

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPERIENCIAS DURANTE LA ONTOGENIA QUE
CONDUCE A APRENDIZAJE EN LA BUSQUEDA
DE PAREJA EN *APHIDIUS ERYI* HALIDAY
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE: APHIIDINAE)

CRISTIAN ALFONSO VILLAGRA GIL

2006

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Cristian Alfonso Villagra Gil

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología Y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 2, de marzo de año 2006

Director de Tesis:

Dr. Hermann M. Niemeyer

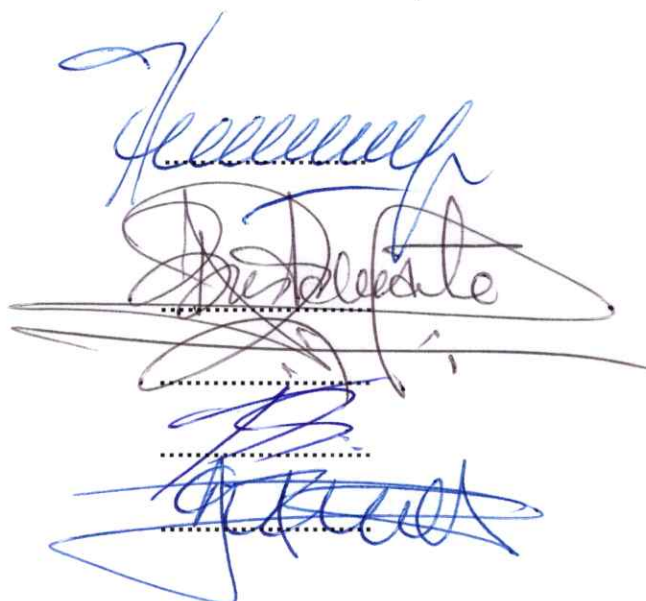
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ramiro Bustamante

Dr. Rigoberto Solís

Dr. Pablo Sabat

Dr. Eduardo Fuentes-Contreras



Biografía



El autor, sexto de siete hermanos, nace el 7 Octubre de 1977. Desde temprana edad muestra pasión por el mundo natural. Entre 1992 y 1995 estudia en el Instituto Nacional General José Miguel Carrera. Desde 1996 hasta 1999 cursa la licenciatura en Ciencias con Mención en Biología en la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. En esta etapa, Cristian expresará su marcada vocación científica, específicamente por el estudio del comportamiento animal, la biología reproductiva y entomología, participando en congresos nacionales con trabajos realizados en el área naturalista. Esta motivación ha quedado plasmada en presentaciones a congresos y varias publicaciones. A partir de 2001, comienza sus estudios de doctorado en el programa de Ecología y Biología Evolutiva. Durante este periodo ha participado en diversas reuniones nacionales e internacionales presentando avances de su trabajo de tesis.

Durante sus estudios universitarios el autor participó activamente en la docencia, en cursos de pregrado y postgrado, nacionales e internacionales, impartiendo el primer semestre de 2001 el curso electivo Introducción a la Entomología en la Facultad de Ciencias. Cristian es miembro de la Sociedad Chilena de Entomología y socio del grupo de discusión en biología evolutiva Decenio. Además ha participado como editor para distintas revistas del área naturalista y comportamiento como *Canadian Journal of Zoology*, *Revista Chilena de Historia Natural*, *Revista Chilena de Entomología* y *Psychological Reports*. A partir del año en curso, el autor se prepara para realizar estudios postdoctorales en la Universidad de South Carolina, USA.

**Dedico este trabajo a la memoria de
Mi colega y amigo Gonzalo Farfán Olea (1978-2003)**

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a CONICYT por la beca doctoral de tres años más la beca de término de tesis de cuatro meses que me fue otorgada, la beca de apoyo a la realización de la tesis doctoral (AT-4040221) y la beca para participar en congresos en el extranjero.

También quisiera dar gracias a la Universidad de Chile por la excelente formación que me ha brindado y por los fondos otorgados (beca N° 31-2004). Agradezco a MECESUP por la beca de estancias cortas en el extranjero que me permitió visitar el Dipartimento di Biologia, Università della Basilicata en Potenza, donde parte de estos experimentos fueron realizados.

Agradezco al Profesor Francesco Pennacchio y a todas las personas del Departamento de Biología en Potenza por su hospitalidad y apoyo durante mi estancia en Italia. También agradezco a mis compañeros de trabajo en el Laboratorio de Química Ecológica, especialmente a Claudia y Marcela.

Quisiera manifestar mi gratitud hacia aquellas personas que desinteresadamente me han ayudado con sus comentarios y correcciones, especialmente a Mark Herkovitz, Jorge Mpodozis, Paolo Fanti, Ivo Hodek, Mario Penna, Corinne Labrosse, Gonzalo Marín, Daniel Stanton y al grupo de discusión en biología evolutiva Decenio.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia y a Macarena Faunes por su apoyo incondicional y cariño, sin el cual nada de esto hubiese sucedido.

A todos muchas gracias.

ÍNDICE DE MATERIAS

Resumen.....	
I. Introducción.....	1
II. Objetivos Generales.....	4
III. Hipótesis.....	5
IV. Resultados.....	6
V. Discusión.....	12
VI. Proyecciones.....	27

Capítulo 1:

Villagra, C A, Vásquez, R. A. & Niemeyer, H.M. (2005) Associative odour learning affects mating behaviour in <i>Aphidius ervi</i> males (Hymenoptera: Braconidae). <i>European Journal of Entomology</i> , 102, 557-559.....	47
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 2:

Villagra, C. Á., Vásquez, R. A. & Niemeyer, H. M. (2005) Olfactive sexual conditioning in males of the parasitoid <i>Aphidius ervi</i> (Hymenoptera: Braconidae). (Manuscrito en revisión en <i>Animal Behaviour a la fecha</i>).....	50
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 3:

Villagra, C. A., Pennacchio, F. & Niemeyer, H.M. (2005) Effect of developmental environment and emergence experience on the responses of male parasitoid imagoes of <i>Aphidius ervi</i> (Hymenoptera: Aphidiidae), to virgin females and host plant complex volatiles. (Manuscrito a enviarse a <i>Journal of Insect Physiology</i>).....	79
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMEN

Una de las etapas importantes en la sexualidad animal es la búsqueda de pareja. En insectos, ésta ha sido clásicamente considerada como una respuesta principalmente fija a señales específicas independientes del hábitat, como por ejemplo la respuesta a feromonas sexuales. Sin embargo, estudios contemporáneos han mostrado la complejidad que subyace a las conductas sexuales en insectos, destacándose la importancia de la integración de señales y de la experiencia en la conformación de las conductas sexuales características de cada grupo. En esta tesis se demuestra la existencia de aprendizaje asociativo de estímulos ambientales durante la búsqueda de pareja en el macho adulto del parasitoide de áfidos *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidinae). Se investigó la importancia de las experiencias tempranas larvales y las presentes durante la eclosión, en el establecimiento de las conductas de atracción a señales del hábitat como las derivadas de la hembra conespecífica. Además, se logró determinar, por primera vez, la importancia de los estímulos ambientales derivados del hábitat donde se desarrolla el insecto (sistema trófico) sobre las conductas de búsqueda de pareja. Comúnmente se ha asumido que el apareamiento ordenado y las barreras reproductivas simpátricas no podrían ocasionarse por divergencias ecológicas. Ya que se ha considerado que, en la búsqueda de pareja, los animales generalmente utilizarían claves relativamente muy detectables e independientes al hábitat. En esta tesis se demuestra que; gracias al aprendizaje, señales detectables del hábitat pueden ser incorporadas en la búsqueda de pareja. Por lo tanto, este trabajo incorpora un nuevo argumento en la discusión sobre los procesos que promoverían el aislamiento entre poblaciones asociadas a hábitats distintos.

ABSTRACT

Searching for mates is one of the important stages in animal sexuality in insects, it has been classically considered as a fixed response towards specific habitat-independent cues, as for example, towards sexual pheromones of potential mates. Although, modern studies has demonstrated the complexity beyond insect sexual behaviours, stressing the relevance of signal integration and experience on sexual responses conformation. This thesis demonstrates the existence of associative learning during mate finding in *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidinae) males. Also it is shown the pivotal role of early experience during larval period and eclosion from the host in the development of attraction responses towards habitat and females cues in the male parasitoid adulthood.

This study determines, for first time, the importance of environmental stimuli derived from the tritrophic system where the insect may develops in the organization of mate searching responses. Most of studies on parasitoid learning were focused on female searching for hosts. This thesis extending the study towards the male responses wants to collaborate in the generation of a broad explanation about the development of searching behaviour in parasitoids, considering each stage on ontogeny that is sensible to experiences. Assortative mating and isolation has been assumed to be less likely to be arise via ecological divergence, because is considered that animals use long-range habitat-independent cues mainly in mate searching. This study, demonstrating that long-range habitat cues could be incorporated in mate-finding by learning, incorporates a new argument to the discussion about the process that may promotes isolation between populations in a tight relation with different habitats.

I-INTRODUCCIÓN

La búsqueda de pareja corresponde a una etapa inicial en el apareamiento. Los animales pueden incrementar la probabilidad de ocurrencia del encuentro sexual empleando la experiencia pasada en la búsqueda de pareja gracias al aprendizaje y memoria (Woodson, 2002, Pfaus *et al.*, 2001). Las experiencias significativas pueden ocurrir tempranamente en la vida y, en algunos casos, su efecto puede perdurar a través de la ontogenia, lo que ha sido definido como impronta sexual (Bateson, 1978).

También se ha descrito que los individuos pueden presentar preferencias por el ambiente donde han conseguido parejas por sobre otro donde no lo han hecho. Esto ha sido estudiado en roedores, donde se ha logrado condicionar a machos para que prefieran el olor a cadaverina (inicialmente repulsivo para estos individuos) luego que han experimentado la cópula con una hembra impregnada con este olor. Este tipo de aprendizaje sexual ha sido denominado "preferencia de lugar condicionada" (Pfaus *et al.*, 2001 y referencias allí mencionadas).

En insectos, las conductas sexuales han sido clásicamente consideradas como patrones motores fijos (revisado por Papaj, 1993), gatillados por estímulos altamente específicos tales como las feromonas sexuales (Papaj & Lewis, 1993). Recientemente, se ha demostrado la existencia de plasticidad fenotípica en estas conductas (Pigliucci, 2001), por ejemplo en la conducta de cortejo en moscas de la fruta (Hirsch & Tompkins, 1994) y en la discriminación de pareja en lepidópteros e himenópteros (Wcislo, 1987; 1992 y referencias allí mencionadas). Sin embargo, sobre el aprendizaje en relación con la búsqueda de la pareja, la información disponible es escasa (véase Robacker *et al.*, 1976; Godfray, 1994); específicamente, al realizar una búsqueda

utilizando la base de datos ISI-Web of Science, no se encontró ningún estudio en insectos acerca del posible uso de señales olfativas ambientales en esta búsqueda.

Considerando que el aprendizaje puede ocurrir en diferentes momentos de la vida del animal, se hace necesario estudiar qué etapas de la ontogenia son sensibles a la experiencia. A pesar de que se ha reconocido la importancia de las primeras experiencias del insecto en el desarrollo de conductas del adulto como en la búsqueda de alimento u hospederos (Corbet, 1985; Rodríguez *et al.*, 2002 y referencias), la relevancia de estas experiencias en la organización de las conductas sexuales, tales como la búsqueda de pareja y el cortejo, casi no ha sido tratada en la literatura..

En general, no se conoce claramente la conexión que tienen las primeras experiencias ocurridas durante la etapa larval (Hopkins, 1917; Gandolfi *et al.*, 2003) y durante la eclosión del imago (legado químico *sensu* Corbet, 1985; e.g. van Emden *et al.*, 1996) en la organización de las posteriores conductas de búsqueda. Además, hasta ahora, no se ha analizado el vínculo entre los distintos estadios sensibles a experiencias. La discusión de las evidencias relacionadas con los efectos de las experiencias en los estadios tempranos en la conducta se ha presentado desconectada de los procesos de aprendizaje descritos en el adulto. Esto no ha permitido generar una imagen del proceso ontogenético del cambio en las conductas de búsqueda en parasitoides.

En esta tesis se postula la conformación de las respuestas conductuales como un proceso de integración y organización ontogenética (Schneirla, 1956; Harris & Foster, 1995; Bateson, 2004), a partir de los resultados obtenidos con relación a la búsqueda de pareja en machos y sobre la base de evidencias disponible en la literatura.

Ontogenia y Aprendizaje

Las distintas conductas observables en un animal, se conforman ontogenéticamente a través de un proceso de desarrollo (Kuo, 1976; Lehrman, 1953). En cada una de las etapas del desarrollo de la conducta, existe una interacción identificable entre el ambiente, los procesos orgánicos y el organismo (Gottlieb, 1970; Oyama, 2000). Las señales provenientes del ambiente constituirán los potenciales estímulos que podrán ser incorporados por aprendizaje al repertorio de respuestas conductuales (Harris & Foster, 1995), afectando diversos patrones conductuales relevantes en las relaciones ecológicas intra e interespecíficas del animal (véase Wcislo, 1989).

Antes de discutir sobre el desarrollo del comportamiento de búsqueda de pareja en el macho del parasitoide estudiado, primero es necesario distinguir los distintos factores que pueden actuar como estímulos con relación a las respuestas conductuales del insecto y caracterizar las etapas de la ontogenia relevantes en el sistema de estudio empleado.

Los parasitoides pueden diferir en: i) su habilidad para detectar y procesar diferentes factores estimulantes, ii) la diversidad de factores a los cuales son capaces de responder, y iii) cómo la experiencia puede traducirse en respuestas de atracción o repulsión (Vet *et al.*, 1995; Takasu & Lewis, 2003). Parte de esta variabilidad, inter e intraespecífica, es debida a un componente estructural inicial dado por el sistema nervioso y su relación con el resto del organismo (véase Harris & Foster, 1995 y referencias allí mencionadas). Estas respuestas, comúnmente llamadas "innatas", pueden afectar el rango de respuestas desplegadas y su intensidad (e.g. Campan *et al.*, 2002). Sin embargo, al seguir temporalmente las conductas, encontraremos que la variabilidad inicial en la respuesta cambia plásticamente a través del transcurso de la

vida del insecto (e.g. Kaiser *et al.*, 2003). Esto es el resultado tanto del cambio estructural generado por la maduración del insecto como del efecto de la experiencia en la conformación de nuevas respuestas conductuales, y de la interacción de ambos procesos (Schneirla, 1956; Papaj & Lewis, 1993).

Durante la ontogenia de los parasitoides, tanto en el periodo preadulto como la etapa adulta, la experiencia puede modificar las conductas posteriores (Turlings *et al.*, 1993; Bjorksten & Hoffman, 1995). El periodo preadulto comprende el desarrollo en el hospedero hasta el momento en el que el individuo logra eclosionar desde su sitio de pupación y comenzar su vida libre. El periodo adulto comprende la etapa que comienza exactamente después que el parasitoide se libera de los remanentes de su hospedero de desarrollo hasta el momento de su muerte e incluye la mayoría de las experiencias que pueden afectar la conducta del parasitoide (e.g. Guerrieri *et al.*, 1997; Vet *et al.*, 1995).

II-OBJETIVOS GENERALES

Durante esta tesis se estudió en el parasitoide de áfidos *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidinae) la posibilidad de existencia de aprendizaje asociativo en el periodo adulto de machos en la búsqueda de hembras y cómo los estímulos olfativos del ambiente pueden convertirse en estímulos condicionados. Además, se exploró la importancia de la etapa preadulta en la conformación de las respuestas iniciales que luego, en la etapa adulta, permitirán la organización de respuestas adquiridas por aprendizaje asociativo, vinculando así las experiencias preadultas y adultas en el desarrollo de la conducta de búsqueda de pareja.

III-HIPOTESIS

1)-La experiencia de cópula en machos de *A. ervi* afecta sus respuestas conductuales a estímulos ambientales posteriores. Esto es debido a que los machos pueden desarrollar respuestas condicionadas (a través de aprendizaje asociativo principalmente) a los olores, derivados del ambiente, presentes durante el apareamiento con la hembra.

Alternativamente, la conducta del macho de *A. ervi* podría no ser modificada por la experiencia previa o podría ser modificada por procesos no cognitivos, como cambios a través de maduración fisiológica, que alteren el comportamiento de éstos a través de la ontogenia.

2)-Las respuestas conductuales de los machos hacia estímulos olfativos del ambiente, como los derivados del complejo planta-hospedero (CPH) y de las hembras, se generan tanto a través de las experiencias larvales y de eclosión, como durante las experiencias de la etapa adulta. El cambio conductual en la etapa preadulta ocurre a través de mecanismos semejantes a la impronta en vertebrados.

Alternativamente, las experiencias preadultas podrían no ser relevantes en la conformación de las respuestas iniciales en los machos de *A. ervi*, lo que podría significar que esta etapa no es sensible a la experiencia o que las experiencias de esta etapa no afectan la conducta del adulto.

IV. RESULTADOS

Desarrollo de la Conducta de Búsqueda de Pareja en *A. ervi*

Se ha considerado que, durante la búsqueda de pareja, los animales emplearían estímulos de largo alcance independientes del hábitat, como cantos de atracción o feromonas volátiles (véase Emelianov *et al.*, 2003). Sin embargo no ha sido mayormente considerado el papel que jugaría el aprendizaje en la utilización, de otros tipos de estímulos además de los derivados directamente de la pareja sexual como, por ejemplo, los estímulos olfativos dependientes del contexto ambiental donde es posible encontrar a la pareja u ocurre el encuentro sexual. Éste uso de señales dependientes del hábitat podría generarse tanto en las experiencias tempranas como de aprendizaje asociativo en la etapa adulta. Siendo el lenguaje de las evidencias el más elocuente, a continuación se explicarán brevemente los resultados de esta tesis respecto a la incorporación de estímulos ambientales en la búsqueda de pareja en los machos de *A. ervi*. Posteriormente, a la luz de los resultados de esta tesis, se discutirá el papel del desarrollo del comportamiento en la biología de éstos insectos.

Para conocer si la experiencia de cópula en machos de *A. ervi* puede afectar sus posteriores respuestas conductuales a estímulos ambientales, y que esta modificación es producto de condicionamiento a estímulos olfativos presentes durante la cópula, fue necesario demostrar la existencia de aprendizaje asociativo de olores en el parasitoide macho.

En el primer experimento (Capítulo 1, pág. 47, Villagra *et al.*, 2005a), se empleó *A. ervi* desarrollado en su hospedero, *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera, Aphididae) para probar si las respuestas de atracción sexual del macho hacia las hembras podían ser condicionadas (*sensu* Pávlov, 1923) a un olor presentado durante

la cópula y que no se encuentra en su ambiente natural (vainilla). Este olor ha sido utilizado por otros autores para demostrar las capacidades de aprendizaje en hembras parasitoides (Lewis & Tumlinson, 1988). Al igual que en el estudio de condicionamiento sexual en ratas (Pfaus *et al.*, 2001 y referencias allí mencionadas), la posibilidad de condicionar a los machos hacia un olor "artificial" demostraría la existencia de preferencia de lugar condicionada en avispas parasitoides. Se empleó la experiencia de cópula como el estímulo condicionante y el olor a vainilla como estímulo condicionado. Las respuestas conductuales se probaron en un olfatómetro en Y de vidrio, en machos recientemente eclosionados (respuesta inicial) y después de la experiencia de entrenamiento (respuesta entrenada) nuevamente sobre los mismos individuos. El entrenamiento ocurrió durante un periodo de 10 minutos, en el cual a los machos se les permitió copular con una hembra virgen con o sin la presencia de vainilla, o se les expuso solamente a la presencia de este olor. Se cuantificó el tiempo total y el tiempo empleado en vibración de las alas en cada brazo del olfatómetro tanto en la respuesta inicial y entrenada. A partir de este protocolo, se encontró una atracción sexual incrementada hacia la vainilla en la respuesta entrenada, y la vibración de las alas resultó una conducta recurrente. El olor a vainilla, que inicialmente no gatillaba las conductas de cortejo, se convirtió luego del entrenamiento asociativo (hembra más vainilla) en un estímulo hacia el cual los machos desplegaron esta conducta de cortejo. Este procedimiento permitió demostrar que el aprendizaje asociativo de olores en el macho puede ocurrir si los machos adultos experimentaban previamente el entrenamiento de cópula con la hembra en presencia de estos olores. Por lo tanto, se demostró por primera vez, la ocurrencia de aprendizaje asociativo sexual hacia olores en machos de avispas parasitoides. Ni la cópula ni la experiencia con vainilla por separado lograron provocar estas respuestas en los machos

entrenados (Capítulo 1, pag. 47), reafirmando que la respuesta entrenada de atracción a la vainilla correspondió principalmente a un resultado del condicionamiento. Además, el hecho de que a partir de un solo evento de entrenamiento asociativo, sin reforzamientos adicionales, se obtuviesen las tendencias encontradas, sugiere descartar que estos resultados sean el producto de aprendizaje por condicionamiento operante producto de la interacción del macho con la hembra durante la cópula en presencia de vainilla.

Luego de demostrar la existencia de aprendizaje asociativo en machos adultos de *A. ervi*, un segundo nivel de análisis correspondió a evaluar si los olores presentes en el contexto ambiental, donde ocurre el apareamiento en condiciones naturales, pueden ser incorporados por el macho como estímulos relacionados con la búsqueda de la hembra (Capítulo 2, pág. 50, Villagra *et al.*, 2005b). Para esto, se condicionaron machos a copular con hembras en distintos complejos planta-hospedero (CPHs) compuestos por el áfido *A. pisum* y su planta de alimentación *Medicago sativa* (alfalfa) y el sistema alternativo compuesto por *Sitobion avenae* (Fabricius) en *Triticum aestivum* L. (trigo) encontrándose el mismo fenómeno de condicionamiento observado en los experimentos con vainilla donde los machos condicionados con alfalfa respondieron tanto en tiempo de permanencia como en conductas de cortejo en respuesta al sistema tritrófico donde tuvieron su primera experiencia de cópula. En este experimento, además, se observó que al presentar el CPH alternativo al cual el macho parasitoide había sido condicionado éste no evocaba las respuestas de atracción encontradas al presentarse el olor del CPH condicionado. Para el condicionamiento con el CPH de trigo se encontró que los machos condicionados con este CPH, al presentarse en el olfatómetro el CPH de alfalfa, mostraron una tendencia a preferir el brazo del control en la respuesta entrenada. Esto sugiere que el aprendizaje de los

estímulos derivados del hábitat, que tiene lugar durante el apareamiento, puede influir en el nivel de fidelidad que tienen los parasitoides hacia los sistemas tróficos donde tiene lugar esta experiencia (Capítulo 2, pág. 50). Estas evidencias podrían colaborar en la comprensión de la relación de las avipas parasitoides con sus CPH, por lo que se sus posibles implicancias ecológicas y evolutivas, entre otras, en tratarán la discusión.

