INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

EL PARASITISMO DE *COTESIA FLAVIPES* INDUCE INMUNOSUPRESIÓN E INCREMENTA LA SUSCEPTIBILIDAD DE *DIATRAEA SACCHARALIS* A *BACILLUS THURINGIENSIS.*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN TECNOLOGÍA AVANZADA
PRESENTA:

Ali Mohamed Ali Mahmoud

Noviembre del 2011, Reynosa, Tam., México.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

EL PARASITISMO DE *COTESIA FLAVIPES* INDUCE INMUNOSUPRESIÓN E INCREMENTA LA SUSCEPTIBILIDAD DE *DIATRAEA SACCHARALIS* A *BACILLUS THURINGIENSIS.*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN TECNOLOGÍA AVANZADA
PRESENTA:

Ali Mohamed Ali Mahmoud

Aprobada por:

Comité

DR. ABELARDO IRINEO FLORES VELA
DR. FELIPE CABALLERO BRIONES
DR. MARIO ALBERTO RDZ. PÉREZ
DR. XIANWU GUO
DR. LUIS VIDAL PONCE CABRERA
DR. RAYMUNDO ROSAS QUIJANO

Noviembre del 2011, Reynosa, Tam., México.

SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Altamira, Tam. siendo las 11:00 horas del día 31 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-Altamira para examinar la tesis titulada:

El parasitismo de *Cotesia flavipes* induce inmunosupresión e incrementa la susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* a *Bacillus thuringiensis*.

Presentada por el alumno:

Ali	Mahmoud	Ali Mohamed
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: A 0 9 0 4 1 4

aspirante de:

Doctorado en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron ***APROBAR LA TESIS***, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

DR. MARIO A RODRIGUEZ PÉREZ

DR. XIANWU GUO

DRA. ABELARDO T. FLORES VELA.

DR. FELIPE CABALLERO BRIONES

DR. LUIS VIDAL PONCE CABRERA.

DR. RAYMUNDO ROSAS QUIJANO.

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. ABELARDO T. FLORES VELA.

CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGIA AVANZADA DEL I.P.N. UNIDAD ALTAMIRA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Altamira, Tam el día 09 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe M:C: Ali Mohamed Ali Mahmoud alumno (a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada con número de registro A090414, adscrito a Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado El parasitismo de *Cotesia flavipes* induce inmunosupresión e incrementa la susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* a *Bacillus thu*ringiensis., al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Km. 14.5 Carretera Tampico- Puerto Industrial, Altamira Tamaulipas, México. Teléfonos 01(833) 260- 01 24 al 26 y 260- 90- 23. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M.C: Ali Mohamed Ali Mahmoud
Nombre y firma

Tabla de Contenidos

Lista de Figuras	……..	**6**
Lista de Tablas	……..	**8**
Abstract	……..	**9**
Resumen	……..	**11**
Introducción	……..	**13**
Antecedentes	……..	**15**
Hipótesis	……..	**27**
Objetivos	……..	**27**
Capítulo 1	Efecto del parasitismo de *Cotesia flavipes* sobre la población de hemocitos y la respuesta humoral del barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis*……	**28**
Capítulo 2	Efecto del parasitismo de *Cotesia flavipes* sobre la respuesta de encapsulación y nodulación en *Diatraea saccharalis*…….....	**55**
Capítulo 3	Desarrollo de la avispa Braconidae *Cotesia flavipes* en dos insectos cámbridos estrechamente relacionados, *Diatraea saccharalis* y *Eoreuma loftini*: evidencia de inmunosupresión en el hospedero…….…....	**73**
Capítulo 4	Efecto del parasitismo de *Cotesia flavipes* sobre el desarrollo y la eficiencia metabólica de *Diatraea saccharalis*…….……	**93**
Capítulo 5	Efecto del parasitismo de *Cotesia flavipes* sobre la susceptibilidad de las larvas de *Diatraea saccharalis* larva a la infección bacteriana……..….....	**113**
Conclusiones	……..	**127**
Biblografia	……..…….	**129**

Lista de Figuras

Figura No.	Titulo	Pagina
1	Ciclo vital del parasitoide *Cotesia flavipes* y su polidnavirus…….....	**17**
2	Imágenes de microscopia de contraste de fases de los hemocitos de larvas de *D. saccharalis*……..	**37**
3	Conteo total de hemocitos (CTH) en la hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* de 1, 3, 6 y 9 días después de la parasitación de *C. flavipes*……...	**39**
4	Conteo de Plasmatocitos (Pl) en la hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* de 1, 6 y 9 días después de la parasitación de *C. flavipes*……..……..	**40**
5	Conteo de Granulocitos (Gr) en la hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* de 1, 6 y 9 días después de la parasitación de *C. flavipes.*……	**41**
6	Conteo de otros tipos de hemocitos en hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* de 1, 6 y 9 días después de la parasitación de *C. flavipes.*……	**42**
7	Porcentaje de muestras de hemolinfas que presentaron melanización 1, 2, 4, 6 y 7 días después de la parasitación por *C. flavipes*……	**43**
8	Actividad fenoloxidasa presente en la hemolinfa total de larvas parasitadas (P) y no parasitadas (NP) de *D. saccharalis.*……	**44**
9	Actividad fenoloxidasa presente en el plasma de larvas parasitadas (P) y no parasitadas (NP) de *D. saccharalis*……..	**44**
10	Actividad fenoloxidasa presente en los hemocitos de larvas parasitadas (P) y no parasitadas (NP) de *D. saccharalis.*……	**45**
11	Efecto de la parasitación de *C. flavipes* sobre la concentración de proteínas totales del plasma de larvas parasitadas (P) y no parasitadas (NP) de *D. saccharalis.*……...	**47**
12	Microfotografías de esferas de Sephadex A-25 después de la recuperación a partir de larvas de *D. saccharalis* mostrando diferentes niveles de encapsulación……..	**62**
13	Efecto de la parasitación sobre la respuesta de encapsulación de larvas de *D. saccharalis* a esperas de Sephadex A-25….……..	**66**
14	Efecto de la parasitación sobre el grosor de la capsula (A) y la melanización (B) de las esferas cubiertas de Sephadex A-25 después de un periodo de incubación (3, 12, o 24 h) en la hemocele de larvas del quinto del quinto instar de *D. saccharalis*……...……	**67**
15	Efecto del PDV purificado por filtración sobre la respuesta de encapsulación hacia esferas de Sephadex.A-25 en larvas del quinto instar de *D. saccharalis*……...	**68**
16	Efecto de la parasitación *C. flavipes* sobre la formación de nódulos en *D. saccharalis* en respuesta a la infección con la bacteria no patogénica, *E. coli*, ($5x10^6$ bacterias/larva)……..….	**69**
17	Microfotografías de las esferas de Sephadex A-25 después de ser recubiertas en larvas de *D. saccharalis* y *E. loftini* durante la encapsulación……...	**85**
18	Respuesta de encapsulación *in vivo* de los hemocitos sobre esferas inyectadas	**86**

de Sephadex A-25 en larvas de *D. saccharalis* y *E. loftini* parasitadas y no parasitadas.……

19 Reacción de melanización en esferas encapsuladas en larvas parasitadas y no parasitadas de *D. saccharalis* y *E. loftini*…… **88**

20 Efecto de la parasitación de *C. flavipes* sobre la actividad fenoloxidasa de *D. saccharalis* y *E. loftini*…… **89**

21 Pesos promedio (±SE) de larvas parasitadas y no parasitadas del quinto y sexto instar de *D. saccharalis*. …… **102**

22 Correlación del peso de las larvas de *D. saccharalis* y el tamaño de la nidada de los parasitoides (avispas emergidas y no emergidas)……. **103**

23 Porcentaje y número total de avispas de *C. flavipes* emergidas exitosamente graficadas en función del tamaño del grupo de parasitoides (avispas emergidas y no emergidas)..... **104**

24 Peso final del complejo de parasitoides graficados en función del tamaño de los parasitoides……..... **106**

25 Correlación negativa del peso seco de los parasitoides individuales en relación al incremento del total de parasitoides emergidos……... **107**

26 Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *D. saccharalis* y *E. loftini* tratadas con diferentes cepas de *B. thuringiensis* a una dosis de 50 µg *Bt*/ml de dieta……..... **120**

27 Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *D. saccharalis* y *E. loftini* tratadas con diferentes cepas de *B. thuringiensis* a una dosis de 500 µg *Bt*/ml de dieta…… **120**

28 Susceptibilidad de larvas del quinto de *D. saccharalis* a diferentes cepas de *B. thuringiensis*……..... **122**

29 Porcentaje de pupas producidas en larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas y no parasitadas alimentadas sobre dieta contaminada con diferentes cepas de *B. thuringiensis*……..... **123**

Lista de Tablas

Tabla No.	Titulo	Pagina
1	Destino de larvas de *D. saccharalis* y *E. loftini* parasitadas por *C. flavipes*……..	**88**
2	Valores promedio del índice de Waldauer sobre larvas parasitadas y no parasitadas de *D. saccharalis*…….	**108**

Abstract

Cotesia flavipes (Hymenoptera: Braconidae) is an important gregarious larval endoparasitoid of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), a serious pest of sugarcane in Mexico and USA. During oviposition, the parasitoid wasp *C. flavipes* injects polidnavirus, venom, and parasitoid eggs into larvae of its Lepidopteron host, the *D. saccharalis.* This research analyzed cellular and humoral immunosuppression of *D. saccharalis* parasitized by *C. flavipes* in terms of hemocyte composition, encapsulation (using Sephadex A-25 beads) and nodulation (using *E. coli*) processes, and the activity of phenoloxidase (PO). Moreover, the effects of parasitism on the metabolic rates and food consumption were studied, and the susceptibility of parasitized and nonparasitzed larvae to different *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains was assessed in terms of larval mortality and pupation rates. The hemocyte types into granular cells, plasmatocitos, and others by morphological characters were classified. In both nonparasitized and parasitized larvae, the major hemocyte types were the granulocytes and plasmatocytes which consisted of 70–75% in the total hemocyte population. There were strong reductions of total hemocyte counts in parasitized larvae compared to those of the control group. *D. saccharalis* larvae showed a strong suppression of their encapsulation response to Sephadex A-25 beads and there was a reduction in the number of nodules in parasitized larvae. In terms of humoral inmune capacity, significant reductions in PO activity were detected in both hemocytes and plasma in parasitized larvae compared to unparasitized, indicating a significant decrease in humoral inmune response. The parasitized larvae showed significant decrease in total hemolymph proteins after 8 days of parasitization. Parasitism by the *C. flavipes* affects the growth and caused a decrease in weight gain and food consumption in *D. saccharalis* larvae, resulting in a lower final weight for parasitized hosts. Approximate digestibility and the efficiency of conversion of digested food of the parasitized hosts were also lower in parasitized larvae. The *D. saccharalis* parasitized by *C. flavipes* exhibited higher susceptibility to HD-73, HD-551 and HD-133 strains. This research demonstrates that the parasitism of *C. flavipes*

adversely affects both celular and humoral immunity, and increases the susceptibility of *D. saccharalis* to bacterial infections.

Key words: Sugarcane borer, polidnavirus, encapsulation, nodulation, phenoloxidase, hemocytes

Resumen

Cotesia flavipes (Himenóptera: Braconidae), es un endoparasitoide gregario importante de *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera: Crambidae), una plaga severa de la caña de azúcar presente en México y EE.UU. Durante la ovoposición, el parasitoide *C. flavipes* inyecta en el lepidóptero hospedero *D. saccharalis*, una mezcla conformada por polidnavirus, veneno y los huevecillos de su progenie. Esta investigación tiene como objetivo analizar la inmunosupresión celular y humoral en el estadío larval de *D. saccharalis* una vez que son parasitadas por *C. flavipes* en términos de la composición de la población de hemocitos y diversos procesos de defensa como lo es la encapsulación (utilizando perlas de Sephadex A-25), la nodulación (induciendo una infección artificial con *E. coli*), y la actividad fenoloxidasa (PO). Por otra parte se analizaron los efectos del parasitismo sobre las tasas metabólicas y del consumo de alimentos y también se evaluó la susceptibilidad de las larvas de *D. saccharalis* parasitadas y sin parasitar a diferentes cepas *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) en términos de mortalidad larvaria y las tasas de pupación. Se clasificaron los tipos de hemocitos en células granulares, plasmatocitos, y otros por sus caracteres morfológicos. Tanto en las larvas sin parasitar como en las parasitadas, los tipos de hemocitos más importantes fueron los granulocitos y plasmatocitos, constituyendo estos alrededor del 70-75% de la población total de hemocitos. Al realizar un conteo total de hemocitos se presentó una fuerte reducción del número de los mismos en las larvas parasitadas en comparación con el grupo control. Las larvas de *D. saccharalis* mostraron una fuerte supresión de la respuesta de encapsulación de las esferas de Sephadex A-25 y además, se observó una reducción en el número de nódulos en los ejemplares parasitados. En cuanto a la capacidad inmune humoral, se detectó una reducción significativa en la actividad PO tanto en los hemocitos y el plasma proveniente de las larvas parasitadas en comparación con las no parasitadas, lo que indica una disminución significativa en la respuesta

inmune humoral. Las larvas parasitadas mostraron una disminución significativa de la concentración de proteínas en la hemolinfa total después de 8 días de parasitación. El parasitismo de la *C. flavipes* afecta el desarrollo en las larvas de *D. saccharalis* causando una disminución en la ganancia de peso y el consumo de alimento, lo que resulta en una ganancia menor del peso final de los ejemplares parasitados. Parámetros como la digestibilidad y la eficiencia de la conversión de los alimentos digeridos en los ejemplares parasitados también fueron más bajos. Cuando *D. saccharalis* fue parasitado por *C. flavipes* mostró una mayor susceptibilidad a las cepas HD73, HD551 y HD133 de *Bacillus thuringensis*. Esta investigación demuestra que el parasitismo de *C. flavipes* afecta negativamente a la inmunidad celular y humoral, y aumenta la susceptibilidad de *D. saccharalis* a las infecciones bacterianas.

Palabras clave: Barrenador de la caña de azúcar, polidnavirus, encapsulación, nodulación, fenoloxidasa, hemocitos

Introducción

El sistema inmune de los insectos puede ser clasificado en inmunidad humoral y celular (Ratcliffe *et al.*, 1985). La respuesta inmune celular se refiere a la respuesta llevada a cabo por los hemocitos como la fagocitosis, la nodulación y la encapsulación. La encapsulación es la respuesta inmune más importante llevada a cabo en contra de los huevecillos de los parasitoides (Strand y Pech, 1995b), el cual es un proceso complejo en el cual los hemocitos encierran los cuerpos extraños que no pueden ser digeridos mediante el proceso de fagocitosis. En esta reacción inmunológica, los hemocitos rodean los cuerpos extraños mediante múltiples capas celulares (Lavine y Strand, 2002) originando la muerte o eliminación del cuerpo extraño para de esta manera evitar la nutrición del cuerpo extraño mediante la liberación de agentes químicos citotóxicos. (Schmidt *et al.*, 2001). Algunas avispas de himenópteros de las familias Braconidae e Ichneumonidae, reconocidas como endoparasitoides, completan el desarrollo de los huevecillos y las larvas en el hemocele de otro insecto (Mackauer y Sequeria, 1993). Para que la parasitación sea exitosa, la descendencia de la avispa endoparasitoide debe superar las respuestas inmunes del huésped con la finalidad de evitar su muerte (Ibrahim y Kim, 2006; Strand *et al.*, 2006; Webb y Strand, 2005; Li y Webb, 1994). Estas respuestas alteran el estadio larval del huésped con la finalidad de permitir el desarrollo y la nutrición del parasitoide (Lee y Kim, 2004). Para inducir la inmunosupresión y permitir el desarrollo se requieren varios factores parasíticos, los cuales pueden ser clasificados como factores maternos o embrionarios (Theopold *et al.*, 2000). Los factores maternos como por ejemplo las proteínas del ovario (Webb y Luckhart, 1994), el veneno (Richards y Parkinson, 2000), y los polidnavirus (Strand y Pech, 1995a) son entregados por la avispa hembra adulta durante la ovoposición, mientras que los factores embrionarios incluyen a los teratocitos y la larva del parasitoide mismo

(Dahlman y Vinson, 1993; Jones y Coudron, 1993; Krell *et al.*, 1982). Los polidnavirus son un grupo único de virus de ADN de doble cadena segmentada, los cuales se presentan en asociación muta con algunas avispas himenópteras (Krell *et al.*, 1982), para ello los virus en su forma proviral están integrados en el genoma de la avispa y se replica solamente en la región del cáliz. Durante la ovoposición, los virus son liberados dentro del hemocele del hospedero en donde éste expresa sus genes sin llevar a cabo su replicación (Fleming y Summers, 1991). El genoma del polidnavirus reveló que tiene a varias familias de genes como los genes *IkB*, *ELP*, y los relacionados a las proteínas parecidas a la lectina, a las proteínas específicas de parasitismo, y la proteína tirosina fosfatasa (Kim *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2005). *Cotesia flavipes* (Himenóptera: Braconidae) es un endoparasitoide gregario que parasita barrenador de la caña, *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera: Crambidae), e induce la inmunosupresión del hospedero y el bloqueo del desarrollo (Mahmoud *et al.*, 2011). Este estudio se enfocó en la supresión de la respuesta inmune celular y humoral en *D. saccharalis* después del proceso de parasitación realizado por *C. flavipes.*

Antecedentes

Diatraea saccharalis y los polidnavirus de *Cotesia flavipes*

El barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis* (F.) es una plaga importante de la caña de azúcar en el continente americano (Posey *et al.*, 2006; Reagan, 2001). Ocasionalmente este insecto causa daños económicos en el cultivo del arroz y el sorgo (Castro *et al.*, 2004). En años recientes, *D. saccharalis* ha llegado a ser un organismo barrenador que se encuentra como principal plaga en el cultivo de maíz en algunas áreas en la región central y media de los Estados Unidos, especialmente en el estado de Luisiana (Huang *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2004) y Texas (Porter *et al.*, 2005). Un estudio de tres años (2004–2006) en Luisiana mostro que *D. saccharalis* representó el 73% de la población total de barrenador del maíz en las áreas productoras de maíz más importantes del estado (Huang *et al.*, 2006). Grandes extensiones infestadas con el barrenador de la caña de azúcar también fueron reportados en el campo en las regiones del sur y centro de Texas durante el 2005 (Porter *et al.*, 2005).

Cotesia favipes es un endoparasitoide gregario y koinobionte de larvas, el cual ha sido muy usado en los programas de control biológico del barrenador de la caña de azúcar *D. saccharalis* (Botelho y Macedo, 2002). *C. flavipes* parasita al estadío larval de *D. saccharalis*, e induce una inmunosupresión en el hospedero. La parasitación exitosa por la avispa endoparásita se lleva a cabo disminuyendo el sistema inmune con la finalidad de proteger su progenie y arrestar el desarrollo del hospedero con la finalidad de canalizar todos los nutrientes del hospedero y aportarlos al desarrollo del parasitoide (Strand y Pech, 1995; Beckage y Kanost, 1993). Algunas avispas himenópteras poseen algunos factores inmunosupresores, provenientes tanto de la parte materna como de la parte embrionaria (Theopold *et al.*, 2001). Se ha demostrado que los factores maternos incluyen a las proteínas de ovario, el veneno, y los polidnavirus (PDV), mientras que los

factores embrionarios son los teratocitos, un tipo específico de células derivada de la membrana serosa embrionaria (Webb y Luckhart, 1994; Dahlman y Vinson, 1993; Jones y Coudron, 1993; Krell *et al.*, 1982). Diferentes especies de himenópteros poseen diferentes combinaciones de estos factores inmunosupresores. Los teratocitos se han encontrado en seis familias de insectos del orden Himenóptera: Braconidae, Ichneumonidae, Platygastridae, Scelionidae, Trichogrammatidae, y Aphelinidae (Basio y Kim, 2005). Por otro lado, los PDV sólo se han encontrado en dos familias, los Braconidae e Ichneumonidae, y se clasifican en bracovirus y ichnovirus, respectivamente (Webb *et al.*, 2000).

