



**“EL COCCINÉLIDO INVASOR *HARMONIA AXYRIDIS*, ¿UN HOSPEDERO MENOS  
ADECUADO PARA EL PARASITOIDE *DINOCAMPUS COCCINELLAE* QUE  
*ERIOPIS CHILENSIS* E *HIPPODAMIA VARIEGATA*?”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de:

**Bióloga con mención en Medio Ambiente.**

**Violeta Romero Gamba**

Directora del Seminario de Título: Audrey Alejandra Grez Villarroel

Co-Directora del Seminario de Título: Tania Zaviezo Palacios

Abril 2018

Santiago - Chile

## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta). Violeta Romero Gamba**

**“EL COCCINÉLIDO INVASOR *HARMONIA AXYRIDIS*, ¿UN HOSPEDERO MENOS ADECUADO PARA EL PARASITOIDE *DINOCAMPUS COCCINELLAE* QUE *ERIOPIIS CHILENSIS* E *HIPPODAMIA VARIEGATA*?”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente.

MSc. Audrey Alejandra Grez Villarroel  
**Directora Seminario de Título:**

Dra. Tania Zaviezo Palacios  
**Co-Directora del Seminario de Título:**

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:** \_\_\_\_\_

**Evaluador:** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, .....

## Biografía



Violeta Romero Gamba nació la noche del 22 de junio de 1989 en la ciudad de Bogotá - Colombia, siendo la primera de dos amados hijos. A los 12 años tuvo que migrar a Chile junto a su madre y hermano, lugar donde terminó de cursar su enseñanza básica y parte de la educación media. Cansada del sistema escolar y con la idea de buscar nuevas maneras para adquirir experiencia y conocimiento decidió trasladarse a Venezuela y finalizar sus estudios en casa presentando exámenes libres. Durante toda su niñez tuvo una gran cercanía con la vida en el campo y la plenitud que entrega la naturaleza por lo que decide iniciar sus estudios en Biología, sin embargo, un nuevo vuelco en la vida de la familia la lleva a decidir regresar a Chile. En el 2012 reinicia sus estudios, ingresando a la Universidad de Chile a la carrera de Biología ambiental y hoy en día está iniciando el Magister en Ciencias Biológicas de esta misma universidad.

*Dedicado a Elvira Gamba y Camilo Romero, por inspirar en muchos la búsqueda de la rectitud, la justicia y el profundo amor por la vida.*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quisiera darle gracias a Dios por que la comprensión de su grandeza me inspira cada día. Agradezco a mis padres por la sabiduría de sus consejos, su apoyo y amor incondicional. A mi familia en Chile, Jairo, Deicy, Luna y Alejandro y a mis hermanas Claudia y Neobelly, gracias por su amor y compañía durante estos años. A Sebastián Jiménez por ser el mejor compañero, gracias por tu amor, paciencia y complicidad en este proceso. A los amigos con los que pasé muchos de los momentos más bonitos y no tan bonitos de la universidad, María Luisa, Daniela, David, Francisca e Ignacio, a mi eterna compañera de trabajos Constanza y a todos los que durante estos años en la facultad compartimos largas horas de estudio, nervios de presentaciones, malas notas y uno que otro momento de diversión extracurricular.

Agradezco a la profesora Alejandra Gonzales por su apoyo, consejos y por incluirme en su trabajo durante la carrera.

Agradezco de manera especial a las profesoras Audrey Grez y Tania Zaviezo por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su rigurosidad, dedicación y apoyo constante como guías de este trabajo. A Elizabeth Gazzano por su solidaridad más allá de lo laboral y por recibirnos siempre con una sonrisa. Agradecer también a todos mis compañeros del LEAF.

Agradezco a las chinitas nativas e introducidas, a las plantas de les dan un hogar y los pulgones que las sustentan, a todos los seres vivos que participan de este tipo de estudios y a todos los seres vivos del planeta que sufren por nuestra ignorancia y llenan mis sueños como bióloga.

Agradezco el financiamiento de esta tesis a través del proyecto FONDECYT 1140662.

## Índice de contenido

Biografía .....	¡Error! Marcador no definido.
Agradecimientos.....	¡Error! Marcador no definido.
Índice de contenido .....	¡Error! Marcador no definido.
Índice de tablas .....	¡Error! Marcador no definido.
Índice de figuras .....	¡Error! Marcador no definido.
Resumen .....	¡Error! Marcador no definido.
Abstract .....	¡Error! Marcador no definido.
Introducción.....	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo General .....	¡Error! Marcador no definido.
Objetivos específicos .....	¡Error! Marcador no definido.
Materiales y Métodos .....	¡Error! Marcador no definido.
Resultados .....	¡Error! Marcador no definido.
Discusión.....	¡Error! Marcador no definido.
Conclusiones.....	¡Error! Marcador no definido.
Bibliografía .....	¡Error! Marcador no definido.

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Porcentajes de formación de pupa, parasitoidismo exitoso, desarrollo larval fallido, parasitados y parasitados con desarrollo larval fallido por parte de <i>D. coccinellae</i> en cada una de las especies capturadas en campos de alfalfa. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de oviposición por parte de <i>D. coccinellae</i> en las especies expuestas en condiciones de laboratorio. ....	16
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de formación de pupa, parasitoidismo exitoso, desarrollo larval fallido y parasitados por parte de <i>D. coccinellae</i> en cada una de las especies expuestas en condiciones de laboratorio. ....	17

**Índice de figuras**

**Figura 1.** Ciclo de vida de *Dinocampus coccinellae* ..... 7



## Resumen

Uno de los factores que favorecen el éxito de una especie invasora es la ausencia de control por parte de enemigos naturales en los lugares invadidos, como lo predice la Hipótesis del Escape de Enemigos Naturales. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) invadió el país recientemente, dominando en cultivos de alfalfa en Chile central, donde coexiste con *Hippodamia variegata*, otra especie introducida, y *Eriopsis chilensis*, especie nativa, las cuales disminuyeron su abundancia luego de la llegada de *H. axyridis*. Un enemigo natural de coccinélidos es el parasitoide *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae), el cual está presente en varias regiones del mundo, incluido Chile. El éxito de la parasitación de *D. coccinellae* puede fluctuar considerablemente dependiendo de la especie de coccinélido. En otras regiones, *H. axyridis* ha sido catalogada como un hospedero menos adecuado para *D. coccinellae* en comparación con especies de coccinélidos nativas en la zona invadida, sugiriendo distintos mecanismos por medio de los cuales esta especie podría evitar el desarrollo exitoso de este parasitoide y, por lo tanto, presentar una menor proporción de individuos afectados por este enemigo natural. El presente estudio buscó dilucidar si *H. axyridis* es un hospedero menos adecuado para *D. coccinellae* en comparación con *H. variegata* y *E. chilensis*. Para esto se compararon la formación de pupa del parasitoide, parasitoidismo exitoso (i.e. emergencia de parasitoide adulto), desarrollo larval fallido (i.e. parasitoidismo con muerte de larva) y parasitoidismo total (i.e. formación de pupa del parasitoide o desarrollo larval fallido) en las tres especies de coccinélidos, capturados en campos de alfalfa en la Región Metropolitana y mantenidos en laboratorio. Además, individuos criados en el laboratorio fueron expuestos al parasitoide para comparar en las tres especies la oviposición por parte del