En insectos holometábolos, incluyendo avipas parasitoides, se ha asumido que las únicas experiencias relevantes en las conductas del imago son las que derivan de la etapa adulta, puesto que se ha considerado que las transformaciones que ocurren durante la metamorfosis no permitirían la permanencia de la memoria larval. Sin embargo, varios autores han aportado evidencias, tanto conductuales como neurofisiológicas (Tully *et al.*, 1994; Armstrong *et al.*, 1998; Rietdorf & Steidle, 1999; Gandolfi *et al.*, 2003), demostrando que las experiencias larvales (preimaginales) pueden trascender esta etapa e influenciar las primeras respuestas del adulto. Por otro lado, las experiencias relacionadas con la eclosión desde el pupario (Thorpe & Jones, 1937; van Emden *et al.*, 2002) corresponden a una instancia diferente y de vital relevancia para el desarrollo posterior de conductas del adulto, tales como aquellas relacionadas con la búsqueda de hospederos. Las avispas endoparasitoides presentan, obligadamente, un desarrollo y emergencia desde el interior de un artrópodo hospedero (Quicke, 1997). Durante este periodo estos parasitoides pueden ser afectados por los estímulos derivados del hospedero, el sustrato alimentario de éste o el ambiente circundante (Turlings *et al.*, 1992; Godfray, 1994). Muchas veces estas influencias relevantes no son evidentes al observador, siendo necesarios experimentos especialmente dirigidos a probar la importancia de esta etapa para demostrar su valor explicativo (Gandolfi *et al.*, 2003; Gutierrez-Ibáñez *et al.*, 2005). Estas características constituyen un desafío para el estudio del desarrollo del

aprendizaje en insectos y un sistema útil para probar la importancia de las experiencias tempranas en el desarrollo de la conducta. A partir de estas evidencias, el paso siguiente en la tesis (segunda hipótesis) consistió en evaluar la importancia de las experiencias en la etapa preadulta en la conformación de las conductas de búsqueda en machos de *A. ervi*. Se exploraron las posibles influencias que el ambiente de desarrollo larval y la experiencia de eclosión desde un determinado hospedero pueden ejercer sobre las conductas de atracción tanto hacia los olores derivados de la hembra como hacia los provenientes del hábitat (planta-áfido) dado.

Para esto fue necesario emplear dos técnicas que permitieron neutralizar al máximo los efectos de la experiencia de eclosión y del ambiente de desarrollo en un áfido alimentándose en una planta. Lo primero se logró extrayendo los parasitoides en el tercer estadio larval desde el hospedero, para que luego el parasitoide llegara a la pupación en una placa Petri desde donde se obtenía el adulto. El cambio en el ambiente de desarrollo se logró criando hospederos en dietas artificiales desde su nacimiento, los cuales eran posteriormente parasitados por hembras vírgenes de *A. ervi*¹ permitiendo que se desarrollasen los parasitoides hasta eclosionar. Gracias a estas técnicas fue posible demostrar que tanto el ambiente de desarrollo como la experiencia de eclosión son relevantes para la conformación de respuestas conductuales hacia un sistema planta-hospedero. Estas experiencias también colaboran en que la respuesta de vibración de las alas sea expresada por los machos en presencia de olores derivados de hembras vírgenes desarrolladas normalmente. Esto es sugerido por los resultados, ya que ésta conducta fue principalmente expresada por machos que no habían sido afectados a través de dietas artificiales para

¹ Gracias al sistema de determinación del sexo haplodiploide presente en himenópteros, donde desde los huevos no fertilizados (XO) se desarrollarán solamente machos, a partir solamente del material hereditario de la madre.

el pulgón hospedero en que se desarrollaron, ni por la eliminación de la experiencia de eclosión desde el interior del exoesqueleto del áfido (Capítulo 3, pág 79). Estos resultados demuestran la importancia de la etapa preadulta en el establecimiento de las primeras conductas en la vida adulta, sobre las cuales se desarrollarán nuevas respuestas, por ejemplo, a través de aprendizaje. Particularmente novedoso fue encontrar que la conducta de vibración de las alas hacia la hembra se vio modificada por las experiencias preadultas. La atracción del macho hacia la hembra es considerada una respuesta poco modificable por la influencia de experiencias (véase Pfaus *et al.*, 2001 y referencias allí mencionadas), por lo que puede ser considerada una respuesta no condicionada, que en la etapa adulta, permitirá la adquisición de respuestas condicionadas hacia olores como vainilla o CPHs. Por lo tanto, inclusive las respuestas sexuales que podrían ser consideradas "innatas" y que sirven de base para el establecimiento de respuestas aprendidas en el adulto, pueden derivar de efectos de las experiencias de la etapa preadulta. Estas evidencias permiten una mayor comprensión de las respuestas encontradas para parasitoides recientemente eclosionados. Con anterioridad, se consideraban como respuestas innatas las primeras conductas de atracción hacia el CPH donde se había desarrollado el parasitoide (véase Turlings *et al.*, 1993 y referencias allí mencionadas), sin tomar en cuenta la importancia de las experiencias preadultas en el desarrollo de estas respuestas (e.g. Geervliet *et al.*, 1996). Como se muestra en el capítulo 3 de esta tesis (pág 79), las experiencias preadultas pueden afectar tanto las respuestas iniciales hacia estímulos independientes del hábitat (olores de hembras) como dependientes de éste (olores de CPH) en la búsqueda de pareja del macho parasitoide. Además, en el periodo adulto, el nivel de respuesta hacia diferentes estímulos desarrollado en la etapa preadulta puede servir de base para el establecimiento de respuestas hacia estímulos

previamente no atractivos gracias a aprendizaje asociativo, constituyendo la base sobre la cual las conductas podrán ser modificadas por las experiencias del adulto (véase Vet *et al.*, 1995 y referencias allí mencionadas).

V.DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos y la literatura disponible, es posible construir un esquema general sobre el desarrollo de las conductas de búsqueda en parasitoides que considere la importancia tanto de las experiencias preadultas como de las que tienen lugar durante la etapa adulta. Además, el comprender el mecanismo que permite relacionar los estímulos derivados del ambiente con las diferentes conductas de búsquedas (reproductivas y alimentarias, entre otras) permite contextualizar el cambio en la conducta en el escenario ecológico donde ocurre.

Aprendizaje

A través de los distintos experimentos realizados, la primera observación relevante tiene relación con el nivel de influencia del ambiente en el desarrollo conductual de la avispa parasitoide estudiada. Este cambio del comportamiento ocurre en el eje temporal, donde determinadas experiencias pueden marcar un antes y un después en las respuestas a los distintos estímulos. En el caso del mecanismo de aprendizaje estudiado, las respuestas a estímulos que permiten la organización de las conductas entrenadas tienen un componente estructural dado por el sistema perceptual del insecto y las condiciones cognitivas preexistentes dadas por un pasado de influencias en la conducta, derivadas de experiencias en la etapa preadulta. Estos factores podrían estar afectando tanto las posibles expresiones de respuestas hacia los

estímulos ambientales en la respuesta inicial (Gottlieb, 1999), como la aparición de nuevos rasgos conductuales a partir de experiencias cuando adultas (Schneirla, 1956; Lehrman, 1970; Wcislo, 1989), encontradas en las respuestas entrenadas (Capítulos 1 y 2).

Además de la influencia de la etapa preadulto como fuente de las primeras experiencias en el desarrollo de la conducta, el ambiente de desarrollo podría estar influenciando las respuestas iniciales a través de efectos en la conformación de las estructuras relacionadas con la percepción de estímulos como los olores de CPH o de conoespecíficos. En moscas de la familia Calliphoridae se ha encontrado que la sensibilidad de los quimiorreceptores en el adulto es afectada por las azúcares presentes durante el desarrollo larval (Diether & Goldrich, 1971). Al depender también las avipas parasitoides fuertemente del hospedero como fuente nutricional durante el desarrollo larval, es posible que exista un efecto sobre el desarrollo de los sistemas sensoriales del adulto durante la etapa preadulto, pero esto aún no ha sido demostrado.

Por otro lado, el ambiente preadulto constituye el primer conjunto de estímulos donde las experiencias podrían afectar la conducta del insecto, en forma similar a como sucede en las experiencias prenatales en vertebrados (Gottlieb, 1970). En una segunda instancia, la experiencia de eclosión desde el hospedero, podría además ser un mecanismo análogo a la impronta observable en vertebrados (Bolhuis, 1999). Esta experiencia ha demostrado, en los experimentos de esta tesis y otros, afectar fuertemente las conductas de la etapa adulta tanto en las respuestas sexuales (Villagra *et al.*, 2002; Capítulo 3, pág. 79) como en la búsqueda de hospederos (Daza-Bustamante *et al.*, 2001). La explicación de este tipo de impronta guarda relación con los compuestos químicos volátiles provenientes de la planta donde se desarrolla el

parasitoide, que se impregnan en el exterior del sitio de pupación (exoesqueleto del hospedero), y que tomarían contacto con el parasitoide en la experiencia de eclosión (Corbet, 1985). Esto se traduce en la preferencia por la combinación de compuestos químicos volátiles que estuvieron presentes durante el desarrollo del parasitoide, independientemente que éstos provengan del sistema planta-hospedero correspondiente. Existiría también aprendizaje de señales químicas derivadas del periodo preadulto (e.g. Barron, 2001; van Emden *et al.*, 2002).

En el parasitoide adulto, la integración de los efectos del desarrollo del sistema perceptual del insecto y las experiencias preadultas podrían ayudar a explicar el nivel de respuesta inicial hacia distintos estímulos olfativos ambientales encontrados. Esto puede ser observado al comparar las respuestas iniciales presentadas por *A. ervi* criados en el CPH de alfalfa donde los machos enfrentados a los olores derivados del CPH alfalfa tendieron a permanecer más tiempo en el brazo del olfatómetro donde se presentaba este olor, mientras que los machos criados en iguales condiciones no tuvieron ningún tipo de preferencia en la respuesta inicial al enfrentarse en el olfatómetro a CPH de trigo versus el control (Figura 3, Capítulo 2, pág. 77).

Por otro lado, al comparar las respuestas entrenadas obtenidas por los machos condicionados a los CPH de alfalfa o trigo se encontró que, independientemente si el estímulo condicionado correspondía o no al CPH donde los machos habían sido desarrollados, éstos desarrollaron preferencias marcadas por los olores del CPH donde experimentaron la cópula con la hembra durante el entrenamiento asociativo (Figura 3, Capítulo 2, pág. 77). Por lo tanto, la tendencia encontrada en la respuesta inicial de la etapa adulta del insecto a reaccionar a un determinado estímulo (como los olores del CPH), puede ser conservada o modificada drásticamente, dependiendo de las experiencias que enfrente el adulto. Si el adulto experimenta durante la cópula los

olores del hábitat, por ejemplo un nuevo CPH (distinto de su ambiente de desarrollo y eclosión), puede desarrollar respuestas entrenadas de atracción hacia estos nuevos olores encontrados, modificando su respuesta inicial (que pudo ser baja o nula) a este estímulo alternativo. Así, las respuestas generadas en cada etapa sensible de la ontogenia serían integradas durante el desarrollo del comportamiento. Previamente, en el mismo sistema empleado en esta tesis, al comparar las respuestas iniciales de parasitoides desarrollados y eclosionados desde áfidos provenientes de los CPH de alfalfa y trigo, se encontró una preferencia por el CPH donde había sido criado el insecto y que éstas respuestas iniciales podían ser modificadas por la experiencia de oviposición en un CPH dado (Rodríguez *et al.*, 2002; Daza-Bustamante *et al.*, 2002). Además, se ha documentado que a través de la etapa adulta, distintas instancias consecutivas de aprendizaje pueden permitir al insecto incorporar más de un estímulo a su conducta de búsqueda y modificar sus preferencias por estímulos a los cuales aprende a responder (Kaiser *et al.*, 2003). En la avispa parasitoide *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Eucoilidae) se encontró que las hembras eran capaces de aprender a responder a más de un olor por asociación con la experiencia de oviposición. A partir de entrenamiento asociativo, estas avispas memorizaron y respondieron al menos a dos estímulos olfativos distintos y mostraron preferencia por el último olor al que fueron entrenadas (DeJong & Kaiser, 1992). Estos ejemplos sugieren que, tanto las respuestas tempranas como las generadas a partir de experiencias de la etapa adulta, pueden ser modificadas a partir de nuevas experiencias. Esto podría significar que el fenotipo conductual generado gracias al aprendizaje en parasitoides, no se fijaría a partir de una sola etapa sensible, sino que sería el resultado de la integración de sucesivas experiencias durante la ontogenia.

Es importante mencionar que durante este periodo el parasitoide también pueden adquirir respuestas a través de procesos de aprendizaje no asociativos, como sensibilización y habituación (e.g. Kaiser & Cardé, 1992), además del aprendizaje asociativo. Para poder verificar si se presentaron estos otros tipos de aprendizaje, en todos los experimentos de condicionamiento se emplearon controles para evaluar la posibilidad de que el cambio de conducta encontrado en los machos fuera producto de mecanismos de aprendizaje no asociativo (Capítulos 1 y 2). Este último tipo de aprendizaje ha sido ampliamente demostrado para varios grupos de avispas parasitoides (Vet *et al.*, 1995).

Los diferentes mecanismos de aprendizaje encontrados en parasitoides podrían estar actuando a diferentes escalas temporales, por lo que el estudiar la dinámica del desarrollo conductual es útil para diferenciar el papel que juegan éstos en el comportamiento de insectos. En el parasitoide de moscas *L. boulandi*, la modificación de la respuesta a corto plazo (menos de 24 horas) se origina por sensibilización mientras que las respuestas duraderas (más de 24 horas) se establecieron por aprendizaje asociativo (Kaiser *et al.*, 2003).

En el caso estudiado en esta tesis se observó una tendencia a que la respuesta condicionada a los olores de vainilla decayera ca. 30 % si se probaba la respuesta entrenada después de 24 horas respecto a la registrada media hora después del entrenamiento, mientras que si se probaba 72 horas después, ésta permanecía ca. 50%, lo que sugiere un cierto grado de retención de la respuesta entrenada por la memoria del insecto y un decaimiento de ésta. Sin embargo estas evidencias no son, por el momento, sometibles a prueba debido que muchos individuos murieron antes del tiempo necesario para ser registrados, por lo que el tamaño de la muestra es muy bajo como para hacer una comparación estadística.

Los machos de *A. ervi* fueron capaces de aprender por asociación los estímulos presentes durante la primera experiencia copulatoria. El aprendizaje asociativo ocurrió en relación con estímulos artificiales como vainilla (Capítulo 1) así como también hacia los compuestos volátiles derivados de CPHs (Capítulo 2), independientemente si el CPH que se usó como estímulo condicionado correspondió a aquel sobre los cuales los parasitoides habían sido criados (CPH de alfalfa) o si correspondió al CPH alternativo (CPH de trigo). Estos resultados corresponden a la primera demostración de aprendizaje asociativo en insectos con relación a la búsqueda de pareja que considera el contexto químico del ambiente donde el apareamiento tiene lugar. Este aprendizaje de olores durante la cópula operaría de forma similar al condicionamiento encontrado en ratas por lo que podría considerarse también como un caso de preferencia de lugar condicionada (*sensu* Pfaus *et al.*, 2001, Capítulo 2). Los resultados obtenidos demuestran que el macho parasitoide puede utilizar estímulos olfativos provenientes del CPH a través de aprendizaje durante la experiencia copulatoria (Capítulo 2: Tabla 2, pág 73 y Figuras 3 y 4) además de las derivadas directamente desde la hembra (como feromonas sexuales) (i.e. McNeil & Brodeur, 1995). Esta respuesta parece no ser un resultado de aprendizaje por generalización de la respuesta hacia olores, donde la respuesta podría ser originada en respuesta a cualquier CPH luego de la experiencia con un CPH dado, sino corresponde a un resultado específico del aprendizaje asociativo a un CPH. Al presentarse a machos condicionados con un determinado CPH, el CPH alternativo, éstos no expresan respuestas de atracción a los olores de éste último, sino solamente al CPH que estuvo presente durante la cópula con la hembra. Estas respuestas pueden ser interpretadas como atracciones (fidelidad) al CPH (Feder, 1998) obtenida a través de la ontogenia gracias al aprendizaje.

Consecuencias Ecológicas y Evolutivas

Para poder contextualizar los resultados obtenidos en el marco teórico y experimental previo desarrollado en avispas parasitoides, es necesario referirse al cambio de la conducta de la hembra en búsqueda de hospederos, donde han sido realizados la mayoría de los trabajos (revisado por Godfray, 1994).

Respecto a la búsqueda de hospederos, se ha sugerido que los estímulos derivados del hospedero mismo corresponderían a claves que con mayor "confiabilidad" permitirían al parasitoide encontrarlo, pero los hospederos son sólo uno de los componentes de un hábitat complejo y si proveen de algún tipo de clave, como olores, esto será en cantidades relativamente pequeñas, que complicarán su detección a distancia (Vet & Dicke, 1992). Por otro lado, los estímulos derivados de la planta u otras señales del ambiente del hospedero, serán más detectables por el parasitoide (e.g. Geervliet *et al.*, 1996; Geervliet *et al.*, 1997), pero generalmente, menos "confiables" indicadores de la presencia del hospedero (revisado por Dicke, 1999). Las características de "detectabilidad-confiabilidad" de los estímulos disponibles conformarían un escenario complejo sobre el cual las conductas de búsqueda (de hospederos en el planteamiento original) se desarrollaría (Vet *et al.*, 1991). El aprendizaje asociativo ha sido propuesto como una de las soluciones al llamado "problema de la confiabilidad-detectabilidad" para la búsqueda de hospederos por parte de la hembra parasitoide (Vet *et al.*, 1991), ya que permitiría al parasitoide el uso de claves de largo alcance dependientes del hábitat donde encuentre hospederos (e.g. Turlings *et al.*, 1990a). A través de la experiencia asociativa con los estímulos derivados del hospedero, el parasitoide podría desarrollar respuestas de atracción hacia un contexto de señales del hábitat, como por ejemplo, los estímulos olfativos

derivados de la planta alimento del hospedero y/o de la interacción de ésta con el hospedero fitófago (CPH).

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que este tipo de "estrategias" no sería exclusivo de las conductas de hembras, sino que constituiría un patrón general con relación a las conductas de búsqueda en avispas parasitoides. A pesar de que han sido descritas feromonas sexuales (volátiles y también de contacto) en avispas parasitoides (Swedenborg & Jones, 1992; Syvertsen *et al.*, 1995; Fauvergue *et al.*, 1995; De Lury *et al.*, 1999), estas sólo afectarían a los machos a distancias cortas (i.e. McNeil & Brodeur, 1995), contrario a lo que se ha demostrado en otros insectos (Papaj & Lewis, 1993; Cardé & Bell, 1995). La incorporación de otros estímulos con relación a la atracción de la pareja, podría aumentar la efectividad de la búsqueda de pareja en avispas parasitoides. Además, al comparar la relación "detectabilidad-confiabilidad" de las feromonas sexuales de las hembras con otras fuentes de olores presentes en el ambiente, es destacable que los estímulos olfativos volátiles del hábitat (derivados de las plantas del CPH) son producidos en mayor cantidad y pueden dispersarse en un radio mucho mayor que los olores provenientes de las hembras (e.g. McNeil & Brodeur, 1995; revisado por Ayasse *et al.*, 2001). Estas señales del hábitat podrían ser detectadas con mayor facilidad relativa por parte del macho pero no asegurarían la presencia de la hembra como si lo haría la feromona sexual de ésta. Pero, luego de la experiencia de cópula en un hábitat dado estas claves olfativas del hábitat copulatorio podrían gatillar la conducta de búsqueda sexual. Al igual que en las hembras en la búsqueda de hospederos (Vet *et al.*, 1991), los machos en búsqueda de hembras también podrían desarrollar respuestas de atracción hacia señales de alta detectabilidad del ambiente cuando en éste han logrado copular con la hembra (Capítulo 2, pág. 50).

Al sesgar las preferencias del insecto por un sistema hospedero dado, el uso de estímulos dependientes del hábitat con relación a los comportamientos reproductivos ha sido propuesto como un mecanismo de divergencia ecológica a través de barreras etológicas (Mayr, 1959) que podrían generar apareamiento ordenado en un CPH dado y aislamiento reproductivo (Walsh, 1864; Bush, 1968; Dierickman & Doebeli, 1999; Emelianov *et al.*, 2003; Cronin & Abrahamson, 2001; Bateson, 2004). Sin embargo ha sido puesta en duda que estas barreras puedan originarse a partir de las preferencias por un hábitat dado a partir de señales de largo alcance proveídas por el CPH (Futuyma, 1998), debido a que se ha asumido que los animales emplearían claves de largo alcance independientes del hábitat en la búsqueda de pareja. El estudio del desarrollo de la conducta de búsqueda de pareja en el macho de *A. ervi* presentado esta tesis, sugiere que el uso de estímulos durante la búsqueda es un proceso mucho más dinámico y complejo que lo que se proponía; los estímulos independientes del hábitat (como los derivados de la pareja sexual), podrían colaborar en la incorporación de estímulos dependientes del hábitat (CPH) a través de aprendizaje asociativo. De esta forma, las respuestas adquiridas por la experiencias de cópula en un CPH dado podrían incidir en una preferencia por un hábitat en particular por sobre otro.

