



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSGRADO EN FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**INFLUENCIA DE UN SUPLEMENTO A BASE  
DE PROTEÍNA EN LA BIOLOGÍA  
REPRODUCTIVA DE HEMBRAS DE  
*Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA:  
PTEROMALIDAE)**

**AGUSTÍN JESÚS GONZAGA SEGURA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

2017



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, Agustín Jesús Gonzaga Segura, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Esteban Rodríguez Leyva, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "Influencia de un suplemento a base de proteína en la biología reproductiva de hembras de *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae", y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Campus Montecillo, a 27 de noviembre de 2017.

Agustín Jesús Gonzaga Segura

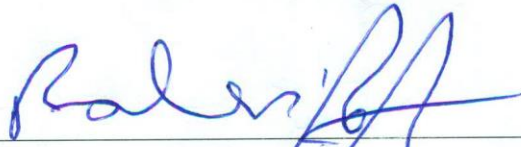
Vo. Bo. Esteban Rodríguez Leyva

La presente tesis titulada: **“INFLUENCIA DE UN SUPLEMENTO A BASE DE PROTEÍNA EN LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE HEMBRAS DE *Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE)”**, realizada por el alumno: **Agustín Jesús Gonzaga Segura**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

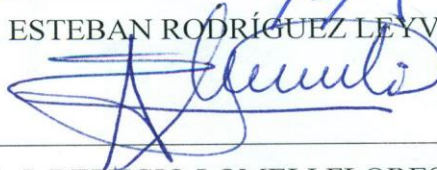
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



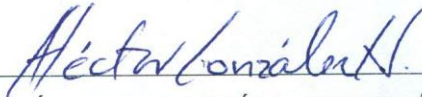
DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

ASESOR



DR. J. REFUGIO LOMELI FLORES

ASESOR



DR. HÉCTOR GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR



DR. JULIO S. BERNAL

ASESOR



DR. JHONY NAVAT ENRÍQUEZ VARA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2017

**INFLUENCIA DE UN SUPLEMENTO A BASE DE PROTEÍNA EN LA BIOLOGÍA  
REPRODUCTIVA DE HEMBRAS DE *Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA:  
PTEROMALIDAE)**

Agustín Jesús Gonzaga Segura, DR.  
Colegio de Postgraduados, 2017

**RESUMEN**

La alimentación de adultos en parasitoides sinovigénicos se considera indispensable para desarrollar funciones vitales de supervivencia y reproducción. Es tan importante que se relaciona con la necesidad de alimentarse de sus huéspedes para obtener nutrientes y manifestar su potencial reproductivo. Aunque existen estudios que exploran el efecto de carbohidratos como fuente de energía para los parasitoides adultos, existen menos estudios que documenten la importancia de una proteína exógena como un complemento alimenticio en la biología reproductiva de parasitoides sinovigénicos. Para conocer este efecto, se utilizó a *Catolaccus hunteri* como modelo de estudio por ser una especie sinovigénica. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) describir las ovariolas de *Catolaccus hunteri* y evaluar el efecto de distintas fuentes de proteína (caseína, polen y proteína hidrolizada) como suplementos alimenticios sobre el potencial reproductivo de este parasitoide, 2) determinar la influencia de un suplemento a base de caseína, con y sin huésped, sobre la oogénesis de *C. hunteri*, 3) determinar si distintas concentraciones de caseína, mezclada con miel, junto con el huésped afectaban parámetros de su biología reproductiva. Las ovariolas de *C. hunteri* son de tipo meroístico politrófico con un par de ovarios y tres ovariolas por ovario. Para ofrecer las fuentes de proteína (caseína, polen y proteína hidrolizada) a los adultos de *C. hunteri* fue necesario mezclarlas con miel. La miel con huésped registró 70% más huevos que cualquier

suplemento de proteína sin huésped. No obstante, miel + caseína sin huésped produjo 38% más huevos que polen o proteína hidrolizada sin huésped. El tamaño de huevo (calidad) no estuvo influenciado por los tratamientos. Después de esta primera evaluación de suplementos proteínicos se continuó sólo con caseína mezclada con miel. Se realizó una evaluación del efecto de dicho suplemento con o sin la presencia del huésped; con estos ensayos se encontró que la caseína mezclada con miel modificó la producción de oocitos y huevos de *C. hunteri*. Las hembras a las que se les ofreció huésped produjeron más huevos (77%) que aquellas sin huésped; las hembras alimentadas con caseína + miel + huésped produjeron 22% más huevos respecto a aquellas hembras con miel + huésped. Por otro lado, hembras alimentadas con miel + caseína sin huésped presentaron 38% más huevos respecto a miel sin huésped. El tamaño de huevo fue 3% más grande en sólo miel comparado con miel + huésped y 10% más grande respecto a miel + caseína con y sin huésped. Después de comprobar que había un efecto de una concentración de caseína sobre el número de huevos, en presencia del huésped, se ensayó con diferentes concentraciones de caseína en un periodo más largo de evaluación y considerando las variables siguientes: periodo de preoviposición, fecundidad, alimentación sobre el huésped, calidad de huevo y fertilidad. De las concentraciones de caseína [(0, 30, 60 y 120) mg/ 1 mL miel] sólo se observó efecto de la concentración 60 mg/mL de miel. En esta concentración se obtuvieron 30% más huevos que en el resto de los tratamientos. No se detectaron diferencias entre tratamientos respecto a parámetros biológicos como preoviposición, fertilidad, tamaño de huevo o alimentación sobre el huésped. Con este trabajo se contribuyó a demostrar que un suplemento a base de proteína (caseína), como suplemento en la alimentación de hembras adultas, puede modificar la capacidad reproductiva de un parasitoide sinovigénico. Este estudio se puede concluir, que la caseína aportó beneficios en

la biología reproductiva de *C. hunteri* cuando el huésped estuvo presente y en menor grado, sin la presencia del huésped.

**Palabras clave:** Control biológico, cría de insectos, nutrición

**INFLUENCE OF A PROTEIN-BASED SUPPLEMENT IN THE REPRODUCTIVE  
BIOLOGY OF FEMALES OF *Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA:  
PTEROMALIDAE)**

Agustín Jesús Gonzaga Segura, DR.  
Colegio de Postgraduados, 2017

**ABSTRACT**

The feeding process of synovigenic parasitoid adults is considered essential to develop vital functions of survival and reproduction. It is so important that it is related to the need for host feeding to obtain nutrients and to express their reproductive potential. Although there are studies about the effect of carbohydrates as an energy source for this kind of parasitoid adults, there are fewer studies that support the importance of an exogenous protein as a dietary supplement in the reproductive biology of synovigenic parasitoids; for knowing if there are any related effect, *Catolaccus hunteri* was used as a model of synovigenic species, and the objectives of this work were: 1) to describe the ovariolas of *Catolaccus hunteri* and to evaluate the effect of different sources of protein (hydrolyzed casein, pollen and hydrolyzed protein) as dietary supplements on its reproductive potential, 2) to determine the influence of a supplement based on casein, with and without host, on the oogenesis of *C. hunteri*, 3) to determine if different casein concentrations, mixed with honey, and the host presence cause any effect on its reproductive biology. The ovariolas of *C. hunteri* are of polytrophic meroistic type with a pair of ovaries and three ovariolas by ovary. To offer the sources of protein (casein, pollen and hydrolyzed protein) to the adults of *C. hunteri* was necessary to mix them with honey. Honey plus host registered 70% more eggs than any protein supplement without host. However, honey plus casein without host produced 38% more eggs

than pollen or hydrolyzed protein without host. The egg size (quality) was not influenced by the treatments. After this first evaluation of protein supplements, only casein mixed with honey was kept for experimentation. We did an evaluation of the effect of a casein concentration (60 mg / 1 mL honey) with or without the presence of the host; after those assays it was found that casein mixed with honey modified the oocytes and eggs production of *C. hunteri*. Females to which host were offered produced more eggs (77%) than those without host; females fed with casein + honey + host produced 22% more eggs than females with honey + host. On the other hand, females fed with honey + casein without host had 38% more eggs than females fed with honey without host. The egg size was 3% larger in honey compared to honey + host and 10% larger in relation to honey + casein with and without host. After checking that there was an effect of casein on the number of eggs in presence of the host, different concentrations of casein were tested as a dietary supplements (0, 30, 60 and 120 casein mg / 1 mL honey) for female adults during a longer period of evaluation. At the same time we considered other variables such as: preoviposition period, fecundity, host feeding, egg quality and fertility. Of the different concentrations of casein only 60 mg / 1 mL honey offered a consistent response. In this concentration, 30% more eggs were obtained than in the rest of treatments. No differences were detected between treatments regarding biological parameters such as preoviposition, fertility, egg size or feeding on the host. This work helped to demonstrate that a supplement based on protein (casein), as a supplement in the diet of adult females, can modify the reproductive capacity of a synovigenic parasitoid. We concluded that casein contributed to the reproductive biology of *C. hunteri* when the host was present and to a lesser degree without the presence of the host.

**Key words:** Biological control, rearing of insects, nutrition



## **AGRADECIMIENTOS**

A la vida, por darme la oportunidad de disfrutar una de las experiencias más gratificantes y emocionantes.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Doctorado.

**Al pueblo de México**, que con los impuestos que pagamos, también nos dan la oportunidad de seguir superándonos profesionalmente.

**Al Comité revisor de tesis**, integrado por el Dr. Esteban Rodríguez Leyva, D. J. Refugio Lomeli Flores, Dr. Héctor González Hernández, Dr. Julio S. Bernal, Dr. Jhony N. Enríquez Vara por su participación, sugerencias y comentarios oportunos para la realización de este trabajo doctoral. Pero sobre todo, por que cada uno aportó algo importante en mi formación académica, profesional y personal.

**Un especial agradecimiento** al M. C. Jorge Valdez Carrasco por darme la oportunidad de compartir su experiencia académica, además de la hospitalidad y la atención brindada en la realización de este trabajo. Y más que un profesor, un amigo.

**A mis compañeros** de laboratorio de control biológico.

## **DEDICATORIA**

**A mi familia  
y a mi otra familia (Pantitlán y anexos)**

“Cuando alguien asume que no entiende algo, es que está en el buen camino para comprender muchas cosas”. Jostein Gaarder, El misterio del solitario.

## CONTENIDO

### Página

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	vii
AGRADECIMIENTOS .....	ix
DEDICATORIA .....	x
LISTA DE CUADROS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Objetivo general .....	3
1.1.1 Objetivos específicos.....	3
<b>CAPÍTULO 1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE OVARIOLAS DE <i>Catolaccus hunteri</i> (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE) Y SU DESARROLLO CON DISTINTAS FUENTES PROTEÍNICAS.....</b>	<b>5</b>
2.1 RESUMEN.....	5
2.2 INTRODUCCIÓN.....	6
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.3.1 Material biológico.....	8
2.3.1.1 Cría de <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	8
2.3.1.2 Cría de <i>Catolaccus hunteri</i> .....	8
2.3.2 Tratamientos y diseño experimental .....	9
2.3.3 Ovariolas, producción de oocitos y huevos en adultos de <i>Catolaccus hunteri</i> ..	10
2.3.4 Análisis estadístico.....	11
2.4 RESULTADOS.....	11
2.4.1 Ovariolas en <i>Catolaccus hunteri</i> .....	11
2.4.2 Formación de oocitos y huevos totales, y calidad (tamaño) de huevos en <i>Catolaccus hunteri</i> .....	13
2.4.3 Dinámica de oocitos en adultos de <i>Catolaccus hunteri</i> .....	15
2.4.4 Dinámica de huevos en adultos de <i>Catolaccus hunteri</i> .....	16

A partir del día 5 se observó un patrón en la presencia de huevos. Conforme transcurría el tiempo, las hembras alimentadas con miel y disposición del huésped tuvieron siempre el mayor número de huevos comparadas con aquellas sin huésped (Figura 3). El tratamiento

que le siguió al anterior fue el de las hembras mantenidas con miel más caseína, que tuvieron ligeramente más huevos los días 5, 10 con respecto a la proteína hidrolizada, o los días 10, 15 y 25 con respecto a sólo la miel.....	16
<b>2.5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 2. EFECTO DE SUPLEMENTOS PROTEÍNICOS SOBRE LA OOGÉNESIS DE <i>Catolaccus hunteri</i> (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE) .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 RESUMEN.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.1 Cría de insectos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.2 Bioensayo y tratamientos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.3 Evaluación de oocitos y huevos de <i>Catolaccus hunteri</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.4 Análisis de datos.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.1 Número total de oocitos, huevos y tamaño de huevo (calidad) en <i>Catolaccus hunteri</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4.2 Efecto del suplemento proteínico (caseína) sobre la dinámica de oocitos y huevos de <i>Catolaccus hunteri</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 3. ¿TIENE ALGÚN EFECTO, SOBRE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA, ALIMENTAR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CASEÍNA A ADULTOS DE <i>Catolaccus hunteri</i> (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE)?.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 RESUMEN.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.1 Material biológico.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.1.1 Cría del huésped facticio <i>Callosobruchus maculatus</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.1.2 Cría del parasitoide <i>Catolaccus hunteri</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2 Tratamiento y diseño experimental.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.3 Variables evaluadas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.3.1 Periodo preoviposición y fecundidad (oviposición).....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.3.2 Calidad de huevo (tamaño).....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.3.3 Alimentación sobre el huésped.....</b>	<b>36</b>

<b>4.3.3.4 Fertilidad</b> .....	37
<b>4.3.3.5 Análisis estadístico</b> .....	37
<b>4.4 RESULTADOS</b> .....	38
<b>4.5 DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	44
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	46

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Promedio de oocitos, huevos y tamaños de huevos (media geométrica) de <i>Catolaccus hunteri</i> .....	14
<b>Cuadro 2</b> Correlación ( $r^2$ ) entre el número total de huevos con respecto al tamaño de huevo (media geométrica) por cada tratamiento en <i>Catolaccus hunteri</i> . ....	14
<b>Cuadro 3</b> Efecto de los suplementos proteínicos sobre el número de oocitos, huevos y tamaño de huevos en <i>Catolaccus hunteri</i> . ....	26
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de diferentes concentraciones en mg de caseína mezclada con miel sobre parámetros biológicos de <i>Catolaccus hunteri</i> . ....	38
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de diferentes concentraciones en mg de caseína mezclada con miel sobre parámetros biológicos de <i>Catolaccus hunteri</i> . ....	40