parasitoide y, al igual que en campo, la formación de pupa del parasitoide, parasitoidismo exitoso, desarrollo larval fallido y parasitoidismo total. En campo, *H. axyridis* presentó menor parasitoidismo exitoso (7 %) que *H. variegata* (33 %) y *E. chilensis* (36 %), además, *H. axyridis* fue la única especie en que el porcentaje desarrollo larval fallido fue mayor al porcentaje de parasitoidismo exitoso. En condiciones de laboratorio los resultados fueron similares ya que *D. coccinellae* nunca ovipuso en *H. axyridis*, en cambio sí lo hizo en *H. variegata* (40%) y *E. chilensis* (33%), obteniéndose eventos de formación de pupa, parasitoidismo exitoso y desarrollo larval fallido en laboratorio sólo en estas últimas. Esto indicaría que *H. axyridis* en Chile, al igual que en otras latitudes, sería un hospedero menos adecuado para el parasitoide *D. coccinellae* en comparación con las otras especies, nativas e introducidas, abundantes en campos de alfalfa, lo que podría constituir una ventaja para su establecimiento y dominancia en este ecosistema.

### Abstract

One of the factors favoring the success of an invasive species is the absence of control by natural enemies in the invaded areas, as predicted by the Enemy Release Hypothesis. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) recently invaded the country, dominating alfalfa fields in central Chile, where it coexists with *Hippodamia variegata*, another introduced species, and *Eriopsis chilensis*, a native species, both decreasing in abundance after the arrival of *H. axyridis*. A natural enemy of coccinellids is the parasitoid *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae), which is present in several regions of the world, including Chile. The success of *D. coccinellae* parasitization can fluctuate considerably depending on the species of coccinellid. In other regions, *H. axyridis* has been classified as a less suitable host for *D. coccinellae* compared to native coccinellid species in the invaded area, suggesting different mechanisms by which this species could prevent the successful development of this parasitoid, and, therefore, present a lower proportion of individuals affected by this natural enemy. The present study attempted to elucidate whether *H. axyridis* is a less suitable host for *D. coccinellae* compared to *H. variegata* and *E. chilensis*. For this purpose, parasitoid pupa formation, successful parasitism (i.e. adult parasitoid emergence) and failed larval development (i.e. parasitism with larval death) were compared in the three coccinellid species, from insects captured in alfalfa fields in the Metropolitan Region and maintained in the laboratory. In addition, individuals reared in the laboratory were exposed to the parasitoid to compare parasitoid oviposition and, as in the field, parasitoid pupa formation, successful parasitism and failed larval development in all three species. In the field, *H. axyridis* had less successful parasitism (7%) than *H. variegata* (33%) and *E. chilensis* (36%), in addition, *H. axyridis* was the

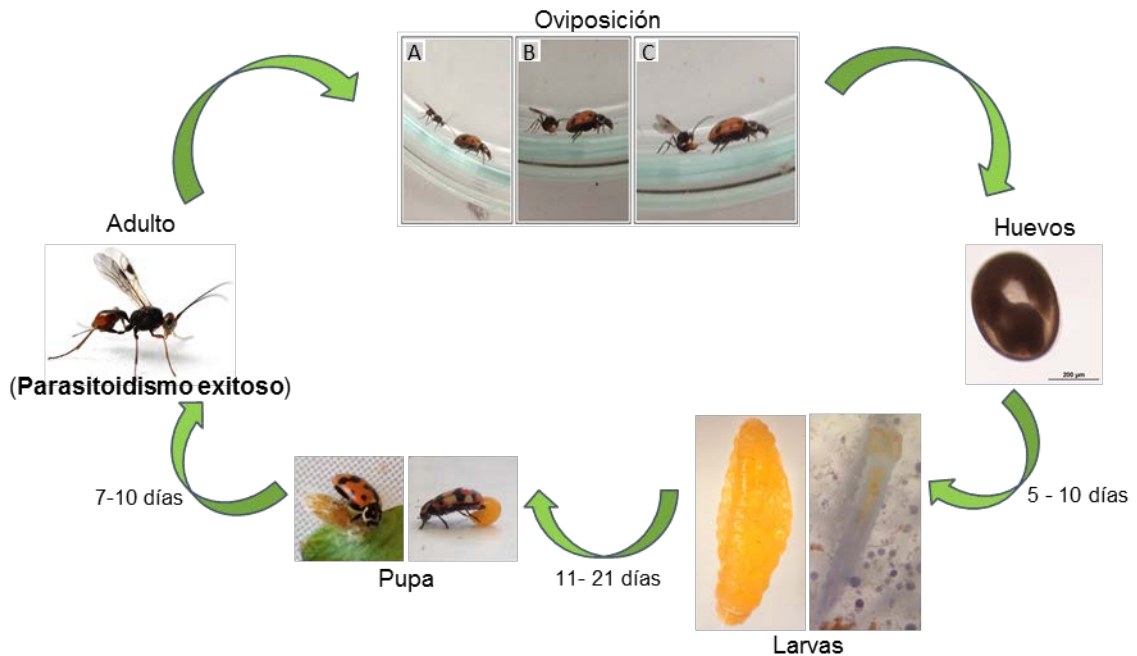
only species in which the percentage of failed larval development was greater than the percentage of successful parasitism. In laboratory conditions, the results were similar, since *D. coccinellae* never oviposited in *H. axyridis*, while it did in *H. variegata* (40%) and *E. chilensis* (33%), obtaining events of pupa development, successful parasitism and failed larval development in the laboratory species. This would indicate that *H. axyridis* in Chile, as in other regions, would be a less suitable host for the parasitoid *D. coccinellae* compared to the other most abundant native and introduced species in alfalfa fields, which could be an advantage for its establishment and dominance in this ecosystem.