Los PDVs son virus únicos de ADN circular de doble cadena y segmentado (Webb *et al.*, 2000). Los PDVs persisten como provirus integrados en el genoma de las avispas asociadas y se replican en los ovarios de las hembras, donde los viriones se acumulan en concentraciones elevadas (Wyler y Lanzrein, 2003; Shelby y Webb, 1999) (ver fig. 1). Los hospederos de las avispas que llevan consigo los polidnavirus son los estadios larvarios de los lepidópteros. Cuando una avispa hembra ovoposita sobre su hospedero, esta inyecta uno o más huevecillos y viriones que infectan al hospedero afectando el sistema inmune celular del insecto (Schmidt *et al.*, 2001, Stoltz, 1993). Los polidnavirus no se replican en el lepidóptero hospedero, solo llevan a cabo la expresión viral de sus genes, los cuales atacan el sistema inmune del hospedero con la finalidad de evitar la muerte o la inactivación de los huevecillos del parasitoide y además originan otras alteraciones fisiológicas que finalmente causan la muerte del hospedero (Webb y Strand, 2005; Beckage y Gelman, 2004; Turnbull y Webb, 2002; Asgari *et al.*, 1996). Así, el mutualismo que existe entre los polidnavirus y las avispas parasitoides, consiste en llevar a cabo la transmisión viral con la finalidad de asegurar la sobrevivencia del parasitoide, y la sobrevivencia del parasitoide dependerá de igual manera de la infección

viral sobre el lepidóptero hospedero (Webb *et al.* 2006). Recíprocamente, los polidnavirus son patógenos de los hospederos de las avispas. El objetivo principal de estos virus parece ser el sistema inmune del huésped. Por lo tanto, vale la pena dar más detalles aquí sobre el sistema inmunológico de los insectos.

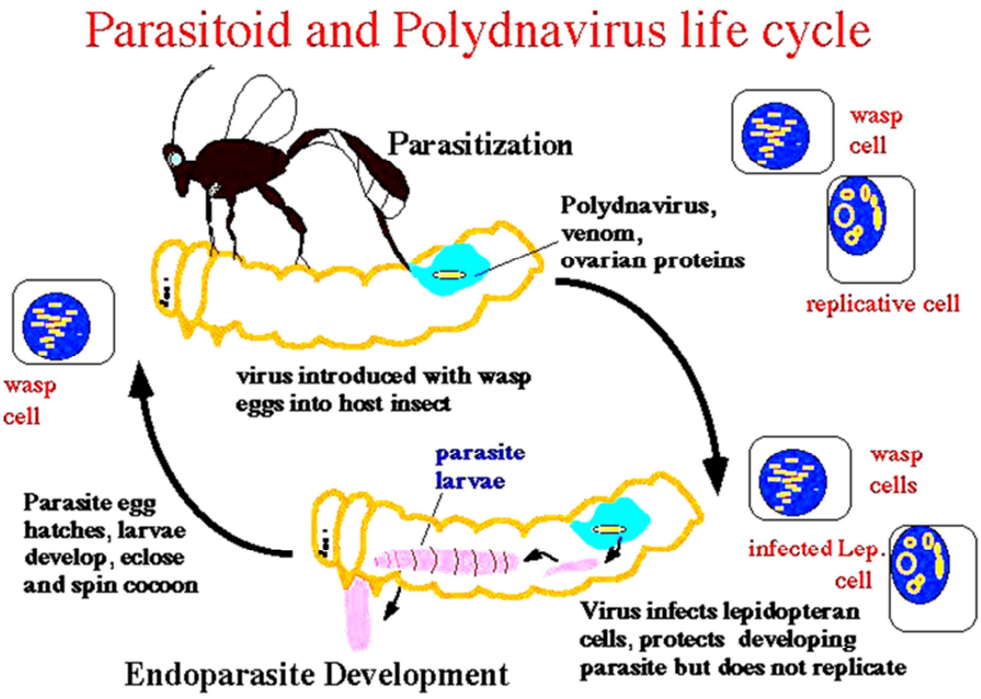


Fig.1. Ciclo vital del parasitoide y su polidnavirus (Webb et al. 1999)

Este diagrama indica el ciclo vital del parasitoide y del polidnavirus. El PDV se replica y se ensambla sólo en las células del cáliz de los oviductos de las avispas hembras. Los PDVs se inyectan en conjunto con los huevecillos, el veneno y las proteínas del ovario en el momento de la ovoposición sobre las larvas huésped.

Los PDVs inhabilitan las respuestas de defensa celular y humoral dirigidas contra los huevecillos. Después de la eclosión, las larvas de la avispa endoparásitica se desarrollan en el hemocele del lepidópteros huésped, y antes de emerger las larvas tejen un capullo y se convierten en crisálidas o pupas (Shelby y Web, 1999).

La asociación mutua entre el polidnavirus y las avispas parasíticas pertenecientes a las familias Braconidae e Ichneumonidae representan una de las relaciones más singulares de este tipo entre los eucariontes y los virus (Krell *et al.*, 1982). Desde su descubrimiento, los polidnavirus representan un área interesante para los entomólogos, debido a la capacidad para inducir la inmunosupresión del hospedero. La siguiente información se está centrando en cómo se está llevando a cabo un control del sistema inmune celular y qué tipo de respuesta inmune llevan a cabo los hemocitos.

Eventos moleculares que controlan la respuesta inmune celular

La inmunidad los insectos es clasificada en dos categorías, la respuesta inmune celular y la humoral (Ratcliffe *et al.*, 1985). Esta clasificación es un tanto arbitraria, ya que algunos factores humorales afectan las funciones celulares y las células pueden contribuir en la activación de algunos factores humorales. La defensa celular se refiere a la respuesta inmune mediada por los hemocitos como la fagocitosis, la nodulación y la encapsulación (Schmidt *et al.*, 2001; Strand y Pech, 1995a). La respuesta inmune celular consiste en el reconocimiento, la mediación y las respuestas efectoras inmunes. En esta sección se darán más detalles acerca de cómo se inician estos pasos.

1. Reconocimiento

Para activar la respuesta inmune, los hemocitos primero deben reconocer si la superficie del blanco es propia o no propia. En los mamíferos, la discriminación de reconocer lo propio de lo extraño se puede lograr ya sea por las moléculas de reconocimiento presentes en la sangre o por la presencia de algunos receptores de reconocimiento en la superficie de las células (Aderem y Underhill, 1999). Un patrón semejante se puede encontrar en los insectos en donde algunas moléculas de reconocimiento se pueden encontrar circulando en la hemolinfa como las lectinas (Yu *et*

al., 2005; Yu y Kanost, 2000; Yu *et al.*, 1999), las hemolinas, los proteínas que se unen a lipopolisacáridos (LPS) (Yu *et al.*, 2001), las proteínas de reconocimiento a la peptidoglicana (Ma y Kanost, 2000), y las proteínas tioester (TEP1) (Christophides *et al.*, 2002). Estas moléculas son identificadas en varios insectos y son reconocidas como receptores de reconocimiento patrón (PRRs) (Schmidt *et al.*, 2001; Bulet *et al.*, 1999). Estas proteínas son capaces de reconocer a los microorganismos probablemente para actuar como un enlace entre los hemocitos o las células del cuerpo graso y los microorganismos. Por ejemplo el silenciamiento de la proteína TEP1 en el mosquito *Anopheles gambiae* reduce la actividad fagocítica ya que esta molécula se une a las bacterias Gram negativas y actúan como un receptor de reconocimiento (Levashina *et al.*, 2001). Los hemocitos también tienen sus propios receptores de membrana como los genes relacionados con Toll y el gen *Imd* encontrados en el genoma de *Drosophila* (Imler y Hoffmann, 2000) y las integrinas, las cuales pueden jugar como inductores de señal no seguros. Las integrinas son un heterodímero formado por dos unidades, α and β (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987) y son un conocido receptor celular de reconocimiento presente en los insectos (Imler y Hoffmann, 2000). Aunque en estado de reposo las integrinas se encuentran en la superficie de los hemocitos, su activación se produce sólo cuando están expuestos a la superficie externa (Lavine y Strand, 2003). Posiblemente en el reconocimiento de las vías de transducción de señal, las integrinas causan un cambio de un estado normal a un estado de pegajoso lo cual facilita la adherencia. Las integrinas pueden reconocer la secuencia de un péptido específico en la superficie celular que contiene una secuencia específica de aminoácidos, RGD (Arg-Gly-Asp) (Ruoslahti, 1996). Pech y Strand (1995) reportaron que las esferas de sepharosa cubiertas con RGD pueden ser fácilmente encapsuladas por los hemocitos de *Pseudoplusia includens*. Además, las secuencias RGD solubles inhiben tanto las células

granulares y la dispersión de los plasmatocitos, y la capacidad de estas células para encapsular las perlas recubiertas con la secuencia RGD. Esto sugiere que el cambio de hemocitos al estadío adhesivo implica la presencia de moléculas de adhesión (integrinas) que contienen secuencias de reconocimiento RGD. Varios estudios (Lavine y Strand, 2003; Giancotti y Ruoslahti, 1999) reportan que los niveles de ARNm de las integrinas se incrementan cuando los hemocitos se someten a la formación de la capsula. Esto sugiere que las integrinas son unas moléculas importantes dentro de la activación de la inmunidad humoral y especialmente en la encapsulación.

2. Mediación

La mediación de la inmunidad celular es controlada por la síntesis de eicosanoides (Miller *et al.* 1994; Stanley *et al.*, 1991), aminas biogénicas (Wiesner *et al.*, 1996; Dunphy y Downer, 1994), citocinas (Lavine y Strand, 2002), y H_2O_2 (Sun y Faye, 1995). Los eicosanoides son metabolitos oxigenados de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, los cuales se pueden clasificar en tres categorías, incluyendo a las prostaglandinas, diversos productos de la lipoxigenasa y los ácidos epoxieicosatrienoicos (Stanley-Samuelson, 1994). El rol de los eicosanoides en la mediación de la respuesta inmune celular ha sido reportado en diversos reportes. Por ejemplo, en la nodulación, los ecoisenoides median la formación de microagregados de hemocitos (Miller y Stanley, 2001; Miller *et al.*, 1994). Otro ejemplo se presenta en larvas de *Galleria melonella*, en donde los eicoisenoides median la dispersión y la propagación de células que se sabe son importantes en las otras dos respuestas inmunes de tipo celular, como lo es la fagocitosis y la encapsulación (Mandato *et al.*, 1997). Las aminas biogénicas también están involucradas en la mediación de la respuesta inmune celular de los hemocitos de los insectos. Por ejemplo, Wiesner *et al.* (1996) sugieren que una de las aminas biógenas puede actuar como un factor estimulador de la

fagocitosis de los plasmatocitos de *Galleria mellonella*. La octopamina se reportó que también modula la nodulación en las larvas de *Galleria mellonella* (Dunphy y Downer, 1994). El peróxido de hidrogeno originado por el estrés oxidativo también induce la expresión de genes del sistema inmune (Sun y Faye, 1995).

3. Respuesta Inmune en los Insectos

En respuesta a la infección por patógenos, los insectos pueden expresar un mecanismo de defensa muy eficaz del tipo inmunidad celular y humoral (Ratcliffe *et al.*, 1985). Hay tres reacciones inmunitarias celulares del huésped en los hemocitos, la nodulación, la fagocitosis y la encapsulación, pero las dos últimas respuestas han sido consideradas como los principales mecanismos dirigidos hacia los endoparasitoides (Strand *et al.*, 2006; Webb y Strand, 2005; Li y Webb, 1994).

i. Nodulacion

Los nódulos son agregados de hemocitos que rodean y atrapan a los microorganismos (Ratcliffe y Gagen, 1976). Esta es una respuesta especialmente eficaz para eliminar un gran número de microorganismos a la vez. Inicialmente después del reconocimiento las células granulares atrapan a los organismos invasores y posteriormente se presenta a una agregación de plasmatocitos sobre el agente extraño la cual es favorecida probablemente por la acción de algunas citoquinas liberadas por las células granulares (Lavine y Strand, 2002).

ii. Fagocitosis

La fagocitosis es una respuesta de defensa ampliamente conservado en el que la unión del blanco a su receptor induce a la célula inmune para formar un fagosoma. Esto se traduce en inmersión del blanco a través de un mecanismo de polimerización dependiente de actina mediante la maduración del fagosoma en un fagolisosoma en donde ocurre una serie de eventos de fisión y la fusión de endosomas y lisosomas

(Stuart y Ezekowitz, 2005). Los hemocitos fagocitan una diversidad de blancos, incluyendo bacterias, levaduras cuerpos apoptóticos e incluso partículas abióticas como esferas sintéticas y partículas de tinta india (Lavine y Strand, 2002; Lanot *et al.*, 2001). El principal tipo de hemocitos reportados como fagocíticos varía entre los insectos. Por ejemplo, en *Drosophila*, las células fagocíticas más importantes son de plasmatocitos (Elrod-Erickson *et al.*, 2000) pero en algunos insectos lepidópteros como *P. includens*, las células granulares son las principales células fagocíticas (Strand *et al.*, 2006). En *Plutella xylostella* sin embargo, muestran que tanto las células granulares y de plasmatocitos son fagocíticas (Ibrahim y Kim, 2006).

iii. Encapsulación

En especies como *Manduca sexta* la distribución de los granulocitos y plasmatocitos en las cápsulas aparecen al azar (Ibrahim y Kime, 2006) mientras que en otros está muy bien organizada con los granulocitos, siendo las primeras células que se unen al blanco y los plasmatocitos se unen después. El último caso se ilustra bien en *P. includens* donde la encapsulación de la mayoría de los blancos foráneos comienza cuando pocos granulocitos se unen con el blanco (Pech y Strand, 2000, 1996). Esto es seguido por la unión de un gran número de plasmatocitos que se adhieren fuertemente al objetivo y entre sí para formar una envoltura multicapa. Ni los granulocitos, ni los plasmatocitos forman cápsulas, sino que los plasmatocitos encapsulan al agente blanco después de que se da la unión de los granulocitos, lo que indica que los granulocitos producen factores que activan y reclutan a los plasmatocitos. Estos factores incluyen los péptidos de dispersión de los plasmatocitos (PSP), así como otras moléculas desconocidas. La formación de la cápsula después acaba cuando una monocapa de granulocitos se adjunta y la apoptosis sobre la periferia la cápsula deja una capa como una matriz extracelular (Liu *et al.*, 1998; Pech y Strand, 1996). En efecto, en la periferia

de la cápsula se asume que probablemente las características de la membrana basal intacta crea una superficie propia a la que no se unen más plasmatocitos. Lavine y Strand (2001) detallan esto en sus estudios, encontrando que mientras la encapsulación de la mayoría de los blancos requiere la cooperación entre las células granulares y los plasmatocitos, algunos blancos pueden ser encapsulados por los plasmatocitos solo si son opsonizadas mediante los receptores solubles en el plasma. En *Drosophila*, las cápsulas se componen principalmente de lamelocitos y otros tipos de células como los plasmatocitos, participando en el reconocimiento del blanco, sin embargo el reclutamiento o la agregación de los lamelocitos no está clara. Las cápsulas formadas por hemocitos de insectos a menudo generan melanización (Wertheim *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2001; Strand y Pech, 1995). Como se discutió previamente, las células oenocitoides de los Lepidoptéros y las células cristal de *Drosophila* son fuente de componentes de la cascada de la fenoloxidasa aunque el plasma por sí mismo contiene estos factores, lo cual no hace claro el origen de la melanina que se forma alrededor de las capsulas. Sin embargo, la caracterización de la cascada de la fenoloxidasa en *M. sexta* indica que las compuestos pro-fenoloxidasa forman un complejo con las proteasas activadores de las profenoloxidasas (PAPs), las proteasas homólogas de serina (SPHs), y las moléculas de reconocimiento parecidas a las inmunolectinas que se unen a las bacterias y a los nematodos (Yu *et al.*, 2003). Este hallazgo sugiere un mecanismo de como el depósito de la melanina puede limitarse a la superficie de un patógeno o a la cápsula. También es bien sabido que la melanina se acumula en torno a una serie de blancos extraños en los mosquitos para formar lo que se denominan cápsulas melanóticas (Michel *et al.*, 2005, 2006). Ningún hemocito se une directamente a los blancos antes de la encapsulación melánica aunque los hemocitos son fuentes

potenciales de los componentes de las cascadas PO necesarias para la formación de melanina.

Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria común que ocurre naturalmente en los suelos de todo el mundo. Varias de sus cepas pueden infectar y matar insectos. Debido a esta propiedad, *Bt* ha sido usado para el control de plagas, siendo en la actualidad el único "insecticida microbiano" de uso generalizado. La actividad insecticida de *Bt* fue descubierto por primera vez en 1911, pero no estuvo disponible comercialmente sino hasta la década de 1950. En los últimos años, ha habido un gran interés en *Bt* y se han desarrollado varios productos nuevos a partir de él, en gran parte debido a la seguridad asociada a estos insecticidas. (http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05556.html website, 2008).

Propiedades

A diferencia de los típicos agentes tóxicos que atacan el sistema nervioso, *Bt* actúa mediante la producción de proteínas (delta-endotoxina, o cristal tóxicos) que reaccionan con las células de la mucosa intestinal de los insectos susceptibles. Estas proteínas de *Bt* paralizan el sistema digestivo y el insecto infectado deja de alimentarse en cuestión de horas. Los insectos afectados por *Bt* en general mueren de inanición, lo cual puede tomar varios días. Ocasionalmente, la bacteria entra en la hemolinfa de los insectos y se reproduce dentro de los insectos. Sin embargo, en la mayoría de los insectos la reacción de los cristales proteicos es letal. Incluso las bacterias muertas que contienen las proteínas pueden actuar como insecticidas eficaces. La cepa más común de *Bt* (var. *kurstaki*) puede matar únicamente gusanos defoliadores y barrenadores. En la última década, las cepas de *Bt* han sido desarrollados para el control de ciertos tipos de larvas de mosquitos (var. *israelensis*, o *Bt*i). Estos son ampliamente utilizados contra las larvas

de mosquitos y simulidos. Más recientemente algunas cepas han sido encontradas con actividad en contra de algunos escarabajos, como el escarabajo de la papa del Colorado y escarabajo del olmo (cepa San Diego o var. *tenebrionis*). Entre las diversas cepas de *Bt*, la actividad insecticida es específica. Es decir, las cepas de *Bt* usadas para controlar larvas de mosquito no afectan a las larvas de los Lepidópteros. El desarrollo de productos de *Bt* es actualmente un área activa y existe una gran variedad de productos, aunque la eficacia de las diversas formulaciones puede ser diferente (http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05556.html website, 2008).

Desventajas

Bt es susceptible a la degradación por la luz solar. La mayoría de las formulaciones persisten en el follaje menos de una semana después de la aplicación. Algunas de las cepas más desarrolladas para el control del escarabajo defoliador se vuelven ineficaces en alrededor de 2 horas. Los fabricantes están experimentando con diversas técnicas para aumentar su persistencia. Una estrategia consiste en insertar genes de las proteínas más toxicas de *Bt* en otras especies de bacterias que pueden sobrevivir mejor en las superficies de las plantas atacadas por los defoliadores (por ejemplo la formulación M-Trak de *Bt* subsp. San Diego). La actividad tan específica de los insecticidas *Bt* podría limitar su uso en los cultivos donde la problemática se presenta con varias plagas a la vez, incluidos los insectos no susceptibles (áfidos, langostas, etc.) Estrictamente como un insecticida oral, *Bt* afecta solamente a los insectos defoliadores para que pueda ser eficaz, y la cobertura de aplicación debe ser cuidadosa. Esto limita aún más su utilidad contra las plagas que son susceptibles a *Bt* pero que rara vez tienen la oportunidad de ingerirlo en el campo. Los aditivos (gomas o humectantes) a menudo son útiles en una aplicación de *Bt* mejorando el rendimiento y su eficiencia, lo que permite cubrir mejor y resistir el lavado. Ya que *Bt* no mata

rápidamente, los usuarios pueden asumir incorrectamente uno o dos días después del tratamiento que no es efectivo. Sin embargo, esto no es más que un problema de percepción.

Los productos a base de *Bt* tienden a tener una vida útil más corta que otros insecticidas. Los fabricantes generalmente indican una menor eficacia después de dos a tres años de almacenamiento. Las formulaciones líquidas son más perecederas que las formulaciones en polvo. La vida útil es mayor cuando las condiciones de almacenamiento son bajo atmósferas frescas, secas y protegidas de la luz.

(http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05556.html website, 2008).

