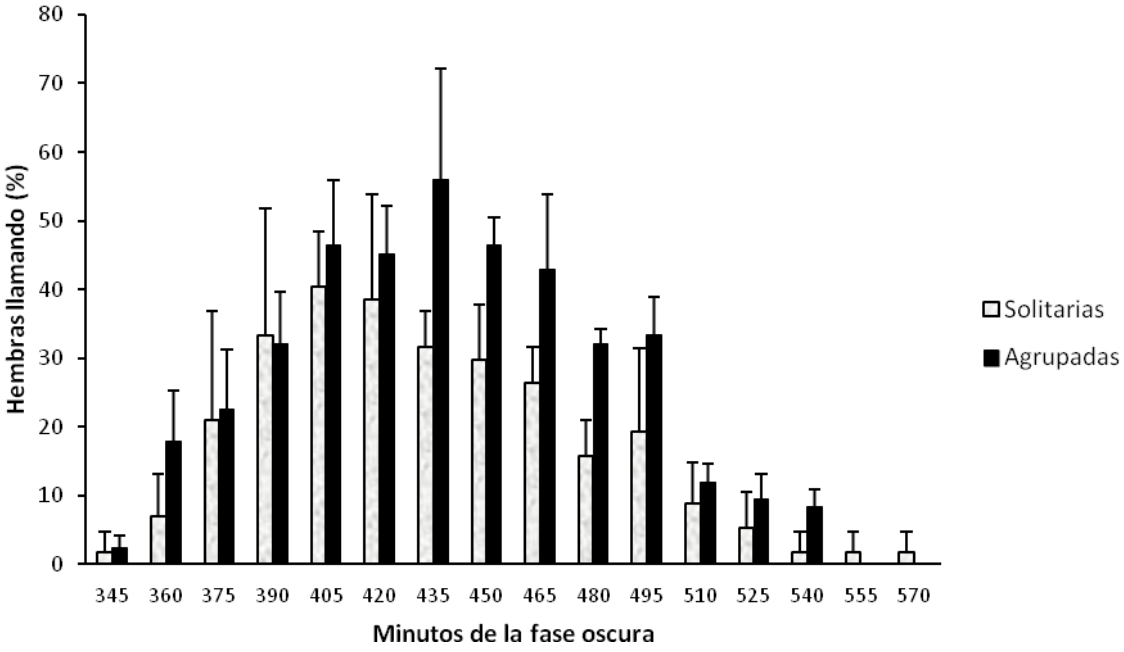

Figura 21. Proporción de hembras vírgenes llamando (promedio ± desvío estándar) durante las primeras tres noches de llamada de manera consecutiva. Hembras solitarias (n = 19) y agrupadas (n = 28, en grupos de 6). Se observa una diferencia en el pico de llamada durante la fase oscura (ANOVA Factorial; P = 0.001). Hembras solitarias concentraron el llamado más temprano que las agrupadas.

iii) Hora de inicio

Se observó que la hora de inicio de llamada de las hembras no fue afectada por los distintos tratamientos (Modelo Lineal General $F_{1,133} = 3.48$, P = 0.064). Sin embargo, las hembras en general inician el llamado más temprano en los días subsecuentes (Modelo Lineal General $F_{2,133} = 6.33$, P = 0.002). Para este análisis fueron tomadas en cuenta la edades de las distintas hembras al iniciar el comportamiento de llamada, resultando ser éste un factor significativo (Modelo Lineal General $F_{4,133} = 4.37$, P = 0.002) (fig. 22).