## Introducción

En comunidades de coccinélidos de Chile central, la abundancia relativa de especies exóticas ha aumentado significativamente producto de la perturbación de su ecosistema (Grez y col., 2013). Dentro de estas, la chinita arlequín, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) se considera una especie invasora de gran éxito a nivel mundial. Es originaria de Asia, pero ahora está establecida en todos los continentes, con excepción de la Antártica (Roy y col., 2016; Camacho-Cervantes y col., 2017). En América del Sur, *H. axyridis* se introdujo para el control biológico a finales de los '80 en varios países, pero también de manera accidental, reportándose el 2003 las primeras poblaciones silvestres en Chile (Grez y col., 2010). Hoy en día está ampliamente distribuida entre las regiones IV y X, siendo especialmente abundante en cultivos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Fabaceae), donde coexiste con otros coccinélidos como la nativa *Eriopis chilensis* Hofmann y la exótica *Hippodamia variegata* (Goeze), introducida al país en la década de los '70 (Grez y col., 2016). Después del establecimiento de *H. axyridis* se han demostrado disminuciones en las poblaciones de otros coccinélidos en campos de alfalfa, particularmente de especies nativas (Grez y col., 2016). El éxito de *H. axyridis* en muchas partes del mundo se ha atribuido principalmente a competencia interespecífica y depredación intragremio asimétricas en favor de la invasora, o al escape de enemigos naturales (Roy & Brown, 2015; Roy y col., 2016). La Hipótesis de Escape de Enemigos Naturales predice que una especie exótica introducida aumentará en distribución y abundancia debido al reducido impacto que enemigos naturales tienen en la nueva zona invadida con relación al área nativa. Dentro de los enemigos naturales de coccinélidos destaca a nivel mundial el parasitoide *Dinocampus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera:

Braconidae) (Ceryngier y col., 2017). Este parasitoide es de distribución cosmopolita, cubriendo todos los continentes con excepción de la Antártida y algunas islas (Camacho-Cervantes y col., 2017). *Dinocampus coccinellae* es una especie principalmente partenogenética telitoca, donde huevos no fecundados dan origen a hembras adultas (Balduf, 1926; Ceryngier & Hodek, 1996). Son escasos los registros de individuos machos de esta especie a nivel mundial y se ha demostrado que estos no son necesarios para la reproducción (Balduf 1926; Ceryngier y col., 2012). La asociación con su hospedero comienza con la oviposición de uno o varios huevos en estados avanzados de desarrollo del coccinélido (Figura 1), pudiendo eclosionar varias larvas, pero finalmente sólo una completará su desarrollo y sobrevivirá, emergiendo del coccinélido adulto a través de la membrana abdominal, y luego tejiendo su capullo entre las patas del coccinélido, donde pupará (Balduf, 1926). Durante el desarrollo larval del parasitoide, la larva no se alimenta directamente de los tejidos internos del coccinélido. Su alimento es mediado por teratocitos, los cuales son células derivadas del material seroso del huevo del parasitoide (Cerynger y col., 2012). Los teratocitos sintetizan, a partir de aminoácidos que absorben de la hemolinfa del coccinélido, un polipéptido que se va acumulando al interior de estos durante el tiempo de desarrollo larval, generando un aumento progresivo de su tamaño, mientras que al mismo tiempo disminuyen en cantidad producto de su consumo por parte de las larvas del parasitoide (Sluss, 1968; Kadono-Okuda y col., 1995). Antes de que emerja la larva del parasitoide se produce una parálisis y cambio en el comportamiento de los coccinélidos debido a la replicación del virus *Dinocampus coccinellae* Paralysis Virus (DcPV) en el cerebro del hospedero, y que es introducido por el parasitoide durante la oviposición (Dheilly y col., 2015). Finalmente, la pupa del parasitoide se desarrolla en el exterior, adherida al abdomen y patas del coccinélido, emergiendo posteriormente el adulto,

completándose en este punto del ciclo un evento de parasitoidismo exitoso, luego del cual el coccinélido generalmente muere (Balduf, 1926; Ceryngier y col., 2012).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Dinocampus coccinellae*

El nivel de parasitación de coccinélidos por *D. coccinellae* puede fluctuar considerablemente dependiendo de la especie hospedera (Ceryngier y col., 2012, 2017). La medida del parasitoidismo exitoso, esto es, el porcentaje de emergencia del parasitoide adulto, es generalmente utilizada para determinar la susceptibilidad de distintas especies de coccinélidos al parasitoide (Ceryngier y col., 2012, 2017; Dindo y col., 2016). Estudios en otras regiones evidencian que *H. axyridis* es menos susceptible a *D. coccinellae* que otros coccinélidos (Berkvens y col., 2010; Comont y col., 2014), registrando una menor frecuencia de parasitoidismo exitoso (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Ceryngier y col., 2012, 2017; Comont y col., 2014). Se ha propuesto

que *H. axyridis* actuaría como un probable sumidero del parasitoide, debido a que sería parasitada de manera similar a otras especies, pero el desarrollo del parasitoide se vería interrumpido (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Firlej y col., 2010). Un patrón anormal en el crecimiento de los teratocitos al interior de *H. axyridis* sería una posible causa de la interrupción del desarrollo de larvas del parasitoide, debido al rol nutritivo que estos cumplen (Firlej, 2012). Otros mecanismos, conductuales, inmunológicos y fisiológicos, han sido descritos como factores que podrían explicar esta menor susceptibilidad (Firlej y col., 2007, 2010, 2012). Sin embargo, también se han registrado especies nativas hospederas de *D. coccinellae* que no presentan diferencias con *H. axyridis* en cuanto a la susceptibilidad a este parasitoide (Dindo y col., 2016), por lo que este fenómeno debe estudiarse mediante comparaciones específicas en las distintas regiones donde se ha establecido *H. axyridis*. Dados los antecedentes actuales del éxito de *H. axyridis* en Chile, se espera encontrar un parasitoidismo por *D. coccinellae* inferior en *H. axyridis* que en las otras especies abundantes en campos de alfalfa de Chile Central, *E. chilensis* e *H. variegata*.



### **Objetivo General**

Evaluar si *Harmonia axyridis* es un hospedero menos adecuado para el parasitoide *Dinocampus coccinellae*, en comparación con *Eriopis chilensis* e *Hippodamia variegata*.

### **Objetivos específicos**

1. Comparar el porcentaje de desarrollo larval fallido, formación de pupa, parasitoidismo exitoso y parasitoidismo total en *H. axyridis*, *E. chilensis* e *H. variegata* en individuos capturados en campo.
2. Comparar el porcentaje de oviposición, desarrollo larval fallido, formación de pupa, parasitoidismo exitoso y parasitoidismo total en *H. axyridis*, *E. chilensis* e *H. variegata* en laboratorio.