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Hembra de *Catolaccus hunteri* (A) morfología de ovariolas (B) Ova, ovario; Oc, oviducto común; Ol, oviducto lateral; Hue, huevo (B, F); Ger, germario (B, C); Vit, Vitelario (B); Oocitos en diferentes estados de desarrollo (D, E), Fol, folículo (D, E); Trof, trofocitos (D, E) y Cor, corion (F)..... 12
- Figura 2.** Dinámica de oocitos de *Catolaccus hunteri* a diferentes intervalos de tiempo. Hembras sometidas a distintos suplementos alimenticios. Datos son medias y las líneas verticales error estándar (EE). ..... 15
- Figura 3.** Dinámica de huevos de *Catolaccus hunteri* a través del tiempo. Hembras sometidas a distintos suplementos alimenticios. Datos son medias y las líneas verticales error estándar (EE). ..... 17
- Figura 4.** Dinámica de oocitos (Media±EE) de *Catolaccus hunteri* a través del tiempo. Hembras sometidas a distintos tratamientos con y sin huésped. .... 28
- Figura 5.** Huevos (Media±EE) de *Catolaccus hunteri* a través del tiempo. Hembras sometidas a distintos suplementos alimenticios con y sin huésped. .... 29
- Figura 6.** Fecundidad por semana (Media±EE) de *Catolaccus hunteri*. Hembras sometidas a distintas concentraciones de caseína en mg mezclada con miel y solo miel. .... 39

## **1 INTRODUCCIÓN GENERAL**

Existen varias maneras de clasificar a los parasitoides de Insecta dependiendo de sus características biológicas y comportamentales. Una de estas clasificaciones tiene que ver con la capacidad de colocar huevos al iniciar el estado adulto, así se habla de parasitoides proovigénicos y sinovigénicos. Los parasitoides proovigénicos emergen de la pupa con una cantidad de huevos maduros, generalmente con su carga completa o casi completa. Mientras que, los sinovigénicos al iniciar su estado adulto tienen pocos o ningún huevo maduro en sus ovariolas (Flanders 1950, Jervis y Kidd 1986, Jervis et al. 2001, Jervis et al. 2008). Como en parasitoides sinovigénicos no hay un número grande de huevos maduros a la emergencia, entonces es común que las hembras necesiten alimentarse a lo largo de su vida, además de requerir un periodo de tiempo, generalmente días, para aparearse, y así producir y madurar los huevos hasta colocar el primero (periodo de preoviposición) (Flanders 1950, Rojas et al. 1996, Jervis et al. 2001, Bernal 2007). Además, necesitan consumir proteína para continuar madurando los huevos. Esta proteína generalmente la proporciona la hemolinfa del huésped y se extrae de éste después de picar con el ovipositor y empezar a alimentarse (alimentación sobre el huésped) (Heimpel y Collier 1996, Giron et al. 2002, Kapranas y Luck 2008), aunque también la disponibilidad de polen puede considerarse de relevancia para algunas especies en determinando momentos (Leius 1969, Wäckers 2005, Jervis y Kidd 1986, Zhang et al. 2004). La necesidad de proteína en el estado adulto de parasitoides sinovigénicos se ha asociado con la alimentación sobre el huésped y por tanto, el aumento en la tasa de mortalidad en la población del huésped (Tena et al. 2011, Paladino et al. 2010, Kapranas y Tena, 2015). De hecho, algunos trabajos han demostrado que para la producción y maduración de un huevo en parasitoides sinovigénicos se puede necesitar alimentarse de al menos un huésped (Heimpel y Rosenheim, 1995, Wang y Messing 2003, Cerón-González et al. 2014).



La nutrición en parasitoides en estado larval y adulto es una de las funciones indispensable para realizar todos los procesos biológicos, tales como crecimiento, desarrollo, maduración y reproducción (Rivero y Casas 1999, Lee et al. 2004, Strand y Casas 2008). Las especies que se consideran sinovigénicas necesitan una alimentación rica en nutrientes como proteínas, lípidos y carbohidratos, sobre todo en estado adulto (Jervis, et al. 2001, Jervis et al. 2008, Boding et al. 2009, Chen y Stansly 2014, Kapranas y Tena 2015). Estos nutrientes son indispensable para manifestar su biología reproductiva y se obtienen, principalmente, de la alimentación sobre el huésped (hemolinfa), o también de otras fuentes externas como néctar, mielecilla o polen (Leius 1969, Heimpel y Collier 1996, Jervis et al. 2001, Wäckers 2004, Casas et al. 2005, Kapranas y Luck 2008, Jervis et al. 2008). De estas fuentes de nutrientes, los parasitoides sinovigénicos obtienen algunas proteínas, que juegan un papel importante para manifestar su potencial reproductivo, porque se relacionan principalmente con la formación de ovariolas, la carga de oocitos y formación de huevos, además de prevenir la reabsorción de estos (Rivero y Casas 1999, Jervis et al. 2001 Jervis et al. 2008, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha 2014).

Algunos carbohidratos que provienen de néctar, polen, fructosa y sacarosa, funcionan como suplementos alimenticios en la dieta de diferentes parasitoides sinovigénicos (Leius 1969, Wäckers 2001, Lee et al. 2004, Wäckers 2005, Wang et al. 2014) y tienen un efecto sobre algunas características biológicas como longevidad, carga de huevos, fecundidad, tamaño de huevo (calidad) así como fertilidad. Estos parámetros son importantes en el desempeño del parasitoide y junto a la disponibilidad de alimentarse del huésped, se pueden incrementar respecto a parasitoides sin esos suplementos (Leatemia et al. 1995, Morales-Ramos et al. 1996, Giron y Casas 2003, Casas et al. 2005, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014, Lahiri et al. 2017).

Existe evidencia experimental que demuestra que las proteínas, además de los carbohidratos, son nutrimentos esenciales en la vida de los parasitoides sinovigénicos, particularmente en el estado adulto. Sin embargo, existen pocos trabajos donde se haya evaluado una fuente de proteína en el estado adulto de un parasitoide sinovigénicos para conocer como influye en su estrategia reproductiva (Morales-Ramos et al. 1996, Lauzière et al. 2001, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014). El presente estudio partió de la hipótesis general que el acceso a una proteína exógena y miel, como alimento suplementario, podrían influenciar la biología reproductiva de un parasitoide sinovigénico. Para probar esta hipótesis, se usó como modelo de estudio a *Catolaccus hunteri* Crawford (Hymenoptera: Pteromalidae) un ectoparasitoide solitario y sinovigénico, y a su huésped facticio *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) (Rodríguez-Leyva et al. 2000). Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron los siguientes.

### **1.1 Objetivo general**

Determinar si un suplemento alimenticio a base de proteínas mezclada con carbohidratos proporcionado a hembras de un parasitoide sinovigénico (*Catolaccus hunteri*) modifica su comportamiento reproductivo.

#### **1.1.1 Objetivos específicos**

1. Describir morfológicamente las ovariolas de *C. hunteri*.
2. Determinar si hembras adultas de *C. hunteri* alimentadas con fuentes de proteína como caseína, polen o proteína hidrolizada, mezcladas con miel, modifican su potencial reproductivo en ausencia del huésped.
3. Determinar si un suplemento a base de proteína (caseína), con y sin alimentación sobre el huésped, influye en la oogénesis de *C. hunteri*.

4. Determinar si *C. hunteri* alimentado con diferentes concentraciones de caseína mezclada con miel, como un suplemento alimenticio en estado adulto, más la alimentación sobre el huésped modifica parámetros de su biología reproductiva.

# **CAPÍTULO 1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE OVARIOLAS DE *Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE) Y SU DESARROLLO CON DISTINTAS FUENTES PROTEÍNICAS**

## **2.1 RESUMEN**

Se realizó una descripción de las ovariolas de *Catolaccus hunteri* y se evaluó en adultos de esta especie, la influencia de tres suplementos proteínicos a base de caseína, polen y proteína hidrolizada, con las combinaciones siguientes: [miel (testigo), miel y presencia de huésped, miel con caseína, miel con polen y miel con proteína hidrolizada], sobre la cantidad de oocitos, huevos y tamaño (calidad) de éstos. Para evaluar las variables antes mencionadas se realizaron disecciones de *C. hunteri* a los 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 d de edad. Las ovariolas de *C. hunteri* son de tipo meroístico politrófico, con un par de ovarios y tres ovariolas por ovario. El total de oocitos fue 38% mayor en miel con alimentación sobre el huésped, comparada con los demás tratamientos; siguieron los tratamientos miel y miel más caseína con 18% más oocitos cada uno respecto a miel más proteína hidrolizada. Por otro lado, miel con alimentación sobre el huésped registró 70% más huevos totales respecto de los tratamientos sin alimentación sobre el huésped. Le siguió el tratamiento miel más caseína con 38% más huevos que los tratamientos sin alimentación sobre el huésped. Por otro lado, el tamaño de huevo de huevo no estuvo influenciada por los tratamientos. No obstante, se encontró una relación positiva entre el número total de huevos, con respecto al tamaño de huevos en el tratamiento miel más caseína, posiblemente las hembras invirtieron más nutrientes hacia la formación de huevos, sin disminuir su tamaño. La mayor producción de oocitos y huevos se presentaron en los días 5, 10 y 15, y el tratamiento miel con alimentación sobre el huésped presentó mayor número en ambas de estas variables. Los resultados en

tratamientos sin alimentación sobre el huésped indican que la caseína tiene un efecto en la biología reproductiva de *C. hunteri* y se debería considerar su evaluación con la alimentación sobre el huésped.

**Palabras clave:** Parasitoides sinovigénicos, nutrición, oogénesis, potencial reproductivo.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

Los parasitoides requieren de macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) para realizar funciones indispensables de desarrollo y reproducción (Rivero y Casas 1999, Jervis y Ferns 2004, Casas et al. 2005, Hogervorst et al. 2007, Strand y Casas 2008). En parasitoides sinovigénicos, es decir aquéllos que necesitan alimentarse para madurar huevos a lo largo del estado adulto, los nutrientes pueden ser adquiridos y almacenados en la etapa larval y/o en adulto (Jervis, et al. 2001, 2008, Chen y Stansly 2014, Kapranas y Tena 2015). En el estado adulto estos nutrimentos se obtienen principalmente por medio de la alimentación sobre el huésped (hemolinfa), o también de otras fuentes externas como néctar, mielecilla y polen, donde adquieren energía y algunas proteínas necesarias para manifestar su potencial reproductivo (Leius 1969, Heimpel y Collier 1996, Rivero y Casas 1999, Thompson 1999, Jervis et al. 2001, Wäckers 2004, Wäckers 2005, Casas et al. 2005, Burguer et al. 2005, Hogervorst et al. 2007, Jervis et al. 2008, Kapranas y Luck 2008). La obtención de proteína en especies sinovigénicas es importante en su biología reproductiva porque se relacionan con la formación de ovariolas, la carga de oocitos, y la disponibilidad y calidad de huevos (Jervis et al. 2008, Kapranas y Luck 2008, Bodin et al. 2009, Visser y Ellers 2012, Chen y Stansly 2014, Liu et al. 2014, Vanaclocha et al. 2014).

En varios estudios se señala que en parasitoides sinovigénicos los suplementos alimenticios prolongan la longevidad; sin embargo, de manera individual estos suplementos

son insuficiente para realizar el proceso de oogénesis (Rojas et al. 1996, Morales-Ramos et al. 1998, Rivero y West 2005, Kapranas y Luck 2008, Visser y Ellers 2012). No obstante, cuando se adiciona una fuente de nutrientes (suplementos) junto con la disonibilidad de alimentarse sobre el huésped, se puede incrementar la fecundidad (Morales-Ramos et al. 1996, Casas et al. 2005, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al, 2014).

Está bien documentado que algunos suplementos alimenticios a base de carbohidratos, principalmente miel, se utilizan en cría de parasitoides y tienen el potencial de influir en su éxito reproductivo como por ejemplo en *Macrocentrus grandii* Goidanich (Hymenoptera: Braconidae), *Neochrysocharis formosa* Westwood (Hymenoptera: Eulophidae) y *Eupelmus vuilletti* Crawford (Hymenoptera: Eupelmidae) (Olson et al. 2000, Casas et al. 2005; Wang et al. 2014). No obstante, existe menos información de la influencia que pudiera tener una fuente exógena de proteína en la biología reproductiva de parasitoides sinovigénicos, sobre todo en ausencia de alimentación sobre el huésped (Morales-Ramos et al. 1996, Lauzière et al. 2001, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014). Para conocer el efecto de un suplemento alimenticio a base de proteína sobre una especie sinovigénica, se usó como modelo de estudio a *Catolaccus hunteri* Crawford (Hymenoptera: Pteromalidae). Este es un ectoparasitoide, solitario, generalista y que necesita alimentarse del huésped para formar huevos (Rodríguez-Leyva et al. 2000). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue describir las ovariolas de *C. hunteri* y determinar si hembras de esta especie alimentada con distintas fuentes de proteína en estado adulto, mezcladas con miel, modifican su potencial reproductivo sin alimentación sobre el huésped.

## **2.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.3.1 Material biológico**

#### **2.3.1.1 Cría de *Callosobruchus maculatus***

Para reproducir al parasitoide se estableció una cría del huésped facticio *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae), el cual se reprodujo sobre semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* Linneo) de acuerdo a la metodología de Vasquez et al. (2005) y Rodríguez-Leyva et al. (2002) con modificaciones ligeras. La metodología consistió en infestar cada dos semanas 200 g de garbanzo con 300 brúquidos adultos. La mitad de este material se mantuvo 21 d en recipientes de plástico de 0.5 L en condiciones controladas (25±2°C, 60-70% H. R. y 12:12 h L:O) para la obtención de larvas para el parasitoide, el resto del material se conservó en las mismas condiciones hasta la emergencia de adultos para mantener la cría del huésped facticio.

#### **2.3.1.2 Cría de *Catolaccus hunteri***

Los individuos de *C. hunteri* se desarrollaron sobre larvas de *C. maculatus*. En una jaula de 3.8 L se mantuvieron 50-80 adultos del parasitoide y se introducían 200 g de garbanzo infestado con larvas del último instar del gorgojo del garbanzo, aproximadamente de 21 d de edad. Los garbanzos infestados se mantuvieron por 48 h y posteriormente se retiraron a recipientes de plástico de 0.5 L donde se permitió el desarrollo y emergencia de los parasitoides en las condiciones ambientales arriba señaladas. En la cría del parasitoide se seleccionaban y usaban aquellas hembras que ovipositaban los primeros 7 días después de la emergencia.

### 2.3.2 Tratamientos y diseño experimental

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de control biológico del Colegio de Postgraduados a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60-70% H. R. y un fotoperiodo de 12:12 h L:O. En todos los casos se utilizaron hembras adultas de *C. hunteri* de  $\leq 8$  h de edad.

Los tratamientos consistieron en diferentes fuentes de proteína mezclada con miel: 1) miel (testigo), 2) miel y presencia del huésped, 3) miel con caseína hidrolizada (Sigma-Aldrich-22090-500G con 17% de aminoácidos), 4) miel con proteína hidrolizada (Captor 300 con 33% de aminoácidos derivados de la hidrólisis de proteínas) y 5) miel con granos de polen (Polen grano chile F03 con 19.40% de proteínas, KoppertMéxico). En todos los casos, las proteínas se homogeneizaron al 6.3% de acuerdo al porcentaje de aminoácidos utilizados en una dieta para la especie relacionada *Catolaccus grandis* Burks (Rojas et al. 1996).