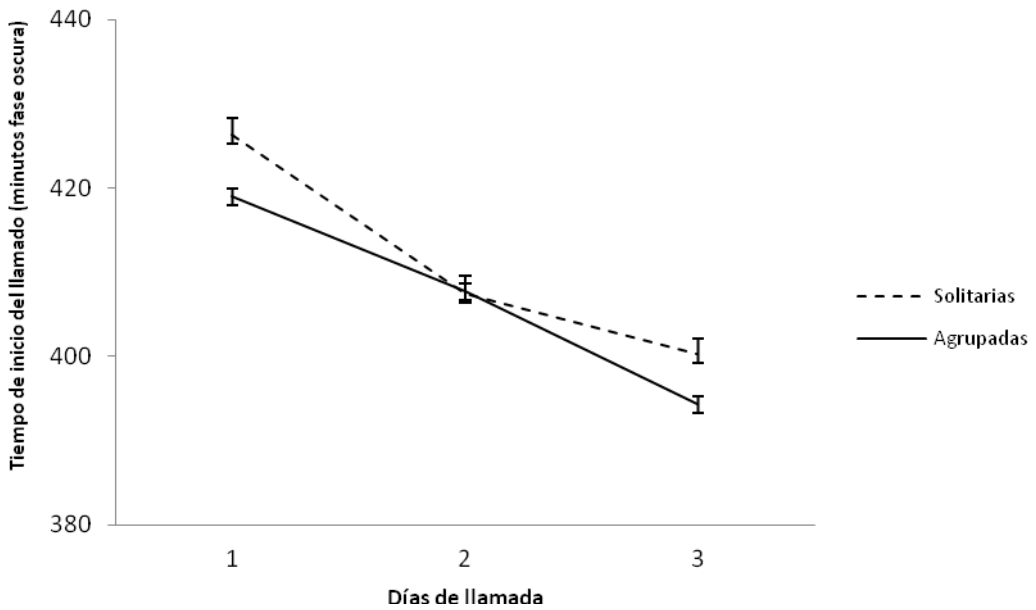

Figura 22. Hora de inicio del comportamiento de llamada (promedio ± error estándar) para las tres primeras noches de llamada de manera consecutiva. Hembras solitarias (n = 19) y agrupadas (n = 28, en grupos de 6). Las hembras de ambos tratamientos no difieren significativamente en la hora que inician el llamado (MLG; $P > 0.05$), y se observa de manera generalizada que el inicio del llamado es más temprano en los días subsecuentes (MLG; $p < 0.01$).

Discusión

El comportamiento de llamada, asociado a la liberación de la feromona sexual, resulta fundamental para la comunicación entre los sexos durante la reproducción en la mayoría de los lepidópteros nocturnos. La periodicidad circadiana y la ritualización del comportamiento de llamada observado, fue consistente con observaciones previas (observaciones de Paula Altesor y personales), en donde las hembras de *Pseudaletia adultera* llamaron durante la segunda mitad de la fase oscura adquiriendo una postura estereotipada. No obstante, este estudio indica que las condiciones ambientales durante el desarrollo y las interacciones intra-sexuales de hembras adultas, afectan la edad a la que las hembras inician el llamado así como el ritmo del comportamiento de llamada de *P. adultera.*

Efecto ambiental: condiciones de cría

Las condiciones ambientales de temperatura y fotoperiodo experimentadas durante el desarrollo del insecto, afectan el comportamiento de llamada del adulto. Condiciones que simulan el otoño resultaron en un retraso en la proporción de hembras que inician el llamado sexual y en una disminución en la probabilidad de llamar (fig. 11 y 12), sin afectar significativamente la duración de la llamada. La hora de inicio de llamada también fue afectada, llamando más temprano aquellas hembras criadas en condiciones ambientalmente favorables (verano). Asimismo, la distribución del llamado a lo largo de la noche fue modificada, ya que hembras criadas en condición de otoño presentaron un pico de llamada más tardío que aquellas criadas en condición de verano. Estos resultados concuerdan con estudios que indican que pupas de polillas mantenidas a distintas condiciones de temperatura y fotoperíodo una vez emergidas pueden regular el llamado en función de las condiciones previas experimentadas [24].