Muchos insectos, asociados directa o indirectamente con una planta dada, realizan sus conductas reproductivas en las cercanías o aún sobre esta planta (Dicke, 1999), la cual constituye así una parte principal del hábitat del animal. Se ha reportado que las plantas pueden influenciar fuertemente la comunicación en insectos (Corbet, 1985; Wood & Keese, 1990; Cardé & Bell, 1995 y referencias allí mencionadas), por ejemplo afectando la composición de las señales químicas producidas por los insectos (revisado por Landolt & Phillips 1997). En la interacción directa o indirecta de los insectos con las plantas, además, el aprendizaje de claves olfativas (u otro tipo de

estímulos) puede influenciar los comportamientos y el grado de fidelidad a un determinado sistema trófico a más de un nivel de interacción. En experimentos previos en el sistema de estudio de la tesis (Villagra *et al.*, 2002), se demostró que el CPH tenía un doble papel en respecto a cuánto eran atraídas las hembras de *A. ervi* hacia los machos. Primero, el CPH donde se habían desarrollado éstos afectaba el tamaño del adulto resultante, y este tamaño era discriminado por las hembras (vírgenes y recientemente eclosionadas) que eran mayormente atraídas por los machos de mayor tamaño. Un segundo efecto provenía de la presencia o no del CPH donde se había desarrollado la hembra, encontrándose que los machos que eran presentados junto al CPH donde provenían las hembras eran más atractivos para éstas, probablemente como resultado de las experiencias preadultas de éstas (Rodríguez *et al.*, 2002). Además se encontraron efectos de interacción con el tamaño del macho presentado (Villagra *et al.*, 2002). Estos resultados ejemplifican la relevancia que tienen los otros niveles tróficos del ambiente en las interacciones interespecíficas en *A. ervi*. Este tipo de influencias podría no estar restringido a los insectos fitófagos (Brues, 1924; Filchak *et al.*, 1981; Via, 1999), sino también a los organismos relacionados con éstos, como por ejemplo, los parasitoides.

¿Diversificación Hospedero-Específica en *Aphidius* a partir del Desarrollo del Comportamiento?

Si se mantienen los ambientes dados por los CPH es posible que, transgeneracionalmente, exista una reiteración de experiencias presentes en los diferentes estadios entre generaciones (West & King, 1987; Oldling-Smee *et al.*, 2003).

Esto podría ocurrir a partir de la herencia de efectos ambientales² (véase Rossiter., 1996 y referencias allí mencionadas; West-Eberhard 2003b), como por ejemplo, a través de "efectos parentales" (Bernardo, 1996; Mousseau & Dingle, 1991), donde el traspaso de preferencias aprendidas se generaría, de forma indirecta entre las generaciones, gracias a que tanto la etapa preadulta y adulta serían sensibles a los estímulos del CPH, como se ha mostrado en los experimentos de esta tesis. Es necesaria más investigación para evaluar si existe algún grado de continuidad del fenotipo conductual de los parasitoides parentales en la descendencia y la relación de estas respuestas con la mantención de los parasitoides en diferentes CPH.

En el caso estudiado, esta reiteración podría generarse por la mantención de los CPHs donde los parasitoides se desarrollan, y además como consecuencia de la fidelidad, un sistema dado por parte de los parasitoides parentales producto de aprendizaje. Esto provocaría que tanto el apareamiento como la oviposición ocurrieran en un hospedero dado desde donde la generación siguiente experimentaría la etapa preadulta (e.g. Cronin & Abrahamson, 2001).

Dado que los parasitoides en la etapa preadulta pueden desarrollar respuestas producto de impronta o legado químico. Estas pueden influenciar las primeras respuestas de la etapa adulta y explicar tendencias a una mayor preferencia por el CPH de desarrollo.

Al mantener la oviposición (como se ha evidenciado en la literatura) y el apareamiento (como sugieren los resultados de la tesis) constante en un hospedero gracias a mecanismos cognitivos, podría potencialmente influenciar a la generación siguiente, constituyendo un mecanismo de fidelidad al hospedero (Bush, 1968; Feder,

² Efectos ambientales heredados, definidos ampliamente como todo componente del fenotipo de la descendencia que es derivado de los parentales, aparte de los genes del núcleo (Rossiter, 1996).

1998). Esta fidelidad es considerada como uno de los requisitos para la formación de variedades asociadas a hospederos como las razas hospederas (Walsh, 1864; Bush, 1968; Frías, 1988).

A partir de la especificidad de la respuesta condicionada encontrada en el estudio de la búsqueda de pareja de *A. ervi* (Capítulo 2, Figura 3, pág 77), es difícil concluir si el aprendizaje asociativo sexual de olores podría contribuir a la generación de barreras al entrecruzamiento de poblaciones de parasitoides desarrollados en distintos CPHs. Para los *A. ervi* chilenos criados en el CPH de alfalfa y CPH de trigo no se han encontrado evidencias de estructura poblacionales basadas en los CPH usados (Daza-Bustamante et al. 2002). Sin embargo, estos insectos fueron introducidos a Chile hace sólo unos 28 años atrás (Starý 1978; Cameron et al. 1984; Starý 1993), por lo que es posible que el tiempo para que operen mecanismos de divergencia simpátrida no haya sido suficiente. Sin embargo, en poblaciones de mayor antigüedad (en Europa y USA), a partir de estudios moleculares en esta especie, se ha detectado déficit migratorio entre poblaciones de *A. ervi* criadas en distintos CPHs. En las poblaciones nativas europeas han sido encontradas diferentes especies hospedero-específicas dentro de género *Aphidius* que ocurren en la mayoría de los casos simpátricamente (Pennacchio & Tremblay, 1987; Sanchis et al., 2001). Para esta diversificación se han propuesto como importantes las barreras ecológicas y etológicas tales como la generación de fenotipos distintos en los CPHs alternativos, la preferencia por un determinado hospedero y los sesgos en conductas de apareamiento (Pennacchio 1989; Powell 1994). Según estos estudios, el aislamiento reproductivo desarrollado a partir de estos mecanismos entre las poblaciones del hospedero de origen y el derivado, habrían finalmente conducido a la divergencia dentro del género *Aphidius* (Mackauer, 1969; Powell & Wright, 1988; Digilio & Pennacchio, 1992).

Los resultados encontrados en esta tesis, sugieren que el aprendizaje asociativo durante la búsqueda de pareja en *A. ervi* es influenciado por el contexto ambiental de estímulos olfativos donde el apareamiento tiene lugar en la etapa adulta (Capítulos 1 y 2). Esto influye en el grado de atracción que tienen los machos hacia los distintos CPH, pudiendo corresponder a un mecanismo que incrementaría la fidelidad al CPH donde ocurre la cópula. Será necesaria más investigación para saber si esto podría afectar las primeras etapas de una divergencia hospedero-específica de las poblaciones de parasitoides, divergencia que ha sido evidenciada en poblaciones que utilizan hospederos alternativos en el hemisferio norte (Pennacchio & Tremblay, 1987; Sanchis *et al.*, 2001; Cronin & Abrahamson, 2001).

Además del aprendizaje en la etapa adulta, es importante recalcar el efecto que tienen las experiencias de la etapa preadulta derivadas del hospedero donde los parasitoides se desarrollan. Las experiencias de la etapa preadulta permiten el potencial desarrollo de conductas aprendidas durante el periodo adulto. Además éstas, al generar los primeros sesgos de preferencias de hábitat, podrían también contribuir a los mecanismos de aislamiento etológico, tales como la impronta ecológica *sensu* Immelman (1975). Con anterioridad (Tremblay & Pennacchio, 1988), esto ha sido propuesto para explicar los primeros pasos en la conformación estable de nuevos nichos durante la radiación de los parasitoides de áfidos. Estas barreras etológicas asociadas al uso de un hábitat (e.g. Word & Keese, 1990), y desarrolladas a través ontogenia (Beltman *et al.*, 2004), podrían posiblemente jugar un papel importante en un amplio rango de relaciones ecológicas estrechas (Oldling-Smee *et al.*, 2003), por lo que su estudio es un desafío para la comprensión de las relaciones tróficas como el parasitismo.

Dentro de los himenópteros, el linaje que comprende las avispas parasíticas es el que incluye la mayor diversidad de modos de vida, tipos de desarrollo, y relaciones ecológicas (Wiegmann *et al.*, 1993). En este grupo es posible encontrar depredadores, fitófagos, agalladores, avispas de los higos, avispas parásitas y parasitoides, entre otros modos de vida (revisado por Quicke, 1997). Remitiéndonos específicamente a los parasitoides existe, además, una gran diversidad de modos de utilización del hospedero que incluye ectoparasitoides idiobiontes³ y koinobiontes⁴, y endoparasitoides idiobiontes y koinobiontes entre otros (revisado por Pennacchio & Strand, 2006). Además, es posible diferenciar estas avispas por el estadio del hospedero que prefieren atacar, existiendo parasitoides de huevos (e.g. Noldus, 1988), larvas (e.g. Turlings *et al.*, 1990b), pupas (e.g. Wang & Messing, 2004) y de hospederos adultos (e.g. Zijp & Blommers, 2002). Otro rasgo relevante es el grado de especificidad que tiene el parasitoide con su hospedero, donde es posible encontrar desde especialistas hasta generalistas (revisado por Godfray, 1994; Steidle & van Loon, 2003). Por último, es relevante mencionar a las avispas hiperparasitoides, grupo que deriva de las avispas parasíticas y que utiliza a los distintos parasitoides como hospederos (Sullivan & Völkl, 1999). Esta impresionante diversidad de biología, estrechamente asociadas a uno o más hospederos, involucra una variedad equivalente de comportamientos reproductivos (Vet *et al.*, 1995), donde la discusión respecto del papel que juega el desarrollo del comportamiento en la diversificación y mantención de tantos tipos de avispas parasíticas podría contribuir a la comprensión de este fenómeno (Godfray, 1994; Cronin & Abrahamson, 2001; West-Eberhard, 2003a).

³ Idiobionte corresponde a una estrategia de historia de vida en el cual el hospedero no continúa su desarrollo luego del evento de parasitismo (Askew Y Shaw, 1986).

⁴ Koinobionte corresponde a un parasitoide que permite a su hospedero continuar su desarrollo, más o menos normalmente, durante un periodo seguido del evento de parasitismo (Quicke, 1997).

En parasitoides, un rasgo común de los diferentes modos de vida descritos es la utilización de una alta cantidad y variedad de estímulos ambientales en las conductas de búsqueda (Turlings *et al.*, 1993). La capacidad de modificar plásticamente respuestas a estímulos a través de la experiencia contribuye a explicar la expansión y establecimiento de los diferentes sistemas planta-hospedero-parasitoide (Ver *et al.*, 1995). Por ejemplo, al incorporar la capacidad de aprendizaje por legado químico a modelos de interacción parasitoide-hospedero, se ha encontrado que, gracias a la capacidad de aprender y encontrar más fácilmente al hospedero natal, los sistemas simulados aumentaban su fidelidad al hospedero, lo que permitía el establecimiento de un equilibrio multihospedero (Hastings & Godfray, 1999). El desarrollo de la conducta a través de las experiencias ontogenéticas (Wcislo, 1989) podría corresponder a un elemento importante en la comprensión de la ecología y evolución de los sistemas tritróficos que incluyen parasitoides. Estos cambios conductuales podrían estar relacionados con la diversificación y mantención de los diversos modos de vida que existen dentro del grupo de las avispas parasíticas, los cambios conductuales podrían ser mantenidos transgeneracionalmente (West & King, 1987), gracias al aprendizaje si se repiten los estímulos ambientales (i.e. derivados del CPH) entre generaciones (Maturana & Mponozis, 2000; Olding-Smee *et al.*, 2003; West-Eberhard, 2003b). Si se considera que las conductas de los insectos adultos determinarán el ambiente que experimentarán su descendencia en la etapa preadulta, al decidir por ejemplo en qué CPH aparearse u ovipositar, se puede considerar que las respuestas aprendidas por los adultos afectarán a la siguiente generación a través de un efecto parental (Bernardo, 1996). Preferencias de hábitat aprendidas podrían aumentar la probabilidad de que la siguiente generación desarrolle su ciclo de vida en ese ambiente (por sobre otro alternativo), si éste se mantiene constante (e.g. Rice &

Salt, 1988). Si esto ocurre, el desarrollo del comportamiento en parasitoides podría estar asociado al origen y mantención de nuevos estilos de vida y modificaciones del nicho asociadas (Bush, 1968; West & King, 1987), tales como cambios de hospederos, fitofagia secundaria, transiciones a modos de vida cecidogénicos (agalladores), inquilinismo o hiperparasitismo. En 1968, Malyshev propuso que el origen de las avipas parasitoides estaría basado en las características observables del comportamiento de los himenópteros, donde, el linaje *Apocrita* habría evolucionado desde un modo de vida agallador. Posteriormente, las secreciones de las hembras, que gatillarían el desarrollo de tejido vegetal alimenticio (rico para las larvas) en la planta, habría generado larvas sedentarias. Éstas a su vez, habrían desarrollado preferencias tróficas hacia avispas agalladoras con similares características. Por lo tanto, la adquisición de nuevas conductas a través de las experiencias preadultas, habría permitido la derivación a modos de vida inquilinos y carnívoros (Quicke, 1997). Por lo tanto, el estudio de la plasticidad fenotípica y el cambio ontogenético del comportamiento podría constituir un elemento importante en la evaluación del papel de la conducta en las modificaciones transgeneracionales de las especies (Schmalhausen, 1949; Lewontin, 1983; West-Eberhard, 1989; Maturana & Mpodozis, 2000). En este escenario, la colonización de nuevos nichos y las capacidades de modificar el comportamiento producto de la experiencia, colaborarían en generar sesgos en las preferencias de apareamiento y hábitat, que podrían constituir las primeras etapas en la diversificación asociada al uso de distintos sistemas hospederos (Cronin & Abrahamson, 2001; Oldling-Smee *et al.*, 2003; Beltman *et al.*, 2004).

VI.PROYECCIONES

Durante las observaciones de la conducta de cortejo en *A. ervi*, surgió la pregunta respecto al posible componente auditivo de la conducta de vibración alar del macho, como ha sido descrito en dípteros (von Schilder, 1976). Al registrar esta vibración con un micrófono de calidad fue posible detectar el sonido que provocan estas vibraciones, el cual tiene un componente principal de 180 Hz. Esta baja frecuencia está en correspondencia con la corta distancia (del orden de milímetros) a la que es emitida por el parasitoide macho y recibida por la hembra cortejada. Ya que se ha descrito que a esta distancia cualquier mecanoreceptor presente en el insecto podría registrar este sonido (revisado por Hoy & Robert, 1996).

Otra posible vía experimental, surgida de observaciones realizadas durante el trabajo de tesis (Capítulo 3, pág. 79), corresponde a la importancia de las experiencias tempranas en las relaciones tróficas en parasitoides. En algunas avispas parasitotes de áfidos, como *A. ervi*, la larva abre un orificio en la parte ventral del exoesqueleto del hospedero previo a la pupación, lo que expone a la larva de tercer estadio al ambiente externo (principalmente a la planta del hospedero). Esto fue observado para el sistema de estudio. A partir de esta observación se realizaron experimentos donde se confirma la importancia de la etapa preadulto y además se precisa la relevancia de la experiencia derivada de la conducta de apertura ventral del hospedero realizada por la larva en el desarrollo de las conductas de preferencia olfativa presente en la etapa adulta (Gutierrez-Ibáñez *et al.*, 2005). Estos experimentos muy posiblemente reabrirán el debate respecto a la posibilidad de aprendizaje durante las etapas larvales en parasitoides (ver Emden van, 1996), y servirán para explicar las tendencias de preferencias sexuales iniciales encontrados previamente tanto de hembras (Villagra *et*

al., 2002) como de machos (Villagra *et al.*, 2005b) y cómo estas interactúan con las respuestas de impronta hacia el CPH. Además, estos resultados abren la pregunta respecto de la repetitividad transgeneracional de las respuestas hacia el CPH producto de mecanismos etológicos tales como efectos parentales de preferencia por CPH de apareamiento y oviposición. Esta continuidad se expresaría gracias a que tanto la etapa preadulta como adulta podrían sufrir los efectos de la experiencia con el hábitat dado por el CPH.

Investigar el desarrollo del comportamiento en estos insectos tendría valor tanto en la comprensión de la especificidad y diversificación de los parasitoides en distintos CPH como en el perfeccionamiento de técnicas de control biológico que involucren este tipo de insectos. Anteriormente, esto ya ha sido empleado en la agricultura, donde se ha entrenado a las hembras de parasitoides y otros depredadores de insectos que se alimentan de especies vegetales de importancia económica previo a ser introducidos como control biológico en un cultivo dado (Prokopy & Lewis, 1993). Si es posible condicionar además a los machos a preferir un determinado CPH por sobre otros alternativos, se podría asegurar una mayor efectividad y duración del control biológico empleado.

De esta misma forma, a partir de los resultados obtenidos, podría evaluarse las consecuencias comunitarias dentro del sistema tritrófico compuesto por plantas-insectos fitófagos-parasitoides (o depredadores) (Begon *et al.*, 1990; Hastings, 1998). El aprendizaje asociativo relacionado con la búsqueda de pareja y hospederos, al sesgar las preferencias por un cierto CPH, afectaría las poblaciones de los organismos interactuantes en la red trófica involucrada (Hawkins, 1994; Combes, 2001).

Finalmente, como ya fue mencionado, las señales independientes del hábitat han sido consideradas como las principales claves en la búsqueda de pareja. Sin

embargo, gracias al aprendizaje asociativo, el contexto ambiental donde ocurre la experiencia de cópula puede ser incorporado a las señales de búsqueda de pareja (Pfaus *et al.*, 2001; Capítulos 1 y 2). La proyección más importante de esta tesis corresponde al estudio de la generalidad del aprendizaje del contexto copulatorio en la búsqueda de pareja y sus consecuencias ecológicas. ¿Podría este aprendizaje de los estímulos del hábitat copulatorio (CPHs) ayudar a explicar los diferentes grados de especificidad y divergencia encontrados en insectos que dependen fuertemente de un hospedero (vegetal o animal) para completar su ciclo vital? El aprendizaje del contexto copulatorio podría estar relacionado con un incremento en la fidelidad al hospedero (Bush, 1968), al aumentar la probabilidad de que el próximo apareamiento del macho ocurra en el CPH donde copuló previamente (Cronin & Abrahamson, 2001). Si estas preferencias aprendidas pueden constituir los primeros pasos en un proceso de separación simpátrida o no, corresponde a una desafiante pregunta para estudios futuros.

El estudio del desarrollo de la búsqueda de pareja, constituye un elemento enriquecedor en la comprensión de las interacciones de los parasitoides con los otros niveles tróficos. Este tesis incorpora un nuevo argumento en la discusión sobre los procesos que promoverían el aislamiento en entre poblaciones de insectos asociadas a hospederos distintos. Este argumento sugiere considerar la conducta como un factor dinámico que colabora en la construcción de nuevos nichos ecológicos y modos de vida en insectos.

Bibliografía

Armstrong, J. D. de Belle, J. S. Zongsheng, W. Y Kaiser, K. 1998. Metamorphosis of the Mushroom Bodies; large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. *Lear. & Mem.* 5:102-114.

Askew, R.R. Y Shaw, M.R. 1986. Parasitoid communities: their size, structure and development. En W. J. Knight y J. D. Holloway (eds), *Insect Parasitoids*. pp. 255-260. Royal Entomological Society, London.

Ayasse, M. Paxton, R. J. Y Tengö J. 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 46:31-78.

Barron, A. B. Y Corbet, S. A. 2000. Behavioural induction in *Drosophila* : timing and specificity. *Entom. Exper. App.* 94: 159-171.

Bateson, P. 1978. Sexual Imprinting and optimal outbreeding. *Nat.* 273: 659-660.

Bateson, P. 2004. The Active Role of Behaviour in Evolution. *Biol and Phil.* 2: 283-298

Begon, M. Harper, J. L. Y Townsend, C. R. 1990. *Ecology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London.

Beltman, J.B. Haccou, P. Y Carel ten, C. 2004. Learning and colonization of new niches: a first step toward speciation. *Evol.* 58:35-46.

Bernardo, J. 1996. Maternal Effects in Animal Ecology. *Amer. Zool.* 36:83-105.

Bjorksten, T.A. Y Hoffman, A.A. 1995. Effects of pre-adult and adult experience on host acceptance in choice and non-choice tests in two strains of *Trichogramma*. *Entomol. Exper. Appl.* 76:49-58.

Bolhuis, J.J. 1999 The development of animal behaviour. From Lorenz to neural nets. *Naturwiss.* 86, 101-111.

Botto, E. Y Hernández, M. 1989. Contribución al conocimiento de los enemigos naturales de los áfidos plaga de los cereales de la República Argentina. I. Claves para la identificación de los áfidos momificados y los parasitoides primarios. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 46:75-85.

Brues, C.T. 1924 The specificity of food-plants in the evolution of phytophagous insects. *Amer. Nat.* 58:127-144.

Bush, G. 1968. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) *Evol.* 23:237-251.

Cardé, R. T. Y Bell, W. J. 1995. *Chemical Ecology of Insects* 2. Chapman & Hall. New York.

Combes, C. 2001. *Les associations du vivant, l'art d'être parasite*. Flammarion, Paris.

Corbet, S.A. 1985. Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. *Ecol. Entom.* 10:143-153.

Cronin, J. T. Y Abrahamson, W. G. 2001. Do parasitoids diversify in response to host-plant shifts by herbivorous insects?. *Ecol. Entomol.* 26:347-355.

Daza-Bustamante, P. Fuentes-Contreras, E. Rodríguez, L. C. Figueroa, C. C. Y Niemeyer, H. M. 2002. Behavioural differences between *Aphidius ervi* populations from two tritrophic systems are due to phenotypic plasticity. *Entomol. Experim. Appl.* 104: 321-328.

DeJong, R. Y Kaiser, L. 1992. Odour preference of a parasitic wasp depends on order of learning. *Experientia* 48:902-904.