Cada arena experimental consistió de 100 hembras y 200 machos de *Catolaccus hunteri* confinados en una jaula de plástico de 3.8 L, con aberturas laterales (13 x 7 cm) cubiertas con tela organdí para favorecer ventilación, donde se proporcionó agua en una mecha de algodón húmeda. Los tratamientos se aplicaron *ad libitum* de los adultos, para ello se usó una jeringa de 10 mL y se colocaban líneas finas de la mezcla de miel y proteínas sobre la cara interna superior de cada jaula. En el caso del tratamiento miel con huésped solo se ofreció miel y se ofrecieron 200 g de garbanzo infestado con larvas de 21 d de edad de *C. maculatus*. La miel y mezcla de proteínas, y los garbanzos con huésped, se renovaron cada 48 h. De cada tratamiento se retiraron diez hembras (cada hembra como repetición) a intervalos de 0 (antes de alimentarse), 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 d para su disección. El experimento se terminó al cabo de 30 d porque durante ese periodo la sobrevivencia de hembras fue del 80% e iniciaba la disminución de oviposición (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Seal et al. 2002). Debido a la gran cantidad de material para disectar, una vez retiradas las



hembras de los tratamientos, cada una de las avispas se colocó en un tubo de Eppendorf de 2 mL y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador (Thermo Fisher Scientific, Modelo 703) hasta su disección, previamente se confirmó que el proceso de congelación permitía que el material se mantuviera sin cambios en la ovariolas y huevos (datos sin publicar).

### **2.3.3 Ovariolas, producción de oocitos y huevos en adultos de *Catolaccus hunteri***

Cada una de las 10 hembras de cada tratamiento e intervalo de tiempo (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 d), se colocaba de manera individual en una caja de Petri en agua corriente. Bajo un microscopio estereoscópico (10x), y con unas pinzas entomológicas, se les separó el abdomen y enseguida se retiraron los escleritos dorsales y ventrales. Después se removieron las ovariolas y se fotografiaron con un Fotomicroscopio III de Carl Zeiss, adaptado con una cámara digital PAXcma 3. Usando estas fotografías se realizó la descripción del sistema reproductor (ovariolas), y conteo de oocitos y huevos. Cabe mencionar que para la descripción morfológica se utilizó únicamente aquellas hembras del tratamiento de miel más huésped. También se midió el tamaño de huevos (calidad) formados en las ovariolas, en todas las hembras de los tratamientos. Para diferenciar oocitos de huevos se consideró lo siguiente: un huevo maduro se caracterizaba por la presencia de corion y la ausencia de células nodrizas (trofocitos), mientras que en oocitos las células nodrizas estaban presentes además de tejido folicular (Andrade et al. 2012, Chapman 2013).

En cada hembra se midió el largo ( $\mu$ ) y ancho ( $\mu$ ) de dos huevos, los más cercanos al oviducto de cada ovario, de ambos parámetros se obtuvo la media geométrica (Manikandan 2011) como índice de calidad de huevo (tamaño). La medición se llevó a cabo con el analizador de imágenes Image tool para Windows versión 3.0 (Wilcox et al. 2002). La imagen de cada huevo se calibró de acuerdo a la escala establecida para cada fotografía. También se realizó un análisis exploratorio de correlación entre el número de huevos totales

y tamaño de huevos, porque parece ser que existe una relación positiva de hembras que producen más huevos y estos son de menor tamaño (Price 1973, Blackburn 1991).

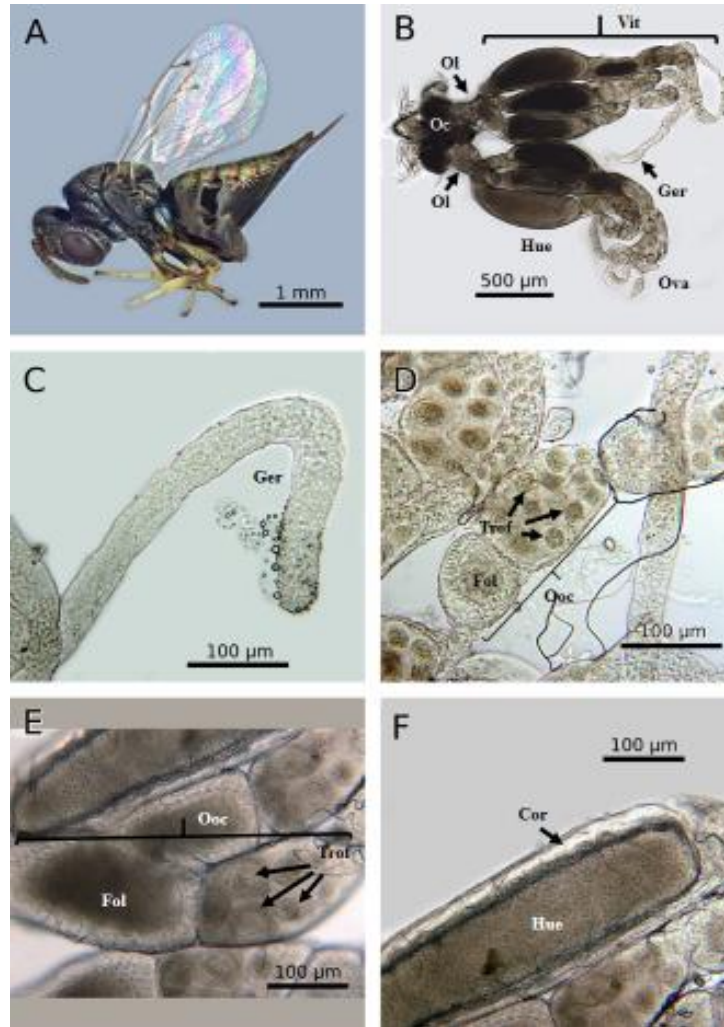
#### **2.3.4 Análisis estadístico**

El número de oocitos y huevos por tratamiento e intervalo de tiempo se transformaron en rangos para su análisis. Mientras que el tamaño de huevo (media geométrica), los datos se transformaron a raíz cúbica. Los oocitos y huevos se analizaron por cada una de las fechas. Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y en caso de existir diferencias entre tratamientos se utilizó una separación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ). También se realizó una correlación de Spearman del número total de huevos con respecto al tamaño de huevos. Los análisis se realizaron con el programa Statistix 8.1 (Analytical Software 2003).

## **2.4 RESULTADOS**

### **2.4.1 Ovariolas en *Catolaccus hunteri***

Aunque el número de ovariolas varió de cinco a ocho, el sistema reproductivo en hembras de *C. hunteri* (Figura 1A, B) consistió en la mayoría de los casos (76%) de un par de ovarios y tres ovariolas alargadas, paralelamente en cada ovario. Las ovariolas son de tipo meroístico politrófico, y cada una se conecta a un oviducto, y ambos oviductos a su vez se unen a un oviducto común. Además, existen dos glándulas accesorias y cada una se localiza lateralmente hacia el oviducto común (Figura 1B).



**Figura 1.** Hembra de *Catolaccus hunteri* (A) morfología de ovariolas (B) Ova, ovario; Oc, oviducto común; Ol, oviducto lateral; Hue, huevo (B, F); Ger, germario (B, C); Vit, Vitelario (B); Oocitos en diferentes estados de desarrollo (D, E), Fol, folículo (D, E); Trof, trofocitos (D, E) y Cor, corion (F).

En cada ovariola se distinguen dos zonas de maduración: el germario (Figura 1 B, C), que se encuentra en la parte distal y posee células germinales (formación de oocitos) y el vitelario, que ocupa la mayor parte de la ovariola y donde se pueden observar líneas de oocitos en diferentes etapas de desarrollo (Figura 1B, D, E). Estos oocitos se caracterizan por una división o constricción que forma dos sacos, uno con tejido folicular (Figura 1D, E) y el otro con trofocitos (células nodrizas) (Figura 1D, E). Conforme los oocitos están más

próximos a los oviductos, aumentan de tamaño hasta convertirse en huevos, estos se localizan en la región basal, cercana a los oviductos laterales (Figura 1B), y se caracterizan por la presencia de corion. Los huevos son himenopteriformes y ligeramente ornamentados (Figura 1F).

#### **2.4.2 Formación de oocitos y huevos totales, y calidad (tamaño) de huevos en**

##### ***Catolaccus hunteri***

La miel y las distintas fuentes de proteína con la que se alimentó a las hembras influyeron significativamente en el número total de oocitos ( $F_{4, 383} = 24.81$ ;  $P < 0.0001$ ) y huevos ( $F_{4, 383} = 105.94$ ;  $P < 0.0001$ ) (Cuadro 1).

Las hembras alimentadas con miel más huésped presentaron la mayor producción de oocitos y huevos. La producción de oocitos en los tratamientos sin huésped fue similar en caseína, miel y polen; no obstante, este último tratamiento no fue diferente a proteína hidrolizada (Cuadro 1).

El número total de huevos con miel y huésped fue superior en al menos 50% con respecto a miel más caseína, y 70% superior al resto de tratamientos. El tamaño de huevo (Cuadro 1) no presentó variación entre los tratamientos ( $F_{4, 308} = 2.01$ ;  $P = 0.1086$ ).

Únicamente en el tratamiento miel más caseína se encontró una correlación entre el número total de huevos y tamaño de huevos (media geométrica). El resto de los tratamientos no mostraron alguna relación significativa (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Promedio de oocitos, huevos y tamaños de huevos (media geométrica) de *Catolaccus hunteri*.

Tratamientos	Variables (Media±EE)		
	Oocitos	Huevos	Tamaño del huevo ( $\mu$ )
Miel (control)	24.84±0.69 b	3.42±0.25 c	314.37±2.81 a
Miel con huésped	32.96±1.23 a	12.25± 0.98 a	310.52±3.59 a
Miel con caseína	25.67±0.90 b	5.57±0.36 b	304.66±2.46 a
Miel con proteína hidrolizada	21±0.70 c	3.42±0.23 c	304.64±2.88 a
Miel con polen	23.14±0.75 bc	3.49±0.24 c	310.88.54±2.87 a

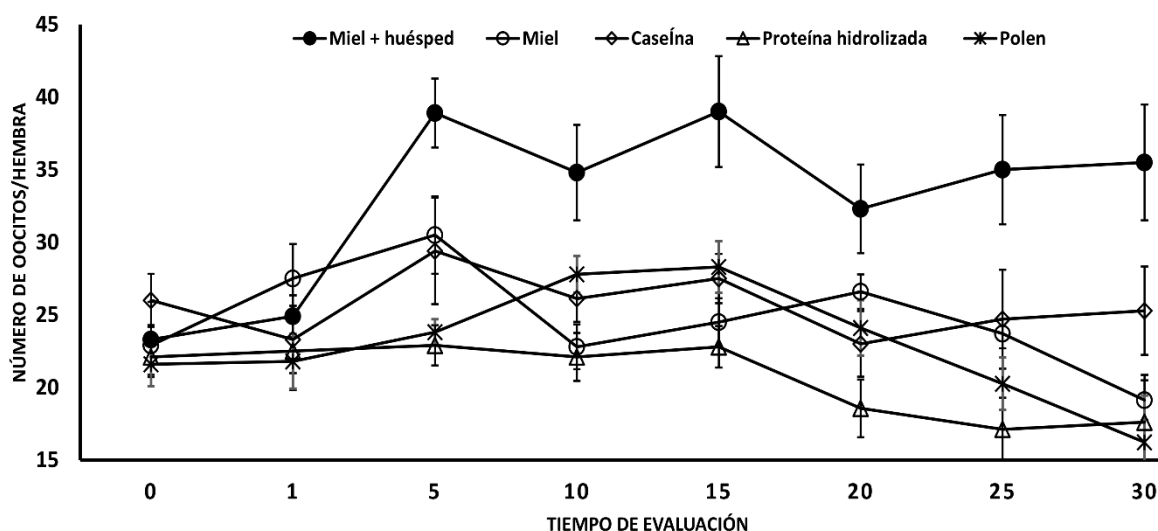
Medias con la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente entre sí (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 2** Correlación ( $r^2$ ) entre el número total de huevos con respecto al tamaño de huevo (media geométrica) por cada tratamiento en *Catolaccus hunteri*.

Tratamientos	$r^2$	n	P
Miel (control absoluto)	0.1533	63	0.2296
Miel con huésped	0.0364	67	0.7695
Miel con caseína	0.7036	60	<0.0001
Miel con proteína hidrolizada	0.2443	59	0.0624
Miel con polen	0.1671	61	0.1975

### 2.4.3 Dinámica de oocitos en adultos de *Catolaccus hunteri*

El desarrollo de oocitos a través del tiempo mostró diferencias durante los días de evaluación entre tratamientos ( $F_{7, 383}=5.27$ ;  $P < 0.0001$ ). Las hembras de *C. hunteri* recién emergidas ( $\leq 8$  h) tenían  $23.2 \pm 0.8$  oocitos en desarrollo sin diferencias entre tratamientos ( $F_{4, 49}=0.92$ ;  $P = 0.4580$ ), también sin diferencias para el día 1 ( $F_{4, 49}=1.08$ ;  $P = 0.3771$ ) (Figura 2). El efecto de la alimentación de las hembras con los suplementos alimenticios sobre la producción de oocitos se observó a partir del día 5 ( $F_{4, 49}=7.12$ ;  $P = 0.0002$ ), y a partir de esta fecha las hembras alimentadas con miel y disposición del huésped presentaron mayor número de oocitos en todas las fechas de evaluación. En el día 5, en todos los tratamientos, las hembras aumentaron la carga de oocitos con respecto al día 1 aunque ese aumento fue menos evidente en polen y proteína hidrolizada. Las hembras alimentadas con miel y disposición del huésped presentaron mayor número de oocitos ( $38.9 \pm 2.37$ ) comparadas con aquellas expuestas a miel y suplementos proteínicos.



**Figura 2.** Dinámica de oocitos de *Catolaccus hunteri* a diferentes intervalos de tiempo. Hembras sometidas a distintos suplementos alimenticios. Datos son medias y las líneas verticales error estándar (EE).