## Materiales y Métodos

### **1. Desarrollo larval fallido, formación de pupa, parasitoidismo exitoso y parasitoidismo total en las tres especies de coccinélidos desde individuos capturados en campo:**

Durante los periodos de primavera del 2016 y otoño del 2017 se realizaron capturas con redes entomológicas cada 15 días de adultos de *H. axyridis*, *E. chilensis* e *H. variegata* en un alfalfal de Pirque (Santiago de Chile, 33°40'16.2"S 70°35'04.8"W) y uno de La Pintana (Santiago de Chile, 33°34'22.4"S 70°37'40.9"W), capturando en cada alfalfal un mínimo de 20 adultos de cada especie por fecha de captura. Estos se mantuvieron en cajas acrílicas de crianza, separados por especie, con plantas de haba *Vicia faba* (Fabaceae) infestadas con *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae) criados en el laboratorio. Los individuos se mantuvieron bajo condiciones controladas de 21°C, 70% HR y fotoperiodo 16:8 (L: D) h, por 30 ± 5 días, y durante este periodo se contabilizaron y extrajeron de las cajas, cada dos días, aquellos insectos que presentaron formación de pupa del parasitoide. Durante la primavera del 2016 sólo se obtuvieron datos del número de individuos por especie que presentaron formación de pupa. En las capturas de otoño de 2017 las pupas extraídas se mantuvieron individualmente en placas de Petri y se contabilizaron aquellas pupas en las que se completó un evento de parasitoidismo exitoso (i.e. emergencia de parasitoide adulto), calculando los porcentajes de ocurrencia de este evento para cada especie y usando estos resultados para estimar la proporción de parasitoidismo exitoso que se habría presentado en las capturas realizadas durante la temporada de primavera del 2016 para cada especie. Además, la observación de la emergencia del parasitoide adulto permitió confirmar que se trataba de *D. coccinellae*, lo que se

esperaba dado que en Chile sólo se ha registrado esta especie parasitando coccinélidos (Togni y col., 2015). La identidad del parasitoide fue corroborada siguiendo la clave del “Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera)” (Wharton y col., 1997). Aquellos coccinélidos que no presentaron formación de pupa del parasitoide fueron diseccionados, estimándose el porcentaje de estos que presentaban desarrollo larval fallido (larvas que murieron en el coccinélido) o ausencia de parasitoidismo (individuos sin presencia de larvas).

## **2. Porcentaje de oviposición, desarrollo larval fallido, formación de pupa, parasitoidismo exitoso y parasitoidismo total en las tres especies de coccinélidos en laboratorio:**

### **Crianza de los insectos:**

Durante la primavera del 2017 se colectaron coccinélidos en campos de alfalfa, y se inició una crianza en laboratorio bajo las condiciones controladas anteriormente mencionadas. Para ello, los huevos de cada especie fueron recolectados periódicamente, manteniéndolos en placas de Petri -separados por especie- hasta la emergencia de las larvas. Una vez que emergieron las larvas, se mantuvieron un máximo de 10 larvas por placa de Petri, proporcionándoles alimentación *ad libitum* de áfidos de la especie *A. pisum* y agua en un algodón, hasta alcanzar un tamaño apropiado para ser manipuladas, entre el segundo y tercer estadio larval. Estas se trasladaron a cajas de crianza separadas por especie, con plantas de haba, infestadas con el áfido, hasta alcanzar su fase adulta, manteniendo un máximo de 30 adultos por caja.

Los parasitoides se obtuvieron de aquellos coccinélidos capturados que presentaron emergencia del parasitoide en el laboratorio. Una vez que emergieron los

parasitoides adultos, fueron alimentados con miel y agua en un algodón, manteniéndolos individualmente en placas de Petri durante 2-3 días, tiempo en que alcanzan la madurez sexual (Balduf, 1926), siendo esta la edad adecuada para realizar la exposición a los coccinélidos. Todos los parasitoides criados corresponden a hembras dado que, como se mencionó previamente, la especie se reproduce por partenogénesis telitoca. Sin embargo, en cada uno de los ensayos se verificó que el individuo adulto realizara al menos un intento de oviposición sobre alguno de los coccinélidos.

#### **Exposición al parasitoide:**

Para estudiar el efecto de la especie de coccinélido en el éxito de cada una de las etapas del parasitoidismo por *D. coccinellae*, en un recipiente transparente de 755 cm<sup>3</sup>, se expusieron 4 coccinélidos adultos de una misma especie y de sexo mixto a una hembra adulta de *D. coccinellae*, por un periodo de 1 hora. Esto teniendo en cuenta la metodología utilizada en estudios similares (Geoghegan y col., 1998; Dindo y col., 2016), y sabiendo que a los dos días de vida una hembra de *D. coccinellae* alcanza su madurez sexual, conteniendo al menos 100 huevos por ovario y pudiendo realizar persecuciones continuas durante una hora (Balduf, 1926). Por lo tanto, se puede considerar que un parasitoide tiene el potencial para parasitar a una gran cantidad de coccinélidos en el lapso dispuesto para estos experimentos. El porcentaje de oviposición, formación de pupa, parasitoidismo exitoso y desarrollo larval fallido se analizó en un mínimo de 20 individuos por especie (20 *H. variegata*, 24 *E. chilensis* y 40 *H. axyridis*). Con la mitad de los individuos se calculó el porcentaje de oviposición (10 *H. variegata*, 12 *E. chilensis* y 20 *H. axyridis*), extrayendo 2 de los cuatro coccinélidos expuestos al parasitoide en cada grupo, los cuales fueron diseccionados en búsqueda de huevos 3-4 días después de ser expuestos al parasitoide. Con la otra

mitad se evaluó el porcentaje de formación de pupa, parasitoidismo exitoso y desarrollo larval fallido. Para ello, los otros dos coccinélidos en cada grupo fueron mantenidos en recipientes transparentes durante  $30 \pm 5$  días, con la alimentación y condiciones controladas mencionadas anteriormente. Este tiempo permite asegurar que todas las larvas de parasitoides viables finalizaran su proceso de desarrollo, dado que el tiempo de desarrollo huevo-larva de último estadio es 3 a 4 semanas (Balduf, 1926; Ceryngier y col., 2012). Durante este periodo, y cada dos días, se contabilizaron y extrajeron del recipiente aquellos coccinélidos que presentaron formación de pupa del parasitoide y estos se mantuvieron de manera individual en placas de Petri para contabilizar aquellas pupas desde donde emergieron exitosamente adultos (i.e. parasitoidismo exitoso). Para estimar los porcentajes de desarrollo larval fallido, aquellos individuos que después de los  $30 \pm 5$  días no presentaron formación de pupa del parasitoide fueron diseccionados en busca de larvas y se registró la cantidad de coccinélidos con larvas sin emerger. Finalmente, con los porcentajes de formación de pupa y desarrollo larval fallido se calculó el porcentaje total de parasitoidismo.

Inicialmente se había determinado realizar exposiciones al parasitoide por un periodo de 24 horas, teniendo en cuenta que este tiempo ha sido registrado como suficiente para una oviposición exitosa (Balduf, 1926; Dindo y col., 2016). Se aplicó este tiempo de exposición al parasitoide a 2 grupos de coccinélidos por especie, en total 8 coccinélidos por especie, sin embargo, se produjo una alta mortalidad en *E. chilensis* e *H. variegata* por eventos de superparasitoidismo (i.e. un hospedero conteniendo más de un huevo o larva de la misma especie), por lo que para los siguientes grupos expuestos al parasitoide se redujo este tiempo, manteniendo al parasitoide solo 1 hora al interior del recipiente, siendo este un tiempo que también se ha descrito como suficiente para la oviposición por parte del parasitoide (Balduf, 1926;

Dindo y col., 2016), incluso con una mayor cantidad de coccinélidos por parasitoides (Dindo y col., 2016), disminuyendo de esta manera las muertes. Sin embargo, los resultados obtenidos con exposiciones de 24 horas fueron registrados y se informan como evidencia del posible efecto del tiempo de exposición en las tres especies.