DeLury, N. C. Gries, G. Gries, R. Judd, G. J. R. Brown, J. J. 1999. Sex pheromone of *Ascogaster quadridentata* a parasitoid of *Cydia pomonella*. *Jour. Chem. Ecol.* 25:2229-2245.

Dicke, M. 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods?. *Ecol. Experim. Appl.* 91:131-142.

Dierickman, U Y Doebeli, M. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nat.* 400:354-357.

Diether, V.G. & Goldrich, N. 1971. Bowflies: alteration of adult taste responses by chemicals present during development. *Sci.* 173:242-244.

Du, Y., Poppy, G.M., Powell, W. & Wadhams, L.J. 1997. Chemically mediated associative learning in the host foraging behavior of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *Jour. Insect. Behav.* 10: 509-522.

Du, Y., Poppy, G.M. & Powell, W. 1996. Relative importance of semiochemicals from first and second trophic levels in host foraging of *Aphidius ervi*. *Jour. Chem. Ecol.* 22:1591-1605.

Emden van, H.F., Eletherianos, I., Rose, J., Douloupaka, S. & Pettersson, J. 2002. Aphid parasitoids detect that an alien plant was present nearby during their development. *Phys. Entomol.* 27: 199-206.

Emden van, H.F., Sponagl, B., Wagner, E., Baker, T., Ganguly, S. & Douloupaka, S. 1996. Hopkins' "host selection principle", another nail in its coffin. *Phys. Entomol.* 21:325-328.

Emelianov, I., Simpson, F., Narang, P. & Mallet, J. 2003. Host choice promotes reproductive isolation between host races of the budmoth *Zeiraphera diniana*. *Jour. Evol. Biol.* 16:208-218.

Fauvergue, X., Hopper, K. R. & Antolin, M. F. (1995) Mate finding via a trail sex pheromone by a parasitoid wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:900-904.

Feder, J. L. 1998. The apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*. Flies in the face of conventional wisdom about speciation? En D.J. Howard y S.H. Berlocher (eds), *Endless Forms, species and speciation*. pp.130-144. Oxford University Press, London..

Filchak, K.E. Róetele, J.B. Y Feder, J.L. 1981. Natural selection and sympatric divergente in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Nature*. 407: 739-742.

Frías, D. 1988. Tiempos y modos de especiación En I. Santibáñez-Lara (ed), *Manejo del tiempo en biología y algunas de sus ingeniosas maneras de estudiarlo*. Pp. 158-171 Publicación de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Fukushima, J. Kainoh, Y. Honda, H. Y Takabayashi, J. 2002. Learning of herbivore-induced and nonspecific plant volatiles by a parasitoid, *Cotesia kariyai*. *Jour. Chem. Ecol.* 28:579-586.

Futuyma, D-J. 1998. *Evolutionary Biology*, Tercera Edición. Sinauer, Sunderland.

Gandolfi, M. Mattiacci, L. Dorn, S. 2003. Preimaginal learning determines adult responses to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proc. R. Soc. Lonn., B.* 270: 2623-2629.

Geervliet, J.B.F. Posthumus, M.A. Vet, L.E.M. Y Dicke, M. 1997. Comparative analysis of headspace volatiles from different caerpillar-infested and uninfested food plants of *Pieris* species. *Jour. Chem. Ecol.* 23:2935-2954

Geervliet, J.B.F. Vet, L.E.M. Y Dicke, M. 1996. Innate responses of the parasitoids *Cotesia glomerata* and *C. rubecula* (Hymenoptera, Braconidae) to volatiles from different plant-herbivore complexes. Jour. Insect Behav. 9:525-538

Godfray, H.C.J. 1994. *Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Gottlieb, G. 1970. Conceptions of prenatal behaviour. En L. R. Aronson, E. Tobach, D. S. Lehrman y J. S. Rosenblatt (eds), *Development and evolution of behaviour: Essays in memory of TC Schneirla*, pp 113-137. Freeman, San Fransisco.

Gottlieb, G. 1999. *Probabilistic epigénesis and evolution*. Clark Univesity Press. Worcester.

Guerrieri, E. Pennacchio, F. Y Tremblay, E. 1997. Effect of adult experience on infligth orientation to plant and plant-host complex volatiles in *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). Biol. Cont. 10:159-165

Gutierrez-Ibañez C., Villagra, C.A. Y Niemeyer, H.M. 2005 Comportamiento de pupación del parasitoide de áfidos *Aphidius ervi* (Haliday) y sus consecuencias en el aprendizaje preimaginal. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Biol. Res. 38:R-113.

Harris, M. Y Foster, S.P. 1995. Behavior and Integration, En: R. T. Cardé. y W. J. Bell (eds), *Chemical Ecology of Insects 2*. pp. 65-101. Chapman & Hall. New York.

Hastings, A. 1998. Population biology, concepts and models. Springer-Verlag, New York.

Hawkins, B. A. 1994. Patterns and process in host-parasitoid interactions. Cambridge University Press, New York.

Hirsch, H.V.B. Tompkins, L. 1994. The flexible fly: experience-dependent development of complex behaviors of *Drosophila melanogaster*. Jour. Exper. Biol., 195, 1-18.

Hopkins, A.D. 1917. A discussion of H. G. Hewitt's paper on "Insect behaviour". Jour. Econ. Entomol., 10, 92-93.

Hoy, R. R. Y Robert, D. 1996 Tympanal hearing in insects. Ann. Rev. Entomol. 41:433-50

Hughes, A.M. Everitt, B.J. Y Herbert, J. 1990. Comparative effects of preoptic area infusions of opioid peptides, lesions, and castration on sexual behavior in male rats: studies of instrumental behavior, conditioned place preference and partner preference. Psychopharm. 102: 243-256.

Kaesar, T. Ney-Nifle, M. Mangel, M. Y Swezey, S. 2001. Early oviposition experience affects patch residence time in a foraging parasitoid. Entomol. Experim. Applic. 98:123-132.

Kaiser, L. Pérez-Maluf, R. Sandoz, J.C. Y Pham Delégue M.H. 2003. Dynamics of odour learning in *Leptopilina boulardi*, a hymenopterous parasitoid. Anim Behav. 66:1077-1084

Kuo, Z-Y. 1967. The dynamics of behaviour development. University of Victoria, Random House. New York.

Lehrman, D.S. 1953. A critique to Konrad Lorenz's theory of instinctive behavior. *Quart. Rev. Biol.* 28, 337-363.

Lehrman, D.S. 1970. Semantic and conceptual issues in the nature-nurture problem, En L. R. Aronson, D. S. Lehrman, E. Tobach y J. S. Rosenblatt (eds), *Development and Evolution of Behaviour*. pp 17-50. Freeman, San Fransisco.

Lewis, W.J. Y Tumlinson, J.H. 1988. Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nat.* 331:257-259.

Lewontin, R.C. 1983. The organism as the subject and object of evolution. *Scien.* 118, 63-82.

MacNeil, J.N. Y Brodeur, J. 1995. Pheromone-mediated mating in the aphid parasitoid *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphididae). *Jour. Chem. Ecol.* 21:959-972.

Malyshev, S.I. 1968. A comparative study of the life and development of primitive gasteruptiids (Hymenoptera, Gasteruptiidae). *Entomol. Rev.* 43:267-271.

Maturana-Romensin, H. Y Mpodozis, J. 2000. The origin of species by means of natural drift. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73:261-310.

Mayr, E. 1959. The emergence and evolutionary novelties. En *Evolution after Darwin*, S. Tax (ed). pp 349-380.

Mousseau, T.A. Y Dingle, H. (1991) Maternal effects in insects: examples, constraints and geographic variation. En *ICSEB Proceedings (eds) The Unity of evolutionary biology*. Vol. 2, 2745-761, Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Noldus, L.P.J.J. 1988. Response of the egg parasitoid *Trichogramma petiosum* to the sex pheromone of its host *Heliothis zea*. *Entomol. Experim. Applic.* 48:293-300.

Olding-Smee, J.F. Laland, K.N. Y Feldman, M.W. 2003. *Niche construction: the neglected process in evolution*. Princeton University Press. Princeton.

Oyama, S. 2000. *The ontogeny of information*. Duke University Press. Durham.

Papaj, D.R. Y Prokopy, R.J. 1989. Ecological and evolutionary aspects of learning in phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 34:315-350.

Papaj, D.R. Y Lewis, A.C. 1993. *Insect Learning*. Chapman Y Hall. New York.

Pávlov, I. 1923. *Reflejos condicionados e inhibiciones*. Planeta Agostini. Barcelona. España.

Pennacchio, F. Y Strand M.R. 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 51:233–58. Publicado online como Review en Avance el 26 de Julio de 2005.

Pfaus, J.G. Kippin, T.E. Y Centeno, S. 2001. Conditioning and sexual behavior: a review. *Horm. Behav.* 40: 291-321.

Pigliucci, M. 2001. Phenotypic plasticity, beyond nature and nurture. Samuel M. Schneider, Series Editor, New York.

Powell, W. Y Zhang, Z.L. 1983. The reactions of two cereal aphid parasitoids, *Aphidius uzbekistanicus* and *Aphidius ervi*, to host aphids and their host plants. *Phys. Entomol.* 8:439-443.

Prokopy, R. J. Y Lewis, J. 1993. Application of learning to pest management. En D.R. Papaj, y Lewis, A.C. (eds). *Insect Learning*. pp 308-342. Chapman Y Hall. New York.

Quicke, D.L.J. 1997. *Parasitic Wasps*. Chapman & Hall. London.

Rice, W.R. Y Salt, G.W. 1988. Speciation via disruptive selection on habitat preference: Experimental evidence. *Amer. Nat.* 131:911-917.

Rietdorf, K. Y Steidle, J.L.M. 1999. Was Hopkins right? Influence of larval experience and early adult experience on the olfactory response in the granary weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera, Curculionidae). *Physiol. Entomol.* 27, 223-227.

Robacker, D.C, Weaver, K.M. Y Hendry, L.B. 1976. Sexual communication and associative learning in the parasitic wasp *Itopectis conquisitor*. Jour. Chem. Ecol. 2: 39-48.

Robacker, D.C. Y Hendry, L.B.. 1977. Neral and geranial: components of sex pheromone of the parasitic wasp *Itopectis conquisitor*. Jour. Chem. Ecol. 3:563-577.

Rodríguez, L.C. Fuentes-Contreras, E. Y Niemeyer, H.M. 2002 Effects of innate preferences, conditioning and adult experience on the attraction of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) towards plant volatiles. Eur Jour Entomol. 99:285-288.

Rossiter., M. 1996. Incidence and consequence of inherited environmental effects. Ann. Rev. Ecol. Sist. 27:451-476.

Sanchis, A. Michelena, J. M.. Latorre, A. Quicke, D.L.J. Gärdenfors, U. Y Belshaw, R. 2001. The Phylogenetic analysis of variable-length sequence data: elongation factor-1a introns in european populations of the parasitoid wasp genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). Mol. Biol. Evol. 18:1117-1131.

Schilder von, F. 1976. The role of auditory stimuli in the courtship of *Drosophila melanogaster*. Anim. Behav. 24:18-26

Schmalhausen, I. I. 1949. *Factors of Evolution* (1986 reprint). Chicago: University Press, Chicago.

Schneirla, T.C. 1956. Interrelationships of the "innate" and the "acquired" in the instinctive behaviour. En P. Grassé (ed) *Instinct dans le comportement des animaux et de l'homme*. pp 131-187, Masson et Cie, Paris.

Starý, P. 1993. The fate of released parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) for biological control of aphids in Chile. *Bull. Entomol. Res.* 83:633-639.

Steidle, J.L.M. Y Loon van, J.J.A. 2003. Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. *Entomol. Experim. Applic.* 108:133-148.

Sullivan, D.J. Y Völkl, W. 1999. Hyperparasitism: Multitrophic Ecology and Behavior *Ann. Rev. Entomol.* 44:291-315.

Swedenborg, P. D. Y Jones, R. L. 1992. Multicomponent sex pheromone in *Macrocentrus grandii* Goidanich (Hymenoptera: Braconidae). *Jour. Chem. Ecol.* 18:1901-1912.

Syvertsen, T. C. Jackson, L. L. Blomquist, G. J. Y Vinson, S. B. 1995. Alkadienes mediating courtship in the parasitoid *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Jour. Chem. Ecol.* 21:1971-1989.

Tully, T. Cambiazo, V. Y Kruse, L. 1994. Memory through Metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *Jour. Neur.* 14, 68-74.

Turlings, T.C.J. Scheepmaker, J.W.A. Vet, L.E.M. Tumlinson, J.H. Lewis, W.J. 1990b. How contact foraging experiences affect preferences for host-related odors in the larval parasitoid *Cotesia marginiventris*. Jour. Chem. Ecol. 16:1577-1589.

Turlings, T.C.J. Tumlinson, J.H. Lewis, W.J. 1990a. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host seeking parasitic wasps. Sci. 250: 1251-1253.

Turlings, T.C.J. Wäckers, F.L. Vet, L. E. M. Lewis, W.J. Y Tumlinson, J.H. 1993. Learning of host-finding cues by Hymenopterous parasitoids En D. R. Papaj y A. C. Lewis (eds) Insect Learning, Ecological and Evolutionary Perspectives. pp. 51-78. Chapman Y Hall, London.

Vet, L. E. M Wäckers, F. L. Y Dicke, M. 1991. How to hunt for hiding hosts: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. Neth Jour. Zool. 41:202-213.

Vet, L. E. M. Y Dicke, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. Annu. Rev. Entomol.37:141-272.

Vet, L.E.M. Lewis, W.J. Y Cardé, R.T. 1995. Parasitoid foraging and learning. En R.T. Cardé y W.J. Bell, (eds). Chemical Ecology of Insects 2. pp 65-101. Chapman & Hall. New York.

Vía, S 1999. Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids, I. Gene flow restriction and hábitat choice. Evolution. 53: 1446-1457.

Villagra, C.A. Oporto, A. Vásquez, R.A. Y Niemeyer H.M. 2002 Preferencia de apareamiento y microhábitat reproductivo en *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae): ¿Con quién y dónde aparearse?. pp. 30. VI Jornadas de Etología. 24-26 Octubre 2002, libro de resúmenes:

Villagra, C.A. Vásquez, R.A. Y Niemeyer H.M. 2005b Aprendizaje asociativo de olores afecta el comportamiento de búsqueda de pareja en el parasitoide *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. *Biological Research*, 38:R-57.

Villagra, C.A. Vásquez, R.A. Y Niemeyer, H.M. 2005a. Associative odour learning affects mating behaviour in *Aphidius ervi* males (Hymenoptera: Braconidae). *Eur Jour Entomol.* 102, 557-559.

Wäckers, F.L. Bonifay, C. Y Lewis, W.J. 2002. Conditioning of appetitive behavior in the Hymenopteran parasitoid *Microplitis croceipes*. *Entomol. Experim. Applic.* 103:135-138.

Walsh, B.D. 1864. On phytophagic varieties and phytophagic species. *Proceedings of the Entomological Society of Philadelphia*, 3:403-431

Wang, X.G. Y Messing, R.H. 2004. The ectoparasitic pupal parasitoid, *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), attacks other primary tephritid fruit fly parasitoids: host expansion and non-target impact. *Biol. Cont.* 31: 227-236.

Wcislo, W.T. 1989. Behavioral environments and evolutionary change. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 20: 137-169.

Wcislo, W.T. 1987. The role of learning in the mating biology of a sweat bee, *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20:179-185.

Wcislo, W.T. 1992. Attraction and learning in mate-finding by solitary bees, *Lasioglossum (Dialictus) figueresi* Wcislo and *Nomia triangulifera* Vachal (Hymenoptera: Halictidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 31:139-148.

West, M.J. & King, A.P. 1987. Settling nature and nurture into an ontogenetic niche. *Devel. Psychobiol.* 20:549-562.

West-Eberhard, M.J. 1989. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 20: 249-278.

West-Eberhard, M.J. 2003a. Phenotypic recombinations due to learning. En *Developmental Plasticity and Evolution*. M. J. West-Eberhard, (ed). pp 337-352. Oxford University Press. New York.

West-Eberhard, M. J. 2003b. Environmental modifications. En *Developmental Plasticity and Evolution*. M. J. West-Eberhard, (ed). pp 498-525. Oxford University Press. New York.

Wiegmann, B.M. Mitter, C. Y Farrell, B. 1993. Diversification of carnivorous parasitic insects: Extraordinary radiation or specialized dead end? *Amer. Nat.* 142: 737-754.

Wood, T.K. Y Keese, M.C. 1990. Host plant-induced assortative mating in *Enchenopa* treehoppers. *Evol.* 44:619-628.

Woodson, J.C. 2002. Including "learned sexuality" in the organization of sexual behavior. *Neurosc. Biobehav Rev.* 26: 69-80.

Zijp, J-P. Y Blommers, L.H.M. 2002. Biology of *Centistes delusorius*, a parasitoid of adult apple blossom weevil. *Agric. For. Entomol.* 4: 275-282.

Associative odour learning affects mating behaviour in *Aphidius ervi* males (Hymenoptera: Braconidae)

CRISTIAN A. VILLAGRA, RODRIGO A. VÁSQUEZ and HERMANN M. NIEMEYER

Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile;
e-mail: niemeyer@abulafia.ciencias.uchile.cl

Keywords. Braconidae, *Aphidius ervi*, mating behaviour, odour learning

Abstract. We used the aphid parasitoid *Aphidius ervi* reared in its host *Acyrtosiphon pisum* to examine if male sexual attractive responses can be conditioned to an odour (vanilla) that is not present in the natural environment. We used prior mating experience (exposure to females) as a non-conditioning stimulus and vanilla odour as a conditioning stimulus. The behavioural responses were tested in a glass Y-olfactometer just after eclosion (i.e., initial response) and after a training experience (i.e., trained response). During the 10-min training period individual males were allowed to copulate with a virgin female with or without vanilla odour present, or were exposed only to vanilla odour. Wing fanning was a recurrent behaviour which denoted increased sexual attraction to a volatile stimulus. Total time and time doing wing fanning in each olfactometer arm were determined. Vanilla odour, which initially did not elicit sexual-related behaviours, triggered strong sexual attractive responses when males were trained to females plus vanilla odour. Neither copulation only nor vanilla odour only treatments elicited such behaviours in trained males. The results are discussed in terms of parasitoid learning ability and its ecological consequences.

INTRODUCTION

Learning allows female parasitoids to display plastic responses in changing environments while searching for oviposition sites (Turlings et al., 1993). In spite of its relevance, no solid evidence has been published in relation to the occurrence of learning in males searching for females. Females are prone to copulate during a brief period of time, approximately 8 h after eclosion (Mackauer, 1969). After this period, they tend to refuse males and spend most of their time searching for an oviposition site. In contrast, males search for females for almost their entire adult lifetime.

We addressed the question if males of the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) are able to learn by association during copulation, and respond to novel stimuli not present in their natural environment. We hypothesise that males learn to respond to a training stimulus (e.g., vanilla odour) present in the mating environment, and we propose that this learning is mainly associative.

METHODS

Olfactometer

Y-tube olfactometers were used to investigate the responses of *A. ervi* males when presented with a choice of odours. The olfactometers used (9 cm-long tube and 6 cm-long arms) allowed the parasitoids to explore both arms and to move from one arm to the other. Olfactometers were changed after each test and cleaned successively with ethanol, odour-free soap, and distilled water. Pure air to feed into the stimulus chambers was obtained from an ultrapure synthetic air cylinder (Indura®). The air flow during the tests was maintained at 250 ml/min, light intensity at 3600 lux, and temperature at 20°C. Experimental parasitoids were exposed to air only, or to air with commercial vanilla odour (Marcopolo®) at a concentration of 0.01 µl vanilla/ml air.

Insects

Parasitoids were obtained from a laboratory culture maintained on *Acyrtosiphon pisum* Harris on broad bean (*Vicia faba*

L.). Mummies were isolated in Petri dishes containing a wet piece of filter paper, and newly eclosed male and female insects were fed with water only.

In order to assess changes in behavioural responses due to experience, males were tested twice with the same stimulus set. The first time the males were tested within 8 h of eclosion and before any induced experience (initial response, IR); the second time, they were tested 30 min after being subjected to a training protocol (trained response, TR). Each test lasted 5 min, measured from the time a male was introduced in the olfactometer. The tests were videorecorded.

Training protocol

After the recording of the initial responses, male parasitoids were randomly assigned to three groups that were subjected to different training protocols. Males were exposed to stimuli in a Petri dish during 10 min; this experience was followed by 30 min in an empty Petri dish before testing the trained response.

In the first group, males were introduced into a Petri dish with a virgin female (within 8 h of eclosion) in the presence of a vanilla air flow at the same concentration and flux as used in the Y-tube (n = 13). In the second group, only a female was present in the Petri dish (n = 18). In the third group (n = 16), males only experienced the vanilla stimulation. In the first two protocols, males copulated with the female within a few minutes. The first training protocol is associative while the other two are non-associative learning controls. If males are capable of learning by association during copulation, they are expected to change their response to the vanilla stimulus alone.

Behaviour

As measures of the attraction to a stimulus, time spent in each arm of the Y-olfactometer, and time spent wing fanning were recorded. This behaviour is related to male attraction to the females and is an important behavioural display during courtship (Mackauer, 1969; Battaglia et al., 2002). Behavioural data were collected utilizing the JWatcher Software 0.9® (Blumstein et al., 2000).

TABLE 1. Wing fanning responses between female plus vanilla (F + V), female only (F), and vanilla only (V) treatments: negative values represent a vanilla-biased behavioural display, while positive values represent a stronger response to the pure air control arm. In A, the mean value for each treatment in initial and trained responses is shown; in B, MANOVA and Post hoc LSD test results are displayed.