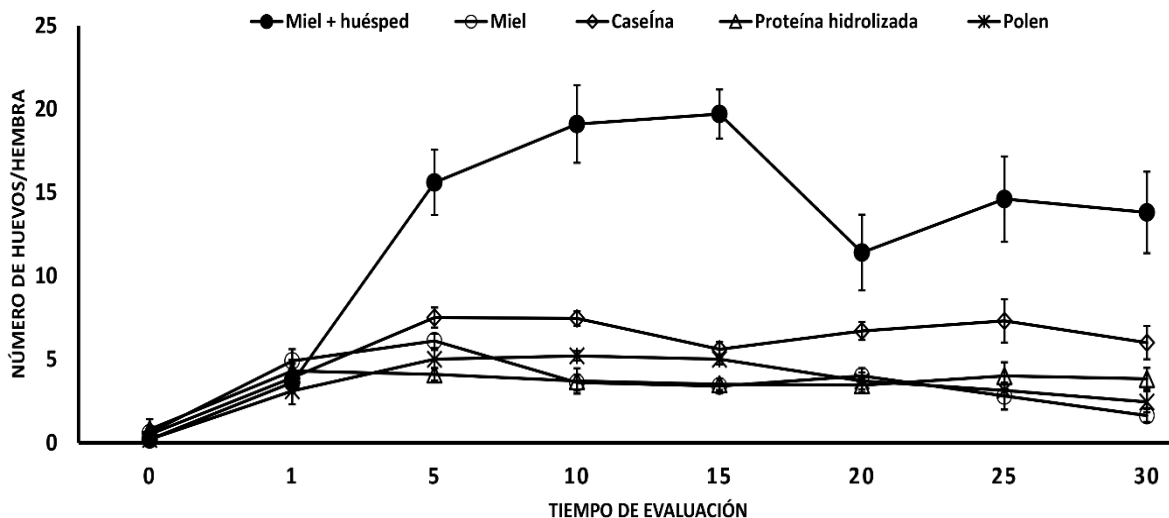
A los 10 días de evaluación se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $F_{4, 48}=6.47$ ;  $P= 0.0003$ ). Los parasitoides sometidos a miel más huésped desarrollaron más oocitos ( $34.8\pm 3.28$ ) mientras los tratamientos sin huésped tuvieron ligeras variaciones en el desarrollo de los oocitos pero no fueron diferentes entre sí.

En la evaluación del día 15 se presentó el mayor número de oocitos en el tratamiento de miel más huésped ( $39\pm 3.82$ ) ( $F_{4, 49}=7.87$ ;  $P= 0.0001$ ) y a partir de allí comienza un descenso gradual en el desarrollo de oocitos. No obstante, el efecto de la miel y presencia del huésped siguieron teniendo efecto significativo en el día 20 ( $F_{4, 48}=5.29$ ;  $P= 0.0014$ ), 25 ( $F_{4, 38}=6.68$ ;  $P= 0.0004$ ) y 30 ( $F_{4, 38}=6.68$ ;  $P= 0.0004$ ). El resto de tratamientos siguió presentando menor número de oocitos pero estuvieron presentes hasta el último día de evaluación.

#### **2.4.4 Dinámica de huevos en adultos de *Catolaccus hunteri***

El número de huevos estuvo influenciado por los tratamientos conforme transcurría el tiempo ( $F_{7, 383}=7.57$ ;  $P= 0.0001$ ) (Figura 3). Las hembras de todos los tratamientos tuvieron una carga inicial de huevos el primer día de evaluación ( $3.96\pm 0.32$ ) y no hubo diferencias entre estos ( $F_{4, 49}= 0.89$ ;  $P = 0.4790$ ). No obstante, se observaron diferencias significativas en el día 5 ( $F_{4, 49}= 22.06$ ;  $P <0.0001$ ), 10 ( $F_{4, 48}= 31.99$ ;  $P <0.0001$ ), 15 ( $F_{4, 49}= 86.38$ ;  $P <0.0001$ ); 20 ( $F_{4, 48}= 9.01$ ;  $P <0.0001$ ), 25 ( $F_{4, 45}= 11.4$ ;  $P <0.0001$ ) y 30 ( $F_{4, 39}= 12.58$ ;  $P <0.0001$ ).

A partir del día 5 se observó un patrón en la presencia de huevos. Conforme transcurría el tiempo, las hembras alimentadas con miel y disposición del huésped tuvieron siempre el mayor número de huevos comparadas con aquellas sin huésped (Figura 3). El tratamiento que le siguió al anterior fue el de las hembras mantenidas con miel más caseína, que tuvieron ligeramente más huevos los días 5, 10 con respecto a la proteína hidrolizada, o los días 10, 15 y 25 con respecto a sólo la miel.



**Figura 3.** Dinámica de huevos de *Catolaccus hunteri* a través del tiempo. Hembras sometidas a distintos suplementos alimenticios. Datos son medias y las líneas verticales error estándar (EE).

## 2.5 DISCUSIÓN

La morfología de las ovariolas en *Catolaccus hunteri* es la común entre los himenópteros (Iwata 1960, Andrade et al. 2012, Liu et al. 2014, Mao et al. 2016). El número de ovariolas en esta especie tuvo variación de 3 a 8, pero el mayor porcentaje de hembras (76%) tuvieron sólo 3 ovariolas por ovario. Esta característica morfológica es similar a la especie relacionada *Catolaccus grandis* y a otros pteromálicos como *Trichomalopsis shirakii* Crawford y al eupélmido *Eupelmus vuilleti* (Morales-Ramos et al. 1996, Bodin et al. 2009, Mao et al. 2016).

Los huevos de *C. hunteri* son del tipo anhidrópicos, es decir, que se forman por la adquisición de lípidos y proteínas que darán origen al vitelo (yema) permitiendo el desarrollo embrionario dentro del huevo y la eclosión. Este tipo de huevo es característico de las especies sinovigénicas, especialmente de ectoparasitoides (King y Richards 1969, Antolin y Williams 1989, Jervis et al. 2001, Jervis et al. 2008, Andrade et al. 2012, Liu et al. 2014).



Está bien documentado que la nutrición y la presencia del huésped son importantes en el proceso de oogénesis en parasitoides sinovigénicos (Jervis et al. 2001, Jervis et al. 2008) incluida la especie relacionada *Catolaccus grandis* (Morales-Ramos et al. 1998). En este trabajo sobre *C. hunteri* se observaron diferencias en el número total de oocitos y número total de huevos, además de diferencias en el desarrollo de estos a través del tiempo, como consecuencia del acceso a las diferentes fuentes de suplementos proteínicos más miel de la que disponían los adultos. El número total de oocitos tuvo una influencia menos acentuada con respecto a la fuente proteínica. Aparentemente, la miel más proteína hidrolizada tuvo menos efectos favorables para la producción de oocitos. Sin embargo, esta situación fue diferente en el caso del número total de huevos. La miel más la alimentación sobre el huésped fue el tratamiento que proporcionó el mayor número de huevos totales, después la miel más caseína superó al resto de tratamientos, aunque sólo en diferencias limitadas. Debido a que en parasitoides sinovigénicos el desarrollo de huevos está relacionado con la adquisición de nutrientes en estado adulto (Casas et al. 2005, Jervis et al. 2008, Kapranas y Tena 2015), es probable que la miel más caseína sea una mejor fuente de proteínas para *C. hunteri*, comparada con el resto de tratamientos sin alimentación sobre el huésped. Esta respuesta diferencial a fuentes proteínicas en adultos se ha reportado en especies de *Aphytis* (Vanaclocha et al. 2014). Como se ha mencionado, la menor cantidad de huevos se registró en los suplementos sin huésped y en algunos de estos tratamientos la carga de huevo no difirió entre ellos. Hay un aspecto que se debe considerar en parasitoides sinovigénicos, la carga de huevos y su disponibilidad dependen del estímulo de oviposición en presencia del huésped, es decir los parasitoides forman más huevos conforme van ovipositando (Donaldson y Walter 1988, Rivero-Lynch y Godfray, 1997). Es probable que las hembras de *C. hunteri* sin presencia del huésped acumularon huevos a través del tiempo, una vez que se formaron, pero

no expresaron su capacidad reproductiva en esa condición porque no hubo estímulo del huésped.

El número de oocitos a través del tiempo en *C. hunteri* reveló algunos hechos interesantes. Por ejemplo, las hembras de *C. hunteri* emergen con una carga de oocitos formados, y esa carga se modifica con la disposición del huésped rápidamente. Las hembras que se alimentaron sólo de miel lograron mantener esa carga de oocitos hasta el día 20, y no hubo efecto marcado cuando se ofrecieron las fuentes proteínicas. En otros parasitoides la maduración de oocitos se da en la fase de pupa y las hembras eclosionan con una carga de oocitos en diferentes estados de desarrollo (Bodin et al. 2009, Liu et al. 2014, Wang y Messing 2003), probablemente suceda lo mismo en *C. hunteri* obteniendo cantidades necesarias de nutrientes desde la etapa larval para tener disponible esa carga de oocitos.

El número de huevos y su dinámica en el tiempo tuvieron diferencias con respecto al comportamiento de los oocitos. Está bien establecido que *C. hunteri* es una especie sinovigénica (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Seal et al. 2002), en este caso al momento de la emergencia no había huevos formados pero en el primer día se registró una cantidad pequeña de huevos (alrededor de tres) en todas las hembras. Este aspecto biológico también se ha observado en algunas especies sinovigénicas, madurando algunos huevos en los primeros días de emergencia y necesitando alimento para la producción de más huevos (Bodin et al. 2009, Liu et al. 2014, Wang y Messing 2003). En *C. hunteri* la alimentación sobre el huésped fue decisiva para el incremento en el número de huevos. Por otro lado, el tratamiento de miel más caseína mostró ligeramente más huevos los días 5 y 10 con respecto a la proteína hidrolizada, o los días 10, 15 y 25 con respecto a sólo la miel. Esto hace suponer que ese tratamiento proporcionó alguna ventaja alimenticia con respecto a los tratamientos señalados, lo que corrobora el papel de las proteínas como nutrientes indispensables en la formación de

oocitos y huevos (Chen y Stansly 2014, Liu et al. 2014, Vanaclocha et al. 2014) y que la caseína, en el caso de *C. hunteri*, aportó algo de esas proteínas necesarias para la formación de más huevos.

El tamaño del huevo (calidad) se considera un parámetro biológico de éxito reproductivo en parasitoides y se relaciona con la cantidad de nutrientes para el individuo en formación (Blackburn 1991, Giron y Casas 2003). En este estudio, los suplementos a base proteína con y sin huésped no mostraron un efecto respecto al tamaño de huevo de *C. hunteri* como se ha observado en otros trabajos (Giron y Casas 2003, Bodin et al. 2009, Liu et al. 2014). Por otro lado, una mayor producción de huevos se relaciona con huevos de menor tamaño (Blackburn 1991, Mayhew y Blackburn 1999). En *C. hunteri* se observó una relación importante entre el número de huevos y su tamaño en el suplemento de miel más caseína, no así en el resto de los tratamientos. Aparentemente, *C. hunteri* empleó más nutrientes hacia el número (carga de huevos) que hacia el tamaño de huevo como se ha registrado en algunos ichneumonidos, bracónidos, eulófidos y encértidos (Price 1973, Kapranas y Luck 2008).

En este trabajo, con el parasitoide sinovigénico *C. hunteri*, se corroboró la necesidad del huésped para obtener una fuente de proteína y el estímulo para la oogénesis. Las fuentes de proteína mezcladas con miel tuvieron poco efecto en este fenómeno; no obstante, es conveniente experimentar con algunas de estas fuentes de proteína en adultos de *C. hunteri* y la presencia del huésped. Quizá de esta manera se podría explorar si alguna de esas fuentes de proteína fomenta cambios de relevancia en la biología reproductiva de la especie.

## **CAPÍTULO 2. EFECTO DE SUPLEMENTOS PROTEÍNICOS SOBRE LA OOGÉNESIS DE *Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE)**

### **3.1 RESUMEN**

En este trabajo se exploró el efecto de la adición de una proteína (caseína (60 mg/mL miel), con o sin la alimentación del huésped, como suplemento alimenticio de hembras adultas de *Catolaccus hunteri* sobre la producción de oocitos, y la cantidad y calidad de huevos. Los tratamientos fueron: 1) miel sin huésped (testigo), 2) miel con huésped, 3) miel con caseína (Sigma-Aldrich-22090-500G 17% aminoácidos) sin huésped y 4) miel más caseína con huésped. . Las hembras después de ser alimentadas con los diferentes tratamientos fueron disectadas a los 0, 1, 3, 5, 7 10, 15, 20, 25 y 30 días de edad. Las hembras de *C. hunteri* alimentadas con huésped produjeron 26% más oocitos respecto a aquellas sin huésped. Las hembras alimentadas con miel más caseína con huésped produjeron 22% más huevos que aquellas con miel más huésped. El tratamiento miel más caseína sin huésped produjo 38% más huevos respecto a aquellas alimentadas sólo con miel. El tamaño de huevo fue 3% más grande en miel comparado con miel más huésped y 10% más grande respecto a miel más caseína con y sin huésped. La caseína en una sola concentración de 60 mg/mL de miel, influyó la producción y dinámica de oocitos y huevos a través del tiempo. La mayor producción de oocitos y huevos se presentó en los días 5, 7, 10 y 15 y la caseína con huésped registró el mayor número en ambas variables. La caseína aportó beneficios en la biología reproductiva de *C. hunteri* cuando el huésped estuvo presente y en menor grado, sin la presencia del huésped.

**Palabras clave:** Parasitoides sinovigénicos, nutrición, oogénesis, control biológico.

### 3.2 INTRODUCCIÓN

La nutrición es una de las funciones biológicas que repercuten en todas las actividades de los parasitoides, específicamente en la supervivencia y reproducción (Jervis y Ferns 2004, Casas et al. 2005; Wang et al. 2014). Las especies que se consideran sinovigénicas requieren de fuentes nutritivas durante su vida adulta para la formación de oocitos y huevos (oogénesis) (Flanders 1950, Jervis y Kidd 1986, Jervis et al. 2001, Jervis et al. 2008). Particularmente, las proteínas son nutrimentos esenciales para estos insectos, ya que participan en la producción constante de huevos y en ocasiones contribuyen a prevenir su reabsorción incrementando la fecundidad del parasitoide (Rivero y Casas 1999, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014).

En el capítulo previo, se confirmó que *Catolaccus hunteri*, el insecto modelo de estudio como parasitoide sinovigénico, necesita alimentarse del huésped para obtener proteína, además que la presencia de éste también es un estímulo importante para la formación de huevos (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Seal et al. 2002). De las diferentes fuentes de proteína (todas mezcladas con miel y señaladas en el capítulo anterior) sin la presencia de huésped, sólo la caseína contribuyó a mayor formación de huevos de *C. hunteri*, comparada con polen o proteína hidrolizada, aunque ese incremento no fue equivalente a la presencia del huésped. Aparentemente la influencia de suplementos alimenticios a base de proteínas en el proceso de oogénesis no está suficientemente explorada en parasitoides sinovigénicos (Morales-Ramos et al. 1996, Lauzière et al. 2001, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014). La evidencia experimental del efecto de algunas fuentes exógenas de proteína para parasitoides sinovigénicos habían incluido a polen, proteína hidrolizada y levaduras y se reportó un incremento en la fecundidad y siempre en presencia del huésped

(Leius 1969, Morales-Ramos et al. 1996, Jervis et al. 2001, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si un suplemento a base de caseína como una fuente externa de proteína en adultos, con y sin la alimentación sobre su huésped presencia, influye en la formación de huevos y oocitos de un parasitoide sinovigénico.