Ventajas

La actividad específica de *Bt* en general se considera muy beneficiosa. A diferencia de la mayoría de los insecticidas, *Bt* no tiene un amplio espectro de actividad, por lo que no matan a insectos benéficos, como los enemigos naturales (parasitoides y depredadores), ni a los insectos polinizadores como las abejas. Por lo tanto, *Bt* puede ser empleado de manera conjunta con otras estrategias de control biológico. Por ejemplo, en el estado de Colorado, *Bt* se está empleando para controlar el barrenador del maíz en el campo. Quizás la mayor ventaja de *Bt* es que no es tóxico para las personas, mascotas y otros animales. Este margen de seguridad se recomienda utilizar en la agricultura o en otros lugares sensibles, donde el uso de plaguicidas puede causar efectos adversos (http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05556.html website, 2008).

Hipótesis

El parasitismo de *Cotesia flavipes* induce inmunosupresión en *Diatraea saccharalis* el cual podría tener efecto sobre el consumo y la eficiencia de utilización de alimentos y en la susceptibilidad del insecto hospedero a la infección originada por bacterias.

Objetivo General

Estudiar el efecto del parasitismo por *Cotesia flavipes* sobre la respuesta inmune celular y humoral, el consumo y la eficiencia de utilización de alimentos y la susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* hacia diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Objetivos Específicos

1. Estudiar el efecto del parasitismo de *C. flavipes* sobre la inmunidad humoral y celular de *D. saccharalis.*
2. Estudiar el efecto del parasitismo de *C. flavipes* sobre el consumo de alimentos y la eficiencia de utilización de *D. saccharalis.*
3. Estudiar el efecto del parasitismo de *C. flavipes* sobre la susceptibilidad de *D. saccharalis* a diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis.*

Capítulo 1: El parasitismo de *Cotesia flavipes* altera la población de hemocitos y la inmunidad humoral del barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis.*

Resumen

El parasitismo de larvas de *Diatraea saccharalis* por la avisa Braconidae *Cotesia flavipes* o la inyección del polidnavirus de *C. flavipes* (CfPDV) causa numerosas alteraciones en la fisiología del huésped, incluyendo la interrupción del desarrollo, la disminución de la inmunidad del insecto huésped, y cambios bioquímicos en las proteínas, carbohidratos, el glucógeno y los lípidos. Este estudio se centró en los cambios de la inmunidad celular durante la parasitación de *D. saccharalis* en términos de la composición de hemocitos y las funciones celulares. También se analizaron los efectos de la parasitación por *C. flavipes* en la inmunidad humoral sobre ejemplares parasitados de *D. saccharalis* en relación a la actividad fenoloxidasa. En las larvas no parasitadas de *D. saccharalis*, las células granulares representan el principal tipo de hemocitos (35%), sin embargo los plasmatocitos también estuvieron presentes en alrededor del 30% de los conteos totales. Después de la parasitación por *C. flavipes*, las proporciones relativas de estos dos hemocitos cambiaron ligeramente, lo cual se reflejó en el recuento de hemocitos totales, mostrando una reducción significativa del número de estas células en las larvas parasitadas. Las larvas parasitadas mostraron una disminución significativa de la concentración de total de las proteínas de la hemolinfa 8 días después de la parasitación. De igual forma mostraron una disminución significativa en la capacidad inmune humoral como lo demostró la reducción de la actividad fenoloxidasa. Esta investigación demuestra que el parasitismo de *C. flavipes* afecta negativamente a la población total de hemocitos en relación al número y la función, lo cual contribuye a generar un proceso de inmunosupresión. También el plasma mostró tener una menor actividad fenoloxidasa que los hemocitos y de igual forma las larvas parasitadas mostraron menor actividad fenoloxidasa que las larvas de control.

Palabras Clave: Parasitismo*, Cotesia flavipes, Diatraea saccharalis*, Fenoloxidasa, hemocitos

1. Introducción

El desarrollo exitoso de endoparasitoides requiere de la supresión del sistema inmune humoral de manera irreversible. El parasitoide invasor tiene que asegurarse de que no será destruido por los procesos del sistema inmune del huésped y además de que el sistema inmunológico comprometido del hospedero no posea la capacidad para combatir una infección secundaria. Es muy importante que la reacción inmune no llegue al punto de la muerte del huésped, con lo que el desarrollo del parasitoide durante la parasitación no se finalice. Los animales multicelulares se defienden contra los organismos infecciosos mediante dos sistemas conocidos como inmunidad innata y la adquirida. El sistema inmune innato está constituida principalmente por línea germinal codificada por los factores del reconocimiento y la muerte de invasores extraños, mientras que el sistema inmune adquirido produce receptores mediante un reordenamiento de genes somáticos que reconocen antígenos específicos y que permiten a los organismos desarrollar una memoria inmunológica (Fearon, 1997). Los insectos carecen de un sistema inmune adquirido, pero tienen una respuesta innata bien desarrollada. Las defensas iniciales incluyen las barreras físicas de la envoltura o el intestino, las respuestas de la coagulación de la hemolinfa, y la producción de diversas moléculas citotóxicas en el sitio de la lesión. Las entidades extrañas que pasan estas barreras y entrar al hemocele deben enfrentarse a más moléculas citotóxicas, así como una serie de diferentes hemocitos. El sistema inmunológico de insectos se subdivide en las respuestas de defensa humoral y celular. Las defensas humorales incluyen la producción de péptidos antimicrobianos (cecropinas, atraquinas, defensinas, lisozima, hemolinas, lectinas, las proteasas, e inhibidores de la proteasa) (Hoffmann *et al.*, 1996) y la formación de radicales libres citotóxicos (Lowenberger, 2001; Meister *et al.*, 2000; Nappi *et al.*, 1995), intermediarios reactivos de oxígeno y nitrogeno (Nappi y Vass,

2001; Bogdan *et al.*, 2000) y las cascadas de los complejos enzimáticos que regulan la coagulación y la melanización de la hemolinfa (Gillespie *et al.*, 1997; Muta y Iwanaga, 1996). Por el contrario, la defensa celular se refiere a las respuestas inmunes mediadas por los hemocitos como la fagocitosis, nodulación y encapsulación. El primer desafío con la que se encuentra un endoparasitoide en su vida inmadura es la respuesta inmune de su huésped: los huevos de endoparasitoides se colocan en la cavidad del aparato circulatorio (hemocele) de los insectos y deben de enfrentarse a una reacción de encapsulación potencial mediado por hemocitos del hospedero. En esta reacción de defensa, los objetos extraños bióticos o abióticos demasiado grandes como para ser fagocitados son reconocidos por primera vez por los granulocitos del huésped los cuales se degranulan y reclutan a los plasmatocitos. La propagación de estas células y la adherencia a la superficie exterior, origina que se forme un sello dentro de una cápsula celular (Ibrahim y Kim, 2006; Lavine y Beckage, 1996)**.** La agregación de los plasmatocitos es con mayor frecuencia seguida de la melanización, un proceso que implica el depósito de pigmentos de melanina dentro de las células de la cápsulas apoyada por la enzima fenoloxidasa (PO) (Lavine y Beckage, 1996). La melanización se cree que contribuye a la muerte de los organismos invasores así encapsulados (Lavine y Strand, 2002). Los endoparasitoides han desarrollado una variedad de estrategias para eludir la reacción inmune de sus hospedadores habituales. En algunas especies, los huevos se cubren con secreciones que impiden la unión de, o el reconocimiento por parte de los hemocitos. Por ejemplo, los huevos de *Cardiochiles nigriceps* están cubiertos con una capa coriónica de material fibroso que impide la unión de los plasmatocitos en el huésped *Heliothis virescens* (Davies y Vinson, 1986). Del mismo modo, los huevos de *Venturia canescens* están recubiertos con partículas semejantes a virus que comparten los determinantes antigénicos con una proteína del hospedero y por

lo tanto confieren protección pasiva contra el encapsulamiento al ocultar al parasitoide de los hemocitos (Rotheram, 1973). Por otro lado, algunas avispas parasitoides de la familia Braconidae e Ichneumónidae inyectan veneno, las proteínas de ovario y los polidnavirus (PDVs) dentro del lepidóptero hospedero durante la ovoposición (Stoltz, 1993). Estos factores han demostrado mediar diversas alteraciones de la fisiología del hospedero (Beckage y Kanost, 1993), uno de los cuales es la inmunosupresión (Lavine y Beckage, 1995; Strand y Pech, 1995a,b) que no solo protege a los huevecillos de los parasitoides de la encapsulación, sino también previene la respuesta del hospedero a otros blancos bióticos o abióticos, los cuales podrían ser encapsulados o nodulados (Strand y Noda, 1991; Davies y Vinson, 1988; Davies *et al.*, 1987; Guzo y Stoltz, 1987; Tanaka, 1987; Stoltz y Guzo, 1986; Vinson, 1974).

Cotesia flavipes introduce el veneno, las proteínas del ovario, los teratocitos (los cuales son derivados de la membrana del parasitoide durante la emergencia de la larva del huevo) y los polidnavirus durante la ovoposición, los cuales son los principales factores que modifican la fisiología del hospedero en términos de los procesos inmunológicos y de desarrollo (Mahmoud *et al.*, 2011; Ngi-Song, 1995). La parasitación de las larvas de *Diatraea saccharalis* por la avispa Braconidae *Cotesia flavipes* causa una supresión crónica de la respuesta inmune celular del insecto (encapsulación y la nodulación) y prolonga el periodo larval, el cual es resultado de la falla de la metamorfosis de las pupas (Mahmoud *et al.*, 2011). Se ha observado que las larvas parasitadas son susceptibles a las infecciones oportunistas (septicemia bacteriana) (Mahmoud *et al.*, 2011) lo que sugiere que las defensas antibacterianas de estos insectos son también comprometidas. Es del todo conocido que los diferentes tipos de hemocitos están involucrados en la respuesta inmune celular. Por ejemplo, la encapsulación originada por los hemocitos es un proceso complejo donde participan las células

granulares y los plasmatocitos de manera secuencial (Lavine y Strand, 2002). Cuando las células granulares pueden reconocer un agente extraño, estas liberan un conjunto de moléculas reconocidas como citosinas con la finalidad de atraer a los plasmatocitos, responsables de formar varias capas alrededor del patógeno o del agente extraño (Strand *et al.*, 2006; Pech y Strand, 2000, 1996). Un tipo de citosinas en este proceso ha sido identificado en *Pseudoplusia includens* la cual es reconocida como PSP1 (péptido de dispersión de plasmatocitos), el cual juega un rol en la modulación del comportamiento de los plasmatocitos. Así mismo, la fagocitosis de los hemocitos puede ser realizada por determinados tipos de células (Strand *et al.*, 2006).

El objetivo de esta investigación fue analizar la inmunosupresión de *D. saccharalis* después de la parasitación realizada por *C. flavipes* en términos de la composición de hemocitos, mediante la medición de los cambios de la población de hemocitos totales en larvas parasitadas tomando como referencia una población de larvas sin parasitar. También mostramos como la parasitación realizada por *C. flavipes* tiene influencia sobre las proteínas totales de la hemolinfa y la inmunidad humoral en términos de la actividad fenoloxidasa de la hemolinfa de *D. saccharalis.*

2. Materiales y Métodos

2.1. Insectos

Las avispas usadas en este estudio fueron originalmente importadas de África. *C. flavipes* fue reproducida sobre su hospedero habitual *D. saccharalis.* Ellos fueron mantenidos en nuestro laboratorio desde el año 2009. Los parasitoides adultos fueron alimentados sobre una solución de miel de abeja y las larvas hospedero fueron mantenidas sobre una dieta artificial, y los adultos fueron alimentados sobre una solución de sacarosa al 10% como lo describe Mahmoud *et al.* (2011). Los insectos fueron mantenidos en una atmosfera de 28°C y un fotoperiodo de 16:8 horas luz:

oscuridad. El parasitismo por *C. flavipes* fue realizado manualmente al exponer larvas del 3er al 6to instar de *D. saccharalis* a una avispa hembra de un día de emergidas después de la còpula. Los parasitoides ovopositaron una vez sobre la larva del insecto lepidóptero, y posteriormente estas fueron transferidas a dieta fresca proporcionada en una caja Petri.

2.2. Conteo de Hemocitos

Larvas del cuarto estadio *D. saccharalis* se dividieron en dos grupos. El primer grupo se utilizó como control (no parasitados), y el segundo grupo fue parasitado por *C. flavipes.* La hemolinfa se recogió después del día 1, 3, 6 y 9 después de la ovoposición del parasitoide. Las larvas no parasitadas de la misma edad fueron utilizadas como control. Para el recuento de hemocitos, las larvas se enfriaron en hielo durante 5 min y posteriormente fueron esterilizadas en etanol al 70%. Posterior a ello las larvas fueron disectadas en una caja de Petri removiendo un par de las patas falsas de la región abdominal, empleando unas tijeras estériles. Se colectaron 10 µl de hemolinfa en tubos eppendorf de 200 µl conteniendo 50 µl de buffer anticoagulante (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM Na_2EDTA y 41 mM ácido cítrico, pH 4.5) para evitar la agregación de hemocitos después de la colecta. La hemolinfa diluida se mantuvo en hielo y los hemocitos fueron contados inmediatamente en un hemocitómetro (cámara de Neubauer, Paul Marenfield GmbH&Co®, Germany) usando un microscopio de contraste de fases (Olympus BX41, Japan). Los tipos de hemocitos fueron clasificados en células granulares, plasmatocitos y en base a otras características morfológicas (Ibrahim y Kim, 2006; Gardiner y Strand, 1999). Las células granulares son células redondas con gránulos en su citoplasma, mientras que los plasmatocitos asumieron una forma de huso durante su estado difuso y en la forma no difusa mostraron una extensión citoplasmica

bilateral (ver fig. 2). Se observaron también otros tipos de hemocitos, pero colectivamente fueron denominados como "otros" en este estudio.

2.3. Reacción de Melanización

Con el fin de evaluar la capacidad de la hemolinfa total para mostrar una reacción de melanización, la hemolinfa se recogió de la misma manera como se explicó anteriormente mediante el uso de las larvas parasitadas y no parasitadas de la misma edad. La hemolinfa sin diluir fue depositada en una placa de Petri estéril durante 30 minutos a temperatura ambiente. Un cambio en la coloración de la hemolinfa, desde el verde esmeralda a marrón-negro se registró como melanización normal, mientras que el mantenimiento del color verde original fue considerado como el reflejo de una inhibición de la melanización (Doucet y Cusson, 1996). El oscurecimiento de la hemolinfa (indicio de melanización) fue evaluado visualmente después de 1, 2, 4, 6 y 7 días post- parasitación.

2.4. Ensayo de la actividad Fenoloxidasa (PO)

Las larvas de *D. saccharalis* se dividieron en dos grupos al momento de recoger la hemolinfa: el primero de ellos estuvo conformado por larvas del día 1, 2, 4, 6 y 7 post-parasitación y larvas no parasitadas de la misma edad, las cuales fueron utilizadas como control. La actividad fenoloxidasa (PO) se determinó con el sustrato, L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), según lo descrito por Kim *et al.* (2001). Las larvas fueron esterilizadas en etanol al 70% y se mantuvieron durante cinco minutos en hielo con la finalidad de anestesiarlas antes de cortar el patas falsas de la región abdominal para recolectar la hemolinfa. La actividad fenoloxidasa se midió tanto en los hemocitos como en el plasma del insecto. Los hemocitos y el plasma fueron separados por centrifugación a 8.000 rpm durante 10min a 4 ° C. Los hemocitos fueron resuspendidos en 20 μl de buffer salino de fosfatos 50 mM (PBS, pH 7,4). Se mezclaron 2 μl del

plasma con 10 μl de PBS. Para medir la actividad fenoloxidasa, se añadieron 2 μl de laminarina (100 mg) a cada mezcla de reacción y se incubó a temperatura ambiente. Después de diez minutos, se añadieron 900 μl de sustrato a una concentración de 10 mM de L-3 ,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (Sigma, EE.UU.) en PBS. La absorbancia se midió a 490 nm cada 5 minutos durante una hora.

2.5. Medición de la concentración de proteína total

Larvas del cuarto estadío de *D. saccharalis* se dividieron en dos grupos: las larvas parasitadas y las no parasitadas. La hemolinfa de las larvas fue recolectada 1, 5 y 8 días después de la parasitación en tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvo en hielo. El material obtenido fue centrifugado a 8000 rpm durante 10 min a 4 °C con la finalidad de eliminar hemocitos y los teratocitos del parasitoide. Los sobrenadantes se utilizaron para medir la concentración de proteína de acuerdo a la metodología descrita por Bradford (1976), empleando la albúmina de suero bovino como estándar.

2.6. Análisis Estadístico

Todos los datos fueron analizados empleando el software SPSS versión 11.0.0 (SPSS Inc., 2001). Las diferencias entre las medias fueron analizadas mediante la prueba de t para muestras independientes.

3. Resultados

3.1. Clasificación y morfología los Hemocitos

Para investigar el efecto del parasitismo en los hemocitos de las larvas de *D. saccharalis*, los hemocitos fueron clasificados en base a los criterios descritos por Strand y Noda (1991) y Brehelin y Zachary (1986). Cinco tipos de hemocitos fueron identificados mediante microscopía de contraste de fase. En la Figura 2 se presentan imágenes de los 5 principales tipos de hemocitos descritos debajo:

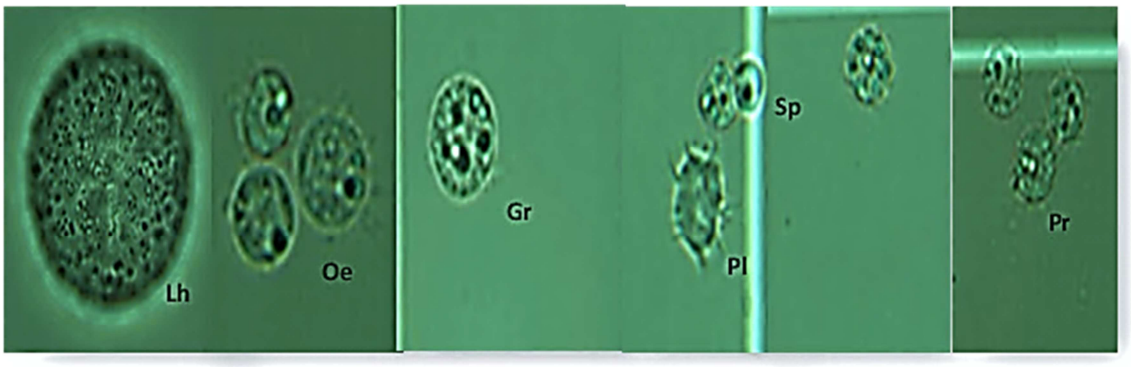


Fig. 2. Microfotografías de contraste de los hemocitos de larvas de *D. saccharalis*. Pr, Prohemocitos; Gr, hemocitos granulares; Sp, esferocitos; Pl, plasmatocitos y Oe, oenocitoides. Scale bar: 6 µm.

1. **Hemocitos Granulares** (Gr) son células de 12-20 µm de diámetro, de morfología ovoide o esférica, con un citoplasma granular, y se difunden en menor proporción al contacto con la superficie del vidrio en comparación con el plasmatocitos.
2. **Plasmatocitos (Pl)** son células de forma irregular, generalmente del mismo tamaño que los hemocitos granulares, poseen una morfología ovoide o fibroblástica y se extienden rápidamente en contacto con el vidrio. Las células presentan un núcleo claro en el centro de la célula, el cual se puede ver cuando está completamente extendido.
3. **Oenocitoides** (Oe) son células esféricas, de 10–40 µm de diámetro, las cuales presentan un núcleo central relativamente pequeño. Este tipo de células son semejantes a los hemocitos granulares después de producirse una lesión.
4. **Esferocitos** (sp) son células de 12–20 µm de diámetro, las cuales contienen gran cantidad de inclusiones citoplasmicas diferentes a las que presentan los hemocitos granulares. Estas células son raramente observadas en la hemolinfa. Los núcleos de los esferocitos se localizan en la parte central y son ricos en cuerpos de cromatina.

5. **Prohemocitos (Pr)** células de 8–10 μm de diámetro, raramente observadas en la hemolinfa y son de fase obscura. Esta ocasión fueron encontrados algunos hemocitos de gran tamaño en la hemolinfa los cuales aparecieron 6 días después de la parasitación.

   Los hemocitos granulares y los plasmatocitos presentaron una gran adherencia y fueron los hemocitos principales responsables de formar la capsula durante las reacciones de inmunidad celular que se describen más adelante. No se observaron diferencias en general en relación a la morfología y la ultraestructura de estos tipos de hemocitos en las larvas parasitadas y no parasitadas en larvas del quinto instar de *D. saccharalis*.