A: Experimental results									
Wing Fanning Response	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n
	F + V			F			V		
Initial	-0.0027	0.0061	13	0.0007	0.0024	18	-0.0002	0.0008	16
Trained	0.0051	0.0062	13	-0.0006	0.0023	18	-0.0016	0.0061	16

B: MANOVA fixed effects for Trained Response - Initial Response, F(2 d.f.) = 9.3218, p = 0.0028. Post hoc LSD test (P values shown)			
Wing Fanning	F + V	F	V
F + V	-	0.004*	0.0006*
F	-	-	0.9865
V	-	-	-

Analysis

In order to combine measurements in the olfactometer in a single variable, the differences between the proportions of time spent in each arm and between wing fanning activity in each arm were calculated as (time in vanilla arm/total time in olfactometer) - (time in air only arm/total time in olfactometer). Hence, attraction responses to vanilla stimulus were represented with positive values while attractive responses to air only appeared as negative values. In order to evaluate changes in behavioural responses in relation to the different training protocols, a two-way repeated measures ANOVA was used with treatment as one factor and temporal changes in the response as measures. Differences between treatments, evaluated as the difference between TR and IR, were analysed with a fixed effects MANOVA and post hoc LSD tests for planned comparisons. Data satisfied the assumptions of the tests employed.

RESULTS

There were no statistically significant differences in the total time in each arm neither in temporal changes, between treatments or their interaction. A significant increase of the time devoted to wing fanning was observed after female plus vanilla treatment [repeated measures ANOVA: treatment \times measure interaction, F-Ratio (2 d.f.) = 9.03, $p = 0.0005$], while no differences were observed for the vanilla-only or female-only treatments. This last result is relevant because wing fanning is an exclusively courtship display and its appearance in response to the vanilla-only stimulus is clear evidence of the acquisition of a conditioned response.

Comparisons between treatments of the TR-IR measures of time spent wing fanning showed significant differences [fixed effects MANOVA : F (2 d.f.) = 9.3218 $p = 0.0028$], post hoc LSD test showing that the female plus vanilla treatment was statistically different from female only and vanilla only treatments (Table 1).

DISCUSSION

Our results demonstrate associative learning capacity in relation to an artificial stimulus in *A. ervi* males when the stimulus is experienced during copulation. For vertebrates, and some invertebrates, copulation experience affects the subsequent behaviour of males, improving their copulatory skills and levels of activity. In rats, copulation with females in the presence of cadaverine essence, can change trained male responses to cadaverine from repulsion to attraction and sexual arousal, in a phenomenon which has been called Conditioned Place Prefer-

ence (CPP) (Pfaus et al., 2001). To the best of our knowledge, this is the first evidence of CPP for a parasitic wasp and possibly for a holometabolous insect, and demonstrates that insect males can utilize secondary cues learned during copulatory experience, over those derived directly from the female, such as pheromones.

Previously, we demonstrated that the olfactometric response of female and male *A. ervi* parasitoids to volatiles from the host-plant depended on their previous rearing experience (Daza-Bustamante et al., 2002). It was further shown that oviposition environment also affected the attraction of females to plant volatiles (Du et al., 1997; Rodríguez et al., 2002). The present evidence constitutes a good framework to test the influence of the host-plant system on mate searching, and the role of learning in the maintenance of parasitoid-host specificity systems (Bush, 1975; Tremblay & Pennacchio, 1988; Digilio & Pennacchio, 1992).

ACKNOWLEDGEMENTS. CAV is grateful to CONICYT for a doctoral fellowship, project funding (AT-4040221), and travel grant, to Universidad de Chile for financial support (N° 31-2004), to Macarena Faunes for statistical advice, and to Decenio Biology Discussion Group for valuable suggestions.

REFERENCES

- BATTAGLIA D., ISIDORO N., ROMANI R., BIN F. & PENNACCHIO F. 2002: Mating behaviour of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae): the role of antennae. *Eur. J. Entomol.* 99: 451-456.
- BLUMSTEIN D.T., EVANS C.S. & DANIEL J.C. 2000: JWatcher 0.9. An Introductory User's Guide. Animal Behaviour Laboratory, Macquarie University. <http://galliform.psy.mq.edu.au/jwatcher/>.
- BUSH G.L. 1975: Sympatric speciation in phytophagous parasitic insects. In Price P.W. (ed.): *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites*. Plenum, New York, pp. 187-206.
- DAZA-BUSTAMANTE P., FUENTES-CONTRERAS E., RODRIGUEZ L.C., FIGUERA C.C. & NIEMEYER H.M. 2002: Behavioural differences between *Aphidius ervi* populations from two tritrophic systems are due to phenotypic plasticity. *Entomol. Exp. Appl.* 104: 321-328.
- DU Y., POPPY G.M., POWELL W. & WADHAMS L.J. 1997: Chemically mediated associative learning in the host foraging behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Insect Behav.* 10: 509-522.
- DIGILIO M.C. & PENNACCHIO F. 1992: A quantitative analysis of pre-mating and post-mating isolation mechanisms between

- Aphidius ervi Haliday and Aphidius microlophii Pennacchio & Tremblay (Hymenoptera: Braconidae). *Boll. Lab. Entomol. Agr. Filippo Silvestri* 49: 117-125.
- MACKAUER M. 1969: Sexual behaviour of and hybridization between three species of Aphidius Nees parasitic on the pea aphid. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 71: 339-351.
- PEAUS J.G., KIPPIN T.E. & CENTENO S. 2001: Conditioning and sexual behaviour: a review. *Hormones Behav.* 40: 291-321.
- RODRIGUEZ L.C., FUENTES-CONTRERAS E. & NIEMEYER H.M. 2002: Effect of innate preferences, conditioning and adult experience on the attraction of Aphidius ervi (Hymenoptera: Braconidae) toward plant volatiles. *Eur. J. Entomol.* 99: 285-288.
- TREMBLAY E. & PENNACCHIO F. 1988: Speciation in Aphidiine Hymenoptera (Hymenoptera: Aphidiidae). In Gupta V.K. (ed.): *Advances in Parasitic Hymenoptera Research*. E.J. Brill, Leiden, pp. 139-146.
- TURLINGS T.C.J., WÄCKERS F.L., VET L.E.M., LEWIS W.J. & TURLINSON J.H. 1993: Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In Papaj D.R. & Lewis A.C. (eds): *Insect Learning, Ecological and Evolutionary Perspectives*. Chapman & Hall, New York, pp. 51-78

Received March 15, 2005; revised and accepted April 18, 2005

Capítulo 2

Olfactive Sexual Conditioning in Males of the Parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae)

CRISTIAN A VILLAGRA, RODRIGO A VÁSQUEZ & HERMANN M NIEMEYER

Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

Correspondence: C A Villagra, Laboratorio de Química Ecológica, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile. email: cavillagra@gmail.com

Abstract

Sexual behaviours change through maturation and learning. In parasitic wasps, the free-living period of males is mainly focused on female searching and mating. Although the role of learning on mating has been suggested, few studies have assessed its role on mate searching. Therefore, we addressed the question whether male sexual attractive responses can be conditioned to odours absent from the natural environment (vanilla) and to a blend of the host-plant complex (HPC) volatiles in the aphid parasitoid *Aphidius ervi* reared in its host *Acyrtosiphon pisum*. We used copulation experience as unconditioned stimulus and vanilla or HPC odours as conditioned stimulus. HPCs used were *A. pisum* reared on alfalfa plants or *Sitobion avenae* reared on wheat plants. The behavioural responses were assessed in a glass Y olfactometer just after eclosion (initial response), and after a training experience (trained response). Training consisted in a 10-minute period where males were allowed to copulate with virgin females in the presence or absence of a conditioned odour stimulus, while others males were exposed to conditioned odour stimulus only. Time spent in each arm of the olfactometer was used as a measure of the attraction to a stimulus. Also, time spent beating the antennae, running, standing still, grooming the abdomen, grooming the antennae, and wing fanning were recorded. Neither vanilla nor HPC stimuli elicited sexual-related behaviours in initial male responses. Vanilla odour triggered strong sexual attractive trained responses when the trained male was exposed to female plus vanilla odour. Neither copulation alone nor vanilla odour alone elicited such behaviour in trained males. A similar trend was observed when males were conditioned to HPCs, and the level of fidelity of the acquired sexual responses differed between *A. pisum*-alfalfa and *S. avenae*-wheat. Through learning, the olfactory stimuli context present during copulation could become predictive cues for further mate searching. These results are

discussed in terms of insect ontogenetic changes in behaviour and its ecological consequences.

INTRODUCTION

In spite of the important roles that learning plays in sexual development, the impact of learning on sexual behaviours, and its ecological and evolutionary consequences are rarely considered (Woodson 2002). In Hymenoptera, sexual behaviours have been studied mainly in relation to pheromones (Ruther et al. 2000; reviewed by Ayasse et al. 2001), while learning during mate searching has been rarely studied (but see Wcislo 1987 and 1992). In parasitic wasps, the free-living period of males is mainly focused on female searching and mating (Mackauer 1969; Gilchrist 1996). Most of the literature on parasitoid learning is concerned with host and food searching by the females; male sexual behaviour has been explored only in few cases (e.g. Robacker et al. 1976; Robacker and Hendry 1977; McAuslane et al. 1990).

At various stages during the ontogeny of a parasitoid, its responses to the chemosensory environment can be modified through learning. Early in ontogeny, stimuli from the larval environment could affect ensuing adult responses in at least two ways: by persistent neural changes in what is called preimaginal conditioning (i.e. Gandolfi et al. 2003), and by the effect of internal or external trace chemical cues known as chemical legacy (Corbet 1985), which influence the adult during emergence. Experiences during the adult free-living period have been proposed to produce even greater effects as behaviour modifiers (Turlings et al. 1993).

As the life cycle of a parasitic wasp is intimately related to its host and host food substrate (Quicke, 1997), the relevance of such environmental context stimulation on parasitoid behaviour may be broader than initially expected. Change of responses to

environmental cues through learning has been shown to play a pivotal role in parasitoids foraging for hosts (Du et al. 1997). Vet & Groenewold (1990), proposed that female parasitoids may use highly detectable cues derived from the food of the host (the plant) or from the host-plant interaction after experiencing oviposition in a given host-plant complex. Thus, learning may bias some ecologically relevant behaviours of parasitoids.

Could male insects utilise olfactive stimuli learned during earlier copulatory experiences, over those derived directly from the current female, such as pheromones? We addressed this question by testing whether males of the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) are able to learn where to find females by associative learning during copulation. We first tested if males could learn to respond to novel stimuli not present in their natural environment by associative learning of olfactive cues. We then considered the environmental context where parasitoids may develop (the parasitoid-host-plant tritrophic system) and tested its relevance as a source of stimuli during learning. We used volatile blends from alfalfa (*Medicago sativa* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) HPCs as conditioned stimuli since these are the two main agroecological systems where *A. ervi* is found in Chile (Starý et al. 1993). Sexual conditioning to the HPC could be particularly relevant in relation to the specificity to HPCs, because if copulation on or near a given HPC generates a conditioned mating place preference (or fidelity) to that HPC on experienced male parasitoids, it may represent an ethological barrier preventing cross-breeding between the two HPC parasitoid populations. Hence, we also tested the response of males trained with a given HPC towards the alternative HPC (not present during training) in order to assess the specificity and fidelity to the HPC of the trained response.

We hypothesised that *A. ervi* males learn to respond specifically to the stimuli present in the mating environment during training (i.e. vanilla or HPC odours) and that this learning is mainly associative. We expect to find that after learning, male sexual behaviours are evoked by the training stimuli.

METHODS

Insects

A. ervi is a solitary, oligophagous koinobiont endoparasitoid of aphids. In its native range, it is mainly associated with Macrosiphinae aphids such as *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae) on legumes and related species (Mackauer & Finlayson 1967; Němec & Starý 1985; Takada & Tada 2000). Although *Sitobion avenae* (Fabricius) on cereals is a suitable host for *A. ervi*, this has a minor relevance on cereal tritrophic agroecosystems in Europe (Cameron et al. 1984). In Chile, since its introduction nearly 28 years ago, *A. ervi* has been reported to parasitise both *A. pisum* (prevalent on alfalfa) and *S. avenae* (prevalent on wheat), and has also expanded its host range to include the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), a species that it does not attack in its area of origin (Zuñiga 1990; Starý et al. 1993). This scenario represents a country scale natural arena where research could contribute to the understanding of the behavioural and ecological aspects of the active diversification currently occurring within the genus *Aphidius* (Atanassova et al. 1998).

Parasitoids were obtained from a laboratory culture maintained on alfalfa. To avoid parasitoid population inbreeding (Unruh et al. 1983) field collected parasitoids derived from the alfalfa-pea aphid system, mainly from around Santiago, were introduced to the laboratory stocks at several occasions. In order to provide a neutral

early experience to the adult parasitoids used, "mummies" were isolated in Petri dishes containing a piece of wet filter paper, and newly born insects, both males and females, were fed with water only. Adults were used around 15 h after eclosion, which corresponds to the most active sexual period for male-female interaction in *A. ervi* (He & Teulon 2004).

Behaviour

The sequence of sexual behaviours of *A. ervi* during mating has been subdivided into two periods: a premating period comprising the courtship behaviour of the male, and ending with the acceptance or rejection of mounting of the female by the male, and a copulation period (Mackauer 1969). Courtship starts as soon as the male becomes aware of the presence of the female (at a distance of 2 to 3 cm). The male pursues the female with its antennae held forward at approximately right angles with respect to its body and the wings spread out horizontally, and performs a characteristic wing fanning courtship display. When the female recognises and accepts her sexual partner, mounting takes place. Finally, the female will accept copulation after an antennal contact phase and the male will engage its genital claps with the corresponding parts of the female genitalia (Mackauer 1969; Battaglia et al. 2002; He & Teulon 2004).

Attraction to an olfactory stimulus was determined in two ways; i) by measuring time spent in each arm of a glass Y-olfactometer, and ii) by assessing the expression of different behaviours triggered by a stimulus. If a given training protocol generates sexual attraction to a given odour, experienced males were expected not only to spend more time near the conditioned stimulus in the olfactometer but also to express sex-related behaviours in a higher proportion than in the initial responses or with respect to

males from other treatments. In order to test this idea, the following behaviours displayed in each arm of the Y-olfactometer were recorded: time spent antennating, running, standing still, grooming the abdomen, grooming the antennae, and fanning its wings. Wing fanning, as described earlier, is a part of male courtship and hence a good indicator of sexual attraction.

Replicates were video-recorded and behavioural data were collected utilising the JWatcher software 0.9 © (Blumstein et al. 2000).

Olfatometry

Glass Y-tube olfactometers were used to investigate the responses of *A. ervi* males when presented with a choice of odours. Olfactometers utilised (9 cm-long tube and 6 cm-long arms) allow parasitoids to explore both arms and to move from one arm to the other. Olfactometers were changed after each test and cleaned successively with ethanol, odour-free soap, and distilled water. Pure air to feed into the stimulus chambers was obtained from an ultrapure synthetic air cylinder (Indura ®). The air flow during the tests was maintained at 250 ml/min, light intensity at 3600 lux, and temperature at 20 °C.

Conditioning to Vanilla Volatiles

Experimental parasitoids were exposed to air only, or to air with odour of a commercial vanilla extract (Marcopolo ®) at a concentration of 0.01 µl vanilla extract /ml air. Vanilla has been used in previous conditioning experiments on parasitic wasps (Lewis & Tumlinson 1988), and is thus a good stimulus for testing if learning can occur during mating experiences. Insects were tested twice: first, ca. 15 h after eclosion to record its initial response (IR), and subsequently, after training in order to record its

trained response (TR). Males were randomly assigned to three groups that were subjected to different training protocols. In the first group, males were introduced into a Petri dish with a virgin young female (ca. 15 h after eclosion) as the sole source of stimulation. In the second group, males only experienced the vanilla air flow at the same concentration and flux as used in the Y-tube. Males in the third group were introduced into the Petri dish with the female and the vanilla essence. Stimulation during training lasted 10 min and was followed by 30 min in an empty clean Petri dish before testing TR. In the presence of the female, males copulated within a few minutes. The last training protocol is associative while the first two are non-associative learning controls. If males are capable of learning by association during copulation, we expected that males from the group trained with females and vanilla extract will change their responses in the presence of vanilla stimulus alone.

Conditioning to Host Plant Complexes

Experimental parasitoids were exposed to air from an olfactometric jar with a pot with soil only (following Ramírez et al. 2000) in the control arm. In the other arm, they were exposed to air from an olfactometric jar containing either a 3-week old alfalfa plant infested with ca. 100 *A. pisum* (alfalfa HPC) from all instars or a 2-week old wheat plant infested with *S. avenae* at the same aphid load (wheat HPC). Both plants were infested 24 h prior to their use as stimulus. As in the first experiment, males were tested twice; first, ca. 15 h after eclosion and then, after training. Male parasitoids were randomly assigned to three groups, which were subjected to different training protocols. In the first group, males were exposed to a virgin female (ca. 15 h after eclosion) as the only source of stimulation; in the second group, males experienced the presence of either alfalfa HPC or wheat HPC; and in the third group, males were exposed to a virgin

female together with either the alfalfa HPC or the wheat HPC. All three trainings protocols followed the same timing and procedure as the first experiment and all males exposed to females copulated within a few minutes.

Associative learning was tested on males by recording their IR and thereafter their TR to the same HPC used in conditioning. At the same time, fidelity to the conditioned HPC was tested with a subgroup of experimental males by recording their IR and thereafter their TR to the alternative HPC i.e. the HPC not used in their conditioning, in order to know the strength and specificity of the training used.

Analysis

Measurements in the olfactometer were combined into a single variable equal to the difference between time spent performing a given behaviour in the stimulus arm minus time spent performing this behaviour in the control arm. Thus, attractive responses to a stimulus were represented by positive values.

Data were analysed using a protected multivariate analysis of variance for repeated measures (Scheiner 1993) comprising a MANOVA for global effects and repeated measures ANOVA if the MANOVA showed significant results. Finally, *post hoc* LSD tests for planned comparisons were performed if the ANOVA showed significant effects by any factor studied. Wing fanning data was not normally distributed; hence, it was transformed to ranks before the analysis (Conover & Iman 1982).

For all experiments, the proportion of time spent in the stimulus or the control arms of the olfactometer were compared using paired t-tests for each treatment in IR and TR.

RESULTS

Conditioning Effect of Vanilla Volatiles

Only the trained response in the female + vanilla treatment showed significant differences in times spent in each olfactometer arms (paired t-test, $t=1.79$, $N=17$, $p < 0.05$, Figure 1). MANOVA analysis showed a significant global effect of treatment ($F= 3.85$, $p < 0.0005$) and of the interaction of treatments and responses (T x R) ($F= 2.48$, $p < 0.005$). Repeated measures ANOVA revealed significant effects of treatment and also interaction of T x R for wing fanning and grooming of the antennae whereas grooming of the abdomen was significantly different only for T x R (Table 1). Grooming of the abdomen (Figure 2A) was highly expressed in TR of males from female + vanilla treatment but this was not significantly different when it was compared with vanilla only treatment IR; hence, we cannot conclude that this corresponds only to an acquired response due to learning. For grooming of the antennae (Figure 2B), the same tendency was observed; however, in this case, TR of males from female + vanilla treatment was significantly different from all other treatments and measures (LSD *post-hoc* test, $p < 0.05$,). Wing fanning response to vanilla volatiles (Figure 2C) was mainly expressed by trained males from the female + vanilla treatment, which was different from all other IR and TR (LSD *post-hoc* test, $p < 0.005$).

Conditioning Effects of HPCs Volatiles Blends

MANOVA revealed a significant global effect of treatment x response interaction. Neither treatment, response (IR, TR), stimulus used (alfalfa HPC, wheat HPC), nor any other interaction combination were statistically significant (Table 2a). Two-way repeated measures ANOVA revealed a significant effect of the treatment x response interaction

for grooming of the abdomen behaviour (Table 2b-1), whereas for wing fanning there was a significant effect of treatment and of treatment x response interaction (Table 2b-2).

Using alfalfa HPC volatile blends as conditioned stimulus, only the trained response in the female + alfalfa HPC treatment showed significant differences between times in the olfactometer arms (paired t-test, $t=1.782$, $N=12$, $p < 0.05$, Figure 3A); Grooming of the abdomen showed a trend similar to that observed in the experiment using vanilla (compare Figures 2A and 4A), whereas grooming of the antennae showed no significant differences (results not shown). Wing fanning showed a more contrasting difference than in the vanilla experiment (compare Figures 4B and 2C), the only group displaying this sexual response in the presence of a blend of alfalfa HPC volatiles being the female + alfalfa HPC TR group.

Using wheat HPC volatile blends as conditioned stimulus, only the trained response in the female + wheat treatment showed significant differences between times in the olfactometer arms (paired t-test, $t=3.939$, $N=19$, $p < 0.005$); other comparisons were not significant. The three behaviours examined showed similar trends as when using the alfalfa HPC as conditioning stimulus (compare Figures 4A and 4C, and Figures 4B and 4D).

While males trained with female + alfalfa HPC spent significantly more time in alfalfa HPC volatiles arm (Figure 3A), males trained with female plus wheat HPC spent similar times in both olfactometer arms (paired t-test, $t=-0.494$, $N=10$, $p = 0.633$, Figure 3A). Males trained with female + alfalfa HPC did not spend more time in the alfalfa HPC arm than males trained with female + wheat HPC (t-test, $t=0.330$, $p = 0.745$). Thus, the response towards alfalfa HPC volatile blend triggered in males trained with female + alfalfa HPC is at least to some degree a specific learned response. On the other hand,

while males trained with female + wheat HPC spent significantly more time in the wheat HPC than in the only soil control arm (Figure 3B), males trained with female + alfalfa HPC spent similar times in both arms (paired t-test, $t=-0.595$, $N=10$, $p=0.481$, Figure 4B). However, while males trained with females + alfalfa HPC did not spend more time in the wheat HPC arm than males trained with females + wheat HPC (t-test, $t=1.248$ $p=0.221$). They did spend more time in the only soil control arm than males trained with females + wheat HPC (t-test, $t=3.318$, $p < 0.005$), thus showing an increased attractive response to the only soil control.

A non-significant tendency towards a greater wing fanning response to alfalfa HPC was found in males trained with female + alfalfa HPC than in males trained with female + wheat HPC (Aspin-Welch unequal variance test, $t= 13.237$, $p= 0.212$). However, males trained with female + wheat HPC showed significantly stronger wing fanning response to wheat HPC than males trained with female + alfalfa HPC (Aspin-Welch unequal variance test, $t= 26,682$, $p < 0.05$) Thus, conditioning to wheat HPC seems to generate a more specific trained response, i.e. more behavioural fidelity to wheat HPC. It is worth noting that the female stimulus was held constant in these comparisons, since all females were reared on alfalfa HPC.