### **3.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

La cría de insectos y el desarrollo de los experimentos se realizaron en el laboratorio de Control Biológico del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México, en condiciones controladas ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60-70% H. R. y 12:12 h L:O). En este trabajo se seleccionó al parasitoide sinovigénico *C. hunteri* como modelo de estudio debido a que: a) está bien establecido que necesita la presencia del huésped para manifestar oogénesis (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Seal et al. 2002; b) se puede reproducir en un huésped facticio como el gorgojo del garbanzo *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) (Rodríguez-Leyva et al. 2002, Vasquez et al. 2005); c) se mantiene una colonia del parasitoide que manifiesta un periodo de preoviposición menor a cinco días (datos sin publicar).

#### **3.3.1 Cría de insectos**

La colonia del huésped facticio se estableció en semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), de acuerdo a la metodología de Rodríguez-Leyva et al. (2002) y Vasquez et al. (2005), con algunas modificaciones (detalles en capítulo I de este trabajo).

Para la cría del parasitoide (*C. hunteri*) se siguió la metodología de Vasquez et al. (2005), donde básicamente se ofrecían 200 g de garbanzo infestado con larvas del último ínstar del gorgojo, en una jaula de 3.8 L con 50-80 adultos de *C. hunteri* durante 48 h; así los

parasitoides podían alimentarse y ovipositar sobre el huésped. Posteriormente los garbanzos infestados se retiraron en recipientes de 0.5 L y se esperó la emergencia de los parasitoides adultos (detalles en capítulo I de este trabajo).

### **3.3.2 Bioensayo y tratamientos**

La arena experimental consistió en colocar 150 hembras y 300 machos de *Catolaccus hunteri* dentro de un recipiente de plástico de 3.8 L con aberturas laterales (13 x 7 cm), cubiertas con tela organza, para su ventilación. Dentro de la jaula se incluyó una mecha de algodón saturada en agua.

Los tratamientos consistieron en caseína mezclada con miel ofrecida a hembras de *C. hunteri* de  $\leq 8$  h de edad de la siguiente forma: 1) miel sin presencia del huésped (testigo), 2) miel con presencia del huésped, 3) miel con caseína hidrolizada (Sigma-Aldrich-22090-500G con 17% de aminoácidos) sin presencia del huésped y 4) miel con caseína hidrolizada con presencia del huésped. En los tratamientos 2 y 4 se proporcionaron 200 g de garbanzo con larvas del último ínstar del huésped facticio, mientras que los tratamientos 3 y 4 la concentración fue de 60 mg de caseína/ 1 mL de miel. Esta cantidad de proteína se determinó considerando los resultados de la investigación sobre la especie relacionada *Catolaccus grandis* Burks (Hymenoptera: Pteromalidae (Rojas et al. 1996). La miel, o miel más caseína se ofrecieron *ad libitum* a las hembras del parasitoide, para ello se utilizó una jeringa de 5 mL, colocando líneas finas del suplemento alimenticio sobre la cara superior interna de cada recipiente.

### **3.3.3 Evaluación de oocitos y huevos de *Catolaccus hunteri***

En cada tratamiento se realizaron evaluaciones a los 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 y 30 días; en cada ocasión se separaron 10 hembras y cada hembra se constituyó en una repetición (n=10). Antes de las disecciones, los parasitoides se mantuvieron individualmente en un tubo

de Eppendorf (2mL) y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador (Thermo Fisher Scientific, Modelo 703<sup>®</sup>), después cada hembra se colocó dentro de una caja Petri con agua corriente. El abdomen se separó cuidadosamente con unas pinzas entomológicas y bajo un microscopio estereoscópico (10x), retirando los terguitos y esternitos, para poder desprender los ovarios. De esta manera se contaron oocitos y huevos. El criterio para diferenciar oocitos de huevos fue la ausencia o presencia de células nodrizas, tejido folicular y corion (Chapman, 2013). Todos los registros de imágenes se realizaron con un Fotomicroscopio III de Carl Zeiss<sup>®</sup> adaptado con una cámara digital para microscopio PAXcma 3<sup>®</sup>.

Para medir el tamaño de huevo (calidad de huevo) se tomó como referencia el largo y ancho de los dos huevos más cercanos al oviducto de cada ovario y de ambos parámetros se obtuvo la media geométrica (Manikandan 2011). Las medidas, en micras ( $\mu$ ), se llevaron a cabo mediante el analizador de imágenes Image tool para Windows versión 3.0<sup>®</sup> (Wilcox et al. 2002), calibrando de acuerdo a la escala de cada fotografía.

### **3.3.4 Análisis de datos**

Las variables número de oocitos y huevos, así como la evaluación por cada fecha y tamaño de huevo (media geométrica) para cada tratamiento se presentan con valores promedio y errores estándar, los datos se transformaron en rangos para los análisis estadísticos. Se realizó un análisis para cada fecha de evaluación y todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias se realizó una prueba de separación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ). También se realizó una correlación de Spearman del número total de huevos con respecto al tamaño de huevos de cada tratamiento. El análisis se llevó a cabo con el programa Statistix 8.1 (Analytical Software 2003).



### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Número total de oocitos, huevos y tamaño de huevo (calidad) en *Catolaccus*

##### *hunteri*

La disponibilidad del huésped (alimentación) y el suplemento alimenticio influyó el número de oocitos ( $F_{3,397} = 28.46$ ;  $P < 0.0001$ ) y huevos totales ( $F_{3,357} = 100.16$ ;  $P < 0.0001$ ). El mayor número de oocitos se presentó en los tratamientos con presencia del huésped independientemente del suplemento miel o miel más caseína. Los tratamientos sin huésped no presentaron diferencias entre el número de oocitos (Cuadro 3).

La presencia del huésped y miel también influyeron en el tamaño de huevo ( $F_{3,342} = 35.21$ ;  $P < 0.0001$ ). Los huevos de mayor tamaño se registraron en hembras alimentadas de miel sin huésped, seguido de las hembras alimentadas en miel con huésped.

**Cuadro 3** Efecto de los suplementos proteínicos sobre el número de oocitos, huevos y tamaño de huevos en *Catolaccus hunteri*.

Tratamientos	Media±EE		
	Oocitos	Huevos	Tamaño de huevo
Miel sin huésped	25.34±0.60 b	4.52±0.28 d	320.73±4.54 a
Miel con huésped	33.6±1.12 a	13.63±0.85 b	309.64±2.98 b
Miel con caseína sin huésped	26.39±0.62 b	7.4±0.35 c	292.47±1.84 c
Miel con caseína más huésped	36.53±1.13 a	17.38±0.89 a	286.46±2.19 c

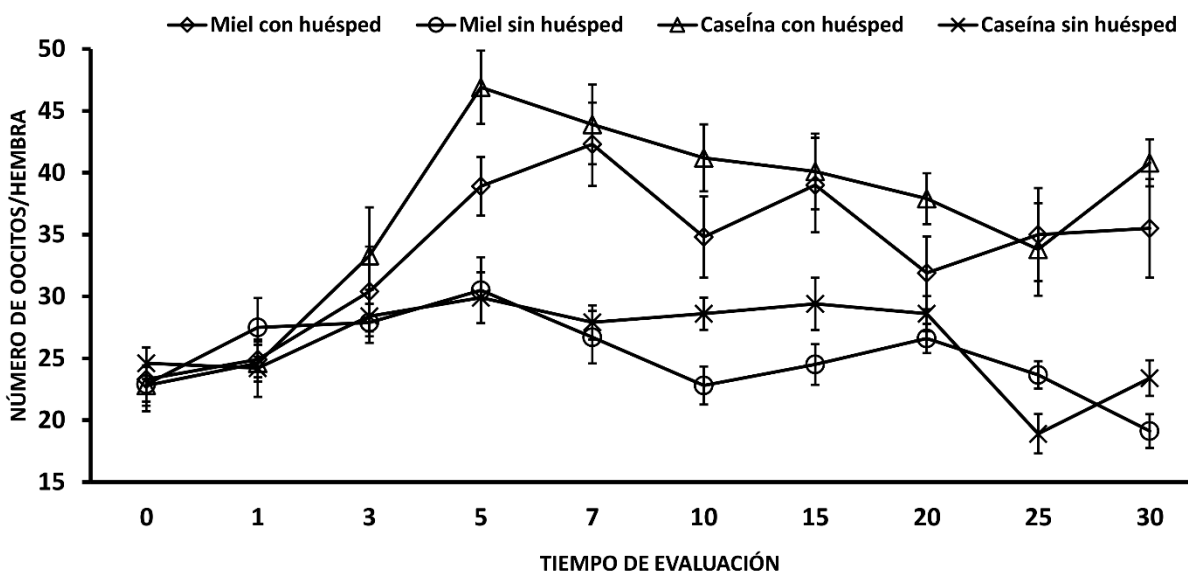
Medias con la misma letra en una columna no difieren estadísticamente entre sí (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

El menor tamaño de huevos se observó en los tratamientos miel con caseína y en miel más caseína y con huésped (Cuadro 3). No obstante, en *C. hunteri* no se observó una

relación importante entre el número total de huevos y tamaño de huevo en cada tratamiento (miel  $r^2 = 0.3280$ ,  $n = 83$ ,  $P = 0.0026$ ; miel con huésped  $r^2 = -0.0078$ ,  $n = 86$ ,  $P = 0.9432$ ; miel con caseína sin huésped  $r^2 = 0.1537$ ,  $n = 86$ ,  $P = 0.1574$ ; miel con caseína más huésped  $r^2 = -0.1309$ ,  $n = 88$ ,  $P = 0.2235$ ).

### **3.4.2 Efecto del suplemento proteínico (caseína) sobre la dinámica de oocitos y huevos de *Catolaccus hunteri***

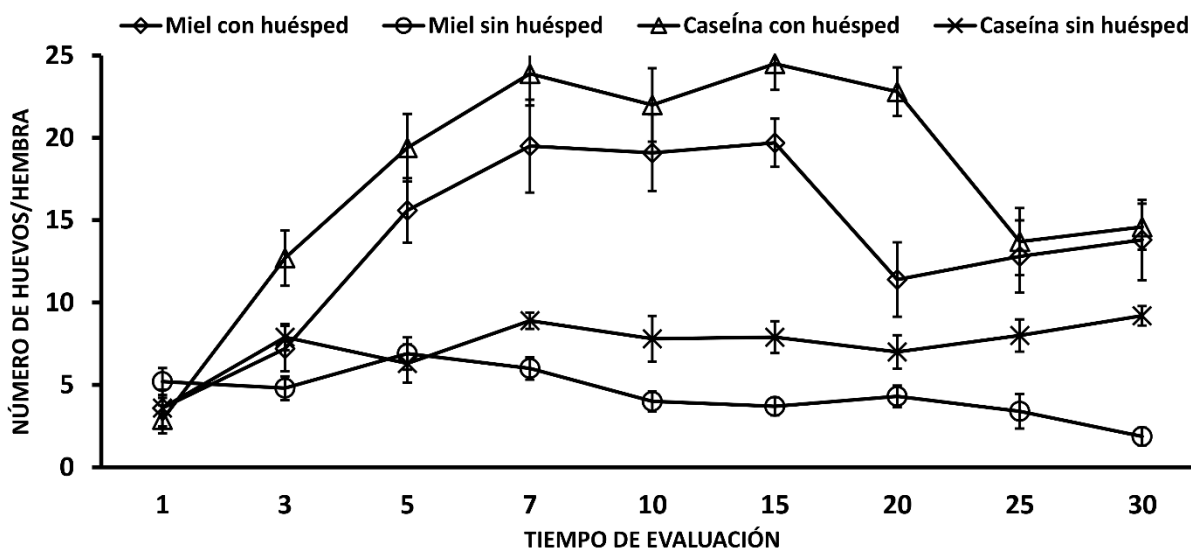
La caseína tuvo un efecto en la dinámica de producción de oocitos ( $F_{9, 397} = 28.46$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 4). Las hembras de *Catolaccus hunteri* nacen con una carga de oocitos ( $25.3 \pm 0.96$ ) y esta carga no fue diferente entre tratamientos a los 0, 1 y 3 d de evaluación (día 0  $F_{3, 39} = 0.21$ ,  $P = 0.8878$ ; día 1  $F_{3, 39} = 0.58$ ,  $P = 0.6323$ ; día 3  $F_{3, 39} = 0.72$ ,  $P = 0.5475$ ). En las fechas restantes, de manera general, las hembras en los tratamientos con huésped presentaron la mayor cantidad de oocitos que aquellas sin huésped, mostrando algunas tendencias entre ciertas fechas de evaluación. En el día 7 ( $F_{3, 39} = 11.88$ ;  $P < 0.0001$ ) y el día 30 ( $F_{3, 37} = 15.73$ ;  $P < 0.0001$ ), las hembras alimentadas en miel más caseína con huésped y miel con huésped registraron el mayor número de oocitos, pero sin diferencias estadísticas en ambos tratamientos, mientras que, el menor número de oocitos se presentó en caseína sin huésped y miel sin huésped. Para el día 5 ( $F_{3, 39} = 9.99$ ;  $P = 0.0001$ ), los oocitos formados en hembras alimentadas únicamente con miel, no fueron estadísticamente diferente a aquellas en caseína sin huésped y miel sin huésped, esta misma tendencia se observó el día 20 ( $F_{3, 39} = 5.96$ ;  $P = 0.0021$ ). Para los días 10 ( $F_{3, 39} = 11.27$ ;  $P < 0.0001$ ) y 15 ( $F_{3, 39} = 7.34$ ;  $P = 0.0006$ ) la menor cantidad de oocitos se presentó en sólo miel, comparada con el resto de los tratamientos.



**Figura 4.** Dinámica de oocitos (Media $\pm$ EE) de *Catolaccus hunteri* a través del tiempo. Hembras sometidas a distintos tratamientos con y sin huésped.

El número de huevos a través del tiempo también fue influenciado por los suplementos alimenticios ( $F_{8, 357}=6.45$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 5). En el día 1 de evaluación, no hubo diferencias entre los tratamientos ( $F_{3, 39}=1.09$ ;  $P= 0.3665$ ), todas las hembras registraron un promedio de  $3.82\pm 0.43$  huevos. El efecto marcado por los tratamientos se observó a partir del día 3 ( $F_{3, 39}=7.67$ ;  $P= 0.0004$ ). El tratamiento de miel más caseína con huésped tuvo una tendencia a mantenerse como el tratamiento que produjo el mayor número de huevos, presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos en el día 20 ( $F_{3, 39}=21$ ;  $P < 0.0001$ ). En esa fecha las hembras formaron un promedio de  $22.8\pm 1.48$  huevos. Para los días 5 ( $F_{3, 39}=16.12$ ;  $P < 0.0001$ ); 7 ( $F_{3, 39}=17.69$ ;  $P < 0.0001$ ), 10 ( $F_{3, 39}=35.49$ ;  $P < 0.0001$ ) y 15 ( $F_{3, 39}=76.07.08$ ;  $P < 0.0001$ ) las hembras se comportaron de manera similar en miel más caseína con huésped y miel con huésped con el mayor número de huevos y sin diferencias entre sí. Los tratamientos que no tuvieron huésped se comportaron de manera similar en la mayoría de las fechas de evaluación, como los de menor producción de huevos. Para el día

25 ( $F_{3, 39}=10.6$ ;  $P < 0.0001$ ) y día 30 ( $F_{3, 37}=16.67$ ;  $P < 0.0001$ ), miel sin huésped presentó la menor cantidad de huevos en esas fechas que cualquier tratamiento.