Delisle y McNeil (1987) demostraron que la periodicidad del comportamiento de llamada, así como la síntesis de la feromona, son circadianos y están temporalmente asociados, pero pueden ser modificados por la temperatura y el fotoperiodo [23]. Muchos insectos “utilizan” claves ambientales para determinar el deterioro de un hábitat [35] que les permiten adoptar dos estrategias reproductivas generales: “here-later” (aquí-luego) y “there-now” (allá-ahora) [36,37]. Aquellos insectos que adoptan la estrategia “there-now” realizan vuelos migratorios en búsqueda de zonas propicias para la reproducción una vez establecidos. En lepidópteros nocturnos, la migración es una estrategia bastante extendida que permite a los individuos incursionar hacia ambientes más favorables [35,38]. Asimismo, aunque con algunas excepciones (ver [39]), existe clara evidencia de que la mayoría de los lepidópteros inician el comportamiento migratorio siendo sexualmente inmaduros [40]. *P. unipuncta* es una especie muy cercana filogenéticamente a nuestra especie en estudio, *P. adultera*. Estudios en la primera, indican que existen diferencias

comportamentales y fisiológicas frente a distintas condiciones de temperatura y fotoperiodo [25]. Individuos sometidos a elevadas temperaturas y largos días (condiciones propicias para la reproducción) maduran sexualmente y realizan el comportamiento de llamada más temprano que aquellos sometidos a bajas temperaturas y días más cortos [41]. Estas diferencias en la maduración de la feromona sexual responden al comportamiento migratorio de la especie norteamericana [42].

De *P. adultera*, se conoce que su distribución comprende el norte de Argentina, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay [32], y se caracteriza por presentar una gran variabilidad en la magnitud de sus daños a cultivos entre temporadas y localidades [43]. A su vez, los resultados del presente estudio muestran que los individuos sometidos a condiciones ambientales desfavorables (otoño) retrasan el llamado, lo que sugiere que la flexibilidad en el comportamiento de llamada de *P. adultera* podría ser adaptativa y estar asociada a un comportamiento migratorio. Cuando se aproxima el invierno en nuestro país, esta especie podría realizar vuelos hacia zonas más templadas y propicias para su reproducción. Conclusiones respecto a las relaciones entre el comportamiento de llamada, las condiciones ambientales y la posibilidad de migrar hacia hábitats más favorables, podrán considerarse cuando más información esté disponible.

Efecto intra-sexual: Hembras con-específicas

De forma similar, la presencia de hembras con-específicas afecta el comportamiento de llamada. Un incremento generalizado en el llamado en hembras agrupadas respecto a hembras solitarias pudo observarse en (1) la edad a la que inician el llamado, (2) la probabilidad de llamar, (3) la duración de la llamada, y (4) el patrón temporal de la misma durante la noche. La hora de inicio del llamado no resulta afectada. Estos resultados sugieren que existen factores poblacionales (de hembras vecinas) que estimulan un desarrollo del comportamiento de llamada más precoz e intenso.

Estudios en distintas familias de lepidópteros indican que las hembras son capaces de responder de manera fisiológica y comportamental a la presencia de hembras con-específicas, así como a la feromona sexual [28,29,44,45,46]. Sin embargo, el tipo de respuesta varía en distintas especies. Hay polillas que incrementan [26], o retrasan [27] la señalización, o incluso son atraídas [47] o repelidas [48] cuando son expuestas a hembras con-específicas y/o a la feromona. Explicaciones adaptativas para este fenómeno sugieren que aumentar los esfuerzos de señalización es una forma de competencia intra-sexual, cuando las hembras se encuentran agrupadas en grandes cantidades. Al mismo tiempo, y de manera no excluyente, podría representar una

forma de cooperación entre hembras para atraer mayor cantidad de machos con respecto a otros grupos [30]. Por el contrario retrasar el inicio o la finalización de la llamada en presencia de hembras con-específicas o de sus feromonas, reduciría la competencia entre hembras [46].