3.2. Efecto del parasitismo sobre el conteo total (THC) y el conteo diferencial de hemocitos

Los experimentos se realizaron con el fin de evaluar el efecto del parasitismo por *C. flavipes* en la abundancia de hemocitos en hemolinfa *D. saccharalis*. Morfológicamente, los hemocitos de *D. saccharalis* se pueden clasificar en células granulares, plasmatocitos, y otros tipos celulares. Como se puede observar en la Figura 3, el conteo total de hemocitos fue de entre $2x10^5$ y $1.9x10^5$ células/ml de hemolinfa hasta un día después del tratamiento tanto en las larvas no parasitadas y parasitadas. Entre 3 y 9 días después del tratamiento, el recuento celular total se elevó a $6x10^5$ y $5x10^5$ cels/ml en el control y las larvas parasitadas respectivamente. Mediante el uso de la prueba t de student, se determinó que el recuento total de hemocitos cambió durante el período de parasitismo y que hubo una diferencia significativa en el recuento de total de hemocitos después de 3 y 6 días después de la ovoposición del parasitoide ($t = 2.3457$, $gl = 34$; $P = 0.02$ y $t = 2.0827$; $gl = 26$; $P = 0.0473$), respectivamente (Fig. 3). No se encontraron diferencias significativas después de 1 y 9 días después de la

ovoposición del parasitoide (t = 1.7594; gl = 16; P = 0.0976 y t = 1.1851; gl = 27; P = 0.2463), respectivamente (Fig. 3).

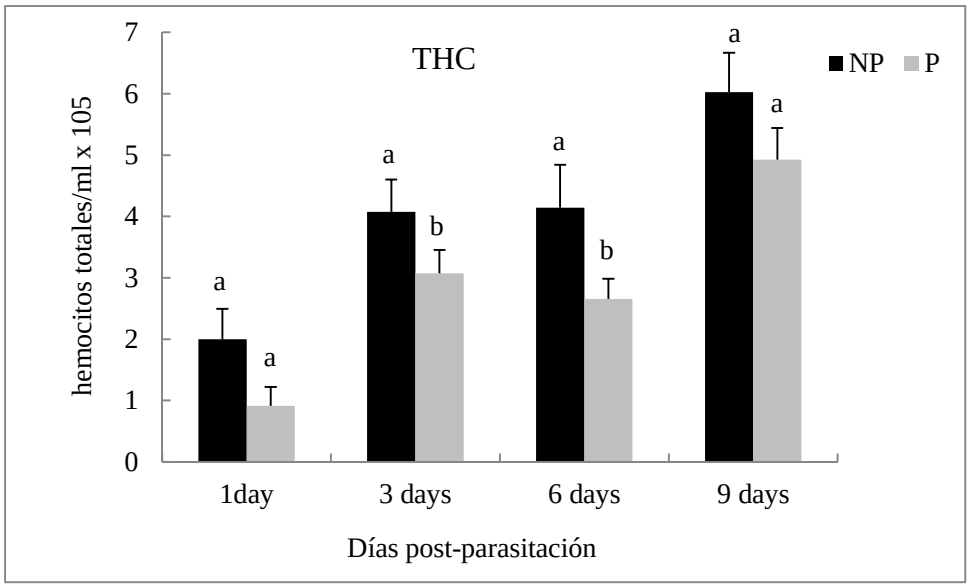


Fig.3. Conteo Total de hemocitos (THC) en la hemolinfa de *D. saccharalis* en el día 1, 3, 6 y 9 después de la parasitación por *C. flavipes*. Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test). El numero total de insectos usados por día fueron: día 1 (n=10 para NP y 8 para P), dia 3 (n=8 para NP y 10 para P), dia 6 (n=10 para NP y 16 para P), y al dia 9(n=8 para NP y 5 para P).

En cuanto a los conteos diferenciales de hemocitos (DHC) en las larvas de *D. saccharalis* sin parasitar, el tipo de hemocitos más frecuente fueron las células granulares, presentándose en un 32-39% de la población total de hemocitos. Los plasmatocitos fueron el segundo tipo más frecuente de hemocitos, representando aproximadamente el 35% del número total de hemocitos. Los hemocitos granulares y plasmatocitos componen más del 70% de la población total de hemocitos y la proporción de hemocitos granulares fue similar a la de los plasmatocitos (35%). Hubo una reducción significativa de la población plasmatocitos en las larvas parasitadas después de 6 días de la ovipostura del parasitoide (t = 2.4452; gl = 26; P = 0.0216), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las larvas parasitadas y no

parasitadas después de 1 y 9 días de parasitismo (t = 0.7261; gl =16; P = 0.4783 y t = 1.8317; gl = 12; P = 0.0919), respectivamente (Fig. 4).

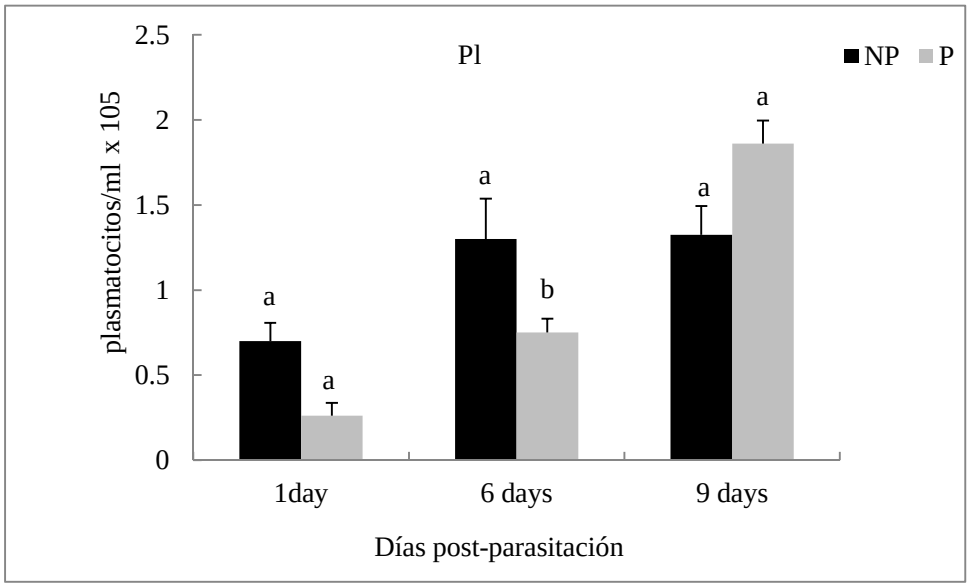


Fig.4. Conteo de Plasmatocitos (Pl) en la hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* de 1, 6 y 9 días después de la parasitación de *C. flavipes*. Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test). El numero total de insectos usados por día fueron: día 1 (n=10 para NP y 8 para P), dia 3 (n=8 para NP y 10 para P), dia 6 (n=10 para NP y 16 para P), y al dia 9(n=8 para NP y 5 para P).

La reducción de la población de células granulares en las larvas parasitadas fue significativa sólo después del sexto día de la parasitación (t = 2.2010; gl = 26; P = 0.0368), y no hubo diferencias significativas en el número total de células granulares después de 1 y 9 días de parasitismo (t= 0.2264; gl = 16; P = 0.8237 y t = 0.6079; gl = 11; P = 0.5556), respectivamente, en tanto las larvas parasitadas y no parasitadas (Fig. 5).

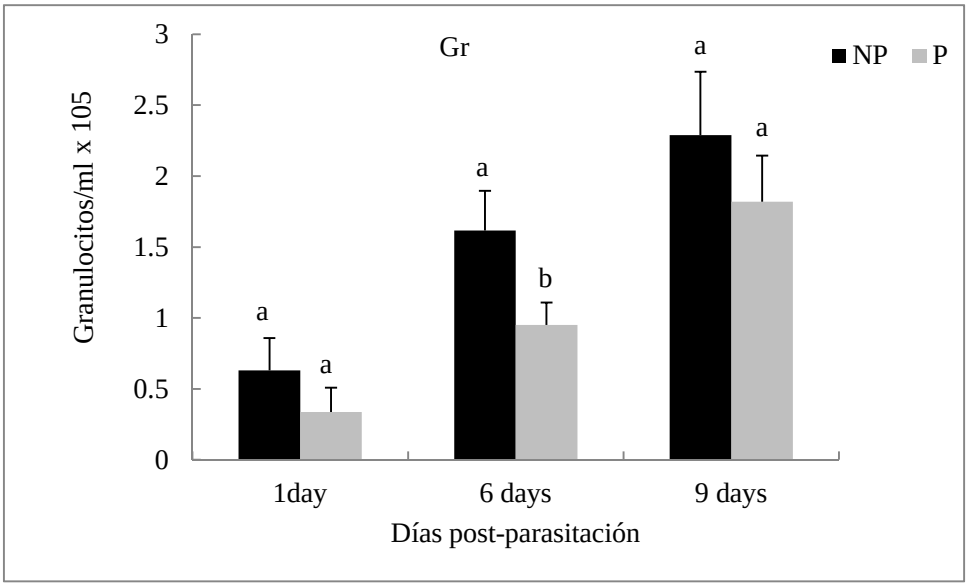


Fig.5. Conteo de Granulocitos (Gr) en la hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* de 1, 6 y 9 días después de la parasitación de *C. flavipes*. Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test). El numero total de insectos usados por día fueron: día 1 (n=10 para NP y 8 para P), dia 3 (n=8 para NP y 10 para P), dia 6 (n=10 para NP y 16 para P), y al dia 9(n=8 para NP y 5 para P).

No hubo diferencias evidentes en la morfología y ultraestructura de hemocitos de las larvas parasitadas y no parasitados. El comportamiento de propagación de los plasmatocitos en las larvas no parasitadas también fue similar a las no parasitadas. Los otros tipos de hemocitos no difirió significativamente después de primer y sexto día post-parasitación (t = 0.3132; gl = 16; 0.7582 y t = 0.9788; gl = 26; P = 0.3367), sin embargo, los otros tipos de células decrecieron significativamente después del noveno día en las larvas parasitadas (t= 2.6970; gl = 11; P = 0.0208) (Fig. 6).

Estos resultados muestran que el parasitismo por *C. flavipes* dio lugar a una reducción significativa de las células inmunocompetentes de *D. saccharalis* atacando tanto a las células granulares y a los plasmatocitos. Que no hay diferencias morfológicas entre los hematocitos provenientes de cada grupo.

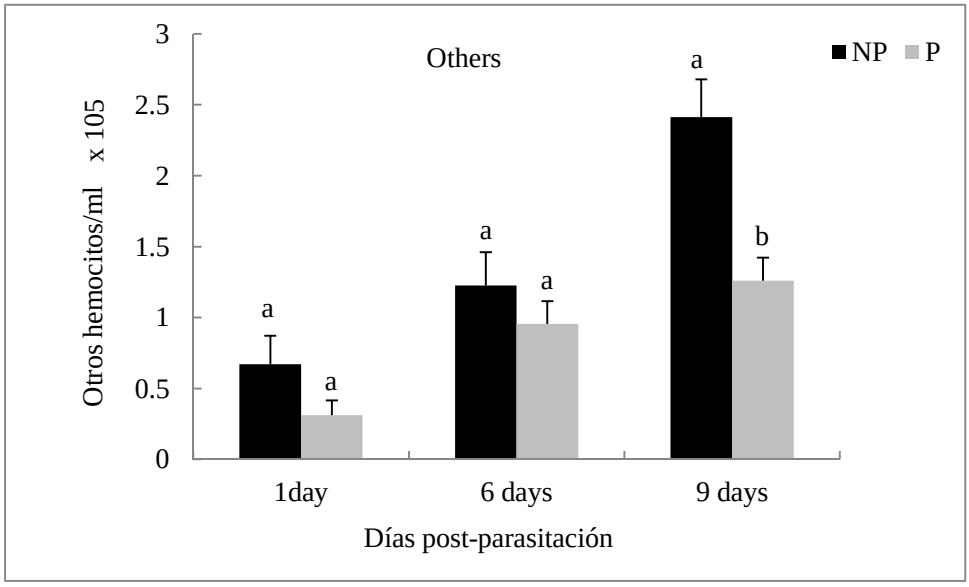


Fig.6. Conteo de otros tipos de hemocitos en hemolinfa de larvas de *D. saccharalis* de 1, 6 y 9 días después de la parasitación de *C. flavipes*. Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test). El numero total de insectos usados por día fueron: día 1 (n=10 para NP y 8 para P), dia 3 (n=8 para NP y 10 para P), dia 6 (n=10 para NP y 16 para P), y al dia 9(n=8 para NP y 5 para P).

3.3. Efecto del parasitismo sobre la melanización de la hemolinfa y la actividad fenoloxidasa

La hemolinfa extraída de cada larva fue expuesta al aire y se analizó la evidencia de la melanización después de 30 min. Tal como se indica en la figura 7, la hemolinfa de las larvas control se fue oscureciendo progresivamente con el tiempo una vez expuesta al aire. Por el contrario, la hemolinfa de las larvas parasitadas se melanizó más lentamente y en menor medida que las larvas control. Sin embargo la hemolinfa de proveniente de las larvas parasitadas y no parasitadas melanizó en los 5 diferentes tiempos de monitoreo (Fig. 7). La melanización también se observó en el 100% de las muestras recogidas de los insectos parasitadas y no parasitados después del día 1 y 2 de la ovoposición, pero sólo el 80, 60 y 30% de estas mostraron evidencia de melanización a los 4, 6 y 7 días después de la parasitación, respectivamente (Fig. 7).

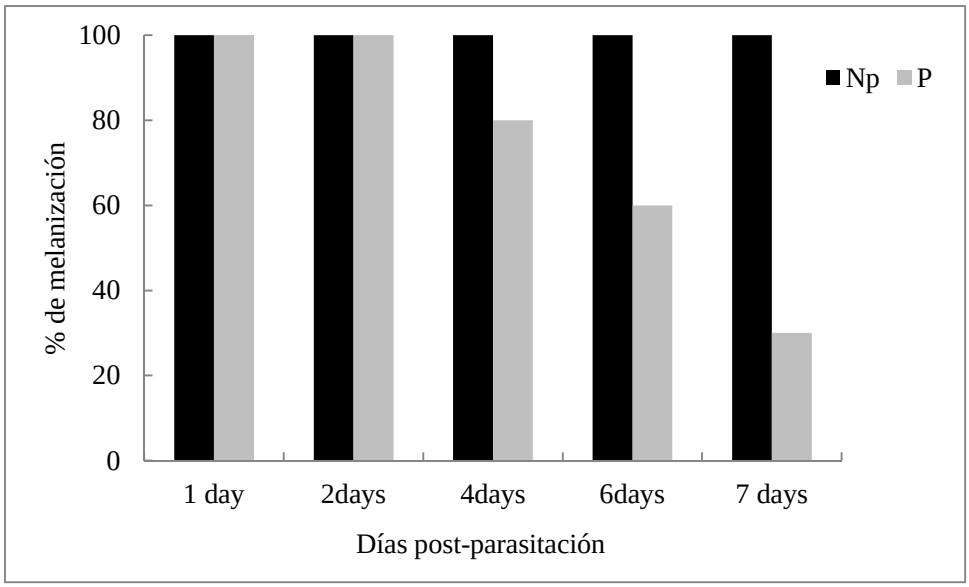


Fig. 7. Porcentaje de muestras de hemolinfas que presentaron melanización 1, 2, 4, 6 y 7 días después de la parasitación por *C. flavipes;* n=3 para larvas parasitadas y no parasitadas.

Con el fin de determinar si la inhibición de la melanización descrita aquí fue el resultado de una forma inactiva del sistema fenoloxidasa, la actividad fenoloxidasa se midió en la hemolinfa de las larvas no parasitadas y parasitadas. Los resultados presentados en la figura 8 indican que la actividad enzimática en las larvas parasitadas fue significativamente menor que en las larvas control al sexto día después de la parasitación ($t = 2.4785$; $gl = 824$; $P = 0.0382$), y que esta fue significativamente diferente después del primer día post-parasitación ($t = 0.6272$; $gl = 4$; $P = 0.5646$) (Fig. 8).

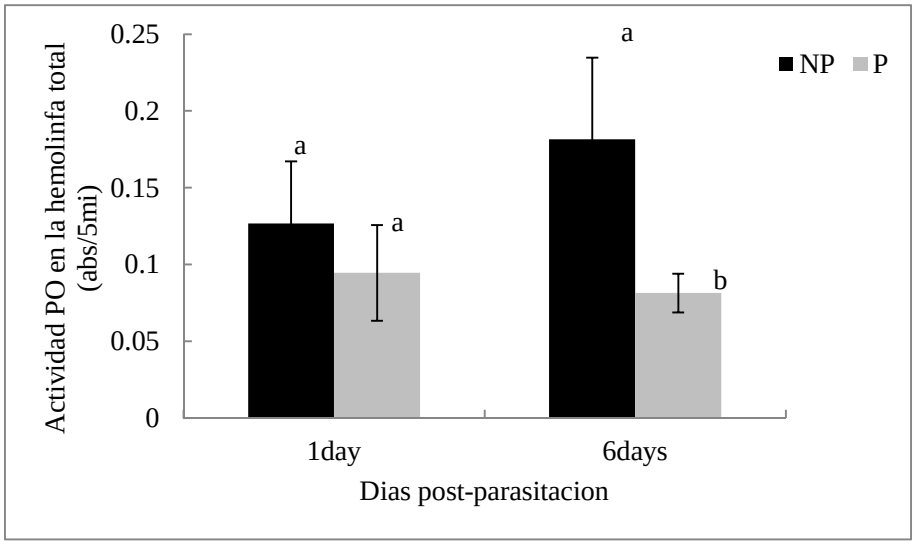


Fig.8. Actividad fenoloxidasa presente en la hemolinfa total de larvas parasitadas (P) (N=5) y no parasitadas (NP) (N=5) de *D. saccharalis.* Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test).

3.4. Efecto de la parasitación sobre la actividad fenoloxidasa en diferentes fracciones de la hemolinfa de *D. saccharalis*

A fin de caracterizar la localización de la actividad fenoloxidasa en la hemolinfa, esta actividad fue evaluada tanto en el plasma, como en los hemocitos. Aunque ambos muestran niveles significativos de la actividad fenoloxidasa, el plasma posee un nivel mayor de la actividad, como lo indican los resultados de la Figura 9.

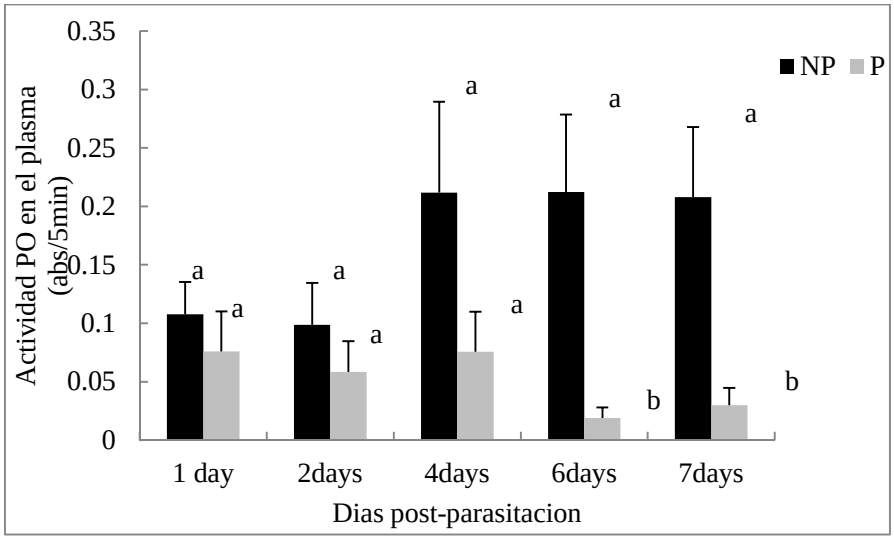


Fig.9. Actividad fenoloxidasa presente en el plasma de larvas parasitadas (P) (N=4) y no parasitadas (NP) (N=4) de *D. saccharalis.* Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test).

La actividad fenoloxidasa del plasma disminuyo significativamente después de 6 y 7 días post-parasitación (t = 2.8883; gl = 4; P = 0.0446 y t = 2.8818; gl = 4; P = 0.0449), respectivamente (Fig. 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las larvas parasitadas y no parasitadas después del primer y segundo (t = 0.7238; gl = 6; P = 0.4965; t = 0.9535; gl = 6; P = 0.3772 y t= 1.6048; gl = 6; P = 0.1597), respectivamente (Fig. 8). Como se muestra en la Fig. 10, alrededor del día 6 y 7 de parasitación, la actividad fenoloxidasa de los hemocitos decreció significativamente en las larvas parasitadas (t = 4.9421; gl = 4; P = 0.0078 y t = 2.9982; gl = 4; P =0.0400). Por otra parte, no hubo diferencias significativas en la actividad fenoloxidasa de los hemocitos de larvas parasitadas y no parasitadas después de los días 1, 2 y 4 post-parasitación (t = 0.0389; gl = 4; P = 0.9708; t = 0.0272; gl = 6; P = 0.9792 y t= 0.5473; gl= 6; P = 0.6046) (Fig. 10).