### **3. Análisis estadísticos:**




La variación de los porcentajes de formación de pupa, parasitoidismo exitoso y desarrollo larval fallido en el campo entre especies de coccinélidos (Objetivo 1) fueron comparados a través de Pruebas de Chi-cuadrado. La variación de los porcentajes de oviposición, formación de pupa, parasitoidismo exitoso, desarrollo larval fallido y parasitoidismo total en laboratorio entre especies de coccinélidos (Objetivo 2) fueron comparados a través de un test exacto de Fisher debido al bajo número de réplicas por especie. Tanto para las Pruebas de Chi-cuadrado como para los test exactos de Fisher en caso de encontrar diferencias significativas entre las tres especies, posteriormente se realizaba la comparación por pares.

## Resultados

### 1. Experimentos en campo:

En total, durante las dos temporadas, se capturaron 737 individuos adultos de las tres especies estudiadas y, como se esperaba, *D. coccinellae* fue el único parasitoide detectado en estos coccinélidos. *H. axyridis* fue la especie con menor porcentaje de formación de pupa y parasitoidismo exitoso en comparación con *E. chilensis* e *H. variegata* (Tabla 1). *Harmonia axyridis* tuvo el menor porcentaje de individuos parasitados y a pesar de que *H. variegata* tuvo el mayor porcentaje de eventos de desarrollo larval fallido, con las otras dos especies teniendo un porcentaje similar, la proporción de individuos con desarrollo larval fallido en función del total parasitados en cada especie es mayor en *H. axyridis* e *H. variegata* que la encontrada en *E. chilensis* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Porcentajes de formación de pupa, parasitoidismo exitoso, desarrollo larval fallido, parasitados y parasitados con desarrollo larval fallido por parte de *D. coccinellae* en cada una de las especies capturadas en campos de alfalfa.

Especie	 <i>E. chilensis</i>	 <i>H. variegata</i>	 <i>H. axyridis</i>	X <sup>2</sup>	p-valor*
<b>N</b>	276	352	109	-	-
<b>Formación de pupa (%)</b>	38% <sup>a</sup>	35% <sup>a</sup>	8% <sup>b</sup>	34.822	<<0,001
<b>Parasitoidismo exitoso (%)</b>	36% <sup>a</sup>	33% <sup>a</sup>	7% <sup>b</sup>	32.769	<<0,001
<b>Desarrollo larval fallido (%)</b>	14% <sup>b</sup>	24% <sup>a</sup>	12% <sup>b</sup>	14.672	<<0,001
<b>Parasitados (%)**</b>	52% <sup>a</sup>	59% <sup>a</sup>	20% <sup>b</sup>	53.928	<<0,001
<b>Parasitados con desarrollo larval fallido (%) ***</b>	27% <sup>b</sup> (145)	41% <sup>a</sup> (210)	59% <sup>a</sup> (22)	12.393	0,002

\* p-valor correspondiente a prueba de Chi-cuadrado para las tres especies ( $\alpha = 0,05$ ).

<sup>a, b</sup>. Pruebas de Chi-cuadrado a pares de especies. Misma letra entre especies indica que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

\*\* Suma de porcentaje de formación de pupa y desarrollo larval fallido.

\*\*\* Porcentaje de desarrollo larval fallido en función del total de individuos parasitados.




() Número de individuos parasitados (Formación de pupa + desarrollo larval fallido)

## 2. Experimentos en laboratorio:

### Oviposición por *Dinocampus coccinellae*

De las tres especies expuestas al parasitoide durante 1 o 24 horas, ningún individuo de *H. axyridis* presentó eventos de oviposición, mientras que en *E. chilensis* e *H. variegata* los porcentajes de oviposición fueron mayores a 30%, similares entre si y significativamente mayores a los de *H. axyridis* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentajes de oviposición por parte de *D. coccinellae* en las especies expuestas en condiciones de laboratorio.

Tiempo	Especie	 <i>E. chilensis</i>	 <i>H. variegata</i>	 <i>H. axyridis</i>	p-valor*
1 hora	N	12	10	20	-
	Oviposición (%)**	33% <sup>b</sup>	40% <sup>b</sup>	0% <sup>a</sup>	0,003
24 horas	N	4	4	4	-
	Oviposición (%)**	100% <sup>b</sup>	75% <sup>b</sup>	0% <sup>a</sup>	0,007

\* p-valor correspondiente a prueba de Chi-cuadrado para las tres especies ( $\alpha = 0.05$ ).

<sup>a, b</sup> Pruebas de chi-cuadrado a pares de especies. Misma letra entre especies indica que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).




\*\* Porcentaje de individuos en q se encontraron huevos del parasitoide 3 – 4 días después de la exposición.

### Desarrollo de *Dinocampus coccinellae*

Dentro de los individuos mantenidos en el laboratorio durante  $30 \pm 5$  días, *H. axyridis* no presentó individuos con formación de pupa del parasitoide. Además, al diseccionar a estos individuos tampoco se registraron eventos de desarrollo larval fallido, esto tanto para las exposiciones de 1 hora como para las de 24 horas (Tabla 3). La frecuencia de eventos de formación de pupa, parasitoidismo exitoso y desarrollo larval fallido en *E. chilensis* e *H. variegata* fueron mayores que en *H. axyridis*, en las exposiciones de 1 y 24 horas, con valores similares entre *E. chilensis* e *H. variegata* (Tabla 3).



**Tabla 3.** Porcentajes de formación de pupa, parasitoidismo exitoso, desarrollo larval fallido y parasitados por parte de *D. coccinellae* en cada una de las especies expuestas en condiciones de laboratorio.

Tiempo	Especie	 <i>E. chilensis</i>	 <i>H. variegata</i>	 <i>H. axyridis</i>	p-valor*
1 hora	N	12	10	20	-
	Formación de pupa (%)	42% <sup>a</sup>	30% <sup>a</sup>	0% <sup>b</sup>	0,003
	Parasitoidismo exitoso (%)	42% <sup>a</sup>	30% <sup>a</sup>	0% <sup>b</sup>	0,003
	Desarrollo larval fallido (%)	25% <sup>a</sup>	10% <sup>a</sup>	0% <sup>b</sup>	0,039
	Parasitados (%)**	50% <sup>a</sup>	35% <sup>a</sup>	0% <sup>b</sup>	< 0,001
24 horas	N	4	4	4	-
	Formación de pupa (%)	33%	0%	0%	n.s
	Parasitoidismo exitoso (%)	33%	0%	0%	n.s
	Desarrollo larval fallido (%)	67% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>	0% <sup>b</sup>	0,018
	Parasitados (%)**	100% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>	0% <sup>b</sup>	0,006

\* p-valor correspondiente a prueba de Chi-cuadrado para las tres especies ( $\alpha = 0,05$ ).

n.s. No hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ )

<sup>a, b</sup>. Pruebas de Chi-cuadrado a pares de especies. Misma letra entre especies indica que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

\*\* Suma de porcentaje de formación de pupa y desarrollo larval fallido.