Estudios en el comportamiento de llamada de *Utetheisa ornatrix* [30] y *Lobesia botrana* (Leptidoptera: Tortricidae) [11] muestran que las hembras interactúan sincronizando e intensificando la liberación de la feromona sexual. No obstante, en el caso de *L. botrana*, esto implica un costo en el fitness de las hembras, que se traduce en menor número de huevos fértiles en comparación con hembras solitarias o no expuestas a la feromona sexual, y en un incremento de la mortalidad de las hembras [11]. En contraste, hembras solitarias podrían ajustar el llamado sexual dependiendo del escenario. En ausencia de competencia intra-sexual, uno esperaría que las hembras minimicen la inversión en el comportamiento de llamada. Mientras que, en ausencia de machos y con el aumento de edad siendo aún vírgenes, aumentarían la inversión de energía en el llamado, procurando asegurar la cópula. Una explicación alternativa, no excluyente, sugiere que la baja señalización de los individuos solitarios durante las primeras noches puede interpretarse como una estrategia de selección por machos más sensibles y eficientes para el encuentro de las parejas. En ausencia de estos machos, las hembras incrementarían el llamado en las sucesivas noches [14,49]. Estas explicaciones van en acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se observa que si bien existe un llamado generalizado mayor en hembras agrupadas, en ambos tratamientos las hembras aumentan la proporción y la duración del llamado en noches subsecuentes.

Si bien el compromiso entre invertir más en señalizar y la reducción del fitness en hembras de *P.aduletra* no ha sido considerado, una posible explicación podría estar relacionada con el sistema de apareamiento de la especie. En lepidópteros, la poliandria - las hembras acceden a múltiples apareamientos con distintos machos - es frecuente, y los niveles varían entre y dentro de las especies [50], sugiriendo que esta estrategia reproductiva depende de un contexto determinado [51]. A través de múltiples apareamientos, las hembras obtendrían beneficios directos e indirectos que compensarían los costos energéticos de producir y emitir grandes cantidades de feromona [52]. Las hembras de *U. ornatrix* son de hábitos crepusculares, en vida libre forman agrupaciones durante el comportamiento reproductivo, y en el curso de las 3 a 4 semanas de su vida adulta experimentan múltiples apareamientos [53]. A través del espermatóforo el macho les transmite: esperma, sustancias para defensa y nutrientes [54], por lo que, como contrapartida de la energía destinada a la producción de grandes cantidades de feromona, las hembras obtendrían beneficios directos e indirectos del apareamiento. Asimismo, en *L. botrana*, Torres-Vila y colaboradores (1997) demostraron que los machos contribuyen con el espermatóforo durante la cópula, y Harari y colaboradores (2011) demostraron que la producción de feromona

sexual de las hembras es costosa y condición dependiente, posiblemente permitiendo a los machos obtener información acerca de la calidad de la pareja [11,55].

Tradicionalmente, la cantidad de feromona sexual emitida durante el comportamiento de llamada ha sido considerada energéticamente poco costosa para las hembras [17], y responsable principalmente del reconocimiento específico [10]. Esta visión, lejos de ser incorrecta, parece sin embargo, no ser rígida. La feromona sexual puede variar entre hembras individuales en cantidad, y en la proporción de los compuestos [56] y ser potencialmente una señal honesta.

Por otra parte, Svard y McNeil (1994) demostraron en *P. unipuncta* que la poliandria incrementa la fecundidad y longevidad de las hembras [57]. Tanto hembras de *P. unipuncta,* como de *P. adultera,* además de otras similitudes comportamentales, poseen un aparato reproductor dytrisio - dos aberturas sexuales -, una destinada a la cópula y el almacenamiento del espermatóforo y otra para la puesta de huevos [58]. En base a estas observaciones, *P. aduletra* podría tener el potencial de aparearse más de una vez, y llamar antes y de manera más intensa cuando está en presencia de con-específicos, podría ser un mecanismo que aumente la probabilidad de atraer más machos para la cópula. Futuros estudios son necesarios para responder estas y otras interrogantes que este estudio deja planteadas, especialmente contemplando el potencial de apareamiento de las hembras, así como la respuesta de los machos frente al llamado en grupo.

Conclusiones

Cambios en el comportamiento de llamada pueden tener consecuencias importantes en la comunicación entre los individuos y en la estructura de las poblaciones [19]. Hembras vírgenes de *Pseudaletia adultera* sometidas a distintas condiciones ambientales y a interacciones intra-sexuales responden modificando el ritmo de la llamada. El efecto combinado de la temperatura y el fotoperiodo durante el desarrollo afecta el inicio del comportamiento, la probabilidad de llamar, la hora de inicio del mismo y el patrón temporal de la llamada durante la noche. Se podría pensar que esta flexibilidad es el resultado de distintos tiempos de maduración según las condiciones de cría. Sin embargo, en *P. unipuncta* cuando el adulto es expuesto a distintas condiciones también modifica su comportamiento [23], sugiriendo que el comportamiento de llamada es controlado por más de un mecanismo operando en simultáneo [24]. Éste estudio demuestra, como el comportamiento de llamada de *P. adultera* puede ser modulado por estímulos externos como la temperatura y el fotoperiodo.