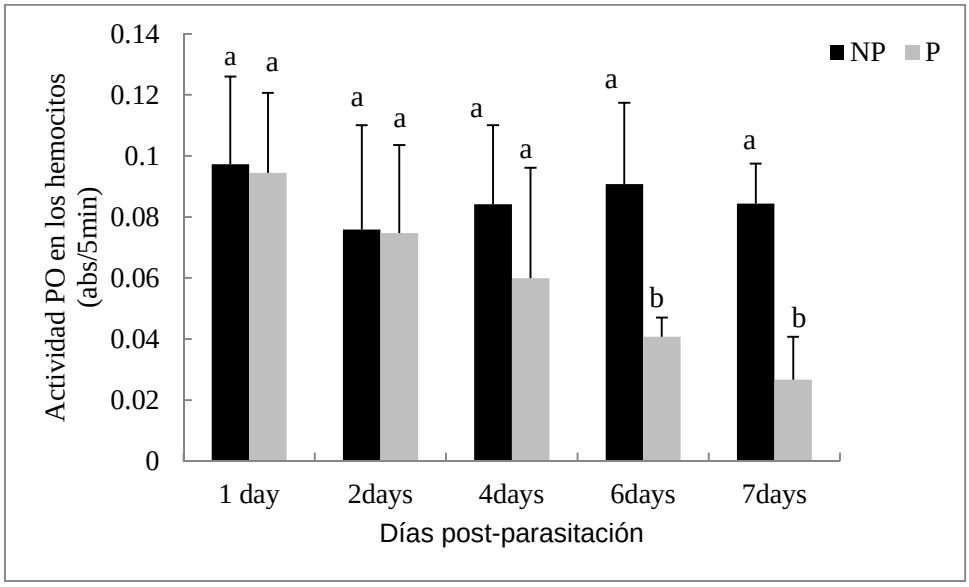


Fig.10. Actividad fenoloxidasa presente en los hemocitos de larvas parasitadas (P) (N=4) y no parasitadas (NP) (N=4) de *D saccharalis.* Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test).

La actividad fenoloxidasa se encuentra presente en todas las fracciones de la hemolinfa, es decir tanto en los hemocitos como en el plasma, pero la mayoría de la actividad fenoloxidasa detectada en la hemolinfa de las larvas de *D. saccharalis* se asoció con el plasma (véanse las figuras 9 y 10.). El hallazgo más interesante, sin embargo, fue que la actividad fenoloxidasa en el plasma y los hemocitos se redujo significativamente en las larvas de parasitadas cuando se comparó con larvas no parasitadas.

3.5. Análisis de Proteínas

Las larvas del parasitoide *C. flavipes* alteraron la composición bioquímica de la hemolinfa y del tejido graso de *D. saccharalis* durante el desarrollo del parasitoide inmaduro como se desprende de los resultados presentados en la Figura 11. Los cambios fueron más evidentes en la hemolinfa que en los tejidos de almacenamiento del hospedero (Salvador y Consoli, 2008). La disponibilidad de la concentración de proteínas disminuye constantemente conforme el progreso del desarrollo de los parasitoides inmaduros. Los cambios en el contenido de proteínas en la hemolinfa de las larvas parasitadas se aprecia desde el primer día después de la parasitación. La concentración total de proteínas en el plasma se evaluó al día 1, 5 y 8 después de la parasitación. A los 8 días después de la parasitación, cuando las larvas no parasitadas estaban a punto de pupar, la larva parasitadas presentaron una concentración significativamente menor de proteínas en la hemolinfa ($t = 10.0419$; $gl = 14$; $P = 0.0001$). No se encontró ninguna diferencia significativa en la concentración de proteínas en las larvas parasitadas y sin parasitar después de los días 1 y 5 post-parasitación ($t= 0.8669$; $gl = 12$; $P = 0.4030$ y $t = 0.6734$; $gl = 13$; $P = 0.5125$).

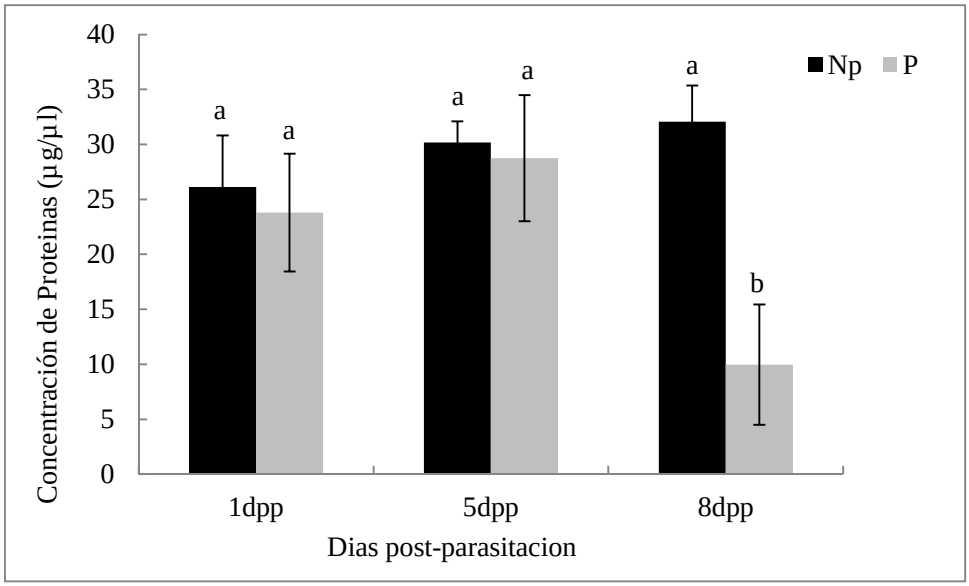


Fig.11. Efecto de la parasitación de C. flavipes sobre la concentración de proteínas totales del plasma de larvas parasitadas (P) (N=10) y no parasitadas (NP) (N=9) de D saccharalis. Letras diferentes arriba de las barras de error indican diferencia significativa α=0.05 (t-test).

4. Discusiones

4.1. Disminución de la población de hemocitos totales en larvas parasitadas de *D. saccharalis*

Los hemocitos son elementos funcionales que intervienen en el reconocimiento y la encapsulación de objetos extraños dentro del sistema inmune del huésped. La mayoría de los parasitoides suprimen las reacciones inmunes del huésped interfiriendo con la función de los hemocitos (Asgari *et al.*, 1996; Webb y Luckhart, 1994; Strand y Noda, 1991). Nuestro estudio mostró que el parasitismo de *D. saccharalis* llevado a cabo por *C. flavipes* afectan claramente la carga de hemocitos (tanto el conteo total o diferencial de hemocitos) (Fig. 2). El parasitismo de *C. flavipes* redujo el número total de la población de hemocitos de *D. saccharalis.* La reducción fue más evidente en el número de las células granulares y plasmatocitos. Por otra parte, este estudio sugiere que estos dos tipos de hemocitos son los más importantes en *D. saccharalis* y desempeñan el papel más importante en las reacciones inmunitarias celulares. En

general, nuestros datos son similares a los resultados reportados en otros sistemas parasitoide/ huésped, tales como en el de *Cotesia plutellae/ Plutella xylostella* (Ibrahim y Kim, 2006) *Hyposoter fugitives/Malacosoma disstria* (Stoltz y Guzo, 1986), *Tranosema rostrale/Choristoneura fumiferana* (Doucet y Cusson, 1996), *Campoletis sonorensis/Heliothis virescens* (Davies *et al.*, 1987), *Cardiochiles nigriceps/Heliothis virescens* (Vinson, 1971) y *Microplitis demolitor/Pseudoplusia includens* (Strand y Pech, 1995a; Strand y Noda, 1991), en el cual el parasitismo incrementa o reduce el número de hemocitos del hospedero por la acción de los polidnavirus. También se ha demostrado que los cambios en los hemocitos pueden ser inducidos por la inyección del fluido del cáliz, o de los PDV solos o en presencia del veneno (Stettler *et al.*, 1998), lo que indica que estos factores maternos activos pueden interferir con la reacción inmune llevada a cabo por los hemocitos. El proceso del parasitismo de varios endoparasitoides origina una reducción significativa en la población de los hemocitos, presumiblemente debido a que se induce directamente una inmunosupresión (Stettler *et al.*, 1998). La reducción de hemocitos en el parasitismo de *Cotesia kariyai* fue causado por la muerte celular de los hemocitos circulantes, así como por la histólisis del órgano hematopoyético (Teramoto y Tanaka, 2004). El hecho de que la plasmatocitos se producen a partir de las células granulares por división mitótica y diferenciación en algunas especies de lepidópteros (Nakahara *et al.*, 2003) sugiere que la reducción de las poblaciones de los hemocitos en las larvas parasitadas de *D. saccharalis* es un efecto citotóxico sobre las células granulares circulantes y por el bloqueo de la producción de plasmatocitos del órgano hematopoyético de *D. saccharalis.* Esto último puede resultar en una disminución retardada de la población de plasmatocitos hasta la muerte natural de la plasmatocitos circulantes. De hecho, la población de células granulares disminuyó más rápido que el de plasmatocitos. En el parasitismo de la avispa Braconidae,

Microplitis demolitor se ha demostrado que el polidnavirus presente en este insecto induce una apoptosis efectiva contra las células granulares del *P. includens* (Strand y Pech, 1995a). La reducción significativa de las células granulares y plasmatocitos después de la parasitación sugiere que estos dos hemocitos juegan un papel importante en la respuesta celular inmune contra *C. flavipes*. Además, Strand *et al.* (2006) demostraron que el factor inhibitorio proviene del polidnavirus de parasitoide debido a que la infección llevada a cabo por el bracovirus de *M. demolitor* inhibe la fagocitosis de los hemocitos de *P. includens*. Se ha demostrado que una proteína polidnaviral del tipo mucina (Glc1.8) es un factor inhibidor en la fagocitosis. Sin embargo, el gen polidnaviral correspondiente no se ha encontrado en el genoma del bracovirus de *C. flavipes* (Choi *et al.*, 2005). Los enfoques recientes del genoma del bracovirus de *C. plutellae* sugieren que algunos genes virales están implicados en la señalización celular, como en el caso de la proteína tirosin fosfatasa (Ibrahim y Kim, 2006) y el gen *IkB* (Kim *et al.*, 2006), lo que perturbaría la activación de la polimerización de la actina para formar el fagosoma, al igual que otros agentes patógenos (Baldwin y Barbieri, 2005; Walzer *et al.*, 2005; Ghosh y Chakraborty, 2002). Además, la recuperación del número de hemocitos totales en el hospedero a los 9 días después de la parasitación sugiere la existencia de otro factor que mantiene el número de hemocitos en un nivel bajo. Es posible que las sustancias secretadas por la larva o los teratocitos provocan efectos sobre la hematopoyesis.

4.2. Efecto del parasitismo de *C. flavipes* sobre la activada Fenoloxidasa

En la inmunidad de los insectos, la fenoloxidasa juega un papel importante en los procesos durante la encapsulación melánica y la fagocitosis. La fenoloxidasa es una enzima que protege a los artrópodos, tanto externa como internamente. La proteína cataliza el endurecimiento o esclerotización del exoesqueleto del insecto recién formado

o cuando se está dando una reparación posterior a una lesión. Además esta enzima juega un papel en la respuesta inmune a nivel interno contra los organismos invasores en el torrente de la hemolinfa (Terwilliger, 1999; Soderhall y Cerenius, 1998; Ashida y Brey, 1995). La actividad fenoloxidasa ha sido descrita en muchos artrópodos, incluidos los crustáceos, insectos y quelicerados (Sugumaran y Nellaiappan, 1996; Ashida y Yamazaki, 1990). Esta enzima circula en la hemolinfa en una forma inactiva, profenoloxidasa, en los crustáceos y los insectos hemocitos. La conversión de la proenzima a la forma activa es un sistema ampliamente estudiado de los controles y equilibrios enzimáticos conocido como la cascada fenoloxidasa que regula la liberación y activación de fenoloxidasa en el momento y lugar adecuado (Soderhall y Cerenius, 1998; Sugumaran y Kanost, 1993; Ashida y Yamazaki, 1990). Las fenoloxidasas catalizan la hidroxilación de monofenoles de orto-difenoles (tirosinasa o actividad monofenolasa) y la oxidación de orto-difenoles a orto-quinonas (catecolasa o actividad difenolasa). Las enzimas que pueden catalizar reacciones se refieren a veces como tirosinasas (EC 1.14.18.1), mientras que los que llevan a cabo sólo la reacción de este último se puede definir como catecoloxidasas (CE 1.10.3.1). En los artrópodos, los altamente reactivos o-quinonas participan en el entrecruzamiento, o esclerosando las proteínas en el exoesqueleto blando y flexible después de la muda (Sugamaran, 1998). Las o-quinonas también están en la vía de la síntesis de melanina, un compuesto con propiedades antibióticas, antifúngicas, y antivirales, y por lo tanto las fenoloxidasas son componentes importantes de la respuesta inmune innata en invertebrados.

Nuestros resultados muestran que la parasitación por *C. flavipes* reduce la respuesta de defensa de la melanización en el plasma de las *D. saccharalis*. Cuando se comparó la actividad de fenoloxidasa en los hemocitos y el plasma de larvas *D. saccharalis* parasitadas y no parasitados, se hicieron dos observaciones importantes. En

primer lugar, en todos los casos, la actividad fenoloxidasa (PO) estuvo presente en cada una de las fracciones de la hemolinfa. En segundo lugar, hubo una menor actividad en las fracciones de las larvas de parásitos en comparación con los de los insectos no parasitados. En cuanto a la distribución de la actividad fenoloxidasa en la hemolinfa de *D. saccharalis* se asemeja al de otros lepidópteros, tales como *Bombyx mori*, donde la enzima está presente tanto en los hemocitos y en el plasma (Huxham y lackie, 1988). Además, en *B. mori* los oenocitoides sintetizan, almacenan y liberan la enzima. Se ha demostrado que determinadas subpoblaciones hemocitos sintetizan la profenoloxidasa, la cual es liberada en el plasma a través de la ruptura de células (Ashida y Brey, 1998). La activación de estas formas inactivas de la enzima se presentan en el plasma debido a la acción de una cascada de proteasas de serina, y por consecuencia la fenoloxidasa activa tiene una tendencia a adherirse a las superficies exteriores, incluyendo la superficie de los hemocitos (Ling Yu, 2005, Mavrouli *et al.*, 2005). Glatz y Schmidt (2004) demostraron los efectos putativos del PDV en la inmunidad humoral, y los colocó en tres amplias categorías: (i) el que reduce la actividad de los compuestos antimicrobianos, (ii) la que inhibe las reacciones en cascada dentro del sistema inmune, y (iii) la que favorece la expresión genes tipo C-lectina. El PDV de *Campoletis sonorensis* es el agente causal, que reduce los niveles plasmáticos fenoloxidasa (Glatz y Schmidt, 2004).

4.3. Análisis de Proteínas

El parasitismo de la asociación *Cotesia flavipes-Diatraea saccharalis* induce cambios en la hemolinfa y en los metabolitos de los tejidos grasos, similar a la registrada por un gran número de parasitoides, y las consecuencias de los cambios observados en el metabolismo y la absorción de nutrientes del hospedero se han discutido en diferentes asociaciones hospederos-parasitoide (Vinson *et al.*, 2001;.

Thompson, 1993; Strand, 1986; Beckage, 1985). Los cambios en los metabolitos suelen ser sincronizados con el desarrollo de parasitoide y con la regulación de otros procesos fisiológicos, los cuales serán necesarios para sostener el desarrollo de parasitoides inmaduros (Vinson *et al.*, 2001) y son especialmente comunes en los parasitoides gregarios (Vinson *et al.*, 2001; Nakamatsu y Tanaka, 2004). Durante este rápido aumento de la masa de los parasitoides, el hospedero puede experimentar un estrés nutricional severo, ya que los nutrientes se desvían para mantener el crecimiento del parasitoide. Por otra parte, es precisamente en este momento cuando los parásitos rápidamente aumentan de masa, originando que el hospedero poco a poco deje de alimentarse; y finalmente 24 horas antes de presentarse la emergencia de las avispas, tanto el consumo de alimentos como el crecimiento del hospedero se ve interrumpido (Beckage y Templeton, 1987; Beckage y Riddiford, 1982). Se produce una desaceleración (o incluso un cierre casi total) en la síntesis de proteínas del huésped como consecuencia de la reorientación del metabolismo de hospedero. De hecho, la cantidad total de aminoácidos libres disponibles para la síntesis de proteínas de Novo. Parece significativamente menor en las larvas parasitadas en comparación con las larvas no parasitadas, lo que sugiere una causa para la reducción observada en la síntesis de proteínas (Thompson *et al.*, 1990).

La hipoproteinuria inducida en *D. parasitadas* por *C. flavipes* puede estar relacionada con la movilización de proteínas por este parasitoide como se observa en otras especies solitarias y gregarias (Vinson, 1990; Tanaka, 1986; Thompson, 1986; Dahlman y Greene, 1981). A pesar de la movilización de las proteínas del huésped, los parasitoides que inducen hipoproteinuria también pueden producir un parasitismo específico en la síntesis de las proteínas derivadas de la polidnavirus asociados, de los teratocitos o desarrollo de la larva del parasitoide (Consoli *et al.*, 2005; Kaeslin *et al.*,

2005; Shelby y Webb, 1997). Las hipoproteinuria observada en huéspedes parasitados por *C. flavipes* podría ser un efecto del consumo directo de las larvas en desarrollo (Vinson y Barbosa, 1987) o la regulación a la baja de las actividades del hospedero en la síntesis de proteínas, lo que limita la asignación energética para sostener el anabolismo proteico como una forma para redirigir los nutrientes al desarrollo del parasitoide en desarrollo (Dahlman *et al.*, 2003). Sin embargo, el hipoproteinuria también podría estar relacionada con la inhibición de las proteínas especificas del hospedero, especialmente aquellas involucrados en la defensa inmune (profenoloxidasas, lipoforinas) y el desarrollo del hospedero (esterasas de la hormona juvenil, juvenil proteínas de unión a hormonas, proteínas de reserva) (Li *et al.* 2003; Beckage y Kanost, 1993; Zhang *et al.*, 1992; Ross y Dunn, 1989). Aunque la concentración de proteína total en la hemolinfa de las larvas parasitadas se redujo en comparación con el control de larvas, dos de las proteínas del huésped fueron reguladas en el parasitismo. El tamaño y el patrón de electroforesis de la proteína de 125 kDa de la hemolinfa de *D. saccharalis* no se ha encontrado en otras especies de lepidópteros, lo que hace difícil hacer un análisis comparativo (Salvador y Consoli, 2007). Sin embargo, la proteína de 48 kDa tuvo un patrón electroforético muy cercano a la proteína del factor inhibidor de agregación y a la proteína parecida a la serpina descrita en *Manduca sexta*, las cuales están involucradas en la regulación de la respuesta inmune del insecto (Beckage *et al.*, 1993). Las proteínas especificas del parasitismo son de tamaño variable (<10 y> 150 kDa) y puede presentarse durante la etapa temprano o tardía durante el desarrollo del parasitoide (Beckage, 1993). La PSPs que ocurre en la fase tardía del parasitismo, parecidas a las proteínas de 138 a 43 kDa liberadas en el sistema *Cotesia flavipes-Diatraea saccharalis* probablemente no están involucradas con la inhibición del sistema inmune, a menos que *C. flavipes* requiera diferentes estrategias para la inhibición

temprana y tardía del sistema inmune. Usualmente, las proteínas que se presentan en la fase tardía como las identificadas en el hospedero parasitado por *C. flavipes* pueden ser útiles en la nutrición del parasitoide (Kadono-Okuda *et al.*, 1998). Sin embargo, el rol exacto de las proteínas específicas de *C. flavipes* y el significado fisiológico de la regulación de las proteínas de las dos proteínas del hospedero requerirán de más investigación a futuro con la finalidad de realizar su identificación y su caracterización. Junto con los estudios sobre la utilización de nutrientes y el desarrollo del parasitoide inmaduro, estos estudios adicionales a los análisis cuantitativos de los metabolitos del hospedero durante el desarrollo del parasitoide que se han hecho hasta el momento, ayudarían a entender las bases moleculares de la regulación del hospedero realizada por *C. flavipes.*

5. Conclusiones

Esta investigación demuestra que el parasitismo de *C. flavipes* afecta negativamente a la población total de hemocitos tanto en número y función, lo cual contribuye a que se presente una inmunosupresión en el sistema de defensa del insecto. Por otro lado se encontró que la actividad fenoloxidasa (PO) fue menor tanto en el plasma como en los hemocitos de las larvas parasitadas en comparación con las larvas control.