**Figura 5.** Huevos (Media±EE) de *Catolaccus hunteri* a través del tiempo. Hembras sometidas a distintos suplementos alimenticios con y sin huésped.

### 3.5 DISCUSIÓN

Los parasitoides sinovigénicos en estado adulto necesitan de nutrientes para realizar el proceso de oogénesis, estos nutrimentos los adquieren del consumo de hemolinfa del huésped o de otras fuentes externas como mielecillas, néctar y polen (Wäckers 2005, Jervis et al. 2001, Chen y Fadamiro 2006, Wang et al. 2014). En este estudio, el suplemento de caseína mezclada con miel tuvo efecto en la producción de huevos totales de *C. hunteri*. En algunas especies de parasitoides, el efecto de suplementos alimenticios en la fase adulta, junto con la presencia de su huésped, también han incrementando la fecundidad (Morales-Ramos et al. 1996, Casas et al. 2005, Vanaclocha et al. 2014, Wang et al. 2014). Por otro lado, los tratamientos sin presencia del huésped fueron útiles para demostrar que hubo un efecto de la combinación de miel y caseína aún en ausencia del huésped. Ese efecto no fue suficiente para producir huevos de manera similar al tratamiento de presencia del huésped más miel, como

sucede con otro parasitoide sinovigénico (Chen y Stansly 2014). Sin embargo, las hembras produjeron un 38% más de huevos totales, comparado con el tratamiento que no tuvo fuente de proteína y sólo miel. Adicionalmente, en este trabajo no se logró separar la alimentación sobre el huésped (adquisición de nutrientes) y el estímulo que tiene la presencia del huésped en la formación de huevos, como ya lo indicaron otros autores (Morales-Ramos et al. 1996, Lauzière et al. 2001, Kapranas y Luck 2008, Chen y Stansly 2014).

Con respecto a la dinámica de oocitos, se observó que su formación se da en hembras recién emergidas ( $\leq 8$  h de edad) con la disponibilidad del huésped y la cantidad de oocitos se fue modificando en todas las fechas de evaluación. Por otro lado, aquellas hembras que se alimentaron sólo de miel continuaron formando oocitos hasta el último día de observación. Además, no se registró un efecto por la adición de suplemento con proteína (miel más caseína). Posiblemente, como sucede en otras especies de parasitoides, los recursos para la formación de oocitos en *C. hunteri* se obtienen en la etapa larval y pupal y las hembras emerjen con una carga de oocitos (Bodin et al. 2009, Liu et al. 2014).

*Catolaccus hunteri* es un especie sinovigénica (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Seal et al. 2002) y por tanto, al momento de la emergencia no había huevos formados, pero al día uno, todas las hembras registraron una carga de alrededor de tres huevos. También se mostró que la combinación del huésped junto con una mezcla de carbohidratos y proteína (miel más caseína) incrementó la cantidad de huevos en la tercera semana (d 20) comparada con miel y huésped. Estos resultados muestran que la obtención de nutrientes en estado adulto de *C. hunteri* es importante para y durante el proceso de oogénesis, como se ha registrado en otras especies de parasitoides sinovigénicos (Rivero y Casas 1999, Jervis y Ferns 2004, Casas et al. 2005). Por otro lado, donde no hubo presencia del huésped, el suplemento de miel más caseína registró más huevos por hembra (a los 10 y 15 d). Esto puede indicar que la caseína,

como un complemento de proteína externa, podría tener un papel importante en la formación de huevos en parasitoides sinovigénicos, como se ha sugerido en otras especies con fuentes de proteína diferente, tales como polen y proteína hidrolizada (Leius 1969, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014).

Cuando *C. hunteri* se alimentó sólo de miel se produjeron menos huevos y estos fueron de mayor tamaño comparados con el tratamiento con miel más caseína más huésped. Las hembras de *C. hunteri* que produjeron más huevos, en los tratamientos con suplemento de caseína, registraron huevos más pequeños, por lo que se sugiere que este comportamiento puede estar dirigido más hacia producir mayor número de huevos, pero no para incrementar su tamaño. Es probable que el concepto de calidad de huevo de esta especie no tenga que ver precisamente con incrementar más su tamaño, situación que se ha registrado en otras especies de parasitoides (Blackburn 1991, Mayhew y Blackburn 1999, Liu et al. 2014).

En el presente trabajo se encontró un efecto positivo con la adición de un suplemento de proteína (60 mg caseína/ mL miel), sobre el número y dinámica de producción de huevos de las hembras adultas de *C. hunteri*. Aunque este suplemento no se considera un sustituto del huésped (alimentación sobre el huésped), la caseína más miel sin presencia del huésped proporcionó un incremento en el número de huevos, particularmente durante las cuatro semanas de mayor fecundidad.

### **CAPÍTULO 3. ¿TIENE ALGÚN EFECTO, SOBRE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA, ALIMENTAR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CASEÍNA A ADULTOS DE *Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE)?**

#### **4.1 RESUMEN**

En este trabajo se ofreció a hembras de *Catolaccus hunteri* un suplemento alimenticio de caseína a diferentes concentraciones mezcladas con miel, y se evaluó su efecto sobre algunos parámetros reproductivos. Los tratamientos consistieron en 0, 30, 60 y 120 mg de caseína hidrolizada (en grado reactivo) / 1 mL miel todos con acceso a su huésped para alimentarse. Cada tratamiento se evaluó sobre 10 hembras por siete semanas y el experimento completo se repitió tres veces con diferentes generaciones de insectos (n=30). La fecundidad total y dinámica de oviposición fue superior en el tratamiento con 60 mg caseína/ 1 mL miel. Las hembras que se alimentaron de esa concentración de caseína más disposición del huésped colocaron 30% más huevos que el resto de los tratamientos; esa diferencia se manifestó principalmente en el periodo de mayor fecundidad. La fecundidad en hembras del tratamiento con 30 mg de caseína/mL miel, no fue diferente a aquellas con 60 mg en las semanas 4 y 5. Por otro lado, no se encontraron efectos sobre periodo de preoviposición, fertilidad, tamaño de huevo o alimentación sobre el huésped de ninguno de los tratamientos.

**Palabras clave:** Parasitoide sinovigénico, reproducción, cría de enemigos naturales, nutrición, control biológico.

## 4.2 INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de nutrientes en parasitoides (Hymenoptera), como en otros seres vivos, es indispensable para realizar funciones vitales, incluida la reproducción (Jervis et al. 2001). El proporcionar una fuente de carbohidratos a parasitoides adultos sinovigénicos, particularmente miel y otros azúcares (monosacáridos, disacáridos y trisacáridos), como un suplemento alimenticio, puede prolongar la vida de varias especies y les permite mayor fecundidad, comparada con hembras sin esta fuente de nutrición (Wäckers 2001, Chen y Fadamiro 2006, Harvey et al. 2012, Vanaclocha et al. 2014, Charles y Paine 2016). Además de los carbohidratos, los parasitoides sinovigénicos en estado adulto necesitan de proteínas para mantener la producción de huevos y manifestar su potencial reproductivo, esto contribuye a explicar la necesidad de alimentarse del huésped (Heimpel y Rosenheim 1995, Rivero y West 2005, Strand y Casas 2008, Cerón-González et al. 2014). Quizá por ello, en otros trabajos se evaluó en parasitoides adultos el efecto de suplementos alimenticios a base de proteínas (Morales-Ramos et al. 1996, Lauzière et al. 2001, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014). En esos trabajos se utilizó como fuente proteínica levaduras, proteína hidrolizada y algunos aminoácidos esenciales. Aunque las concentraciones y variaron en cada uno de esos trabajos, se observó un efecto directo sobre fecundidad y en algunas ocasiones longevidad.

En el capítulo anterior se encontró que hembras de *Catolaccus hunteri* alimentadas sobre su huésped más un suplemento alimenticio a base de caseína (60 mg de caseína hidrolizada / 1 mL miel), incrementaron el número de huevos durante el periodo de mayor fecundidad; pero esto no sustituyó la presencia del huésped para manifestar su potencial reproductivo. Por otro lado, un suplemento a base de diferentes concentraciones de proteína puede provocar efectos sobre los parasitoides sinovigénicos como en la preoviposición,



fecundidad, fertilidad y tamaño de huevo (Leatemia et al. 1995, King 1998, Morales-Ramos et al. 1996, Giron y Casas 2003, Eslampour y Aremidah 2016, Lahiri et al. 2017). En algunos trabajos también se explora la posible influencia de esos suplementos proteínicos sobre la necesidad de alimentación sobre el huésped (Vanaclocha et al. 2014). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue conocer sí la disposición del huésped y distintas concentraciones de caseína, mezclada con miel, modifican parámetros de la biología reproductiva de *C. hunteri*, como son el periodo de preoviposición, fecundidad, alimentación sobre el huésped, tamaño (calidad) de huevo y fertilidad.

### **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.3.1 Material biológico**

##### **4.3.1.1 Cría del huésped facticio *Callosobruchus maculatus***

Se estableció una colonia del gorgojo del garbanzo (huésped facticio) *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae), sobre semillas de garbanzo, *Cicer arietinum* L., siguiendo la metodología de Rodríguez-Leyva et al. (2002) y Vasquez et al. (2005) con algunas modificaciones (ver capítulo I de este trabajo).

##### **4.4.3.2 Cría del parasitoide *Catolaccus hunteri***

Los individuos del parasitoides *C. hunteri* se desarrollaron sobre larvas de su huésped facticio (*C. maculatus*) siguiendo la metodología de Vasquez et al. (2005) para su manutención en laboratorio (ver detalles en el capítulo I de este trabajo).

#### **4.3.2 Tratamiento y diseño experimental**

El bioensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Control Biológico, Posgrado en Fitosanidad, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México,

en una cámara de cría a condiciones ambientales de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60-70% H. R. y un fotoperiodo de 12:12 h L:O. Para los experimentos se utilizaron hembras de *C. hunteri*  $\leq 8$  h de edad.

Los tratamientos consistieron en proporcionar una fuente de proteína, a diferentes concentraciones mezclada con miel. La fuente de proteína fue caseína hidrolizada (Sigma-Aldrich®-22090-500G con 17% de aminoácidos) en las cantidades siguientes: a) solo miel (testigo absoluto), b) 30 (Cas30), c) 60 (Cas60) y d) 120 (Cas120) mg de caseína hidrolizada/ 1 mL miel. Las cantidades de caseína se modificaron usando como referencia el trabajo de Rojas et al. (1996) en una dieta de aminoácidos para la especie relacionada el picudo del algodón *Catolaccus grandis*.

La unidad experimental consistió en confinar dos machos y una hembra de *C. hunteri*, con el fin de asegurar el apareamiento, dentro de una caja de Petri de 10x10x2 cm. La caja tenía un orificio de 1.5 cm de diámetro cubierto con tela organdí para favorecer la ventilación, además se incluyó una mecha de algodón saturada en agua. Dentro de cada caja, y usando una jeringa de 5 mL, se proporcionaron los tratamientos en forma de líneas de miel sobre la cara interna de cada caja para la alimentación *at libitum* de los parasitoides. Asimismo, en cada unidad experimental se colocó una lámina de 12 burbujas de Parafilm® con dos larvas del último ínstar (21 d) del gorgojo del garbanzo. Este tipo de burbujas de parafilm se han usado para evaluar fecundidad y alimentación sobre el huésped (facticio) en ensayos con *Catolaccus grandis* y *C. hunteri* (Morales -Ramos et al. 1992, Rodríguez-Leyva et al. 2000). Las líneas de miel más caseína se renovaron cada 48 h, mientras que la lámina de Parafilm® con el huésped facticio se sustituyó cada 24 h. Cada concentración de caseína mezclada con miel (tratamiento) se evaluó sobre 10 hembras (n=10) y cada hembra se constituyó en una repetición. El experimento completo, en un diseño completamente al azar, se repitió tres veces con generaciones diferentes de insectos (en total n=30). Cada tratamiento tuvo una

duración de siete semanas, en este periodo, la sobrevivencia de hembras fue alrededor de 80% y después se manifestaba una disminución drástica en ella (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Seal et al. 2002), como se confirmó en la primera repetición de este trabajo, por ello estas evaluaciones no se extendieron por más tiempo.

### **4.3.3 Variables evaluadas**

#### **4.3.3.1 Periodo preoviposición y fecundidad (oviposición)**

El periodo de preoviposición consistió en registrar el número de días antes de colocar el primer huevo. La fecundidad se determinó con el número total de huevos por día por cada hembra en cada tratamiento. Las observaciones para contar huevos de *C. grandis* dentro de las cápsulas de parafilm se desarrollaron con un microscopio estereoscópico (10x).

#### **4.3.3.2 Calidad de huevo (tamaño)**

Para medir la calidad de huevo (tamaño), por cada hembra se midieron 10 huevos por tratamiento. De cada huevo se midió la longitud ( $\mu$ ) y ancho ( $\mu$ ), después se obtuvo la media geométrica de ambas medidas (Manikandan 2011). Las mediciones se realizaron con el analizador de imágenes Image tool para Windows versión 3.0 (Wilcox et al. 2002) y se calibró la fotografía de acuerdo a la escala establecida para cada imagen. Las evaluaciones se realizaron en periodos diferentes: a) a los 7 d, que es el inicio del periodo de oviposición, b) a los 21 d, periodo de mayor fecundidad para el parasitoide y c) a los 35 d, periodo donde disminuye la fecundidad (Rodríguez-Leyva et al. 2000). Estas mediciones se realizaron dos veces en repeticiones diferentes.

#### **4.3.3.3 Alimentación sobre el huésped**

El número de larvas muertas del huésped por alimentación del parasitoide se evaluó cada 24 h, sobre 24 larvas de *C. maculatus* (2 larvas por burbuja de Parafilm®). Para las observaciones se utilizó un microscopio estereoscópico (10x), en cada ocasión se revisó,

cuidadosamente, sobre las larvas, la presencia de señales de alimentación del parasitoide, por ejemplo, heridas por picadura del ovipositor, presencia de hemolinfa y/o necrosamiento de tejido por daño del ovipositor.