### Superparasitoidismo

A pesar del bajo número de réplicas (4 individuos por especie), los resultados obtenidos en individuos de *E. chilensis* e *H. variegata* expuestos durante 24 horas al parasitoide mostraron una alta proporción de individuos con oviposición (Tabla 2) y en el 100% de estos casos se trató de eventos de superparasitoidismo (i.e. varios huevos de la misma especie depositados en un mismo hospedero), con un promedio  $18,2 \pm 6,9$  huevos por individuo en *E. chilensis* y  $14 \pm 4$  en *H. variegata*. En las exposiciones durante 1 hora los eventos de superparasitoidismo presentaron una frecuencia menor,

con un 25% en *E. chilensis* y un 75% en *H. variegata*, en los cuales en promedio se encontraron  $2 \pm 0,75$  huevos por individuo en *E. chilensis* y  $3 \pm 0,9$  en *H. variegata*. En los individuos en que se evaluaron las otras etapas del parasitoidismo se registró que los individuos con desarrollo larval fallido fueron mayores en individuos expuestos durante 24 horas (Tabla 3), los que presentaron una frecuencia mayor de superparasitoidismo, encontrando en promedio  $4,5 \pm 0,5$  larvas por individuo de *E. chilensis* y  $11,8 \pm 3,5$  en *H. variegata*. En los individuos con exposiciones de 1 hora el porcentaje de individuos con desarrollo larval fallido fue menor y los promedios de larvas fallidas al interior de estos fueron de  $3,4 \pm 0,9$  larvas por individuo de *E. chilensis* y  $2 \pm 0$  en *H. variegata*.

## Discusión

En función de los resultados de este estudio, que indican que el porcentaje de parasitoidismo exitoso fue significativamente menor en *H. axyridis* que en *H. variegata* y *E. chilensis*, se puede deducir que *H. axyridis* fue un peor hospedero para este parasitoide. Estos resultados apoyan investigaciones previas que describen a *H. axyridis* como un hospedero marginal (menos adecuado) para *D. coccinellae* en comparación con especies nativas en las zonas invadidas por esta especie (Berkvens y col., 2010; Hoogendoor & Heimpel, 2002; Firlej y col., 2007, Castro-Guedes, 2016; Comont y col., 2013). En consecuencia, este parasitoide tendría un mínimo impacto en el control de las poblaciones de este coccinélido exótico tanto en Chile como en otras partes del mundo.

Distintos mecanismos podrían determinar el menor parasitoidismo exitoso de *D. coccinellae* sobre *H. axyridis*, que han sido observadas en otras latitudes con respecto a sus pares nativas y que ameritan ser analizadas en el presente estudio: 1) El comportamiento defensivo de esta especie durante la oviposición (Firlej y col., 2010); 2) El encapsulamiento de los huevos del parasitoide por parte del sistema inmune de *H. axyridis* (Firlej y col., 2012) y 3) La poca idoneidad de *H. axyridis* durante el desarrollo de las larvas del parasitoide (Firlej y col., 2007).

### Comportamiento defensivo de *H. axyridis*

En este estudio, los adultos de *H. axyridis* no presentaron eventos de oviposición en los experimentos realizados en condiciones de laboratorio, por lo que es muy probable que estos individuos estén escapando a la oviposición al repeler el ataque por parte de *D. coccinellae*. Esto no ocurriría con las otras especies estudiadas,

tal como se ha descrito en otras regiones invadidas, en donde los comportamientos de defensa observados en individuos adultos de *H. axyridis* han sido mayores, resultando en un aumento en el tiempo de ataque por parte del parasitoide sobre *H. axyridis* (Firlej y col., 2010) y dificultando la oviposición exitosa. Sin embargo, en individuos capturados en campo, sí se registraron eventos de parasitoidismo, lo cual puede deberse a que en los experimentos de laboratorio sólo se realizaron exposiciones sobre los coccinélidos en su fase adulta, mientras que en campo la oviposición por parte del parasitoide puede haber ocurrido durante las últimas fases larvales. Se ha descrito que los individuos adultos son los más atacados por *D. coccinellae*, seguidos por la cuarta y tercera fase larval respectivamente (Obrycki y col., 1985; Majerus y col., 2000; Firlej y col., 2005). En el caso particular de *H. axyridis*, las larvas de cuarta y tercera fase serían más susceptibles que los adultos, dado que en su fase adulta esta especie manifiesta comportamientos de defensa más agresivos que otras especies (Hoogendoorn & Heimpel 2002; Firlej y col., 2005; Berkvens y col., 2010; Firlej y col., 2010). Grabaciones realizadas durante los ensayos de exposición de los coccinélidos a *D. coccinellae* evidencian el esfuerzo de ataque por parte del parasitoide sobre *H. axyridis* y el comportamiento particularmente agresivo de esta ante el ataque (e.g. mordeduras, patadas, esconder el abdomen, o caminar rápidamente), en comparación con *H. variegata* y *E. chilensis* (<https://drive.google.com/open?id=1iMxLTpptM5ngSEsUJYEsWlsoDHg7Dbw3>). Para confirmar que estas diferencias en la oviposición por parte del parasitoide responden a una diferencia conductual entre las especies, particularmente en la fase adulta de estas, actualmente se están iniciando experimentos en el Laboratorio de Ecología de Ambientes Fragmentados de la Universidad de Chile, que buscarán cuantificar estas

diferencias, tal como ya se ha realizado en otras regiones invadidas por de esta especie (Firlej y col., 2010).

Encapsulamiento de los huevos del parasitoide por parte del sistema inmune de *H. axyridis*

Estudios en otras áreas invadidas han reportado la capacidad del sistema inmune de *H. axyridis* para encapsular los huevos depositados por *D. coccinellae*, sobre todo cuando estos son depositados en bajas proporciones (Firlej y col., 2012). Ello sugiere que la ausencia de eventos de oviposición sobre *H. axyridis* observado en condiciones de laboratorio en nuestro estudio podrían ser solo aparentes, ya que los individuos eran diseccionados de 3 a 4 días después de la exposición, y para ese entonces los huevos de eventuales oviposiciones pudieron haber sido encapsulados. Los bajos porcentajes de parasitoidismo en campo en *H. axyridis* también pueden ser explicados por esta respuesta inmune. Esto es algo que debería evaluarse utilizando otras técnicas que puedan detectar la presencia de huevos del parasitoide inmediatamente después de la oviposición, pudiendo comparar porcentajes de oviposición y porcentajes de presencia de larvas.