Asimismo, la presencia de hembras con-específicas resulta en un adelanto, y en un incremento generalizado del llamado. Hembras agrupadas empiezan a llamar más jóvenes, con mayor probabilidad, y por más tiempo que hembras solitarias. Por lo tanto, interacciones intra-sexuales inducen la señalización. Futuros estudios en la oruga militar permitirán un mejor entendimiento sobre estas interacciones durante el comportamiento reproductivo.

Perspectivas

Teniendo en cuenta el efecto de la temperatura y el fotoperiodo durante los estados de desarrollo de la polilla en el comportamiento de llamada, podría investigarse si para la especie en estudio existen diferencias en la maduración de los ovarios al emerger el adulto. Asimismo, contemplando la posibilidad de que el retraso en el comportamiento sexual sea adaptativo y permita a los individuos migrar hacia regiones más favorables para la reproducción, es posible elaborar un diseño experimental de marca y recaptura de individuos en distintos puntos estratégicos utilizando trampas con feromona.

Respecto al incremento generalizado en el comportamiento de llamada de hembras agrupadas, se podría estudiar el sistema de apareamiento de la especie, si existe una preferencia por parte de los machos frente al llamado grupal de las hembras respecto al de solitarias y también determinar el efecto del canal químico en el comportamiento de llamada de las hembras.

Bibliografía

1. Wislon, E. (1970). Chemical communication among within animal species. En *Chemical Ecology*. Academic Press, New York, **9**: 133 - 155.

2. Law, R. & Regnier, F. (1971). Pheromones. *Annual Review of Biochemistry*, **40**: 533 - 548.

3. Howse, P., Stevens, I. & Jones, O. (1998). *Insect pheromones and their use in pest management.* Chapman & Hall London, UK.

4. Alcock, J. (1998). *Animal Behaviour*. *An evolutionary approach*, 6th ed.

5. Cardé, R. & Millar, J. (2004). *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.

6. Brown, W., Eisner, T. & Whittaker, R. (1970). Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. *BioScience,* **20**: 21 - 22.

7. Wyatt, T. (2003). *Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste.* Cambridge University Press, New York.

8. Eisner, T. & Meinwald, J. (1995). The chemistry of sexual selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **92**: 50 - 55.

9. Borror, D., Triplehorn, C. & Johnson, N. (1989). *An introduction to the study of insects.* Harcourt Brace Jovanovich College.

10. Cardé, R. & Haynes, K. (2004). Structure of the pheromone communication channel in moths. En *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, Pp. 283 - 332.

11. Harari, A., Zahavi, T. & Thiéry, D. (2011). Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. *Evolution,* **65-6**: 1572 - 1582.

12. Trivers, R. (1972). Parental investment and sexual selection. En *Sexual selection and the descent of Man*. ed. B. Campbell, pp. 136 - 179. Aldine Press, Chicago.

13. Thornhill, R. & Alcock, J. (1983). *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University Press, Massachusetts.

14. Phelan, P. (1992). Evolution of sex pheromones and the role of asymmetric tracking. En *Insect Chemical Ecology*. Chapman and Hall, New York, Pp. 265 - 315.

15. Bateman, A. (1948). Intrasexual selection in Drosophila. *Heredity,* **2**: 349 - 368.

16. Arnqvist, G. & Nilsson T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, **60**: 145 - 164.

17. Cardé, R. & Baker, T. (1984). Sexual communication with pheromones. En *Chemical Ecology of Insects*, Chapman and Hall, New York, Pp. 356 – 383.

18. Turgeon, J. & McNeil, J. (1982). Calling behaviour of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *Entomologia Exp. Appl.*, **31**: 402 - 408.