#### **4.3.3.4 Fertilidad**

Para evaluar esta variable se tomaron 10 huevos por hembra de *C. grandis* por tratamiento a los 7, 21 y 35 días de edad, es decir en los periodos de inicio de oviposición, el de mayor oviposición y cuando comenzaba a disminuir ésta (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Seal et al. 2002). Cada huevo se colocó junto con su huésped dentro de una caja de Petri, esta caja tenía un orificio (1.5 cm) cubierto con tela organza para favorecer ventilación, los huevos se individualizaron para prevenir canibalismo del primer ínstar larval del parasitoide (Rodríguez-Leyva et al. 2000). Las observaciones de emergencia de las larvas se realizaron con un microscopio estereoscopio (10x). Este experimento completo se repitió dos veces (n=20). A excepción de esta medición, el resto de las variables tuvieron 10 repeticiones en tres ocasiones diferentes (n=30).

#### **4.3.3.5 Análisis estadístico**

Los datos de preoviposición, fecundidad, alimentación sobre el huésped, tamaño de huevo (media geométrica) y fertilidad se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias entre tratamientos se realizaron pruebas de separación de medias por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD por sus siglas en inglés) ( $P \leq 0.05$ ). Los datos de fertilidad se transformaron a arcoseno, el tamaño de huevo a rangos, mientras que el resto de los datos se transformaron a logaritmo natural (Ln). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistix 8.1 (Analytical Software 2003).

#### 4.4 RESULTADOS

Las variables preoviposición y alimentación sobre el huésped no difirieron entre tratamientos ( $F_{3, 119}=0.3$ ;  $P= 0.8269$  y  $F_{3, 119}=1.17$ ;  $P= 0.3259$ ), pero si sobre el número de huevos totales entre los tratamientos ( $F_{3, 119}=3.04$ ;  $P= 0.032$ ). Las hembras en Cas60 registraron 30% más huevos, respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 4). También se observó diferencias sobre la dinámica de huevos a través del tiempo (Figura 6) ( $F_{6, 718}=32.35$ ;  $P <0.0001$ ).

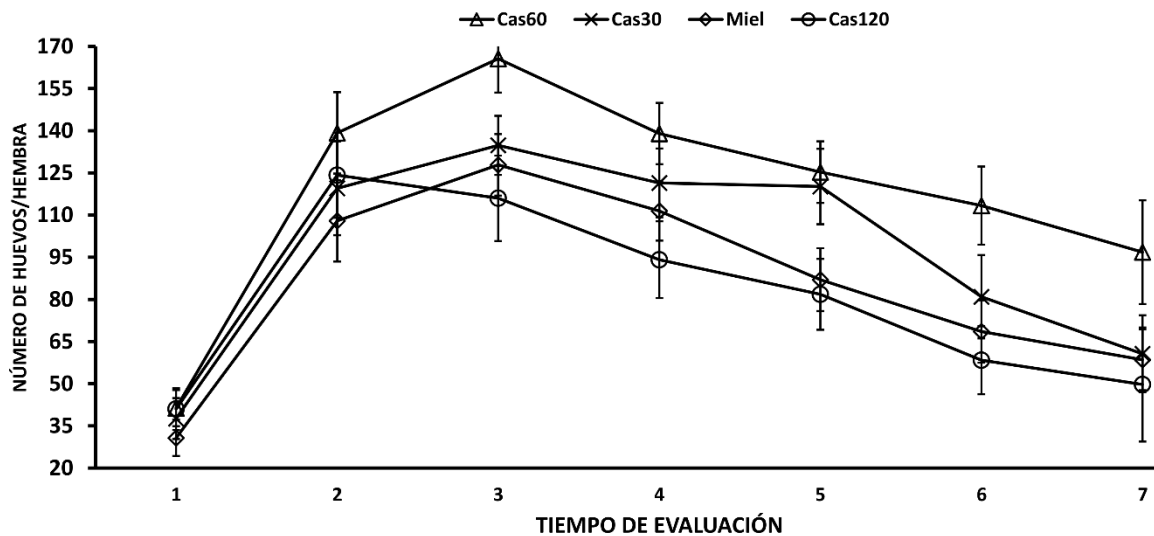
**Cuadro 4.** Efecto de diferentes concentraciones en mg de caseína mezclada con miel sobre parámetros biológicos de *Catolaccus hunteri*.

Tratamientos	Media±EE		
	Preoviposición	Fecundidad	Alimentación sobre el huésped
0 (miel)	8.3±1.35	548.37±42.84 b	365.87±37.47
Cas30	7.43±0.94	564.9±53.68 b	274.6±31.52
Cas60	9.36±1.47	717.37±58.52 a	322.57±35.42
Casas120	8.5±1.88	503.03±57.10 b	318.7±33.43

Medias con la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente entre sí (LSD;  $p \leq 0.05$ ).

Las hembras de *C. hunteri* en la semana uno colocaron  $37.65 \pm 3.43$  huevos sin diferencias entre tratamientos ( $F_{3, 119}=0.51$ ;  $P= 0.6753$ ), también para la semana dos ( $F_{3, 119}=0.72$ ;  $P= 0.5401$ ) y semana siete ( $F_{3, 58}=1.71$ ;  $P= 0.1764$ ). El efecto de las concentraciones de caseína sobre el número de huevos de *C. hunteri* se registró en la semana tres ( $F_{3, 119}=2.96$ ;  $P= 0.0354$ ), cuatro ( $F_{3, 114}=2.55$ ;  $P= 0.05$ ), cinco ( $F_{3, 100}=3.44$ ;  $P= 0.0199$ ) y seis ( $F_{3, 83}=3.42$ ;  $P= 0.0211$ ). De manera general, las hembras de *C. hunteri* mostraron el mayor número de

huevos en el tratamiento Cas60, pero en algunas semanas como la 4 y 5 no fue diferente del tratamiento Cas30. Por el contrario, el menor número de huevos se registró en hembras que tuvieron de suplemento sólo miel y Cas120, aunque en algunas semanas (cuatro, cinco y seis), las hembras se comportaron de manera similar a las hembras alimentadas en Cas30.



**Figura 6.** Fecundidad por semana (Media±EE) de *Catolaccus hunteri*. Hembras sometidas a distintas concentraciones de caseína en mg mezclada con miel y solo miel.

Por otro lado, los tratamientos con diferente concentración de caseína no mostraron diferencia con respecto al número total de huéspedes consumidos por el parasitoide ( $F_{3, 119}=1.17$ ;  $P=0.3259$  (Cuadro 5); tampoco en la calidad de huevo de las hembras ( $F_{3, 237}=1.51$ ;  $P=0.2126$ ), ni en la fertilidad ( $F_{3, 239}=1.07$ ;  $P=0.3798$ ). Este último parámetro fluctuó entre 76 y 82% (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Efecto de diferentes concentraciones en mg de caseína mezclada con miel sobre parámetros biológicos de *Catolaccus hunteri*.

Tratamientos	Media±EE	
	Tamaño de huevo ( $\mu$ )	Fertilidad (%)
0 (miel)	254.14±6.54	82±0.27
Cas30	242.58±9.6	81±0.34
Cas60	238.36±9.48	8.4±0.31
Casas120	225.68±11.6	76±0.41

#### 4.5 DISCUSIÓN

Existen reportes de la influencia de la alimentación sobre parasitoides sinovigénicos, específicamente sobre el ofrecimiento de suplementos alimenticios a base de carbohidratos y algunas proteínas a los adultos, donde se han observado incrementos en algunos parámetros de la biología reproductiva (Leatemala et al. 1995, Rojas et al. 1996, Charles y Paine 2016, Lahiri et al. 2017).

En el presente trabajo, la mezcla de caseína y miel junto con el huésped facticio, no tuvo un efecto sobre el periodo de preoviposición de *C. hunteri*. No obstante, la colonia de *C. hunteri* con la que se desarrolló el ensayo, manifestó un periodo de preoviposición de 3 días menos que lo reportado por Rodríguez-Leyva et al. (2000) y 7 días menos a lo observado por Seal et al. (2002) que fue de 15 días. Esta diferencia puede estar relacionada con la selección de aquellas hembras que ovipositaban durante los primeros 7 días de vida.

La variable que estuvo influenciada por los tratamientos (caseína y miel) fue la fecundidad total. Las hembras alimentadas con de 60 mg de caseína / 1 mL miel, produjeron la mayor cantidad de huevos totales. Estos resultados indican que un suplemento a base de miel y proteína, más la presencia de su huésped, pueden incrementar la fecundidad de *C. hunteri*. Este mismo efecto es similar a lo reportado por Chen y Stansly (2014) para el parasitoide sinovigénico *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera: Eulophidae) y por Vanaclocha et al. (2014) en especies de *Aphytis*.

La concentración de caseína donde fue posible ver un efecto, fue en Cas60. Podría pensarse que Cas30 no fue suficiente para ofrecer nutrientes para incrementar el número de huevos; no obstante, Cas120 resultó casi siempre con menor número de huevos que el tratamiento de solo miel. Esto podría explicarse al menos por dos razones, esa cantidad de 120 mg de caseína, ya no era digerible o causaba alguna repelencia para ser consumida por el parasitoide. Aparentemente, las hembras frecuentaron menos las líneas de miel con concentraciones de Cas120 (datos sin publicar). Por otro lado, aunque se observó un efecto en la fecundidad total por Cas60, este efecto no fue constante en todas las semanas de evaluación. Las hembras alimentadas con Cas60 incrementaron la fecundidad en las semanas 3 a la 6, comparadas con hembras a las que sólo se les ofreció miel. Es probable que el periodo de máxima oviposición (semana cuatro), o de mayor demanda por proteína (Rodríguez-Leyva et al. 2000), fue el período donde la caseína desarrolló un papel fundamental para la formación de huevos de *C. hunteri*. Esto demuestra la importancia que juegan las proteínas como suplemento alimenticio sobre la biología reproductiva de una especie de parasitoide sinovigénica como se ha señalado por otros autores (Lauzière et al. 2001, Chen y Stansly 2014, Vanaclocha et al. 2014).



En el caso de la alimentación de *C. hunteri* sobre el huésped, no se encontró algún efecto de los suplementos alimenticios. Aquí se debe indicar que aunque la revisión de ataques en los huéspedes fue detallada (número de picaduras de oviposición, cicatrices, tejido necrosado), no se contó con una escala de medición para conocer la cantidad de hemolinfa que se obtenía de cada huésped. En trabajos futuros se debería considerar otra manera de evaluar la alimentación sobre el huésped, así como lo realizado por Giron et al. (2002, 2004). En los trabajos de estos autores se pesaron a las hembras del parasitoide *Eupelmus vuilletti* antes y después de haber consumido la hemolinfa de su huésped. En nuestro caso, el número de huéspedes consumido por cada hembra adulta, y el riesgo de maltratar al huésped facticio o al adulto del parasitoide en su manejo, previno realizar ese tipo de evaluación. Sin embargo, en futuros experimentos se deben probar diferentes variables para medir la alimentación sobre el huésped y no solo características físicas como se hizo en este estudio. Este trabajo no fue concluyente para saber si el suplemento alimenticio de miel y Cas60 contribuyó a disminuir el consumo de alimentación sobre el huésped. Como ha sucedido en algunas especies de *Aphytis*, donde el consumo frecuente de una fuente de proteína hidrolizada disminuye la necesidad de alimentarse de su huésped (Vanaclocha et al. 2014).

Adicionalmente, las diferentes concentraciones de caseína más miel (proteína más carbohidratos), no influyeron en cuanto al tamaño (calidad) del huevo del parasitoide, a diferencia de lo que indicaron otros autores (Blackburn 1991, Giron y Casas 2003). Por otro lado, también se ha asociado que una mayor cantidad de huevos se relaciona con huevo de menor tamaño de estos (Blackburn 1991). En este caso la miel más caseína 60 mg se observó una mayor fecundidad de *C. hunteri*; no obstante, el tamaño de huevo no disminuyó. Un caso similar se observó en *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) donde la tasa producción de huevos no influyó en el tamaño (calidad) del huevo (Burger et al. 2005).

La fertilidad es un parámetro importante, porque se considera una estrategia que asegura más descendencia (Rodríguez-Leyva et al. 2000, Harvey et al. 2013). Algunos suplementos más ~~el~~ la presencia del huésped pueden influir en la fertilidad del parasitoide, como se ha observado en *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) y *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) o en el pteromárido *Dinarmus basalis* Rondani que incrementan significativamente la fertilidad (Eliopoulos et al. 2005, Eliopoulos 2007, Hossain y Haque 2015, Eslampour y Aremideh 2016). En el presente trabajo con *C. hunteri* no sucedieron cambios importantes con este parámetro, quizá esto se deba a la biología particular de cada especie y no se descarta que el tipo de huésped también pueda influir en ese resultado (Smith y Pimentel 1969, Schmale et al. 2001, Tang et al. 2015).

La caseína en cantidades de 60 mg caseína hidrolizada/ 1 mL de miel, incrementó la fecundidad total de *C. hunteri* y modificó la dinámica reproductiva durante las semanas de mayor oviposición (3, 4 y 5). Lo que corrobora que este tipo y concentración de proteína, mezclada con miel, puede ayudar a mejorar la reproducción de un parasitoide sinovigénico.

## CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio partió de la hipótesis general que el ofrecimiento de una proteína exógena mezclada con carbohidratos, como alimento suplementario, podrían influenciar la biología reproductiva de un parasitoide sinovigénico. Para contrastar esta hipótesis se usó como modelo de estudio a *Catolaccus hunteri*, un ectoparasitoide solitario y sinovigénico, y a su huésped facticio *Callosobruchus maculatus*. Al evaluar diferentes fuentes de proteína mezcladas con miel y un testigo (miel) sobre la fecundidad de *C. hunteri*, se corroboró la necesidad del huésped para obtener nutrientes y el estímulo para la oogénesis. Las diferentes fuentes exógenas de proteína mezcladas con miel tuvieron poco efecto en la fecundidad; sin embargo, la caseína sobresalió respecto a proteína hidrolizada y polen.

En la evaluación de una sola concentración de caseína mezclada con miel como suplemento alimenticio de los adultos del parasitoide, con o sin la presencia del huésped, se encontró un efecto importante de la caseína mezclada con miel (60 mg caseína hidrolizada/ 1 mL miel), en las hembras adultas de *C. hunteri*, sobre el número y dinámica de producción de huevos. Aunque este suplemento no se consideró un sustituto del huésped, la caseína más miel sin presencia del huésped proporcionó un incremento en el número de huevos al menos durante la segunda semana (d 10 y d 15) y última semana de evaluación (25 y 30 d).

En la evaluación de las diferentes concentraciones de caseína mezclada con miel y su efecto en días de preoviposición, fecundidad, alimentación sobre el huésped, fertilidad y calidad de huevo de *C. hunteri*, con 60mg de caseína hidrolizada/ 1 mL miel, se observó un incremento en el número total de huevos (30%). También se modificó la dinámica de reproducción durante las semanas de mayor oviposición (3, 4, 5 y 6). Para el resto de los parámetros evaluados, no se registró algún efecto del suplemento de caseína mezclada con miel.

En resumen, un suplemento a base de miel mezclada con caseína (60 mg caseína/ mL de miel), ofrecida de manera exógena a *C. hunteri* y cuando el huésped estuvo presente, influyó la biología reproductiva de *C. hunteri*.