DISCUSSION

A. ervi males were able to learn by association the stimuli present during their first copulatory experience. Associative learning occurred in relation to artificial stimuli such as vanilla as well as to HPC volatiles blends, independently of whether it was the HPC on which parasitoids had been reared (alfalfa HPC) or an alternative HPC (wheat HPC). This is supported by the null effect of the odour used for conditioned stimulus as a source of variance (Stimulus effect in the MANOVA report, Table 2b-1). Although earlier

work showed that both female and male *A. ervi* tend to respond initially in some degree to the olfactory stimuli derived from their rearing HPC (Rodríguez et al. 2002; Daza-Bustamante et al. 2002), the initial level of response to alfalfa HPC did not affect the result of the conditioning training (Figure 3).

Olfactory Conditioned Place Preference

As far as we are aware, this is the first set of experiments addressing learning during mate searching in the context of a parasitoid chemosensory tritrophic environment. In the ichneumonid parasitoid, *Itopectis conquisitor*, associative learning has been found in females searching for oviposition hosts, and similarly, in males searching for mates: male wasps will inspect a blank "cup disperser" if they have previously encountered cups containing the pheromone (Robacker et al. 1976, Robacker & Hendry 1977). For vertebrates, as well as for some invertebrates, copulation experience affects the subsequent behaviour of males, improving their copulatory skills and their level of activity. For example, in rats, copulation with females in the presence of cadaverine, can change trained male responses to cadaverine from repulsion to attraction and sexual arousal, a phenomenon that has been called conditioned place preference (Pfaus et al. 2001, and references therein). Our first set of results support that a similar process occurs for the male parasitoid. Instead of cadaverine we used vanilla volatiles (Figure 1), an odour previously used by other authors to demonstrate conditioning in female parasitoids. In addition, we found that not only time spent near the stimulus source was affected (a general measure of attraction) but also wing fanning, a specific behaviour related to courtship (Table 1, Figure 4). Furthermore, we assessed the possible effects of odour sexual associative learning under the environmental set of stimuli that the parasitoid could find during sexual

experiences in nature. We evaluated the effect of HPCs as conditioned stimuli, and demonstrated that the male parasitoid can utilise secondary olfactory stimuli derived from the HPC by learning during copulatory experience (Table 2, Figure 3 and 4) over those derived directly from the female (such as pheromones). The trained response is to some degree a specific result of conditioning, because males that experienced copulation in a given HPC exhibited attraction responses only to this HPC and not to an HPC not present during the previous copulation (Figure 4).

These levels of fidelity to the conditioned HPC could be a consequence of conditioned place preference, making these results important not only for understanding of the behavioural-ecological factors in insect biology but also for a more accurate biological control, because training males to find females in a given crop may improve mating in the specific crop that is under control.

Mating Ecology

Associative learning has been proposed as the major solution to the so called "reliability-detectability problem" for female parasitoids searching hosts (Vet et al. 1991). By associating highly detectable cues from the plant and/or the host-plant complex (HPC) to highly reliable cues from the host, the parasitoid can temporally increase the reliability of detectable cues (Vet et al. 1991). Our results related to sexual conditioning to the HPCs (Table 2, Figure 3 and 4), suggest that this phenomenon is not exclusive of female parasitoids searching an oviposition site but it is also extensible to male parasitoids searching for mates. Commonly, female parasitoid pheromones elicit a strong and relatively short-range attractive response over males (van den Assem 1986). We propose that, through male associative learning, contextual cues present during mating, such as HPC volatiles blends, could become highly detectable (and attractive)

conditioned stimuli, after male copulation experience in the presence of such environment-derived olfactory cues. However, more extensive work is needed to know whether other cues from the tritrophic context, for example, those derived from the host-female parasitoid interaction such as the aphid alarm pheromone (Glinwood et al. 1999) or female host marking signals can also be exploited by experienced males in their "naturally-trained" searching for mates. Many insects associated directly or indirectly with a given plant perform their reproductive behaviours near or on this plant. Thus, besides the direct influence of the plant on insect sexual communication through changes in pheromones production and composition (Landolt & Phillips 1997, and references therein), learning of olfactive cues (or other source or stimulation) present during courtship and mating could represent an important influence on the insect-plant interaction. This phenomenon, as shown by our experiments, seems not to be restricted to phytophagous insects but also occur in third trophic level interactors, such as parasitoids.

Behavioural Contextualization for Parasitoid Diversification

Following our findings on the specificity of the conditioned response to the HPCs (Figure 3), could associative learning during mate searching contribute to the occurrence of ethological barriers preventing cross-breeding between the two HPC-parasitoid populations? This question is difficult to answer, at least within the *A. ervi* scenario in Chile. If sexual learning influences in the field the preference of male parasitoids towards the HPC where copulation occurs, it may generate some bias on the genetic flux between parasitoid populations living on alfalfa HPC versus those living in wheat HPC. Previous studies in the Chilean agro-ecosystem using *A. ervi* from alfalfa HPC and wheat HPC did not show evidence of an HPC-based population structure at a

multilocus level (Daza-Bustamante et al. 2002). Also, differential distribution between both populations was not detected for any allele or phenotype. On the other hand, male parasitoid learning could be related to the migratory behaviour of this parasitoid, since *A. ervi* may migrate between crops at the start of the vegetative period of wheat (late winter-spring), thus maintaining parasitoid populations on both crops (Starý et al. 1993). Male ability to learn environmental cues linked with female presence could be helpful to explain the population trends found in the field. In Chile, *A. ervi* was introduced nearly 28 years ago (Starý 1978, Cameron et al. 1984, Starý 1993), possibly too recently to make parasitoid population divergence appreciable. Whereas, in older parasitoid populations (from Europe and USA), using *A. ervi* microsatellite loci, other authors have found a lack of migration between different populations (based on biases in the Hardy-Weinberg equilibrium). This trend has been attributed to the association of parasitoids with seasonal agricultural habitats (Hufbauer et al. 2001). In its native areas, different host specific *Aphidius* species have been identified and ecological and ethological barriers have been proposed as important elements in *Aphidius* diversification (Pennacchio 1989, Powell 1994). For example, *Aphidius microlophii* was first separated from *A. ervi* by Pennacchio & Tremblay (1987), the former parasitizing *Microlophium carnosum* Buckton (Hemiptera: Aphididae) on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). The two parasitoids are sympatric and *A. microlophii* may have evolved from populations of *A. ervi* adapted to the new host. It is hypothesised from ecological and ethological evidences, such as host ecology, host preference and mating behaviour, that reproductive isolation developed between populations on the original and derived hosts, may lead to divergence (Mackauer 1969; Powell & Wright 1988; Digilio & Pennacchio 1992).

Our results suggest that associative learning during mate searching in parasitoids is influenced by the stimulative ecological context where copulation occurs (Table 1 and 2), and could contribute to parasitoid fidelity to HPC. This may constitute the first steps in a host-adapted divergence, in which behavioural mechanisms such as ecological imprinting *sensu* Immelman (1975) may play an important role as has been proposed as the first step in the stable generation of new niches by Aphidiine parasitoids (Tremblay & Pennacchio 1988). The same may be true of a broad range of highly host dependent animals.

Finally our findings have shown the pivotal role of learning on parasitoid biology as we found that associative learning is not restricted to female parasitoids during their search for oviposition site but is also present in males searching for females. The results bear on parasitoid cognitive processes and their ecological and evolutionary implications.

Acknowledgements

CAV is grateful to CONICYT for a doctoral fellowship and project funding (AT-4040221), and to Universidad de Chile for financial support (N° 31-2004). Thanks are also due to Mark Hershkovitz, Daniel Stanton and Decenio Biology Discussion Group for valuable suggestions. Finally, CAV thanks the Villagra-Gil family and Macarena Faunes for all kinds of support.

References

- Assem, J. van den. 1986. Mating behavior in parasitic wasps. In: *Insect Parasitoids* (Ed. by J. D. Waage), p.125-157. New York, USA: Academic Press.

- Atanassova, P., Brookes, C. P., Loxdale, H. D. & Powell, W.** 1998. Electrophoretic study of five aphid parasitoid species of the genus *Aphidius* (Hymenoptera: Braconidae), including evidence for reproductively isolated sympatric populations and cryptic species. *Bulletin of Entomological Research*, **88**, 3-13.
- Ayasse, M., Paxton, R. J. & Tengö, J.** 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, **46**, 31-78.
- Battaglia, D., Isidoro, N., Romani, R., Bin, F. & Pennacchio, F.** 2002. Mating behaviour of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae): the role of antennae. *European Journal of Entomology*, **99**, 451-456.
- Blumstein, D. T., Evans, C. S. & Daniel, J. C.** 2000. JWatcher 0.9. An Introductory User's Guide. Animal Behaviour Laboratory, Macquarie University, Australia: <http://galliform.psy.mq.edu.au/jwatcher/>
- Cameron, P. J., Powell, W. & Loxdale, D. H.** 1984. Reservoirs for *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae), a polyphagous parasitoid of cereal aphids (Hemiptera, Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, **74**, 647-656
- Conover, W. J. & Iman, R. L.** 1982. Analysis of covariance using the rank transformation. *Biometrics*, **38**, 715-724.
- Corbet, S. A.** 1985. Insect chemosensory responses. A chemical legacy hypothesis. *Ecological Entomology*, **10**, 143-153.
- Daza-Bustamante, P., Fuentes-Contreras, E., Rodríguez, L. C., Figueroa, C. C. & Niemeyer, H. M.** 2002. Behavioural differences between *Aphidius ervi* populations from two tritrophic systems are due to phenotypic plasticity. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **104**, 321-328.

- Digilio, M. C. & Pennacchio, F. 1992. A quantitative analysis of premating and post-mating isolation mechanisms between *Aphidius ervi* Haliday and *Aphidius microlophii* Pennacchio & Tremblay (Hymenoptera: Braconidae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria "Filipo Silvestri"*, **49**, 117-125.
- Du, Y. - J., Poppy, G. M., Powell, W. & Wadhams, L. J. 1997. Chemically mediated associative learning in the host foraging behavior of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behaviour*, **10**, 509-522.
- Gandolfi, M., Mattiacci, L. & Dorn, S. 2003. Preimaginal learning determines adult responses to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society of London, B Series*, **270**, 2623-2629.
- Gilchrist G. 1996. A quantitative genetic analysis of thermal sensibility in the locomotor performance curve of *Aphidius ervi*. *Evolution*, **50**, 1560-1572.
- Glinwood, R. T., Du, Y. - J. & Powell, W. 1999. Responses to aphid sex pheromones by the pea aphid parasitoids *Aphidius ervi* and *Aphidius eadyi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **92**, 227-232.
- He, X. Z. & Teulon, D. A. J. 2004. Emergence, sexual maturation and oviposition of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *New Zeland Plant Protection*, **57**, 214-220.
- Hufbauer, R. A., Bogdanowicz, S. M., Pérez, L. & Harrison, R. G. 2001. Isolation and characterization of microsatellites in *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) and their applicability to related species. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 197-199.
- Immelman, K. 1975. Ecological significance of imprinting and early learning. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **6**, 15-37.
- Landolt, P. L. & Phillips, T. W. 1997. Host plant influences on sex pheromone behaviour of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, **42**, 371-391.

- Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H. 1988. Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature*, **331**, 257-259.
- Mackauer, M. 1969. Sexual behaviour of and hybridization between three species of *Aphidius* Nees parasitic on the pea aphid. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **71**, 339-351.
- Mackauer, M. & Finlayson, T. 1967. The hymenopterous parasites (Hymenoptera: Aphidiidae et Aphelinidae) of the pea aphid in eastern North America. *Canadian Entomologist*, **99**, 1051-1082.
- McAuslane, H. J., Vinson, S. B., & Williams H. J. 1990. Influence of host plant on mate location by the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environmental Entomology*, **19**, 26-31
- Němec, V. & Starý, P. 1985. Genetic diversity of the parasitoid *Aphidius ervi* on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* in Czechoslovakia (Hymenoptera: Aphidiidae; Homoptera, Aphididae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, **82**, 88-94.
- Pennacchio, F. 1989. The Italian species of the genus *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiidae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria "Filipo Silvestri"*, **46**, 76-106.
- Pennacchio, F. & Tremblay, E. 1987. Biosystematic and morphological study of two *Aphidius ervi* Haliday "biotypes" with a description of a new species. *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria "Filipo Silvestri"*, **43**, 105-117.
- Pfaus, J. G., Kippin, T. E. & Centeno, S. 2001. Conditioning and sexual behavior: a review. *Hormones and Behaviour*, **40**, 291-321.
- Powell, W. 1994. Němec and Starý's 'Population Diversity Centre' hypothesis for aphid parasitoids re-visited. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, **16**, 163-169.

- Powell, W. & Wright, A. F. 1988. The abilities of the aphid parasitoids *Aphidius ervi* Haliday and *A. rhopalosiphi* De Stefani Perez (Hymenoptera: Braconidae) to transfer between different host species and the implications for the use of alternative hosts in pest control strategies. *Bulletin of Entomological Research*, **78**, 683-693.
- Quicke, D. L. J. 1997. *Parasitic Wasps*. London, UK: Chapman & Hall.
- Ramirez, C. C., Fuentes-Contreras, E., Rodriguez, L. C. & Niemeyer, H. M. 2000. Pseudoreplication and its frequency in olfactometric laboratory studies. *Journal of Chemical Ecology*, **26**, 1426-1431.
- Robacker, D. C. & Hendry, L. B. 1977. Neral and geranial: components of the sex pheromone of the parasitic wasp *Itoplectis conquisitor*. *Journal of Chemical Ecology*, **3**, 563-577.
- Robacker, D. C., Weaver, K. M. & Hendry, L. B. 1976. Sexual communication and associative learning in the parasitic wasp *Itoplectis conquisitor*. *Journal of Chemical Ecology*, **2**, 39-48.
- Robson, G. C. & Richards, O. W. 1936. *The Variation of Animals in Nature*. London, UK: Longman, Green & Co.
- Rodríguez, L. C., Fuentes-Contreras, E. & Niemeyer, H. M. 2002. Effect of innate preferences, conditioning and adult experience on the attraction of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) toward plant volatiles. *European Journal of Entomology*, **99**, 285-288.
- Ruther, J., Homann, M. & Steidle, J. L. M. 2000. Female-derived sex pheromone mediates courtship behaviour in the parasitoid *Lariophagus distinguendus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **96**, 265-274.

- Scheiner, S. M. 1993. MANOVA: Multiple response variables and multispecies interactions. In: *Design and Analysis of Ecological Experiments* (Ed. by S. M. Scheiner & J. Gurevitch), pp. 94-112. New York, USA: Chapman & Hall.
- Starý, P. 1978. Seasonal relation between lucerne red clover, wheat and barley agro-ecosystems through the aphids and parasitoids (Homoptera, Aphididae: Hymenoptera, Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, **75**, 296-311.
- Starý, P. 1993. The fate of released parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiidae) for biological control of aphids in Chile. *Bulletin of Entomological Research*, **83**, 633-639.
- Starý, P., Gerding, M., Norambuena, H. & Remaudière G. 1993. Environmental research on aphid parasitoid biocontrol agents in Chile (Hym: Aphidiidae, Hom: Aphidoidea). *Journal of Applied Entomology*, **115**, 292-306.
- Takada, H. & Tada, E. 2000. A comparison between two strains from Japan and Europe of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **97**, 11-20
- Tremblay, E. & Pennacchio, F. 1988. Speciation in Aphidiine Hymenoptera (Hymenoptera: Aphidiidae). In: *Advances in Parasitic Hymenoptera Research* (Ed. by V. K. Gupta), pp. 139-146. Leiden, The Netherlands: E. J. Brill.
- Turlings, T. C. J., Wäckers, F. L., Vet, L. E. M., Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H. 1993. Learning of host-finding cues by Hymenopterous parasitoids In: *Insect Learning, Ecological and Evolutionary Perspectives* (Ed. by D. R. Papaj & A. C. Lewis), pp. 51-78. London, UK: Chapman & Hall.
- Unruh, T. R., White, W., Gonzáles D. & Luck R. F. 1983. Heterozygosity and effective size in laboratory populations of *Aphidius ervi* (Hym: Aphidiidae). *Entomophaga*, **28**, 245-258.

- Vet, L.E.M. & Groenewold, A.W. 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*, **11**, 3119-3135.
- Vet, L.E.M., Wäckers, F.L. & Dicke, M. 1991. How to hunt for hiding host: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*, **41**, 202-213.
- Wcislo, W. T. 1987. The role of learning in the mating biology of a sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae). *Behavioural Ecology and Sociobiology*, **20**, 179-189.
- Wcislo, W. T. 1992. Attraction and learning in mate-finding by solitary bees, *Lasioglossum* (Dialictus) *figueresi* Wcislo and *Nomia triangulifera* Vachal (Hymenoptera: Halictidae). *Ecology and Sociobiology*, **31**, 139-148.
- Woodson, J. C. 2002. Including "learned sexuality" in the organization of sexual behaviour. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, **26**, 69-80.
- Zúñiga, E. 1990. Biological control of aphids in the Southern cone of South America. In: *World Perspective in Barley Yellow Dwarf*. (Ed. by P. A. Burnett), pp. 362-367. Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT.

Table 1. Results of a repeated measured two-way ANOVA for the effects of Treatment (vanilla, virgin female, and vanilla + virgin female), Response (IR and TR), and their interaction (TxR) on three behavioural variables.

Source	DF	SS	MS	F	P
Gr. the antennae					
Treatment	2	1443.67	721.83	3.58	0.0369*
Response	1	318.47	318.47	1.6	0.2132
TxR	2	1555.51	777.75	3.91	0.0280*
Gr. the abdomen					
Treatment	2	675.54	337.77	0.95	0.3953
Response	1	350.54	350.54	1.16	0.2876
TxR	2	2555.95	1277.98	4.23	0.0213*
Wing fanning					
Treatment	2	10.91	5.45	4.85	0.0129*
Response	1	1.91	1.91	1.29	0.2633
TxR	2	20.72	10.36	6.99	0.0024*

Table 2. a) MANOVA of Treatment (HPC, virgin female, and HPC + virgin female), Response (IR or TR), Stimulus (alfalfa HPC or wheat HPC), and interaction effects on the different behaviours measured. b) Results of a repeated measured two-way ANOVA for the effects of treatment, response, stimulus used, and interaction effects on grooming the abdomen and wing fanning behaviours.

a) Multivariate test of significance

Effect	Wilk's Labda	F	Numerator DF	Denominator DF	P
Treatment	0.7508	42	712	1.07	0.3588
Response	1	7	151	0	1
T x R	0.6853	42	712	1.42	0.0431*
Stimulus	1	7	151	0	1
T x S	1	42	712	0	1
R x S	0.9909	7	151	0.2	0.9853
T x R x S	1	42	712	0	1

b) Two-Way Repeated Measures ANOVA

1-Grooming the abdomen

Effect	DF	SS	MS	F-Ratio	p
Treatment	6	10800.06	1800.01	1.68	0.1367
Stimulus	1	111.64	111.645	0.1	0.7477
T x S	6	0	0	0	1
Response	1	0	0	0	1
T x R	6	22311.05	3718.51	2.71	0.0192*
S x R	1	0	0	0	1
T x R x S	6	0	0	0	1

2-Wing fanning

Effect	DF	SS	MS	F-Ratio	p
Treatment	6	1.146	1.910	3.46	0.0043*
Stimulus	1	0.001	0.001	0.02	0.9005
T x S	6	0	0	0	1
Response	1	0	0	0	1
T x R	6	1.283	2.139	3.88	0.0019*
S x R	1	0	0	0	1
T x R x S	6	0	0	0	1

Figure 1. Time spent (mean and standard error) in vanilla volatiles stimulus arm (black bars) and in the only air control arm (white bars) by males before (IR) and after (TR) being exposed to only female, only vanilla or female plus vanilla treatments. Significant differences are marked with an asterisk ($p < 0.05$, paired t-test).

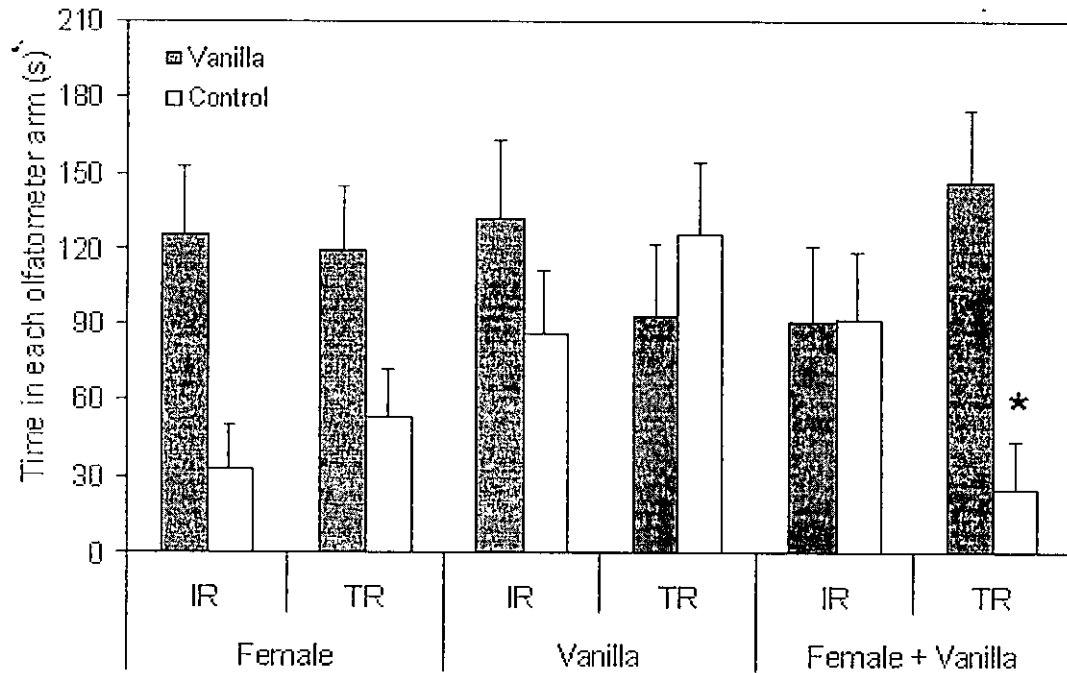


Figure 2. Difference of time spent (mean and standard error) performing grooming of the abdomen (A), grooming of the antennae (B) or wing fanning (C) between the olfactometer arm permeated by vanilla volatiles and only air control arm by males before (IR) and after (TR) being exposed to only female, only vanilla, or female plus vanilla treatments. Positive values show a predominant display of a given behaviour towards the vanilla volatiles arm, while negative values represent a predominant display of a given behaviour towards the only air control arm. Hatched lined bars represent initial response (IR), while grey bars represent trained response. Different letters correspond to statistically different results from the LSD *post-hoc* test.