Poca idoneidad de *H. axyridis* durante el desarrollo de las larvas del parasitoide

Si bien los individuos de *H. axyridis* capturados en campo presentaron eventos de parasitoidismo, el porcentaje de formación de pupa del parasitoide fue el más bajo de las tres especies y la proporción de individuos parasitados con desarrollo larval fallido fue alta tanto en *H. axyridis* como en *H. variegata*. En el caso de *H. axyridis* estos resultados podrían deberse a que aun cuando los huevos de *D. coccinellae* no sean destruidos por el sistema inmune de *H. axyridis*, el desarrollo posterior de las

larvas puede verse impedido o retrasado debido al reducido número e inapropiado patrón de crecimiento que se ha descrito en los teratocitos al interior de *H. axyridis* (Firlej y col., 2007). Estos teratocitos, al tener un rol nutritivo durante el desarrollo de las larvas del parasitoide (Kadono-Okuda y col., 1998), representarían una cantidad insuficiente de alimento para el desarrollo de la larva, provocando esto la muerte de esta al interior del coccinélido. Si bien *H. variegata* también registró una proporción alta de desarrollo larval fallido, es probable que en este caso los eventos estén asociados al pequeño tamaño de este coccinélido, el cual fluctúa entre 4,2 - 5 mm, en comparación con *H. axyridis* 6,5 - 8 mm y *E. chilensis* 4,3 - 5,8 mm. Esto lo que le conferiría una menor capacidad para sustentar el desarrollo de las larvas de *D. coccinellae* (Balduf 1926), generando su muerte o incluso la muerte prematura del coccinélido. Además, tanto en las observaciones realizadas durante las disecciones de los individuos capturados en campo, como en los resultados obtenidos en los experimentos de laboratorio se pudo evidenciar una mayor frecuencia de eventos de superparasitoidismo en esta especie, lo cual acentúa esta falta de recursos para el desarrollo de las larvas (Balduf, 1926; Ceryngier y col. 2012). Esta consecuencia de los eventos de superparasitoidismo se pudo constatar experimentalmente en los individuos de *H. variegata* y *E. chilensis* que fueron expuestos durante 24 horas al parasitoide, los cuales casi en su totalidad presentaron desarrollo larval fallido. Sin embargo, es necesario aumentar el número de individuos evaluados para poder confirmar la significancia de esta tendencia. Este alto porcentaje de desarrollo larval fallido en los individuos parasitados de *H. axyridis* e *H. variegata* señalaría a *E. chilensis* como un mejor hospedero para *D. coccinellae*.

Durante este estudio la evidencia apunta a la ocurrencia de los tres mecanismos más frecuentemente citados como características que permitirían en las regiones invadidas el escape de *H. axyridis* ante la parasitación por parte de *D. coccinellae*. Sin embargo, la efectividad y frecuencia de cada uno de estos mecanismos podría variar entre poblaciones de *H. axyridis*. Tanto en Europa (Berkvens y col., 2010) como en EE. UU. (Hoogendoorn & Heimpel, 2002) y Canadá (Firlej y col., 2005) se han registrado bajos porcentajes de parasitoidismo exitoso en *H. axyridis*, en comparación con las otras especies presentes en las zonas invadidas. Sin embargo, se ha destacado que estos porcentajes pueden incrementar a futuro debido a la adaptación de *D. coccinellae* al nuevo hospedero (Firlej y col., 2005; Koyama & Majerus, 2008), por lo que evaluaciones específicas en las zonas invadidas son necesarias y, además, estas deberían ser realizadas nuevamente después de un periodo que pueda dar cuenta de alguna posible adaptación por parte de este parasitoide.

La parasitación por parte de *D. coccinellae* tiene consecuencias sobre el hospedero, principalmente en hembras, las cuales sufren una reducción del sistema reproductivo, desconociéndose los mecanismos implicados (Kadono-Okuda, 1998). Si bien se han reportado individuos que logran recuperarse después de la emergencia del parasitoide, la gran mayoría de los coccinélidos solo viven entre 2- 5 días después de la emergencia de la larva (Balduf, 1926). En este tiempo el efecto de parálisis por el DcPV desaparece, sin embargo, los individuos quedan atrapados por la pupa formada entre sus patas y finalmente mueren por inanición (Balduf, 1926; Dheilly y col., 2015). Esto generaría diferencias en el desempeño de especies nativas como *E. chilensis* y la invasora *H. axyridis*, dando paso a una condición de desventaja en cuanto la

competencia interespecífica de estos coccinélidos. Siendo Chile central una de las áreas con mayor número de especies nativas y endémicas de coccinélidos (Gonzalez, 2006), ellas podrían estar en peligro tras la invasión de *H. axyridis* (Grez y col., 2016), y dilucidar aquellos factores que determinan el asentamiento y expansión de sus poblaciones resulta importante para desarrollar medidas de conservación para la biodiversidad en el país.



### Conclusiones

Los resultados obtenidos por este estudio, tanto en campo como en laboratorio, dan cuenta de que efectivamente *H. axyridis* es un hospedero menos adecuado para *D. coccinellae* en comparación con *E. chilensis* e *H. variegata*.

El hecho de que la menor parte de los eventos de parasitoidismo exitoso hayan ocurrido en *H. axyridis* y que del total de eventos de parasitoidismo en campo la mayoría correspondan a individuos con desarrollo larval fallido del parasitoide, tanto en *H. axyridis* como en *H. variegata*, pone a la nativa *E. chilensis* como el mejor hospedero para este parasitoide. Esto representa una desventaja para la especie nativa ante la competencia interespecífica con especies introducidas en campos de alfalfa.

El escape de *H. axyridis* a uno de los enemigos naturales de los coccinélidos en Chile pudo haber contribuido al crecimiento y expansión de sus poblaciones, sin embargo, a medida que *D. coccinellae* se adapte a este nuevo hospedero, estos efectos del escape podrían disminuir.

### Bibliografía

Balduf, W.V. 1926. The bionomics of *Dinocampus coccinellae* Schrank. Annals of the Entomological Society of America. 19(4): 465-498.

Berkvens, N., Moens, J., Berkvens, D., Samih, M.A., Tirry, L., De Clercq, P. 2010 *Dinocampus coccinellae* as a parasitoid of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* in Europe. Biological Control. 53: 92-99

Brown, P. M., Thomas, C. E., Lombaert, E., Jeffries, D. L., Estoup, A., & Handley, L. J. L. 2011. The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. BioControl 56(4): 623.

Camacho-Cervantes, M., Ortega-Iturriaga, A., & del-Val, E. 2017. From effective biocontrol agent to successful invader: the harlequin ladybird (*Harmonia axyridis*) as an example of good ideas that could go wrong. PeerJ. 5: e3296.