## LITERATURA CITADA

- Analytical Software. 2003. Statistix 8.1 User's Manual. Tallase, Florida USA.
- Andrade, G. S., A. H. Sousa, J. C. Santos, F. C. Gama, J. E. Serrão, and J. C. Zanuncio. 2012. Oogenesis pattern and type of ovariole of the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *An. Acad. Bras. Cienc.* 84: 767-774.
- Antolin, M. F., and R. L. Williams. 1989. Host feeding and egg production in *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Fla. Entomol.* 72: 129-134.
- Blackburn, T. M. 1991. Evidence for a fast-slow continuum of life-history traits among parasitoid Hymenoptera. *Funct. Ecol.* 5: 65-74.
- Bernal J. S. 2007. Biología, ecología y etología de parasitoides, pp.61-74. *En: L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.), Teoría y Aplicación del Control Biológico.* Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Bodin, A., B. Jaloux, J. P. Delbecq, F. Vannier, J. P. Monge, and N. Mondy. 2009. Reproduction in a variable environment: How does *Eupelmus vuilleti*, a parasitoid wasp, adjust oogenesis to host availability. *J. Insect Physiol.* 55: 643-648.
- Burger, J., A. Kormany, J. C. Lenteren, and L. E. Vet. 2005. Importance of host feeding for parasitoids that attack honeydew-producing hosts. *Entomol. Exp. Appl.* 117:147-154.
- Casas, J., S. Pincebourde, N. Mando, F. Vannier, R. Poujol, and D. Giron. 2005. Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology.* 86: 545-554.
- Cerón-González, C., J. R. Lomeli-Flores, E. Rodríguez-Leyva, y A. Torres-Ruíz. 2014. Fecundidad y alimentación de *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae) sobre el psílido de la papa *Bactericera cockerelli*. *Rev. Mex. De Cienc. Agric.* 5:893-899.
- Chapman, R. F. 2013. *The Insects: Structure and Function.* Stephen J. Simpson and Angela E. Douglas 5th ed. Cambridge, Cambridge University Press. 901 p.
- Charles, J. J., and T. D. Paine. 2016. Fitness Effects of Food Resources on the Polyphagous Aphid Parasitoid, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *PloS one.* 11:1 e0147551.

- Chen, L., and H. Y. Fadamiro. 2006. Comparing the effects of five naturally occurring monosaccharide and oligosaccharide sugars on longevity and carbohydrate nutrient levels of a parasitic phorid fly, *Pseudacteon tricuspis*. *Physiol. Entomol.* 31: 46-56.
- Chen, X., and P. A. Stansly. 2014. Effect of holding diet on egg formation of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoid of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Fla. Entomol.* 97: 491-495.
- Donaldson, J. S., and G. H. Walter. 1988. Effects of egg availability and egg maturity on the ovipositional activity of the parasitic wasp, *Coccophagus atratus*. *Physiol. Entomol.* 13: 407-417.
- Eliopoulos, P. A. 2007. The importance of food supplements for parasitoids of stored product pests: the case of *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *IOBC/WPRS Bull.* 30: 37-41.
- Eliopoulos, P. A., G. J. Stathas, and S. L. Bouras. 2005. Effects and interactions of temperature, host deprivation and adult feeding on the longevity of the parasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Eur. J. Entomol.* 102:181-187.
- Eslampour, L., and S. Aramideh. 2016. Adult longevity, fertility and sex ratio of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae): effect of host artificial diets. *J. Entomol. Zool. Stud.* 4:189-192.
- Flanders, S. E. 1950. Regulation of ovulation and egg disposal in the parasitic Hymenoptera. *Can. Entomol.* 82:134-140.
- Giron, D., A. Rivero, N. Mandon, E. Darrouzet, and J. Casas. 2002. The physiology of host feeding in parasitic wasps: implications for survival. *Funct. Ecol.* 16: 750-757.
- Giron, D., and J. Casas. 2003. Mothers reduce egg provisioning with age. *Ecol. Lett.* 6: 273-277.
- Giron, D., S. Pincebourde, and J. Casas. 2004. Lifetime gains of host-feeding in a synovigenic parasitic wasp. *Physiol. Entomol.* 29: 436-442.
- Harvey, J. A., E. H. Poelman, and T. Tanaka. 2013. Intrinsic inter-and intraspecific competition in parasitoid wasps. *Annu. Rev. Entomol.* 58:333-351.

- Harvey, J. A., J. Cloutier, B. Visser, J. Ellers, F. L. Wäckers, and R. Gols. 2012. The effect of different dietary sugars and honey on longevity and fecundity in two hyperparasitoid wasps. *J. Insect Physiol.* 58: 816-823.
- Heimpel, G. E., and J. A. Rosenheim. 1995. Dynamic host feeding by the parasitoid *Aphytis melinus*: the balance between current and future reproduction. *J. Animal Ecol.* 64: 153-167.
- Heimpel, G. E., and T. R. Collier. 1996. The evolution of host-feeding behaviour in insect parasitoids. *Biol. Rev.* 71: 373-400.
- Hogervorst, P. A. M., F. L. Wäckers, and J. Romeis. 2007. Effect of honeydew sugar composition on the longevity of *Aphidius ervi*. *Entomol. Exp. Appl.* 122: 223-232.
- Hossain, M. A., and M. A. Haque. 2015. Influence of food supplements on the reproductive potential of the parasitoid, *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). *African Entomol.* 23: 88-93.
- Iwata, K. 1960. The comparative anatomy of the ovary in Hymenoptera. Part IV: Proctotrupeoidea and Agriotypidae (Ichneumonoidea) with descriptions of ovarian eggs. *Jpn. J. Entomol.* 27: 18-20-1.
- Jervis, M. A., G. E. Heimpel, P. N. Ferns, J. A. Harvey, and N. A. C. Kidd. 2001. Life-History Strategies in Parasitoid Wasps: A Comparative Analysis of 'Ovigeny'. *J. Animal Ecol.* 70: 442-458.
- Jervis, M. A., and N. A. C. Kidd. 1986. Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 61: 395-434.
- Jervis, M. A., and P. N. Ferns. 2004. The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and resource allocation. *Oikos.* 107: 449-460.
- Jervis, M. A., J. Ellers, and J. A. Harvey. 2008. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 361-385.
- Kapranas, A., and A. Tena. 2015. Encyrtid parasitoids of soft scale insects: Biology, behavior, and their use in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 60: 195-211.
- Kapranas, A., and R. F. Luck. 2008. Egg maturation, host feeding, and longevity in two *Metaphycus* parasitoids of soft scale insects. *Biol. Control.* 47: 147-153.

- King, B. H. 1998. Sex-ratio manipulation in response to host size by the parasitoid wasp *Spalangia cameroni*: a laboratory study. *Evolution*. 42: 1190–1198.
- King, P. E., and J. G. Richards. 1969. Oögenesis in *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Physiol. Entomol.* 44: 143-157
- Lahiri, S., D. Orr, Y. J. Cardoza, and C. Sorenson. 2017. Longevity and fecundity of the egg parasitoid *Telenomus podisi* provided with different carbohydrate diets. *Entomol. Exp. Appl.* 162: 178-187.
- Lauzière, I., G. Pérez-Lachaud, and J. Brodeur. 2001. Importance of nutrition and host availability on oogenesis and oviposition of *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyridae). *Bull. Entomol. Res.* 91: 185–191.
- Leatemia, J. A., J. E. Laing, and J. E. Corrigan. 1995. Effects of adult nutrition on longevity, fecundity, and offspring sex ratio of *Trichogramma minutum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Can. Entomol.* 127: 245-254.
- Lee, J. C., G. E. Heimpel, and G. L. Leibe. 2004. Comparing floral nectar and aphid honeydew diets on the longevity and nutrient levels of a parasitoid wasp. *Entomol. Exp. Appl.* 111: 189-199.
- Leius, K. 1961. Influence of food on fecundity and longevity of adults of *Itopectis conquisitor* (Say) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Can. Entomol.* 93: 771-780.
- Liu, W. X., W. Wang, L. S. Cheng, J. Y. Guo, and F. H. Wan. 2014. Contrasting patterns of ovarian development and oogenesis in two sympatric host-feeding parasitoids, *Diglyphus isaea* and *Neochrysocharis formosa* (Hymenoptera: Eulophidae). *Appl. Entomol. Zool. (Jpn.)*. 49: 305-314.
- Manikandan, S. 2011. Measures of central tendency: The mean. *J Pharmacol Pharmacother.* 2: 140.
- Mao, N., P. Tang, H. W. Tian, M. Shi, and X. X. Chen. 2016. General morphology and ultrastructure of the female reproductive apparatus of *Trichomalopsis shirakii* Crawford (Hymenoptera: Pteromalidae). *Microsc. Res. Tech.* 79: 625-636.
- Mayhew, P. J., and T. M. Blackburn. 1999. Does development mode organize life-history traits in the parasitoid Hymenoptera? *J. Anim. Ecol.* 68: 906-916.



- Morales-Ramos, J. A., and J. R. Cate. 1992. Laboratory determination of age-dependent fecundity, development and rate of increase of *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 469-476.
- Morales-Ramos, J. A., M. G. Rojas, and E. G. King. 1996. Significance of adult nutrition and oviposition experience on longevity and attainment of full fecundity of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89: 555-563.
- Morales-Ramos, J. A., M. G. Rojas, R. J. Coleman, and E. G. King. 1998. Potential use of in vitro-reared *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) for biological control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 91: 101-109.
- Olson, D. A. W. N. M., H. Fadamiro, J. O. Lundgren, and G. E. Heimpel. 2000. Effects of sugar feeding on carbohydrate and lipid metabolism in a parasitoid wasp. *Physiol. Entomol.* 25: 17-26.
- Paladino, L. Z. C., A. G. Papeschi, and J. L. Cladera. 2010. Immature stages of development in the parasitoid wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. *J. Insect Sci.* 10:56.
- Price, P. W. 1973. Reproductive strategies in parasitoid wasps. *Am. Nat.* 107: 685-693.
- Rivero, A., and J. Casas. 1999. Incorporating physiology into parasitoid behavioural ecology: the allocation of nutritional resources. *Res. Popul. Ecol.* 41: 39-45.
- Rivero, A., and S. A. West. 2005. The costs and benefits of host feeding in parasitoids. *Anim. Behav.* 69: 1293-1301.
- Rivero-Lynch, A. P., and H. C. J. Godfray. 1997. The dynamics of egg production, oviposition and resorption in a parasitoid wasp. *Funct. Ecol.* 11: 184-188.
- Rodríguez-Leyva, E., J. L. Leyva, V. Gómez, N. M. Bárcenas, and G. W. Elzen. 2000. Biology of *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae), A Parasitoid of Pepper Weevil and Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 862-868.
- Rodríguez-Leyva, E., V. Gómez, N. M. Bárcenas, y J. L. Leyva. 2002. Efecto de diferentes factores sobre la cría de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) para la producción de *Catolaccus* sp. (Hymenoptera: Pteromalidae). *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 86: 87-101.

- Rojas, M. G., J. A. Morales-Ramos, and E. G. King. 1996. In vitro-rearing of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) on meric diets. *J. Econ. Entomol.* 89: 1095-1104.
- Schmale, I., F. L. Wäckers, C. Cardona, and S. Dorn. 2001. Control potential of three hymenopteran parasitoid species against the bean weevil in stored beans: the effect of adult parasitoid nutrition on longevity and progeny production. *Biol Control.* 21:134-139.
- Seal, D. R., P. A. Stansly, and D. J. Schuster. 2002. Influence of temperature and host on life history parameters of *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environ. Entomol.* 31: 354-360.
- Smith, G. J. C., and D. Pimentel. 1969. The Effect of Two Host Species on the Longevity and Fertility of *Nasonia vitripennis* 1, 2. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 62: 305-308.
- Strand, M. R., and J. Casas. 2008. Parasitoid and host nutritional physiology in behavioral ecology, pp. 113-128. *In* E. Wajnberg, J. J. M van Alphen, C. Bernstein (eds.), Behavioral ecology of parasitoids: from theoretical approaches to field applications. Blackwell Publishing, London.
- Tang, L. D., X. C. Ji, Y. Han B. L. Fu, and K. Liu. 2015. Parasitism, emergence, and development of *Spalangia endius* (Hymenoptera: Pteromalidae) in pupae of different ages of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *J. Insect Sci.* 15: 1-5.
- Tena A., A. Kapranas, G. P. Walker, F. Garcia-Mari, and R. F. Luck. 2011: Larval morphology of *Metaphycus fl avus* and its role in host attachment and larval cannibalism. *Bull. Entomol. Res.* 101: 365–372.
- Thompson, S. N. 1999. Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 561-592.
- Vanaclocha, P., D. Papacek, M. J. Verdú, and A. Urbaneja. 2014. Postteneral protein feeding may improve biological control efficiency of *Aphytis lingnanensis* and *Aphytis melinus*. *J. Insect. Sci.* 1: 208.
- Vasquez, E., D. Dean, D. Schuster, and P. Vanetten. 2005. A laboratory method for rearing *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 88: 191-194.

- Visser, B., and J. Ellers. 2012. Effects of a lipid-rich diet on adult parasitoid income resources and survival. *Biol. Control*. 60: 119-122.
- Wäckers, F. L. 2001. A comparison of nectar-and honeydew sugars with respect to their utilization by the hymenopteran parasitoid *Cotesia glomerata*. *J. Insect Physiol.* 47: 1077-1084.
- Wäckers, F. L. 2004. Assessing the suitability of flowering herbs as parasitoid food sources: flower attractiveness and nectar accessibility. *Biol. Control*. 29: 307-314.
- Wäckers, F. L. 2005. Suitability of (extra-) floral nectar, pollen, and honeydew as insect food sources, pp. 17-74. In F. L. Wäckers, P. C. J. Van Rijn and J. Bruin (ed). *Plant-Provided Food for Carnivorous Insects: A Protective Mutualism and its Applications*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wang, W., S. L. Lu, W. X. Liu, L. S. Cheng, Y. B. Zhang, and F. H. Wan. 2014. Effects of Five Naturally Occurring Sugars on the Longevity, Oogenesis, and Nutrient Accumulation Pattern in Adult Females of the Synovigenic Parasitoid *Neochrysocharis formosa* (Hymenoptera: Eulophidae). *Neotrop. Entomol.* 43: 564-573.
- Wang, X. G., and Messing, R. H. 2003. Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. *Biol. Control*. 27: 251-259.
- Wang, X. G., and R. H. Messing. 2003. Foraging behavior and patch time allocation by *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg-larval parasitoid of tephritid fruit flies. *J Insect Behav.* 16:593-612.
- Wilcox, D. B., D. D. McDavid, and D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for windows ver. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio Texas.
- Zhang, G., O. Zimmermann, and S. A. Hassan, 2004. Pollen as a source of food for egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 14: 201-209.