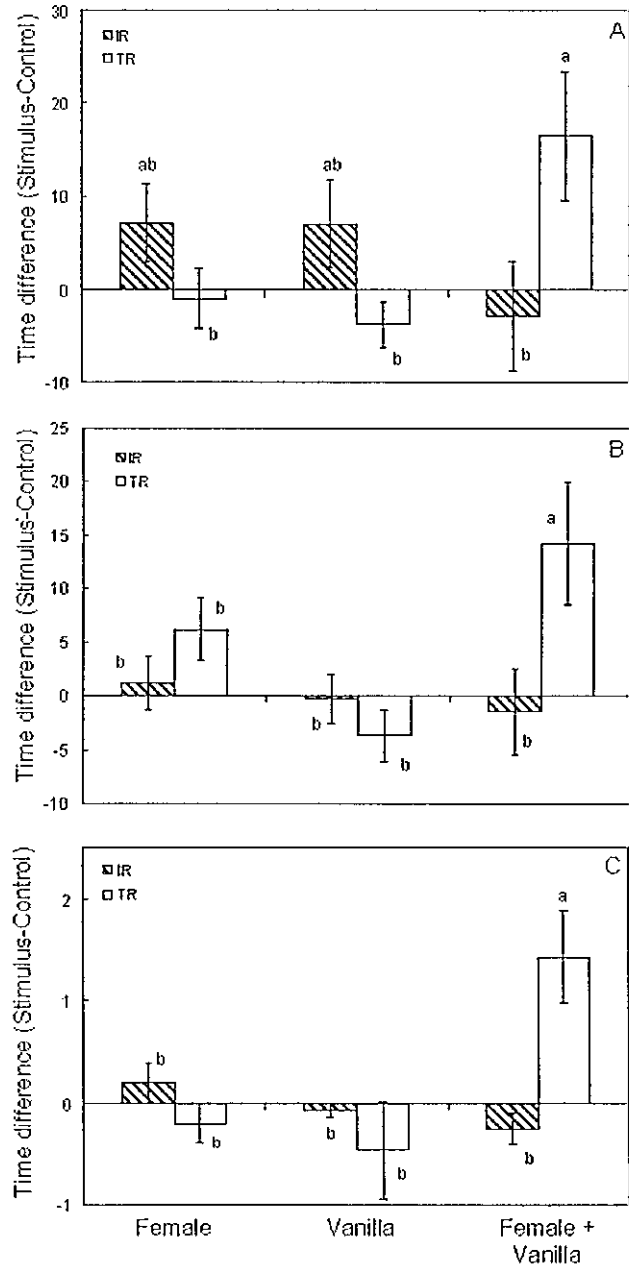


Figure 3. A: time spent (mean and standard error) in the olfatometer arms permeated by alfalfa HPC volatile blend arm (black bars) or only air control (white bars) before (IR) and after (TR) being exposed to female plus alfalfa HPC or female plus wheat HPC treatments, B: time spent (mean and standard error) in the olfatometer arms permeated by wheat HPC volatile blend (black bars) or only air control (white bars) by males before (IR) and after (TR) being exposed to female plus alfalfa HPC or female plus wheat HPC. Significant differences are marked with an asterisk ($p < 0.05$, paired t-test).

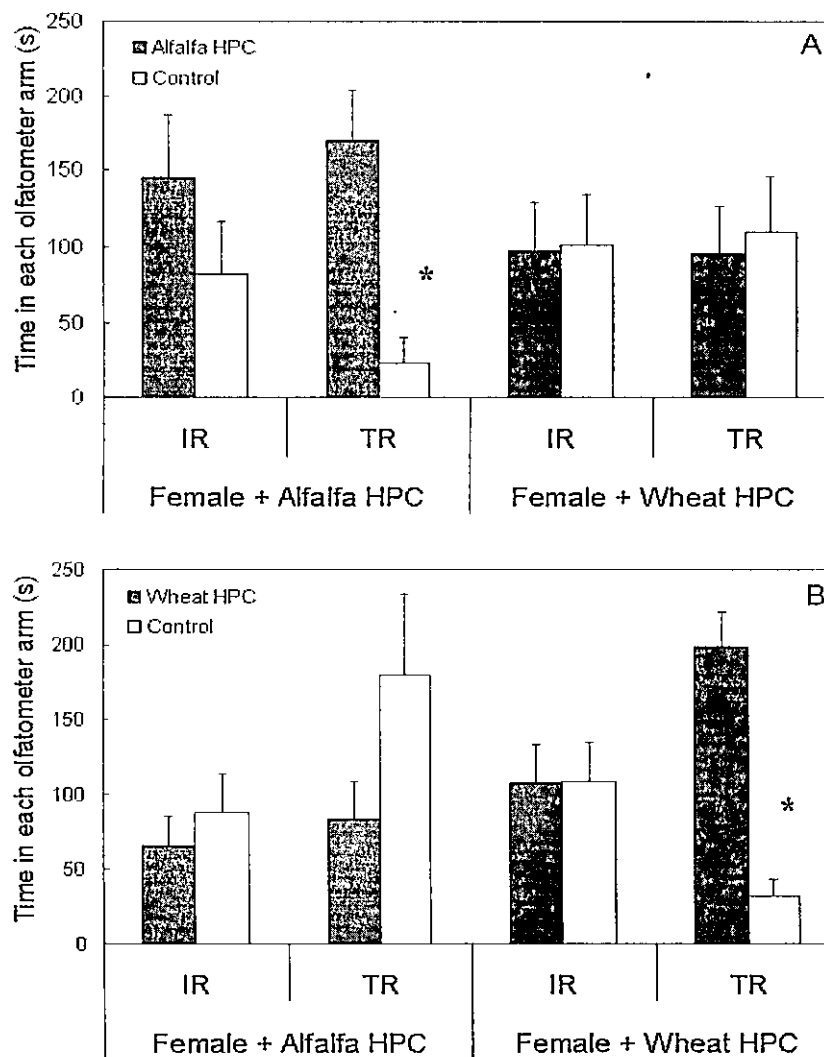
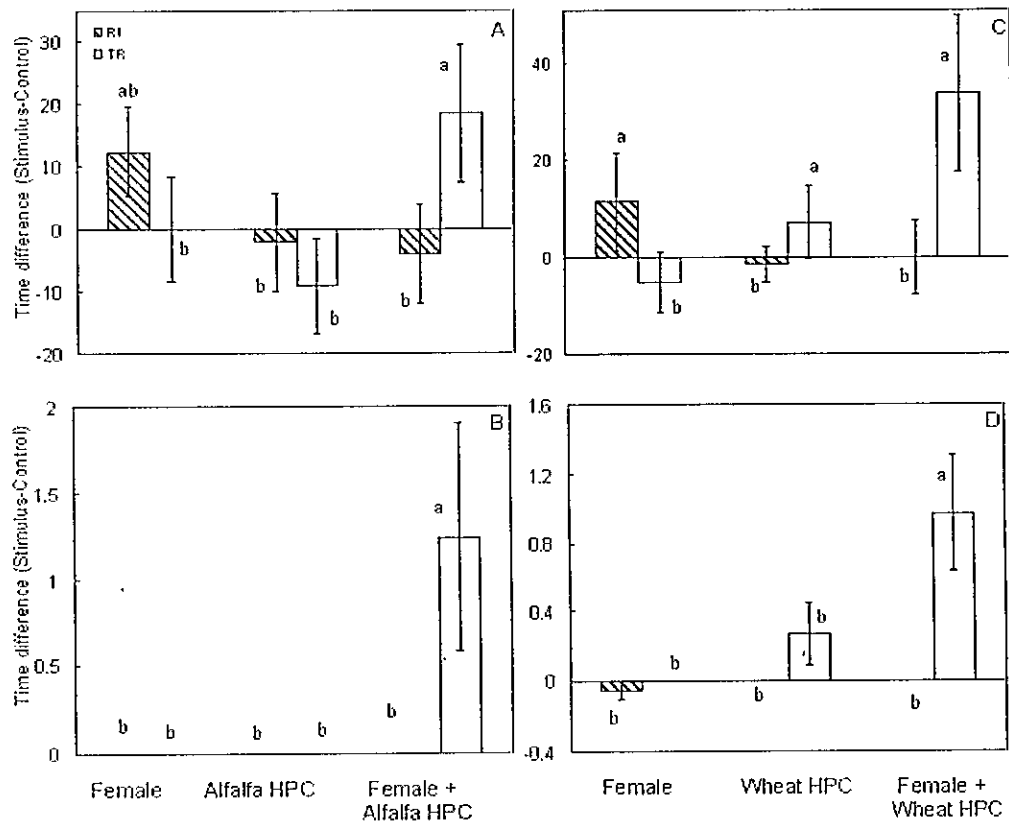


Figure 4. Difference of time spent (mean and standard error) performing grooming of the abdomen (A) or wing fanning (B) between the olfactometer arm permeated by alfalfa HPC volatile blend and the only soil control arm by males before (IR) and after (TR) being exposed to only female, only alfalfa HPC or female plus alfalfa HPC treatments. Positive values correspond to a bias towards the arm with alfalfa HPC volatile blend arm, while negative values correspond to a bias towards the only soil control arm. Graphs 3C and 3D represent difference of time spent (mean and standard error) performing grooming of the abdomen and wing fanning respectively, by males from female only, wheat HPC only or female plus wheat HPC treatments in an olfactometer with arms permeated by wheat HPC volatile blend and only soil control. Positive values represent a bias towards the wheat HPC volatile blend arm, while negative values represent a bias towards only soil control arm. Hatched bars represent initial response (IR), while grey lined bars represent trained response (TR). Different letters correspond to statistically different results from the LSD *post-hoc* test.



Capítulo 3

Effect of development environment and emergence experience on
the responses of male parasitoid imagoes of *Aphidius ervi*
(Hymenoptera: Aphidiidae), to virgin females and host-plant complex
volatiles

Cristian A. Villagra^{1,*}, Francesco Pennacchio² & Hermann M. Niemeyer¹

¹*Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de
Chile, Casilla 653, Santiago, Chile*

²*Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri", Università di
Napoli "Federico II", Italia*

* Corresponding author: Phone: +56 2 9787266; Fax: +56 2 9787445.

Email address: cavillagra@gmail.com

Abstract

Innate responses in insects is a controversial subject with respect to the role that experiential effects may play during early life sensitive stages. It has been suggested that experiences during the larval period do not influence the responses of the adult, and further that only the experiences faced by the imago during emergence constitute early experiences in parasitic wasps. In this work, we evaluated the effect of larval and eclosion experiences on the behavioural responses of the male adult parasitoid towards the host-plant complex (HPC) and towards volatiles from virgin females, in the koinobiont aphid endoparasitoid parasitoid *Aphidius ervi*. Two sources of variability were studied: host diet (normal diet = ND; artificial diet = AD), and extraction of the parasitoid larva from the parasitised aphid (extracted = EX; non-extracted = NE), and four treatments set up: ND/NE, ND/EX, AD/NE, and AD/EX. Glass Y-tube olfactometers were used to investigate the responses of adult *A. ervi* males when presented with a choice of odours (HPC vs. pot with soil, and odours from six virgin females vs. air only). Response variables were: proportion of time spent in each olfactometer arm, latency to choice, and proportion of time spent in antennating, running, grooming the abdomen, grooming the antennae, and wing fanning.

Differences observed between ND/NE and AD/NE treatments and between AD/NE and AD/EX treatments, as well as shorter latency in the ND/NE than in other treatments in experiments using HPC as stimuli show the importance of larval and eclosion environments, respectively, on the fidelity of the adults to the rearing environment. These findings demonstrate the pivotal role for parasitoid learning of experiences faced with during preimaginal and emergence periods. The preferential expression of wing fanning courtship behaviour in the ND/NE than in the AD/NE

treatment suggested the relevance of rearing environment on the triggering of courtship behaviour of males towards receptive females

The results stress the importance of considering that young adult responses are the result of a behavioural development process where both larval and eclosion stages constitute early life sensitive stages.

1. Introduction

Innate responses in insects is a controversial subject with respect to the role that experiential effects may play during early life sensitive stages (Gandolfi et al., 2003). Recent work on holometabolous insects has provided evidence supporting both larval (preimaginal conditioning: Tully et al., 1994; Rietdorf et al., 1999; Gandolfi et al., 2003) and early imago learning (e.g. chemical legacy: Barron & Corbet, 1999; van Emden, 2002).

Endoparasitoids represent a challenging system to test the occurrence of learning during early life sensitive stages, because they develop inside their host and may thus suffer cryptic experiences derived from the host, the host plant, or from other environmental cues (Turlings et al., 1992; Godfray, 1994; Vet et al., 1995). Thus, the time periods during which the larva develops until pupation and that in which the imago emerges from the aphid mummy may be considered as separated instances of experience acquisition which affect adult responses. However, some authors have suggested that experiences during the larval period do not influence the responses of the adult (i.e. van Emden et al., 1996; Barron & Corbet, 1999; Barron, 2001), and further that only the experiences faced by the imago during emergence constitute early experiences in parasitic wasps.

Under this scenario, no clear definition of "naïve" or "innate" responses of a recently emerged parasitoid is possible until experiments are designed which specifically address the role of experiences during the larval period in the ensuing behaviour of the adult parasitoid (Vet et al., 1995).

In this work, we evaluated the effect of larval and eclosion experiences on the behavioural responses of the male adult parasitoid towards the host-plant complex (HPC) and towards volatiles from virgin females.

The study was carried out with the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiidae), developing on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) Harris, feeding on broad bean, *Vicia faba* L., or on artificial diets. The paleoartic Aphidiinae wasp, *A. ervi*, is a solitary, oligophagous koinobiont endoparasitoid, mainly associated with Macrosiphinae aphids on legumes and related species (Mackauer & Finlayson, 1967; Němec & Starý, 1985; Takada & Tada, 2000). Learning from experience has been demonstrated for the *A. ervi* female in search for HPCs, both early in ontogeny (Daza-Bustamante et al., 2001) by chemical legacy, and also during adult life, where experiences reinforce the initial HPC preferences through associative learning (Turlings et al., 1992). Learning in this parasitoid is not constrained to host searching. Thus, Villagra et al. (2005) found that male sexual responses (usually expressed in the presence of females) can be conditioned to an odour (vanilla) which is not present in its natural environment. In the experiments, the conditioning stimulus initially did not elicit sexual-related behaviours neither in newly eclosed males nor in males with copulation experience only or exposed to vanilla fragrance only, but triggered strong sexual attractive responses (wing fanning) when males were trained to female plus vanilla odours. This illustrates the relative flexibility of parasitoid behaviours, and opens the door to the question about the origin,

nature, development, and plasticity of the behavioural responses of newly eclosed parasitoids to the host-plant environment and to sexual partners.

In the experiments we present herein, eclosion experience was manipulated by extracting or not third instar larvae of the parasitoid from the host. To evaluate how the first observable behavioural responses of emerging parasitoids match with the idea of innate response, we used as environmental stimuli the HPC as well as volatile compounds from normally-reared females.

2. Materials and Methods

2.1. Insects

Parasitoids were obtained from a laboratory culture maintained on pea aphids feeding on broad bean. For non-manipulative treatments experimental mummies were isolated in Petri dishes containing a wet piece of filter paper, and newly born insects were fed with water only.

2.2. Manipulation of host diet

The developmental environment of parasitoid larvae was altered through host diet. Reproductively synchronised pea aphids were reared either on broad bean plants (normal diet, ND treatment), or on artificial diets from the first instar (artificial diet, AD treatment) following Pennacchio et al. (2000). Third-instar aphids were parasitised by virgin parasitoid females.

2.3. Manipulation of parasitoid eclosion experience

Half of the parasitised aphids of each diet treatment group was dissected and the parasitoid larva extracted from them (EX treatment) when it was at the end of the third instar (ca. 7 days after oviposition at 20°C). Extracted larvae were maintained in petri dishes (at 20°C) with a 5 mm layer of agar. During pupation, the meconia were removed. The other half of the parasitoids from each diet treatment were not extracted (NE treatment) and they were isolated in petri dishes 24 h prior to eclosion.

These two sources of variability led to four possible treatment combinations: normal host diet / non-extracted larva (ND/NE), normal host diet / extracted larva (ND/EX), artificial diet / non-extracted larva (AD/NE), and artificial diet / extracted larva (AD/EX).

2.4. Olfactometer bioassays

Glass Y-tube olfactometers were used to investigate the responses of *A. ervi* males when presented with a choice of odours. Olfactometers utilised (9 cm-long tube and 6 cm-long arms) allowed parasitoids to explore both arms and move from one arm to the other. Olfactometers were changed after each test and cleaned successively with ethanol, odour-free soap, and distilled water. Pure air to feed into the stimulus chambers was obtained from an ultrapure synthetic air cylinder (Indura ®). The air flow during the tests was maintained at 250 ml/min, light intensity at 3600 lux, and temperature at 20 °C. Parasitoid behaviour inside the olfactometer was observed for 5 min. As measures of the effect of a stimulus, proportion of time spent in each olfactometer arm, latency to choice, and proportion of time spent in antennating,

running, grooming the abdomen, grooming the antennae, and wing fanning were recorded. Finally, the level of activity was defined as the number of behavioural transitions displayed by the wasp plus one. Bioassays were video-recorded and behavioural data were collected utilising the JWatcher software 0.9 © (Blumstein et al., 2000).

In order to test the effect of the larval developmental environment provided by the diet used, the imago eclosion environment given by the extraction manipulation, and the possible interaction of these factors, on the fidelity of the male parasitoid to its rearing HPC, male parasitoids from ND/NE, ND/EX, AD/NE and AD/EX treatments were tested in the olfactometer using a pot with soil (control) in one arm, and the HPC (3- week old broad bean plants with ca. 100 aphids of all instars) in the other.

In order to test the extent to which sexual responses such as attraction and sexual display (wing fanning) towards female-derived stimuli could be modified by host diet, eclosion and their possible interactions, male parasitoids from ND/NE, ND/EX, AD/NE and AD/EX treatments were tested in the olfactometer using odours from six virgin females (within 8h of eclosion) in one arm and air only (control) in the other.

The proportion of time spent in stimulus or control arms were compared using the paired t-test. When time spent in the olfactometer arms was not normal (ND/EX, AD/NE and AD/EX for soil control versus HPC comparison) data were transformed using arcsin square root transformation (Sokal & Rohlf, 1998). Measurements in the olfactometer were combined into a single variable, calculated as the differences between the proportions of time spent in the stimulus arm minus the control arm. The variable was labelled preference index. Hence, attraction towards the stimulus was represented by positive values of the preference index, while attraction towards the control appeared as negative values. Differences between treatments were analysed

with a two-way fixed effects MANOVA and *post hoc* unequal n HSD Tukey test for planned comparisons (for males tested with HPC) and LSD tests (for males tested with virgin females). Wing fanning responses were ranked and then analysed with two-way fixed effects ANOVA and *post hoc* LSD tests.

3. Results

3.1. Response to the odours of the HPC

Most males reared on normal diet and non-extracted (ND/NE, N=22) visited the stimulus arm (95%). These males spent more time in the HPC arm than in the control arm ($t = 2.72$, $p = 0.01$, paired t-test). Only 54 % of the extracted males reared on normal diet (ND/EX, N = 13) visited the stimulus arm, while 76% of the extracted males reared on artificial diet (AD/EX, N = 14) visited the stimulus arm. Both extraction treatment groups (ND/EX and AD/EX) did not show a significant preference in time spent in the olfactometer arms ($t = -0.87$, $p = 0.40$; and $t = 0.20$, $p = 0.85$, respectively, paired t-test) (Fig. 1), independent of the diet employed. Most males reared in artificial diets and non-extracted (AD/NE, N = 27) visited the stimulus arm (56 %), and they spent more time in the control than in the HPC arm ($t = -2.01$, $p = 0.05$, paired t-test).

A significant global effect was found for the interaction between host diet and eclosion experience ($F = 3.93$, $p < 0.001$, MANOVA) in the responses towards the HPC. This interaction produced also significant behavioural differences between the HPC and control arms for time in arm (Fig. 1), antennation (Fig. 2A), running (Fig. 2B), and latency to choice (Fig. 3), but not for grooming the abdomen (results not shown) (see also Table 1).

The level of activity did not differ between treatments in the factor diet ($df=1$, $F = 3.37$, $p = 0.07$) and extraction ($df = 1$, $F = 2.45$, $p = 0.12$), nor in the interaction between both factors ($df = 1$, $F = 2.14E-06$, $p = 0.99$; two-way fixed effects ANOVA).

3.2. Response to the odours of virgin females

For all treatments, males remained significantly more time in the female olfactometer arm than in the control arm ($t = 4.37$, $p = <0.001$, for ND/NE; $t = 3.36$, $p < 0.01$, for ND/EX; $t = 4.76$, $p = <0.001$, for AD/NE ; and $t = 8.74$, $p < 0.001$, for AD/EX, paired t-test) (Fig. 4). All males from the ND/NE ($N = 13$), AD/NE ($N = 11$), and AD/EX ($N = 11$) treatments visited the arm of the olfactometer with odours from virgin females, while the percentage of males responding to this stimulus was only slightly reduced in the ND/EX treatment (90 %, $N = 10$). Differences between proportions of time devoted to wing fanning behaviour (Table 2) showed a significant effect of the interaction between diet and extraction (two-way ANOVA, $F = 4.56$, $p = 0.04$). Parasitoids from the ND/NE treatment displayed significantly more wing fanning inside the female olfactometer arm than those from the AD/NE treatment (post hoc LSD test, $p = 0.03$). Extraction did not significantly affect this behaviour (Fig. 5).