19. Baker, T. & Cardé, R. (1979). Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholita molesta* (Busck). *J. Insect Physiol*., **25**: 943 - 950.

20. Cardé, R., Comeau, A., Baker, T. & Roelofs W. (1975). Moth mating periodicity: temperature regulates the circadian gate. *Experientia*, **31**: 46 - 38.

21. Haynes, K. & Birch, M. (1984) The periodicity of pheromone release and male responsiveness in the artichoke plume moth, *Platyptilia carduidactyla*. *Physiol. Ent.,* **9**: 287 - 295.

22. Webster, R. & Cardé, R. (1982). Influence of relativehumidity on calling behaviour of the female European corn borer moth *Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Exp. Appl.,* **32**: 181 - 185.

23. Delisle, J. & McNeil, J. (1987). The combined effect of photoperiod and temperature on the calling behaviour of the true armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Physiol. Entomol.*, **12**: 157 - 164.

24. Turgeon, J. & McNeil, J. (1983). Modifications of the calling behaviour of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae), induced by temperature conditions during pupal and adult development. *Can Entomol*., **115**: 1015 - 1022.

25. Delisle, J. & McNeil, J. (1986). The effect of photoperiod on the calling behaviour of virgin females of the true armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol*., **32**: 199 - 206.

26. Palaniswamy, P. & Seabrook, W. (1985). The alteration of calling behavior by female *Choristoneura fumiferana* when exposed to synthetic sex pheromone. *Entomol. Exp. Appl*., **37**: 13 - 16.

27. Noguchi, H. & Tamaki, Y. (1985). Conspecific female sex pheromone delays calling behaviour of *Adoxophyes* sp. and *Homona magnanima* (Lepidoptera:Tortricidae). *Japanese J. Appl. Entomol. Zool*., **29**: 113 - 118.

28. Stelinski, L., Il'ichev, A. & Gut, L. (2006). Antennal and behavioral responses of virgin and mated oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) females to their sex pheromone. *Annals of the Entomological Society of America*, **99**: 898 - 904.

29. Lim, H., Park, K. , Baker, T. & Greenfield, M. (2007). Perception of conspecific female pheromone stimulates female calling in an arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. *Journal of Chemical Ecology*, **33**: 1257 - 1271.

30. Lim, H. & Greenfield, M. (2007). Female pheromonal chorusing in an arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. *Behav. Ecol*., **18**: 165 - 173.

31. Bentancourt, C. & Scatoni, I. (2006). Lepidópteros de importancia económica en Uruguay. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. *2da ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. Universidad de la República*. Facultad de Agronomía. Uruguay. **351**: 353 - 359.

32. Bentancourt, C. & Scatoni, I. (1999). Guía de Insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en Uruguay. *Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. Universidad de la República*. Facultad de Agronomía. Uruguay.

33. Zerbino, M. (2007). Manejo de insectos en trigo y cebada. Jornada de Cultivos de Invierno, Pp. 61 - 63.

34. Martin, P. & Bateson, P. (1993). *Measuring Behaviour. An introductory guide*. 2nd ed. Cambridge. University Press.

35. Han, E. & Gatehouse, A. (1991). Genetics of precalling period in the oriental armyworm, *Mythimna separate* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), and implications for migration. *Evolution*, **45**: 1502 - 1510.

36. Southwood, T. (1977). Habitat, the templet for ecological strategies? *J Anim. Ecol.*, **46**: 337 - 365.

37. Solbreck, C. (1978). Migration, diapause, and direct development as alternative life histories in a seed bug, *Neacoryphus bicrucis*. En *Evolution of Insect Migration and Diapause*. Berlin Springer-Verlag, Pp. 196 - 217.

38. McNeil, J., Cusson, M., Delisle, J., Orchard, I. & Tobe, S. (1995). Physiological integration of migration in Lepidoptera. En *Insect Migration: Tracking Resources in Space and Time*. Cambridge University Press, Cambridge, Pp. 279 - 302.