Capítulo 2: Efecto del parasitismo de *Cotesia flavipes* sobre la respuesta de encapsulación y nodulación de *Diatraea saccharalis.*

Resumen

Cotesia flavipes Cameron (Himenóptera: Braconidae), es un endoparasitoide gregario importante de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidóptera: Crambidae), una plaga severa de la caña de azúcar en los campos de México y Estados Unidos. Esta investigación tuvo como objetivo analizar la inmunosupresión celular de la *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* en términos de la encapsulación, melanización y la formación de nódulos de hemocitos. El ensayo de encapsulación se llevó a cabo al día y a los 6 días después de la ovoposición parasitoide. Después de las 3, 12 y 24 horas después de la inyección de esferas, los porcentajes de encapsulación fueron significativamente mayores en comparación con las larvas no parasitadas comparadas con las larvas parasitadas a las 24 horas y 6 días posteriores a la micro inyección. Curiosamente, hubo una reducción significativa en el número de esferas encapsuladas a las 24 horas post-inyección en comparación con las larvas del día 6. Los porcentajes de esferas melanizadas y el de número de nódulos disminuyeron significativamente en las larvas parasitadas en comparación con el control.

Palabras Clave: *Cotesia flavipes*, *Diatraea saccharalis*, Polidnavirus, Encapsulación, Nodulación, *Bacillus thuringiensis*

1. **Introducción**

El barrenador de la caña, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidóptera: Crambidae), es la plaga principal de la caña de azúcar en las Américas (Posey *et al.*, 2006; Reagan, 2001.). En ocasiones, este insecto también causa pérdidas económicas en el cultivo de arroz y sorgo (Castro *et al.*, 2004). *Cotesia flavipes* (Cameron) (Himenóptera: Braconidae) es un parasitoide koinobionte, gregario de larvas muy usado en los programas de control biológico del barrenador de la caña de azúcar *D. saccharalis* (Botelho y Macedo, 2002). *Cotesia flavipes* parasita a *D. saccharalis* e induce la inmunosupresión. Los insectos utilizan las respuestas de defensa humoral y celular contra la invasión de patógenos y parásitos. La respuesta humoral de defensa incluyen la producción de péptidos antimicrobianos (Löwenberger, 2001), moléculas intermediarias reactivas de oxígeno o de nitrógeno (Bogdan *et al.*, 2000) y la fenoloxidasa (PO) activando el sistema que regula la coagulación o la melanización de la hemolinfa (Kanost *et al.*, 2004; Gillespie *et al.*, 1997). La respuesta celular de defensa se refiere a las respuestas inmunes de los hemocitos como la fagocitosis, la nodulación y la encapsulación (Lavine y Strand, 2002). Los patógenos pequeños como las bacterias y los hongos son en general destruidos por las respuestas de defensa humoral o son fagocitadas por hemocitos, mientras que los parásitos, tales como parasitoides y nematodos son encapsulados por hemocitos (Schmidt *et al.*, 2001). La parasitación exitosa de las avispas endoparásitas requiere de una inmunosupresión del huésped, con la finalidad de protegerlo y detener el desarrollo con la finalidad de desviar los nutrientes de hospedero para apoyar el desarrollo de las avispas endoparásitas (Strand y Pech, 1995; Beckage y Kanost, 1993). Algunas avispas himenópteros poseen factores inmunosupresores, provenientes tanto la madre, como del embrión (Theopold *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los factores maternos que inducen protección que

permiten el desarrollo de las avispas incluyen a las proteínas de ovario, el veneno, y los polidnavirus (Amaya *et al*, 2005;. Morales *et al*, 2005; Bae y Kim, 2004; Glatz *et al*, 2004;. Richards y Parkinson, 2000; Asgari *et al*, 1997), mientras que los factores embrionarias son los teratocitos, un tipo específico de célula derivada de la membrana serosa embrionaria (Basio y Kim, 2005; Webb y Luckhart, 1994; Dahlman y Vinson, 1993). Los polidnavirus sólo se han encontrado en dos familias de insectos, los Braconidae e Ichneumónidae, y estos son clasificados en bracovirus e ichnovirus, respectivamente (Webb *et al*., 2000). Los polidnavirus (PDV) es un virus único de forma circular, de ADN de doble cadena segmentada (Webb y Strand, 2005). Los PDV persisten como provirus integrados de forma estable en el genoma de las avispas asociadas y se replican en los ovarios de las hembras, donde los viriones se acumulan en altas concentraciones (Wyler y Lanzrein, 2003). Los hospederos de las avispas que poseen los PDV son principalmente los estadíos larvales de insectos lepidópteros. Cuando una avispa hembra ovoposita en su huésped, inyecta uno o más huevecillos y los viriones que infectan a las células inmunitarias de los tejidos del insecto huésped (Schmidt *et al*., 2001). Los PDV no se replican en los hospederos de las avispas, pero la expresión de los genes virales impide que el sistema inmune del huésped destruya los huevecillos de la avispa y cause otras alteraciones fisiológicas que pueden llegar a causar la muerte del hospedero (Webb y Strand, 2005; Beckage y Gelman, 2004; Turnbull y Webb, 2002; Asgari *et al*, 1996). Por lo tanto, el mutualismo que existe entre los PDV y las avispas, como la transmisión viral depende de la supervivencia del parasitoide, y la supervivencia del parasitoide depende de la infección viral del hospedero (Webb *et al*., 2006). En este capítulo se analiza la inmunosupresión celular de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* en términos de las respuestas de encapsulación, melanización y la nodulación.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cría de insectos

Las larvas de barrenador de la caña fueron criadas en un medio artificial y fueron clasificadas en base al periodo de desarrollo o instar mediante el examinación del ancho de la cápsula cefálica antes de exponerlos a los parasitoides. La dieta artificial del barrenador de la caña (producto N º f9775B, Bioserv, Inc, EE.UU.) fue preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, los componentes solidos (200 g/ dieta basura) se mezclaron a alta velocidad en una licuadora en combinación con una solución de agar-agar al 2%. La dieta fue vertida rápidamente en vasos de plástico de 1 oz o en cajas de Petri y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta solidificar (al menos una hora). La dieta fue almacenada a 4 °C hasta que fue utilizada. Antes de la adición de las larvas los vasos o placas con dieta, la superficie de la dieta se estrió con la ayuda de una aguja.

D. saccharalis y *C. flavipes* fueron mantenidas en una cámara bioclimática a 28 °C bajo un fotoperiodo de 16:8 luz-obscuridad. Para generar la colonia de adulto, las pupas de *D. saccharalis* fueron colectadas diariamente y se colocaron dentro de contenedores de cristal o de plástico cubierto con una bolsa de plástico de polietileno como sustrato para la puesta de huevecillos. Una copa plástica de 1 onza con un algodón saturado con sacarosa al 10% fue utilizada alimentar los adultos emergidos, los cuales sobreviven aproximadamente de 5 a 7 días. Los adultos ovopositan masas de huevecillos de color amarillo sobre la bolsa de plástico. Las masas de huevecillos se recolectaron y se dejaron madurar en una caja de Petri, donde el color de los huevos pasó de amarillo a naranja, hasta finalmente observarse la característica de la cabeza negra (un gran punto negro) al quinto día. Los huevecillos maduros (de color naranja) fueron trasladados a una caja de Petri con dieta fresca. Las larvas neonatas eclosionaron

posteriormente a las 24- 48 horas y migraron a la superficie de la dieta. Las larvas se transfirieron a placas con dieta fresca cuando fue necesario, con la finalidad de evitar el hacinamiento larval y permitir el desarrollo hasta pupar (25-30 días). Las pupas fueron colectadas de las placas y se coloca en los contenedores para la crianza de los adultos.

2.2. Hospedero y parasitación

Larvas del tercer o sexto instar de *D. saccharalis* fueron utilizadas para mantener la colonia de *C. flavipes.* Para realizar la parasitación cada larva fue expuesta de forma individual a una avisa hembra de 1-3 días de edad, con la finalidad de asegurar que las hembras del parasitoide se aparearon y generar una parasitación exitosa. Después de realizar la parasitación mediante una ovipostura de la parasitoide hembra, las larvas de *D. saccharalis* fueron trasladadas a placas de Petri con dieta nueva. Las larvas parasitadas fueron transferidas a dieta fresca cada 4-5 días hasta que las avispas emergieron y se formaron capullos de pupas junto a la larva huésped. Las larvas del parasitoide emergieron del barrenador de la caña de azúcar, no sobreviviendo finalmente al pasar al periodo de la pupación. Los capullos de las avispas parasitoide fueron colectadas y trasladadas a un tubo de falcón de 50 ml conteniendo una torunda de algodón húmedo en la parte inferior, y 4 líneas finas de miel en la pared interna para la alimentación de los parasitoides adultos. Los tubos se mantuvieron en una incubadora a las mismas condiciones ambientales antes mencionadas. Después de la emergencia, los adultos se mezclaron en una proporción de cinco machos y cinco hembras, los parasitoides se les permitieron aparearse durante 24 horas y luego las hembras fueron utilizadas para la parasitación de las larvas del barrenador de la caña. Después de 3-4 días, los parasitoides adultos fueron trasladados a un nuevo tubo de centrífuga con alimento fresco. Todas las soluciones, la cristalería y el material plástico utilizados en este estudio fueron esterilizados.

2.2. Ensayo de encapsulación

Las larvas se dividieron en tres grupos de tratamiento al momento de la inyección de las esferas: las larvas parasitadas 24 h antes, las larvas parasitadas 6 días antes, y las larvas no parasitadas (control). Larvas del quinto estadio fueron parasitadas mediante la exposición a una avispa hembra hasta observarse la ovoposición del parasitoide. En este ensayo se utilizaron esferas de Sephadex A-25 esterilizadas en etanol al 95%. Las esferas se tiñeron en una solución de rojo Congo al 0,1% con la finalidad de ayudar en la recuperación después de la inyección (Lavine y Beckage, 1996). Una vez teñidas, las esferas se secaron bajo la exposición de radiación ultravioleta dentro de una campana de seguridad tipo II, y finalmente se resuspendieron en búfer salino de fosfato 100 mM a pH 7,0 (PBS). Las larvas fueron anestesiadas colocándolas en hielo por espacio de 5 minutos. Posteriormente las esferas se inyectaron en el hemocele a través de la línea dorsal utilizando una microjeringa Hamilton 7000. Entre diez y quince esferas fueron inyectadas por larva, en un volumen total de 5µl PBS por cada inyección. Cada grupo de larvas fueron disectadas 3, 12 y 24 horas más tarde, para evaluar la encapsulación y verificar la presencia de parasitoides en el hemocele de las larvas que habían sido parasitadas seis días antes de la inyección de esferas. Las esferas se examinan bajo un microscopio estereoscópico con una magnificación de 50X y se asignó una de las siguientes categorías en base a la respuesta de encapsulación: (1) esferas con una cápsula transparente (Fig. 12, A), (2) esferas con células adheridas, pero sin una cápsula transparente (Fig. 12, B), (3) esferas melanizadas (Fig. 12, C), y (4) esferas encapsuladas sin células adheridas (Fig. 12, D). La encapsulación fue definida en conjunto como la variación entre un revestimiento completo formado por una delgada capa celular (encapsulación débil), hasta un revestimiento del 50-100%

formado por una capa multicelular (encapsulación fuerte). Suponemos que la medición de la avidez de la respuesta de los hemocitos podría reflejarse en el grosor de la cápsula, el cual fue medido utilizando un microscopio digital Dino-Lite (AN-413T, Taiwán). Si las esferas mostraron alguna evidencia visible de la aparición de melanina sobre la superficie o dentro de las capas de la cápsula, la capsula fue registrada como melanizada.

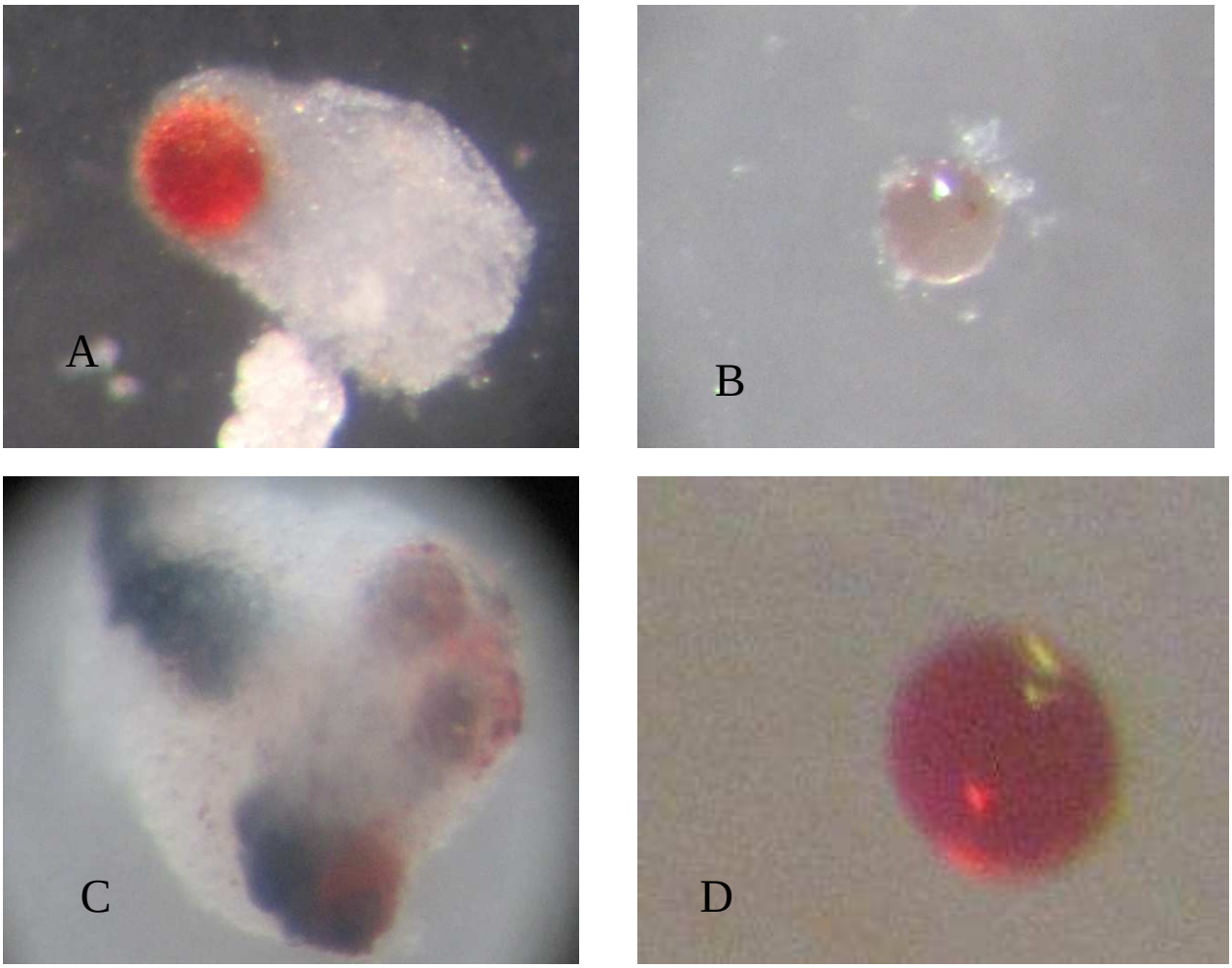


Fig.12. Microfotografía de esferas de Sephadex A-25 después de la recuperación a partir de larvas de *D. saccharalis* mostrando diferentes niveles de encapsulación: (A) esferas encapsuladas; (B) esferas con diferentes células adheridas; (C) esferas melanizadas; (D) esferas sin células adheridas. Scale bar: 50 µm.

2.3.Purificación e inyección de polidnavirus

El PDV fue purificado por filtración a partir de ovarios disecados adulto *C. flavipes* según la metodología descrita por Beckage *et al.* (1994). Hembras adultas de 2 a 3 días de edad fueron utilizados para obtener el líquido del cáliz. Las hembras se colocaron en una solución de etanol al 95% y después fueron colocadas en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml, el cual contenía PBS 100 mM a pH 7,0 (búfer de salino de fosfatos) en hielo. El sistema reproductor de las avispas hembra fue disectado con la ayuda de un microscopio estereoscópico Olympus mod. Stemi-2000 y posteriormente los ovarios se colocaron en un tubo de microcentrífuga que contiene una cantidad definida de PBS en hielo. Una vez disectados 100 pares de ovarios, estos fueron homogeneizados usando una aguja de calibre 23. Las glándulas de veneno fueron cuidadosamente excluidas de la preparación durante la disección. EL homogenizado de la suspensión de PDV se centrifugó 3 minutos a 1500g a 4°C y después fue purificado por filtración usando un cartucho de 0,45 micras (Phenomenex, EE.UU.). El filtrado se centrifugó durante 15 minutos a 15000g a 4 °C. El pellet se resuspendió en PBS. Para los experimentos del bioensayo, larvas no parasitadas del quinto estadio de *D. saccharalis* fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 70% y se les inyecto 5µL del PDV purificado (el equivalente a un ovario de *C. flavipes*). Se inyectaron 5µL de PBS en las larvas control a través de la línea dorsal utilizando una microjeringa Hamilton estéril con aguja de calibre 30. Veinticuatro horas después de la inyección *in vivo* del PDV, a cada larva se les inyectaron 10 -15 esferas de Sephadex A-25, las cuales fueron disectadas, con la finalidad de registrar el proceso de encapsulación siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

2.4. Ensayo de Nodulación

Para determinar la formación de los nódulos de hemocitos, larvas de *D. saccharalis* del quinto estadio parasitadas y no parasitadas fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 70% y mantenidas en hielo. Tanto a las larvas parasitadas y las no parasitadas se les inyectaron 5µL de una suspensión de bacterias inactivadas por calor ($1x10^6$ células de *E. coli*/larva) utilizando una jeringa Hamilton estéril de calibre 30 jeringa. Las larvas fueron mantenidas a 28°C en una incubadora. El número de nódulos se contabilizo 24 h después de la inyección. Las larvas fueron disecadas mediante la cavidad hemocélica. A continuación se registró la aparición de nódulos con melanina, el oscurecimiento del intestino, el sistema graso y de los túbulos de Malpighi bajo un microscopio estereoscópico a 50 aumentos. Los nódulos con melanina presente en la parte ventral del abdomen y el tórax se contaron también externamente a través de la observación de la cutícula transparente antes de la disección.

2.5. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando el software SPSS11.0.0 (SPSS Inc., 2001). Los datos del grosor de la capsula, la melanización y la encapsulación se analizaron mediante un ANOVA simple; las diferencias entre los pares de tratamiento se analizaron mediante la prueba de Rango Múltiple de Duncan (DMR-test). El ensayo de la nodulación fue analizado por la prueba LSD (least Squared difference) discriminado con error de tipo = 0.05. Medias diferentes a un nivel de 0.05% se consideraron significativamente diferentes.

3. Resultados

3.1. Efecto de la parasitación de *C. flavipes* sobre la capacidad de la inmunidad celular.

En este estudio se analizó la capacidad del sistema inmune celular del hospedero parasitado a través del proceso de encapsulación y la formación de nódulos de hemocitos. La encapsulación se analizó *in vivo* en larvas parasitadas y no parasitadas de *D. saccharalis* en base a la observación de cápsulas blancas de hemocitos formadas alrededor de las esferas inyectadas y también por la presencia de esferas con depósitos de melanina, como se mostró en la figura 12. Conforme avanzo el tiempo de la parasitación, el porcentaje de esferas encapsuladas aumentó y también el porcentaje de cápsulas con melanina también aumentó de forma gradual, como se observa en las figuras 13 y 14.