4. Discussion

The difference observed between ND/NE and AD/NE treatments in experiments using HPC as stimuli (Fig.1) show the importance of larval environment on the fidelity of the adult to the rearing environment, while the contrasting behaviours observed between AD/NE and AD/EX treatments (Fig.1) show the importance of eclosion

environment on the fidelity of the adults to the rearing environment. These findings demonstrate the pivotal role for parasitoid learning of experiences faced with during preimaginal and emergence periods, as has been documented by other authors (i.e. Gandolfi et al., 2003). Fidelity to the rearing environment is also demonstrated by the shorter latency observed in the ND/NE than in other treatments (Fig. 3). As total activity was not affected by the treatments performed, no other physiological difference was associated with the trends found. However, the examination of olfactory receptors in parasitoids derived from normal and artificial diets would be desirable in order to avoid sensory structure plasticity effects.

Neither extraction of the larva nor change in rearing diet generated relevant changes in the time spent by males in the olfactometer arm with virgin female odours (Fig. 4). However, the wing fanning courtship behaviour was preferentially expressed in the ND/NE than in the AD/NE treatment (Fig. 5). This latter result suggests the relevance of rearing environment on the triggering of courtship behaviour of males towards receptive females.

The relevance of early sensitive stages in parasitoid learning not only is related to the acquisition of attractive responses towards the olfactive cues derived from the HPC rearing environment but also towards an array of environmental cues presented during parasitoid adult life. This is suggested by the differences in the responses of AD/EX and AD/NE males towards HPC (Fig. 1). This does not mean that all behaviours of parasitoids derive from learning, but that the responses are generated by an ontogenetic process of behavioural development (Lerhman, 1970). During the ontogenetic development of behaviour, any emergent trait is built into pre-existing cognitive conditions (Schneirla, 1956; Bonner, 1988; Wcislo, 1989).

It thus seems that responses acquired through early learning, independent of the underlying mechanism, are relevant "anchors" as unconditioned stimuli in adult associative learning as in, for example, male searching for females or females searching for an oviposition host. This is strongly suggested by the differences found for male courtship behaviour by Villagra et al. (2005), who demonstrated that male adults are capable of learning a novel cue (vanilla) by associating it with the presence of female; in those experiments, conditioned males displayed wing fanning in the presence of the training stimulus, a response that "anchored" the attraction towards the new stimulus. Given the present results, we believe that this anchor is only possible as a result of a given sequence of experiences presented during the larval and emergence stages. It would be desirable to design finer-grain experiments in order to characterise the precise instances when experiences of the larva end up affecting ensuing adult ability to recognise the HPC and conspecifics.

Innate behaviour is usually defined in terms of early responses under "natural conditions". However, the level of "innateness" that could be attributed to a given response also depends on the nature of the stimulus presented (compare Figs. 1 and 4). In our system, the response towards the HPC was more labile than the response towards females, supporting the idea of the existence of different degrees of "innateness" for initial responses (Papaj & Lewis, 1993). Hence, the general attraction of males to female volatiles (Fig. 4) seems to be highly canalized (*sensu* Tierney, 1986). In this sense, the "innateness" of a response should always refer to a stimulus-response pair. Furthermore, it is worth noting that male courtship behaviour, i.e. wing fanning, seems to be influenced by early life environment, since males displayed more wing fanning in the ND/NE treatment than in the other treatments, although this

tendency was significant only with respect to AD/NE males due to the high variability of the data (Fig. 5).

While not neglecting the relevant role that genetics may play in insect behavioural development, it does not seem useful to use the term "innate" to refer to the behavioural responses which develop before emergence of an adult holometabolous insect from pupation. This is supported by the growing literature that demonstrates the existence of different degrees of conservation of memory through metamorphosis (Borsellino et al., 1970; Carlin & Schwartz, 1989; Tully et al., 1994; Rietdorf & Steidle, 1999; Gandolfi et al., 2003), and the clear evidences of early adult learning of surrounding environmental cues at emergence (Caubet & Jaisson, 1991; Barron & Corbet, 2000; van Emden et al., 2002). It would be more useful to recognise that many insect behavioural traits may involve the response to different environmental contexts prevailing at different ontogenetic stages (i.e. behaviour develops!), and that this process occurs in an insect life style-dependent way. As behaviour develops, it is necessary to realise that responses are not discrete and autonomous units of behaviour, but rather emerge ontogenetically in a complex interactive process between the organism and the environment. We suggest the use of the term "initial response" of the imago for the first recordable behavioural response of the adult insects, rather than "naïve" or "innate" response, given the complexity of the behavioural developmental process.

The study of parasitoid initial responses derived from larval and eclosion experiences may help explain many characteristics of the parasitic life style. The environment where the larva is to develop is determined by the preferences of the mother parasitoid, and the offspring cannot avoid this early environmental context. Thus, if larval and eclosion experiences can affect behavioral preferences during

adulthood, this could imply a transgenerational reiteration of environmental cues (Corbet, 1985; West & King, 1987; Bateson, 1988) which could be related with the inheritance of environmental effects (Rossiter, 1996) due to early learning and parental behaviour (Bernardo, 1996; Wcislo, 1989). Whether behavioural changes during ontogeny, as shown for the larval and adult stages, are related to the maintenance of parasitoid host range and specificity, remains to be explored.

Acknowledgements

This study received financial support from CONICYT, Universidad de Chile, and MECESUP. CAV is grateful to CONICYT for a doctoral fellowship and a research grant (AT-4040221), to Universidad de Chile for thesis financial support (N° 31-2004), and to MECESUP for a travel grant to visit the Dipartimento di Biologia, Università della Basilicata at Potenza, where the experiments described were started. CAV is also indebted to people in the laboratory in Potenza and in the Laboratorio de Química Ecológica at Universidad de Chile, to Decenio Evolutionary Biology Discussion Group, and to Macarena Faunes for valuable suggestions.

References

- Bateson, P., 1988. The active role of behaviour in evolution. In: M-W Ho, and S. Fox (eds.) *Process and Metaphors in the New Evolutionary Paradigm*, Wiley, Chichester, pp.191-207.
- Barron, A.B., 2001. The life and death of Hopkins' host selection principle. *Journal of Insect Behavior* 14, 725-737.

- Barron, A.B., Corbet, S.A., 1999. Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. *Animal Behaviour* 58, 621-628.
- Barron, A.B., Corbet, S.A., 2000. Behavioural induction in *Drosophila*: timing and specificity. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94, 159-171.
- Bernardo, J., 1996. Maternal effects in animal ecology. *American Zoologist* 36, 83-105.
- Blumstein, D. T., Evans, C. S., Daniel, J. C. 2000. JWatcher 0.9. An Introductory User's Guide. Animal Behaviour Laboratory, Macquarie University, Australia:
<http://galliform.psy.mq.edu.au/jwatcher/>
- Bonner, J.T., 1988. *The Evolution of Complexity*. Princeton University Press, Princeton.
- Borsellino, A.P., Pierantoni, R., Schieti-Cavazza, B., 1970. Survival in adult mealworm beetles (*Tenebrio molitor*) of learning acquired at the larval stage. *Nature* 225, 963-964.
- Carlin, N.F., Schwartz, P.H., 1989. Pre-imaginal experience and nestmate brood recognition in the carpenter ant, *Camponotus floridanus*. *Animal Behaviour* 38, 89-95.
- Caubet, Y., Jaisson, P., 1991. A post eclosion early learning involved in host recognition by *Dinarmus basalis* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae). *Animal Behaviour* 40, 977-980.
- Corbet, S.A., 1985. Insect chemosensory responses. A chemical legacy hypothesis. *Ecological Entomology* 10, 143-153.
- Daza-Bustamante, P., Fuentes-Contreras, E., Rodriguez, L.C., Figueroa, C.C., Niemeyer, H.M., 2002. Behavioural differences between *Aphidius ervi* populations from two tritrophic systems are due to phenotypic plasticity. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104, 321-328.

- Gandolfi, M., Mattiacci, L., Dorn, S., 2003. Preimaginal learning determines adult responses to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society of London, B Series* 270, 2623-2629.
- Godfray, H.C.J., 1994. *Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Lehrman, D.S., 1970. Semantic and conceptual issues in the nature-nurture problem. In: L. Aronson, E. Tobach, D.S. Lehrman, and J. Rosenblatt (eds.) *Development and Evolution of Behavior*. Freeman, San Francisco, pp. 17-52.
- Mackauer, M., Finlayson, T., 1967. The hymenopterous parasites (Hymenoptera: Aphidiidae et Aphelinidae) of the pea aphid in eastern North America. *Canadian Entomologist* 99, 1051-1082.
- Němec, V., Starý, P., 1985. Genetic diversity of the parasitoid *Aphidius ervi* on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* in Czechoslovakia (Hymenoptera: Aphidiidae; Homoptera, Aphididae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 82, 88-94.
- Papaj, D.J., Lewis, A.C., 1993. *Insect Learning. Ecological and Evolutionary Perspectives*, Chapman & Hall, New York.
- Pennacchio, F., Farneti, R., Digilio, M.C., Fanti, P., de Eguileor, M., 2000. Rearing hymenopterous larval parasitoids of aphids on artificial diets. XXI International Congress of Entomology, Foz de Iguaçu, Brazil, August 20–26, 2000. Abstract no. 1427.
- Rietdorf, K., Steidle, J.L.M., 1999. Was Hopkins right? Influence of larval experience and early adult experience on the olfactory response in the granary weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera, Curculionidae). *Physiological Entomology* 27, 223-227.

Rossiter, M., 1996. Incidence and consequence of inherited environmental effects.

Annual Review of Ecology and Systematics 27, 451-476.

Schneirla, T.C., 1956. Interrelationships of the "innate" and the "acquired" in the instinctive behaviour. In: P. Grassé (ed.). *Instinct dans le comportement des animaux et de l'homme*. Masson et Cie, Paris, pp. 131-187.

Sokal, R., Rohlf, J. F., 1998. *Biometry, the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Company. New York.

Starý, P., Gerding, M., Norambuena, H., Remaudière, G., 1993. Environmental research on aphid parasitoid biocontrol agents in Chile (Hym: Aphidiidae, Hom: Aphidoidea). *Journal of Applied Entomology* 115, 292-306.

Takada, H., Tada, E., 2000. A comparison between two strains from Japan and Europe of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97, 11-20.

Tierney, A.J., 1986. The evolution of learned and innate behaviour: contributions from genetics and neurobiology to a theory of behavioral evolution. *Animal Learning Behavior* 14, 339-348.

Tully, T., Cambiazo, V., Kruse, L., 1994. Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 14, 68-74.

Turlings, T.C.J., Wäckers, F.L. Vet, L.E.M., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H., 1992. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: D. R. Papaj, and A. C. Lewis (eds.). *Insect Learning, Ecological and Evolutionary Aspects*, Chapman & Hall, New York, pp. 51-78.

van Emden, H.F., Sponagl, B., Wagner, G., Baker, T., Ganguly, S., Douloumpaka, S., 1996. Hopkins' 'host selection principle', another nail in its coffin. *Physiological Entomology* 21, 325-328.

- van Emden, H.F., Eletherianos, I., Rose, J. Douloupaka, S., Pettersson J., 2002. Aphid parasitoid detect that an alien plant was present nearby during their development. *Physiological Entomology* 27, 199-205.
- Vet, L.E.M., Lewis, W.J., Cardé, R.T., 1995. Parasitoid foraging and learning. In: R.T. Cardé, and W.J. Bell (eds.). *Chemical Ecology of Insects 2*. Chapman & Hall, New York, pp. 65-101.
- Villagra, C.A., Vásquez, R.A., Niemeyer, H.M., 2005. Associative odour learning affects mating behaviour in *Aphidius ervi* males (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology* 102, 557-559.
- Wcislo, W.T., 1989. Behavioral environments and evolutionary change. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20, 137-169.
- West, M.J., King, A.P., 1987. Settling nature and nurture into an ontogenetic niche. *Developmental Psychobiology* 20, 549-562.

Table 1.

Significant effects from a two-way fixed effects MANOVA for behavioural responses exhibited by *A. ervi* males allowed to choose between HPC and soil only odours in a Y-tube olfactometer.

	Effect	DF	MS	F	p
Behaviour					
Antennation	Host diet*Extraction	1	0.07	6.78	0.01
Running	Host diet*Extraction	1	0.68	4.82	0.03
Time in Arm	Host diet*Extraction	1	1.56	5.17	0.03
Latency to Choice	Host diet*Extraction	1	0.58	4.53	0.04

Table 2.

Summary of two-way ANOVA results on the wing fanning behaviour of *A. ervi* males allowed to choose between odours from virgin females and air only in a Y-tube olfactometer.

Effect	DF	MS	F	p
Host Diet (D)	1	142.1	1.16	0.29
Extraction (E)	1	4.2	0.03	0.85
D*E	1	557.2	4.55	0.04

Fig. 1. Proportion of time (mean with standard error) spent by *A. ervi* males in the HPC olfactometer arm (black bars) and control arm (white bars) for each treatment. Treatments are combinations of host diet and eclosion experience manipulation. ND= parasitoids developed in normally reared aphids; AD= parasitoids developed in aphids reared on artificial diets; NE= parasitoid larvae not extracted from the host; and EX= parasitoid larva extracted from the host. An asterisk denotes paired t-test significant differences between stimulus and control within each treatment.

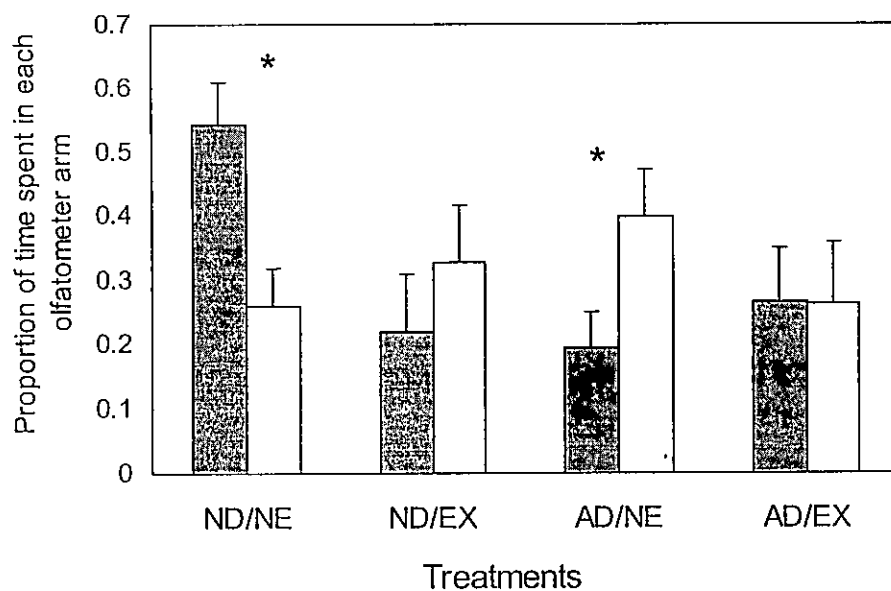


Fig. 2. Differences (mean with standard error) between the proportions of time spent in each arm performing antennation (A) and running (B) behaviours by *A. ervi* male parasitoids offered the choice between host plant complex and soil only odours in a Y-tube olfactometer. X axis shows host diet treatments. Eclosion experience manipulation: grey bars represent non-extraction of the parasitoid larvae from the host (NE), and white bars represent extracted larvae (EX).

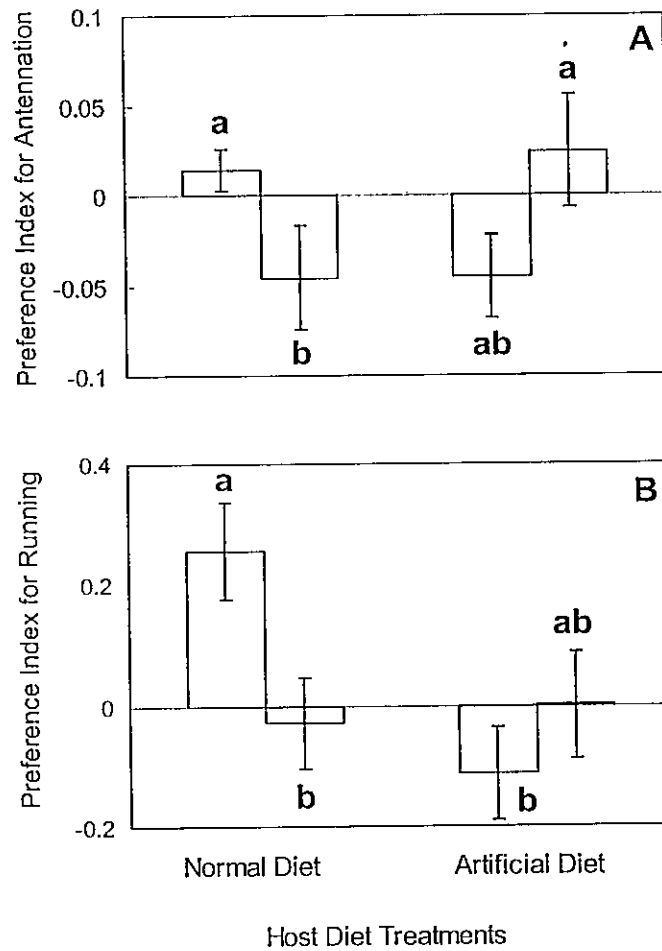


Fig. 3. Latency to choice, i.e. time (mean with standard error) elapsed until the first preference between olfactomer arms by *A. ervi* males offered the choice between odours from the HPC and from soil only (control). X axis shows host diet treatments. Eclosion experience manipulation: hatched bars represent non-extraction of the parasitoid larvae from the host (NE), and white bars represent extracted larvae (EX).

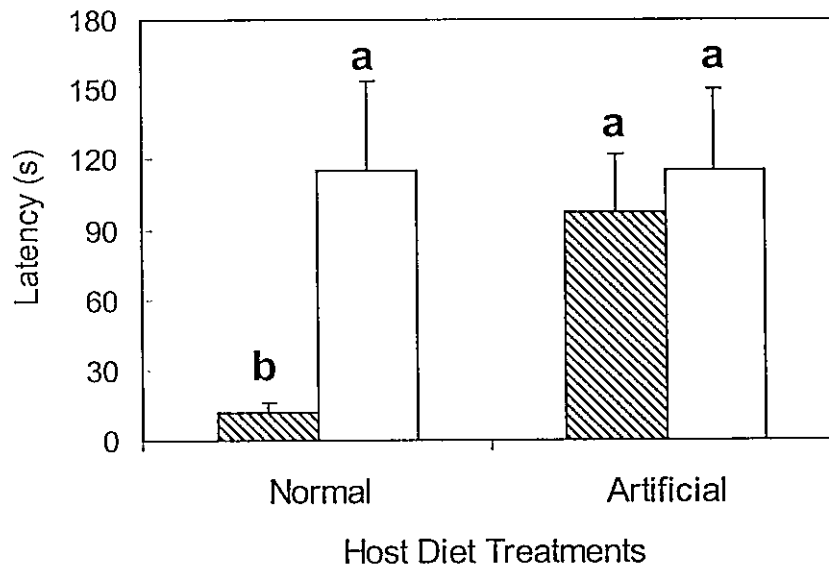


Fig. 4. Proportion of time (mean with standard error) spent by *A. ervi* males in the virgin females olfactometer arm (black bars) and control arm (white bars) for each treatment. Treatment are combinations of host diet and eclosion experience manipulation. ND= parasitoids developed in normally reared aphids; AD= parasitoids developed in aphids reared on artificial diets; NE= parasitoid larvae not extracted from the host; and EX= parasitoid larva extracted from the host. An asterisk denotes paired t-test significant differences between stimulus and control arms within each treatment.

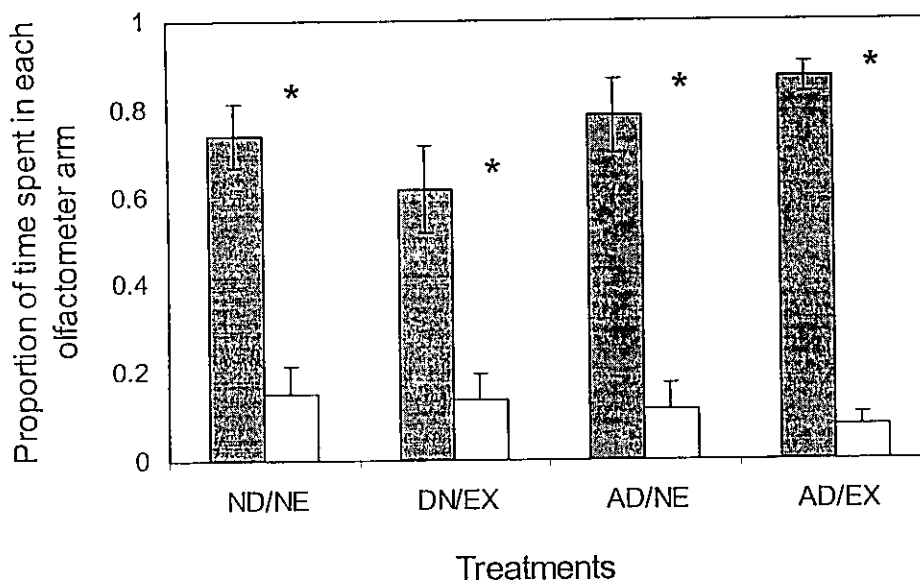


Fig. 5. Differences (mean with standard error) between the proportions of time spent in each arm performing wing fanning towards virgin females by male parasitoids offered the choice between odours from six virgin females and from air only (control) in a Y-tube olfactometer. X axis shows host diet treatments. Eclosion experience manipulation: grey bars represent non-extraction of the parasitoid larvae from the host (NE), and white bars represent extracted larvae (EX).