39. Greenbank, D., Schaefer, G. & Rainey, R. (1980). *Spruce budworm* (Lepidoptera: Tortricidae) moth flight and dispersal: new understanding from canopy observations, radar and aircraft. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, **110**: 1 - 49.

40. Gatehouse, A. & Zhang, X. (1995). Migratory potential of insects: variation in an uncertain environment. En *Insect Migration: Tracking Resource in Space and Time*. Cambridge University Press, Cambridge, Pp. 193 - 242.

41. McNeil, J., Cusson, M., Delisle, J. & Tobe, S. (1994). Hormonal control of sexual behaviour in moths that migrate in response to predictable and unpredictable habitat deterioration. En *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada, Pp .464 - 468.

42. McNeil, J., Miller, D., Laforge, M. & Cusson, M. (2000). Dynamics of juvenile hormone biosynthesis, degradation and titers in females of the true armyworm: a comparison of migratory and non-migratory populations. *Physiol. Ent.*, **25**: 103 - 11.

43. Zerbino, M. (1991). Lagarta de los cereales. Serie Técnica No 9. INIA La Estanzuela. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Editado por la Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA. Montevideo. Uruguay

44. Ljungberg, H., Anderson, P. & Hansson, B. (1993). Physiology and morphology of pheromone specific sensilla on the antennae of male and female *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.*, **39**: 253 - 260.

45. Groot, A., Gemeno, C., Brownie, C., Gould, F. & Schal, C. (2005). Male and female antennal responses in *Heliothis virescens* and *H. subflexa* to conspecific and heterospecific sex pheromone compounds. *Environmental Entomology*, **34**: 256 - 263.

46. Yang, M., Dong, S. & Chen, L. (2009). Electrophysiological and Behavioral Responses of Female Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) to the Conspecific Female Sex Pheromone. *J Insect Behav.*, **22**: 153 - 164.

47. Otter, C., De Cristofaro, A., Voskamp, K. & Rotundo, G. (1996). Electrophysiological and behavioural responses of chestnut moths, *Cydia fagiglandana* and *C. splendana* (Lepidoptera: Tortricidae), to sex attractants and odours of host plants. *J. Appl. Entomol.*, **120**: 413 - 421.

48. Saad, A. & Scott, D. (1981). Repellency of pheromones released by females of *Heliothis armigera* and *H. zea* to females both species. *Entomol Exp. Appl.,* **30**: 123 - 127.

49. Lloyd, J. (1979). Sexual selection in luminescent beetles. En *Sexual selection and reproductive competition in insects*. Academic Press, New York, Pp. 293 - 342.

50. Drummond, B. (1984). Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera. En *Sperm competition and the evolution of animal mating systems.* Academic Press, New York.

51. Torres-Vila, L., Rodriguez-Molina, M. & Jennions, M. (2004). Polyandry and fecundity in the Lepidoptera: can methodological and conceptual approaches bias outcomes? *Behav. Ecol. Sociobiol*., **55**: 315 - 324.

52. Arnqvist, G. & Nilsson, T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, **60**: 145 - 164.

53. Bezzerides, A. & Eisner, T. (2002). Apportionment of nuptial alkaloidal gifts by a multiply-mated female moth (*Utetheisa ornatrix*): eggs individually receive alkaloid from more than one male source. *Chemoecology*, **12**: 213 - 218.

54. Rossini, C., González, A. & Eisner, T. (2001). Fate of an alkaloidal nuptial gift in the moth *Utetheisa ornatrix*: systemic allocation for defense of self by the receiving female. *J Insect Phisiol*., **47**: 639 - 647.

55. Torres-Vila, L., Stockel, J. & Rodríguez-Molina, M. (1997). Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Physiological Entomology*, **22**: 387 - 393.

56. Lofstedt, C. (1990). Population variation and genetic control of pheromone communication systems in moth. *Entomol. Exp. Appl*., **54**: 189 - 218.

57. Svard, L. & McNeil, J. (1994). Female benefit, male risk: Polyandry in the true armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **35**: 319 - 326.

58. García-Barros, E. (1999). Filogenia y evolución de Lepidoptera. *Bol. S.E.A*, **26**: 475 - 483.