La respuesta de encapsulación durante el primer y sexto día post-parasitación hacia las esferas de Sephadex A-25 siempre se redujo significativamente ($P < 0.05$) en relación con larvas no parasitadas. Esto se pudo observar independientemente de si las esferas se mantuvieron en las larvas por espacio de 3, 12, o 24 h, como se muestra en las Figuras 13 A, B y C, respectivamente. No se observó ninguna diferencia significativa en el proceso de encapsulación entre las larvas parasitadas 1 o 6 días después a las 3 h después de la inyección, sin embargo, el porcentaje de esferas encapsuladas a los 12 y 24 h después de la inyección aumentó significativamente en las larvas al sexto día post-parasitación en comparación con las larvas de un día de post-parasitadas (Figs. 13 A, B, C). El porcentaje de esferas mostraron pocas células adheridas a los 3 y 24 h después de la inyección incrementándose significativamente en las larvas parasitadas un día 1 y 6 en comparación con larvas no parasitadas, sin embargo, no se encontraron diferencias

significativas a las 12 h después de la inyección en todos los tratamientos (Figs. 13 A, B, C)

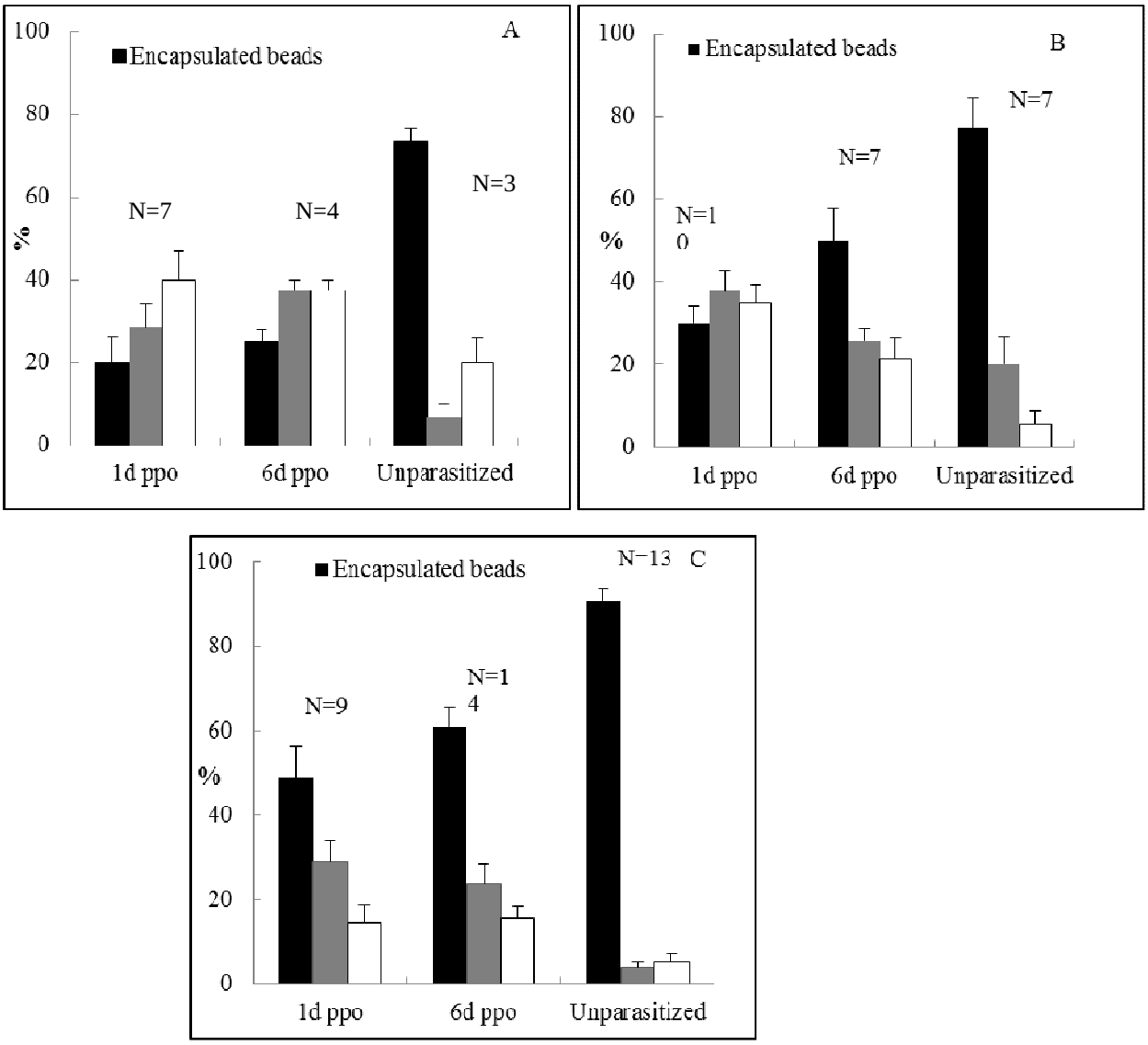


Fig. 13. Efecto de la parasitación sobre la respuesta de encapsulación de larvas de *D. saccharalis* a esperas de Sephadex A-25. 10-15 esferas fueron microinyectadas a cada larva, y 10 esferas fueron recuperadas para evaluar la encapsulación. La grafica de barras representa los porcentajes promedio (de n larvas) ± error estándar. ppo= ovoposición post-parasitación (A). Las esferas fueron recuperadas (por disección) de las larvas después de 3 horas. (B) Las esferas fueron recuperadas 12 horas después. (C) Las esferas fueron recuperadas después de 24 h.

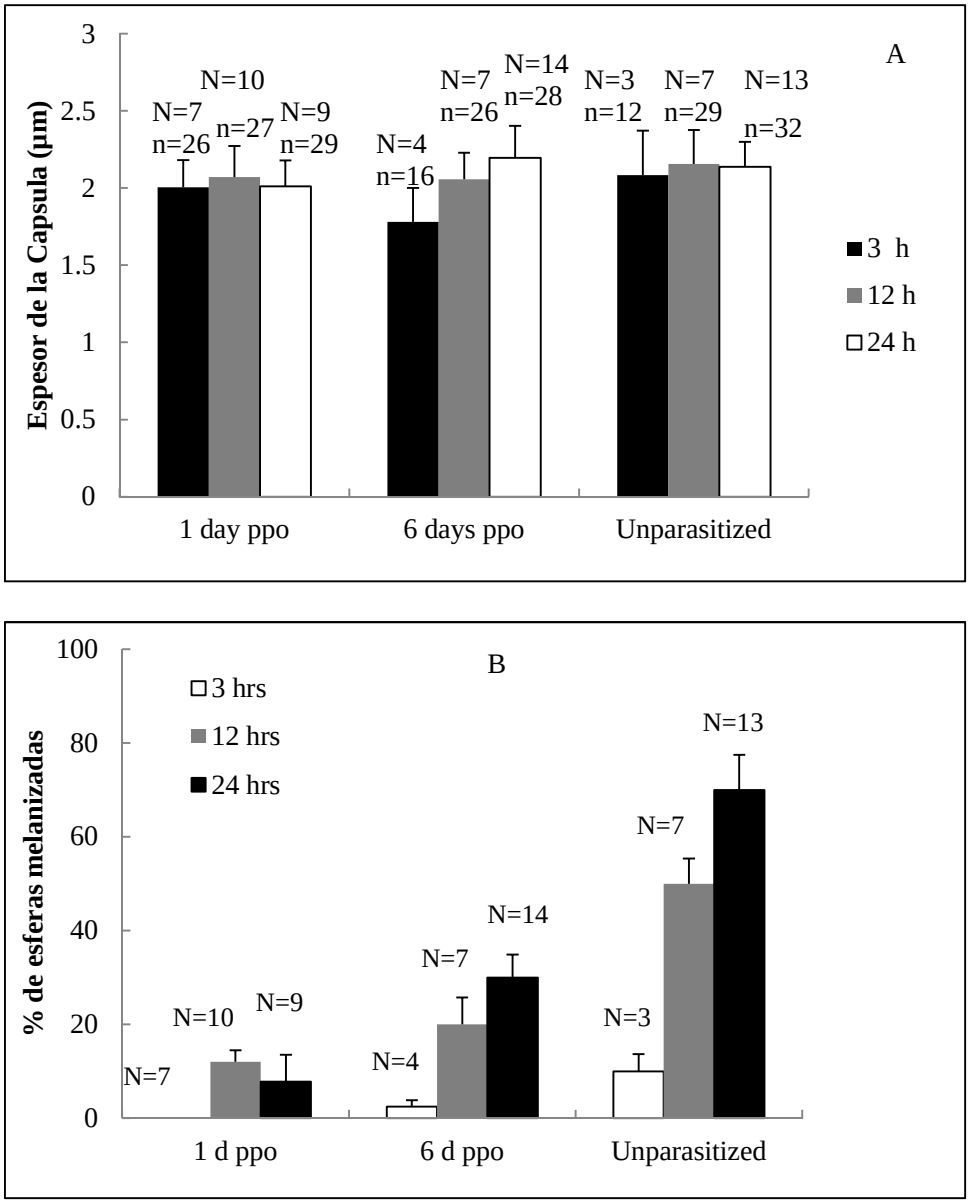


Fig. 14. Efecto de la parasitación sobre el grosor de la capsula (A) y la melanización (B) de las esferas cubiertas de Sephadex A-25 después de un periodo de incubación (3, 12, o 24 h) en la hemocele de larvas del quinto del quinto instar de *D. saccharalis*. (A) La grafica de barras representa el espesor promedio ± error estándar de las capsulas alrededor de las n esferas d las N larvas. (B) La grafica de barras muestra el porcentaje promedio (± error estándar) de las esferas (de n larvas) que presentaron melanización asociada.

.

Los espesores de las cápsulas fueron variables y algunos de ellos eran más gruesas que el diámetro de las esferas de Sephadex. Curiosamente, el grosor de la cápsula no varió significativamente en el período de incubación *in vivo* ($P \geq 0.05$), ni los

grupos de tratamiento (P ≥ 0.05) (Fig. 14 A). Hubo algunas esferas asociados con melanización menos 3 horas después de las inyecciones en las larvas de los parásitos y el control (P ≥ 0.05) (Fig. 13 B). Sin embargo, el porcentaje de esferas que muestran melanización a las 12 y 24 horas después de las inyecciones se redujo significativamente (P <0.05) durante los días 1 y 6 días ppo en comparación con las larvas parasitadas (Fig. 14 B). También el porcentaje de esferas melanizadas aumentó significativamente durante el día 6 ppo en comparación con las larvas de un día de ppo. a las 24 h después de la inyección.

Las larvas que fueron inyectadas con PDV purificados por filtración 24 h antes que las esferas mostraron una reducción significativa en la respuesta de encapsulación en relación con las larvas control inyectadas solo con búfer PBS (P <0.05) (Fig. 15).

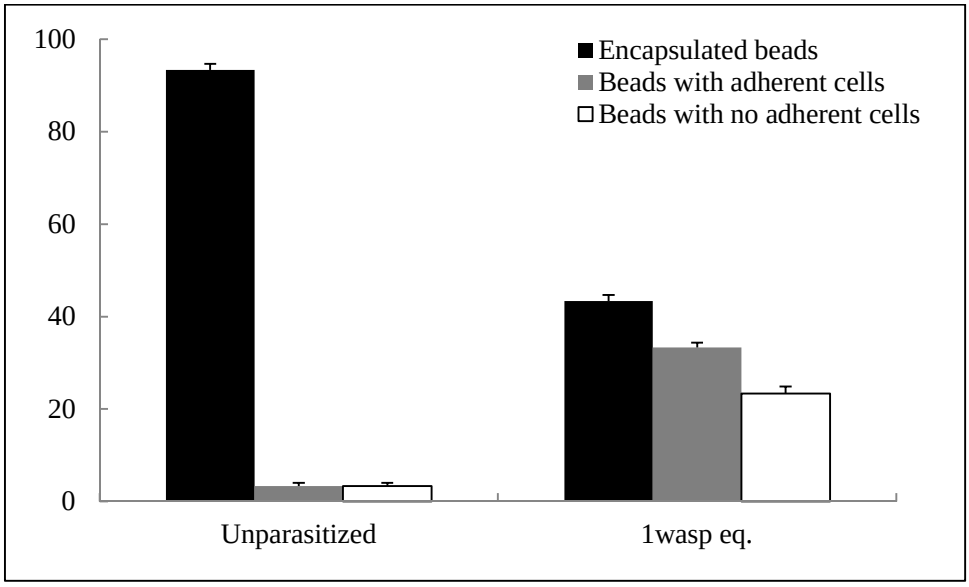


Fig. 15. Efecto del PDV purificado por filtración sobre la respuesta de encapsulación hacia esferas de Sephadex.A-25 en larvas del quinto instar de *D. saccharalis*. Las larvas recibieron el equivalente (eq.) al fluido filtrado del cáliz de una avispa. Veinticuatro horas después, cada larva recibieron de 10-15 esferas, las cuales fueron recuperadas después de 24 h de incubación. La grafica de barras representa el porcentaje promedio (de n larvas) ± error estándar.

Las larvas parasitadas por *C. flavipes* mostraron una menor formación de nódulos en comparación con las larvas no parasitadas (Fig. 16). En *D. saccharalis*, las larvas no parasitadas formaron un promedio de 231.44 nódulos durante la respuesta a la infección bacteriana, mientras que las larvas parasitadas presentaron un promedio de 111.5 nódulos (Fig. 16).

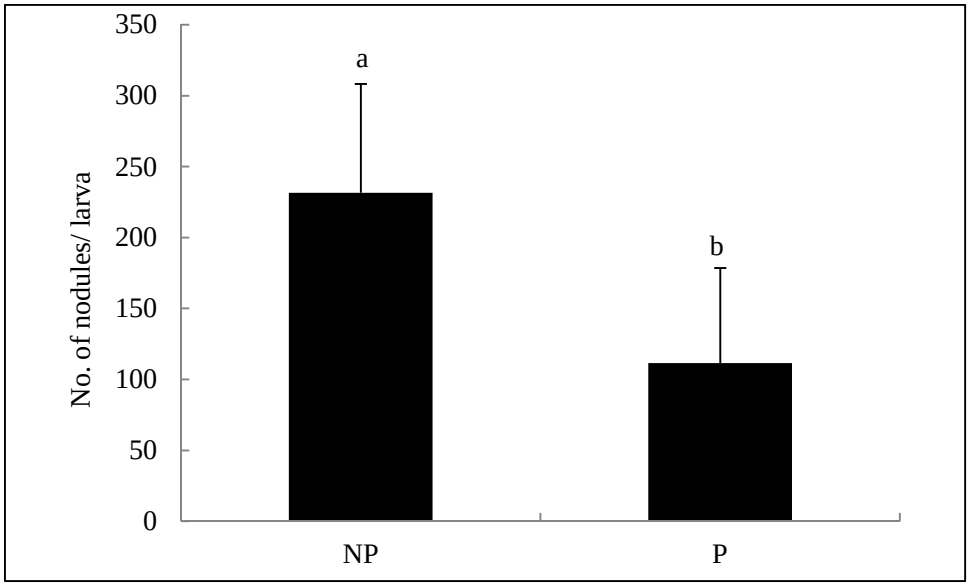


Fig. 16. Efecto de la parasitación *C. flavipes* sobre la formación de nódulos en *D. saccharalis* en respuesta a la infección con la bacteria no patogénica, *E. coli*, ($5x10^6$ bacterias/larva).Cada medición se realizó empleando 10 réplicas. Las claves NP y P representas a las larvas no parasitadas y parasitadas, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes debajo de las barras de error nos indican la diferencia significativa con un α=0.05 (prueba LSD).

4. Discusiones

La parasitación de las larvas de lepidópteros mediante el empleo de endoparasitoides generalmente se asocia con la supresión de la inmunidad celular y humoral del insecto hospedero (Glatz *et al*., 2004). La parasitación por *Cotesia spp* induce una inmunosupresión del hospedero en varias especies de insectos (Schmidt, 2007; Amaya *et al*, 2005;. Schmidt, 2005, Bae y Kim, 2004). Este estudio evaluó los

efectos de la parasitación de *C. flavipes* en relación a la respuesta inmune celular de *D. saccharalis* en términos de dos reacciones asociadas a esta respuesta: la encapsulación y la formación de nódulos de hemocitos. La encapsulación es la principal reacción celular del huésped frente a los insectos endoparasitoides, como se ilustra en los insectos hospederos no permisivos en los que los hemocitos unen y se dispersan a través del parasitoide en desarrollo para formar una cubierta de varias capas de células (Strand y Pech, 1995b). En la encapsulación hemocítica, tanto las células granulares y los plasmatocitos son requeridos para la formación de la cápsula (Pech y Strand, 1996). Las células granulares son los primeros hemocitos en unirse al blanco externo, y posteriormente se unen los plasmatocitos a la capa primaria constituida de células granulares. Finalmente, otra capa de células granulares forman la capa más externa y en ese momento la cápsula deja de crecer en tamaño (Cai *et al*, 2004;. Pech y Strand, 1996). En nuestros resultados hubo una fuerte reducción en el porcentaje de esferas encapsuladas y el número de nódulos formados en las larvas parasitadas en comparación con las larvas no parasitadas. Curiosamente, los hospederos muestran una recuperación de la capacidad de encapsulamiento hemocítica a las 12 y 24 horas después de la inyección de esferas a los 6 días ppo en comparación con las del día 1 ppo, como se deduce del análisis de las Figuras 13 A, B, y C. Los mecanismos responsables de la supresión de la encapsulación ha sido estudiado en muchos sistema parasitoide/ hospedero (Ibrahim y Kim, 2006; Hu *et al*, 2003; Lavine y Beckage, 1996; Pech y Strand, 1996). Se ha demostrado que los PDVs median varias alteraciones de la fisiología del hospedero (Beckage, 1993), uno de los cuales es la inmunosupresión (Lavine y Beckage, 1995; Strand y Pech, 1995a, b), el cual no sólo protege a los huevecillos del parasitoide del proceso de encapsulación , sino que también impide una respuesta del huésped a otros blancos bióticos y abióticos que normalmente los

encapsulan o nodulan (Strand y Noda, 1991; Davies y Vinson, 1988; Davies *et al*, 1987;. Guzo y Stoltz, 1987; Tanaka, 1987; Stoltz y Guzo, 1986; Vinson, 1974). En *Cotesia kariyai,* los huevecillos pueden ser protegidos de la reacción de encapsulación a través de una proteína de inmuno-evasiva del ovario codificada en el genoma de la avispa (Tanaka *et al*., 2002). El veneno de la glándula es otro factor inmunosupresor, el cual actúa de manera individual en *Cotesia melanoscela* (Stoltz *et al*., 1988) o de manera sinérgica en *Cotesia glomeratus* (Kitano, 1986), aunque su efecto puede ser prescindible en *Campoletis sonorensis* probablemente debido a la estructura de los genes compartidos con los PDVs (Webb y Summers, 1990). Por otra parte, varios genes del polidnavirus se sugieren están implicado en la supresión de la encapsulación, tras el primer informe de Edson *et al*. (1981). Ibrahim y Kim, (2006) clasifica estos genes candidatos en dos grupos en función de la estrategia inhibitorias para manipular la adhesividad de los hemocitos durante el proceso de encapsulación. Uno de ellos es interrumpir el reordenamiento del citoesqueleto normal como respuesta a la infección ocasionada por los patógenos, como lo sugiere el gen VHV1.1 de *C. sonorensis* (Li y Webb, 1994) y el gen CrV1 de *Cotesia rubecula* (Asgari *et al*., 1996). El otro es el de impedir la interacción funcional entre el receptor de los hemocitos y el ligando externo deprimiendo la expresión inducible de una selección de integrinas del tipo A y B o mediante la formación de una barrera física, parecida a la Glc1.8 del bracovirus *Microplitis demolitor* (Beck y Strand, 2005; Lavine y Strand, 2003). En nuestro experimento se encontró que la supresión de la respuesta de encapsulación de las esferas Sephadex fue inducida por la inyección de PDVs en larvas no parasitadas *D. saccharalis* (Fig. 5), lo que sugiere que el efecto es mediado por el virus. Lavine y Beckage (1996) encontraron que los cambios morfológicos e inmunosupresores de los hemocitos fueron imitados por la inyección de polidnavirus de *C. congregata*

purificados por filtración en larvas parasitadas de *M. sexta*, indicando la mediación viral de estos cambios. La expresión temporal de algunos genes los PDVs (Harwood y Beckage, 1994; Harwood *et al*, 1994) se correlaciona con el patrón observado en las anomalías morfológicas y la inmunosupresión de los hemocitos, lo que sugiere que la inmunosupresión es el resultado de la transcripción y traducción de los genes de los PDVs (Lavine Beckage, 1996).