Cartwright, B., Eikenbary, R. D., & Angalet, G. W. 1982. Parasitism by *Perilitus coccinellae* [Hym.: Braconidae] of indigenous coccinellid hosts and the introduced *Coccinella septempunctata* [Col.: Coccinellidae], with notes on winter mortality. BioControl. 27(3): 237-243.

Ceryngier, P., HODEK, I. 1996. Enemies of Coccinellidae. En: *Ecology of Coccinellidae*. Springer, Dordrecht, p. 319-350.

Ceryngier P, Roy HE, Poland RL. 2012. Natural enemies of ladybird beetles. En: Hodek I, van Emden HF, Honek A (eds) *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Wiley-Blackwell, Chichester, pp 375–443

Comont RF, Purse BV, Phillips W, Kunin WE, Hanson M, et al. 2014. Escape from parasitism by the invasive alien ladybird, *Harmonia axyridis*. *Insect Conservation and Diversity*. 7(4): 334-342.

De Castro-Guedes, C., & de Almeida, L. 2016. Laboratory investigations reveal that *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) is a poor host for *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil. *Journal of Insect Science*. 16(1): 55.

Dheilly NM, Maure F, Ravallec M, Galinier R, Doyon J, et al. 2015. Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 282(1803): 20142773.

Dindo ML, Francati S, Lanzoni A, Di Vitantonio C, et al. 2016. Interactions between the Multicolored Asian Lady Beetle *Harmonia axyridis* and the parasitoid *Dinocampus coccinellae*. *Insects*. 7(4): 67.

Firlej A, Girard PA, Brehélin M, Coderre D, Boivin G. 2012. Immune response of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) supports the enemy release hypothesis in North America. *Annals of the Entomological Society of America*. 105(2): 328-338.

Firlej, A., Lucas, E., Coderre, D., & Boivin, G. 2010. Impact of host behavioral defenses on parasitization efficacy of a larval and adult parasitoid. *BioControl*, 55(3), 339-348

Firlej, A., Lucas, E., Coderre, D., & Boivin, G. 2007. Teratocytes growth pattern reflects host suitability in a host-parasitoid assemblage. *Physiological Entomology*, 32(2), 181-187.

Gonzalez, G. (2006) Los Coccinellidae de Chile. <http://www.coccinellidae.cl>. (revisado: 27 de diciembre del 2017).

Grez AA, Zaviezo T, González G, Rothmann S. 2010. *Harmonia axyridis* in Chile: a new threat. *Ciencia e Investigación Agraria*. 37(3): 145-149.

Grez, A. A., Viera, B., & Soares, A. O. 2012. Biotic interactions between *Eriopsis connexa* and *Hippodamia variegata*, a native and an exotic coccinellid species associated with alfalfa fields in Chile. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 142(1). 36-44.

Grez AA, Rand TA, Zaviezo T, Castillo-Serey F. 2013. Land use intensification differentially benefits alien over native predators in agricultural landscape mosaics. *Diversity and Distributions*. 19(7): 749-759.

Grez AA, Zaviezo T, Roy HE, Brown PM, Bizama G. 2016. Rapid spread of *Harmonia axyridis* in Chile and its effects on local coccinellid biodiversity. *Diversity and Distributions*. 22(9): 982-994.

Hoogendoorn, M. & Heimpel, G.E. 2002. Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid. *Biological Control*. 25(3): 224-230.

Kadono-Okuda, K., Sakurai, H., Takeda, S., & Okuda, T. 1995. Synchronous growth of a parasitoid, *Perilitus coccinellae*, and teratocytes with the development of the host, *Coccinella septempunctata*. *Entomologia Experimentalis and Applicata*. 75: 145-149.

Kadono-Okuda, K., Weyda, F., & Okuda, T. 1998. *Dinocampus* (= *Perilitus*) *coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. *Journal of insect physiology*, 44(11), 1073-1080.

Koyama, S. & Majerus, M.E.N. 2008. Interactions between the parasitoid wasp *Dinocampus coccinellae* and two species of coccinellid from Japan and Britain. *BioControl*. 53: 253–264.

Obrycki, J.J. 1989. Parasitization of native and exotic coccinellids by *Dinocampus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae). *J Kansas Entomol Soc.* 62:211–218

Roy, H. E., De Clercq, P., Handley, L. J. L., Poland, R. L., Sloggett, J. J., & Wajnberg, E. 2011. Alien arthropod predators and parasitoids: an ecological approach. *BioControl*. 56(4), 375.

Roy, H.E., Adriaens, T., Isaac, N.J.B., Kenis, M., Onkelinx, T., Martin, G.S., Brown, P.M.J., Hautier, L., Poland, R., Roy, D.B., Comont, R., Eschen, R., Frost, R., Zindel, R., Van Vlaenderen, J., Nedved, O., Ravn, H.P., Gregoire, J.C., de Biseau, J.C. & Maes, D. 2012. Invasive alien predator causes rapid declines of native European ladybirds. *Diversity and Distributions* 18(7): 717-725.

Roy, H.E. & Brown, P.M. 2015. Ten years of invasion: *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in Britain. *Ecological entomology*. 40(4): 336-348.

Roy, H.E., Brown, P.M.J., Adriaens, T., Berkvens, N., Borges, I., Clusella-Trullas, S., Comont, R.F., De Clercq, P., Eschen, R., Estoup, A., Evans, E.W., Facon, B., Gardiner, M.M., Gil, A., Grez, A.A., Guillemaud, T., Haelewaters, D., Herz, A., Honek, A., Howe, A.G., Hui, C., Hutchison, W.D., Kenis, M., Koch, R.L., Kulfan, J., Lawson Handley, L.,

Lombaert, E., Loomans, A., Losey, J., Lukashuk, A.O., Maes, D., Magro, A., Murray, K.M., San Martin, G., Martinkova, Z., Minnaar, I., Nedvěd, O., Orlova-Bienkowskaja, M.J., Rabitsch, W., Ravn, H.P., Rondoni, G., Rorke, S.L., Ryndevich, S.K., Saethre, M-G., Sloggett, J.J., Soares, A.O., Stals, R., Tinsley, M.C., Vandereycken, A., van Wielink, P., Vigišová, S., Zach, P., Zaviezo, T., Zhao, Z. 2016. The harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*: global perspectives on invasion history and ecology. *Biological Invasions*. 18(4): 997-1044.

Togni, P.H.B., Souza, L.M., Sicsú, P.R., Costa, V.A., Amaral, D.S.S.L., Franco, A.C., Sujii, E.R., Venzon, M. 2015. Coccinellidae parasitoids in Brazil: neglected species in a mega-diverse country. *Neotropical entomology*. 44(5): 528-532.

Wharton, R.A., Marsh, P.M., Sharkey, M.J. 1997. Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera). vol 1: 235 - 254.