En presencia de los efectos de pre-acondicionamiento de los polidnavirus, así como de otros factores normalmente presentes en los hospedadores parasitado, como las proteínas de ovario, el veneno, y teratocitos, las larvas de 1 día ppo mostraron una respuesta clara encapsulación reducida hacia las esferas en relación con las larvas del día 6 ppo [Figs. 13 (A, B, C)]. Las larvas de 1 día de ppo mostraron un bajo número de hemocitos con morfología normal (datos no publicados), y estas larvas además son a veces capaces de encapsular un pequeño número de esferas, y cuando esto ocurrió las cápsulas fueron el mismo grosor que las cápsulas presentadas en larvas parasitadas posterior al día 6 y en las larvas no parasitadas, como se muestra en la Figura 14 A. Por lo tanto, las larvas recién parasitadas probablemente mantienen una pequeña población de hemocitos funcionales.

Nuestros resultados indican que hubo una recuperación casi total de la respuesta del hospedero hacia las esferas de Sephadex A-25 en las larvas del día 6 ppo, ya que los parasitoides en desarrollo no fueron encapsulados. Lavine y Beckage (1996) indicó que a las 24 horas después de la parasitación, las larvas de *M. sexta* parasitadas por *C. congregata* mostraron una fuerte supresión de la respuesta de encapsulación hacia las esferas de Sephadex A-25; y a los 8 días ppo la frecuencia de encapsulación de las esferas inyectadas ya no se distingue diferencia alguna en comparación a lo que observado en las larvas no parasitadas. Ross y Dunn (1989) también observó una

recuperación de la capacidad de *M. sexta* respuesta hacia *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* a los 10 días ppo. Sin embargo, el nivel de recuperación nunca alcanzo niveles de control elevados. Por lo tanto, la respuesta inmune de los hospederos puede permanecer parcialmente deteriorada a pesar de la recuperación de algunas capacidades, como por ejemplo en la encapsulación de las esferas. El aumento significativo en el número de esferas que mostraron algunas células adherentes en las larvas parasitadas puede ser ilustrado en los resultados obtenidos por Lavine y Beckage (1996). Ellos encontraron que el parasitismo de *C. congregata* provocó alteraciones morfológicas radicales en los hemocitos de *Manduca sexta* que se correlacionaron con la reducción en la capacidad para encapsular las esferas. Estas alteraciones incluyen el agrupamiento, la pérdida de adherencia, y la vesiculación, que probablemente son las manifestaciones de la incapacidad de los hemocitos para responder a los objetos que normalmente son encapsulados.

La reducción del nivel de melanización defensiva de la hemolinfa en el huésped parasitado se ha visto acompañado por una actividad reducida de la actividad fenoloxidasa (Lavine y Beckage, 1995). El porcentaje significativamente menor de esferas que muestran melanización en las larvas de un día ppo (Fig. 14 B), probablemente fue una consecuencia de baja cantidad de esferas encapsuladas, ya que la melanización no se produjo en ausencia de la encapsulación, lo que sugiere que la melanización de cuerpos extraños requiere hemocitos inducidos. Se ha mencionado que el PDV de *C. sonorensis* juega un papel importante en el bloqueo de melanización del plasma y en el comportamiento de propagación de los hemocitos del hospedero (Shelby *et al*, 2000; Luckhart y Webb, 1996).

5. Conclusion

En resumen, este estudio muestra que el parasitismo de *C. flavipes* suprime las reacciones inmunes celulares durante el proceso de encapsulación y nodulación. Aunque los hospederos muestran una recuperación en la capacidad de encapsulación hemocítica en el transcurso de parasitismo durante el día 6 ppo, esta nunca llega recuperarse a los niveles de las larvas control.

Capítulo 3: Desarrollo de la avispa Braconidae *Cotesia flavipes* en dos cámbridos estrechamente relacionados, *Diatraea saccharalis* y *Eoreuma loftini*: evidencia de la inmunosupresión del hospedero.

Resumen

Cotesia flavipes es un importante endoparasitoide larval gregario de varias larvas del barrenadoras del tallo de importancia económica como el barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis*. *Eoreuma loftini*, una plaga de la caña de azúcar y el arroz en Texas fue estudiada para comparar con respecto a *D. saccharalis* el desarrollo de *C. flavipes*. Se evaluó *in vivo* el efecto de la parasitación por *C. flavipes* en la respuesta de encapsulación mediante el uso de esferas de Sephadex A-25, tanto en *D. saccharalis* como en *E. loftini*. Los resultados indicaron que el parasitoide se desarrolló con éxito en las larvas de *D. saccharalis*. Curiosamente, las larvas de *E. loftini* fueron parasitados con facilidad por el parasitoide *C. flavipes*, pero ninguna larvas de la avispa pudieron desarrollarse en el hospedero. Los huevecillos del parasitoide se concentraron por la acción de los hemocitos del hospedero y, finalmente no lograron sobrevivir ni el hospedero ni el parasitoide. El destino de desarrollo de las larvas de *E. loftini* parasitadas en relación al proceso de encapsulamiento fue variable. Finalmente la mayoría de las larvas se quedaron como larvas del quinto estadio, mientras que unos pocos se desarrollaron con normalidad a la fase de pupa. En el experimento *in vivo* se observó una reducción significativa en el porcentaje de granos encapsulados en las larvas de parásitos en ambas máquinas. Sin embargo, el porcentaje de esferas que muestran melanización disminuyó significativamente en las larvas de parásitos en *D. saccharalis* y no difieren significativamente en parasitados y no parasitados larvas de *E. loftini*. Nuestros resultados mostraron que *D. saccharalis* es un huésped adecuado para *C. flavipes* mientras que *E. loftini* no lo fue. En este estudio pudimos apreciar que dos lepidópteros barrenadores del tallo taxonómicamente cercanos, con un comportamiento y ecológicamente muy semejantes difieren en su capacidad para encapsular una especie parasitoide.

Palabras Clave: *Diatraea saccharalis*, barrenador mexicano del arroz, Encapsulación, parasitismo, Polidnavirus, hospedero permisivo y no permisivo.

1. Introducción

La posibilidad de un endoparasitoide para desarrollarse depende de la idoneidad fisiológica del huésped y de la capacidad del endoparasitoide para desmontar la respuesta inmune del hospedero contra las especies invasoras (Godfray, 1994). La encapsulación de huevecillos y larvas del parasitoide por parte de los hemocitos de un hospedero no permisivo es el principal mecanismo celular de defensa utilizado por las larvas del lepidóptero cuando son invadidos por endoparasitoides (Lackie, 1988; Rowley y Ratcliffe, 1981). La encapsulación implica el reconocimiento por parte de los hemocitos, una posterior contratación de más hemocitos y la adhesión de los mismos sobre la superficie del invasor, lo cual a la larga resulta en la formación de una cápsula multicelular que mata a los parasitoides (Ibrahim y Kim, 2006; Cai *et al*., 2004; Pech y Strand, 1996). Por otro lado, muchos endoparasitoides inyectan varios factores en el huésped durante la ovoposición, incluyendo el veneno, las proteínas del ovario, los teratocitos (que son liberadas de la serosa de la membrana del huevo en la trama), las partículas similares a virus y los polidnavirus para hacer que el estado fisiológico de los huéspedes sea el adecuado para el desarrollo del parasitoide (Pruissjers *et al*, 2009; Pennacchio y Strand, 2006). Estos factores suprimen la respuesta inmune celular y el crecimiento de hospedero, asegurando de esta manera que no crezca demasiado para que la progenie del parasitoide pueda consumir con éxito los nutrientes necesario para su desarrollo (Pennacchio y Strand, 2006; Suzuki y Tanaka, 2006).

Así, los hospederos parasitados dejan disponibles todos los requerimientos necesarios, suprimiendo los factores inmunes y de esta manera ayudando a que los parasitoides se desarrollan y emergen con éxito, mientras que los hospederos alargan su estadio como larvas. Sin embargo, en especies de hospederos no permisivos, los parasitoides son encapsulados por hemocitos y finalmente no sobreviven ni el

hospedero ni el parasitoide (Rodríguez- Pérez *et al*, 2005;. Beckage *et al*, 2003;. Beckage y Tan, 2002; Lovallo *et al*, 2002)..

Los lepidópteros barrenadores del tallo de la familia Pyralidae, Noctuidae y Crambidae son plagas de diversos cultivos en muchas regiones del mundo (Smith *et al*., 1993). Los hospederos de lepidópteros estudiados aquí *Diatraea saccharalis* (F.) y *Eoreuma loftini* (Dyar) son comúnmente de plagas de los cultivos, barrenador de la caña y el barrenador del arroz a la mexicana, respectivamente. En América del Norte, el barrenador de la caña y el barrenador del arroz son dos plagas de importancia económica de la caña de azúcar, arroz, sorgo y maíz en los Estados Unidos de América y México (Showler y Castro, 2010; Reay-Jones *et al*, 2008;. 2007a, b; 2005; 2003). Estas dos especies están estrechamente relacionadas taxonómica y ecológicamente, comparten muchas de las mismas plantas hospedantes cultivables y silvestres, y también presentan similitudes en el comportamiento de alimentación (Reay-Jones *et al*., 2007).

Las larvas de la avispas endoparasitoides pertenecientes al complejo del Viejo Mundo de *Cotesia flavipes* se utilizan como agentes de control biológico de barrenadores del tallo que atacan a una gran variedad de cultivos en el Nuevo Mundo, como *Diatraea saccharalis, D. grandiosella, Ostrinia nubilalis y Chilo spp.* (Alleyne y Wiedenmann, 2001a, b, Ngi-Song, 1995;. Ngi-Song *et al*, 1995). *Cotesia flavipes* Cameron fue elegido como el agente de control biológico candidato para controlar el barrenador de la caña debido a su histórico éxito e importancia en el control de los barrenadores del tallo en Asia y África (Overholt *et al*., 1994a, b). Debido a que dos o más especies de barrenadores del tallo a menudo ocurren simultáneamente en el campo es importante determinar el rango de hospederos de *C. flavipes* antes de su lanzamiento, especialmente para los hospederos que son cercanos desde un punto de vista ecológico y

de comportamiento similar. En el presente estudio, el parasitoide *C. flavipes* se establece y mantiene en las larvas del barrenador de la caña. A continuación, probamos el destino de dos especies estrechamente relacionadas, larvas de *D. saccharalis* y *E. loftini* parasitadas por *C. flavipes*. Además, se analizó *in vivo* el efecto de la parasitación por *C. flavipes* en la respuesta de encapsulación de ambas especies. Los estudios sobre la respuesta inmune presentada por los hospederos antes de la liberación de un agente de control biológico ayudarán a comprender cómo utilizar los enemigos naturales potenciales, lo que facilitará la implementación de estos enemigos naturales para emplearse en el control biológico.

2. Material y Métodos

2.1. Cría de Insectos

Larvas de *D. saccharalis* y *E. loftini* fueron mantenidas en una dieta artificial bajo una temperatura de 28º C y un fotoperíodo de L16: D8. Se empleó una dieta artificial específica para barrenadores del tallo (producto N º F9775B, Bioserv, Inc., EE.UU.) siguiendo el método utilizado por Rodríguez-Pérez *et al*. (2005). Brevemente, el contenido de la dieta (200 g de dieta/litro) se mezcló con una solución de agar-agar al 2% en una licuadora a una velocidad alta. La dieta fue vertida rápidamente en vasos de plástico o cajas de Petri y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante al menos una hora. La dieta fue almacenada a 4 °C hasta ser requerida para la alimentación de las larvas. Antes de la infestación de la dieta con las larvas, la superficie de la dieta fue estriada o escoriada con la ayuda de una aguja.

Para generar las colonia de palomillas adultas de *D. saccharalis* y *E. loftini*, las pupas fueron colectadas diariamente y se colocaron dentro de recipientes de vidrio o de plástico. Una copa plástica pequeña se llenó con solución de sacarosa al 10% y

posteriormente se colocó una torunda de algodón con la finalidad de llevar a cabo la alimentación de las polillas adultas emergidas. Las paredes de los recipientes de plástico o cristal que contenían la colonia de adultos fueron cubiertas con una bolsa de plástico como sustrato para la puesta de huevecillos de *D. saccharalis*, mientras que para los adultos de *E. loftini* se colocaron bloques de tirillas de papel de impresión unidas, las cuales fueron sujetadas en la pared interior del contenedor como lo describe Legaspi *et al*. (1997), ya que los adultos por lo general ponen los huevecillos entre las capas de tejido de las hojas secas, cerca de la base de la planta. Las masas de huevecillos se recogieron diariamente y se incubaron en placa de Petri en cuyo interior se colocó un pequeño bloque de dieta merídica. Una vez que las masas de huevecillos se tornaron oscuras fueron trasladadas a una caja de Petri con dieta fresca. Los huevos eclosionaron a los 1-2 días después y las larvas neonatas se dirigieron directamente a la superficie de la dieta para iniciar su alimentación. Las larvas neonatas se transfirieron a placas de Petri con dieta fresca colocando alrededor de 50 larvas neonatas por placa, evitando con ello el hacinamiento larvario y favoreciendo finalmente el obtener pupas sanas. Las pupas fueron colectadas y se colocaron en contenedores de cristal para facilitar la formación de la colonia de adulto los cuales llevaron a cabo la obtención de una nueva generación, a través de la ovipostura de la nueva progenie.

2.2. Colonia de *C. flavipes* y Parasitación del hospedero

Larvas del tercer o sexto instar de *D. saccharalis* fueron utilizadas para mantener la colonia de *C. flavipes*. Para realizar la parasitación cada larva fue expuesta de forma individual a una avisa hembra de 1-3 días de edad, con la finalidad de asegurar que las hembras del parasitoide se aparearan y generar una parasitación exitosa. Después de realizar la parasitación mediante la ovipostura del parasitoide hembra, las larvas de *D. saccharalis* fueron trasladadas a placas de Petri con dieta nueva. Las larvas

parasitadas fueron transferidas a dieta fresca cada 4-5 días hasta que las avispas emergieron y se formaron capullos de pupas junto a la larva hospedero. Las larvas del parasitoide emergieron del barrenador de la caña de azúcar, y las larvas del hospedero no sobrevivieron finalmente al pasar al periodo de la pupación. Los capullos de las avispas parasitoide fueron colectados y trasladados a un tubo de falcón de 50 ml conteniendo una torunda de algodón húmeda en la parte inferior, y 4 líneas finas de miel en la pared interna para facilitar la alimentación de los parasitoides adultos. Los tubos se mantuvieron en una incubadora bajo las mismas condiciones ambientales antes mencionadas. Después de la emergencia, los adultos del parasitoide se mezclaron en una proporción de cinco machos y cinco hembras, con la finalidad de permitir el apareamiento durante 24 horas y luego las hembras fueron utilizadas para la parasitación de las larvas del barrenador. Después de 3-4 días, los parasitoides adultos fueron trasladados a un nuevo tubo de centrífuga con alimento fresco. Todas las soluciones, la cristalería y el material plástico utilizados en este estudio fueron esterilizados.

2.3. Parasitación de larvas de *Eoreuma loftini*

Larvas de *E. loftini* fueron parasitadas de la misma manera se mencionó anteriormente para *D. saccharalis*. Se produjo una ovoposición exitosa de *C. flavipes*, pero los huevos *C. flavipes* se concentraron siempre en larvas de *E. loftini*. Se verifico si la incapacidad de desarrollo de *C. flavipes* se debió a una reacción de encapsulación. A un lote de 60 hembras de *C. flavipes* se le permitió poner huevos una vez en la larva del quinto estadio de *E. loftini*. Treinta larvas fueron disectadas, después de cuatro días de la parasitación y las otras treinta larvas fueron disectadas ocho días después de la parasitación para comprobar la encapsulación. En otro experimento, el destino de las 150 y 140 larvas no parasitadas y parasitadas respectivamente fue monitoreado

diariamente durante 30 días para observar los síntomas de los trastornos del desarrollo. Los huevos fueron considerados encapsulados cuando no produjeron descendencia en el hospedero parasitado. En este caso, el hospedero parasitado se encontró todavía en la etapa larvaria después de 30 días, cuando las observaciones se dieron por concluidas. La mortalidad de los ejemplares parasitados se registró en los hospederos por causas desconocidas antes de los 30 días.

2.4. Ensayo de Encapsulación

Para medir *in vivo* las respuestas de la encapsulación de ambas especies, se utilizaron esferas de Sephadex A-25 siguiendo el método utilizado por Lavine y Beckage, (1996). Para ello, las esferas fueron esterilizadas en alcohol al 95%, y posteriormente fueron teñidas con una solución de rojo congo al 0,1% con la finalidad de ayudar en la recuperación después de la inyección. Las esferas teñidas se secaron bajo luz ultravioleta en una campana de cultivo de flujo laminar, y finalmente fueron resuspendidas en un búfer salino de fosfatos (PBS) (100 mM de buffer de fosfatos a pH 7.0). Para el ensayo, tanto las larvas de quinto parasitadas, como las no parasitadas fueron esterilizadas superficialmente en etanol al 70% y posteriormente fueron anestesiadas en el hielo durante cinco minutos antes de la inyección de esferas. Se inyectaron entre 10 y 15 esferas a través de la línea dorsal del hemocele utilizando una microjeringa Hamilton 7000. Las esferas se examinan bajo un microscopio estereoscópico a 50 aumentos y se registró la encapsulación. Se consideró que las esferas estaban encapsuladas si mostraron una evidencia de depósitos de melanina en la cápsula de hemocitos o entre las capas de la cápsula hemocitos.

2.5. Ensayo de la fenoloxidasa

Las larvas de quinto estadio de *D. saccharalis* y *E. loftini* se dividieron en dos grupos al momento de recolectar la hemolinfa, el primer grupo estuvo constituido por

las larvas parasitadas y el segundo por las larvas no parasitadas (control). Las larvas fueron esterilizadas en etanol al 70% y se mantuvieron durante cinco minutos en hielo con la finalidad de anestesiar las larvas antes de cortar las patas proleg de la parte abdominal y realizar la recolección de la hemolinfa. La actividad de la hemolinfa fenoloxidasa se midió según el método descrito por Bae y Kim, 2004. La mezcla de reacción para medir la actividad fenoloxidasa consistió de 5µl de hemolinfa y 2 µl de laminarina (50 mg/µl), la cual se incubó a temperatura ambiente. Después de diez minutos, a la mezcla de reacción se le añadió 900 µl de sustrato (10 mM de L-3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) (Sigma, EE.UU.) en PBS. La absorbancia se midió a 490 nm cada 5 minutos durante una hora.

2.6. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media ± error estándar (SE). Estos datos representaron el número de esferas encapsuladas con depósitos de melanina para cada especie. Los datos de la actividad fenoloxidasa y el tiempo de desarrollo se analizaron mediante la prueba de la t de Student, con la finalidad de comparar los efectos entre los grupos parasitados y no parasitados. La mortalidad de *E. loftini* se expresó en porcentaje. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Excel de Microsoft Office (versión 2007).

3. Resultados

3.1. Destino de las larvas parasitadas de *D. saccharalis* y *E. loftini* por *C. flavipes*

Cuando *D. saccharalis* fue parasitada por *C. flavipes*, los huevos del parasitoide comenzaron su desarrollo después de la parasitación, para eclosionar después de 3-4 días de la oviposición del parasitoide. Todas las larvas de *D. saccharalis* del tercer y sexto estadío permanecieron en el mismo instar, permitiendo el desarrollado de los

parasitoides emergido con éxito después de 10 días post- parasitación bajo las condiciones ambientales mencionadas anteriormente (Tabla 1).

Tabla 1. Destino de las larvas de *D. saccharalis* y *E. loftini* parasitadas por *C. flavipes*

Hospedero	Estado	No. de larvas	(%) No. parasitoides producidas	(%)No. de larvas muertas	(%)No. Pupas muertas	Pupas Normales (%)
D. saccharalis	No parasitado	145	-	8 (5.5)	4 (2.7)	133 (91.7)
	Parasitado	150	150 (100)	150 (100)	-	-
E. loftini	No parasitado	150	-	10 (5.8)	5 (1.6)	135 (92.5)
	Parasitado	140	0	115 (82.1)	5 (3.5)	20 (14.2)

Por otro lado, las larvas del tercer instar de *E. loftini* fueron parasitadas por *C. flavipes, s*in embargo, los parasitoides de las larvas hospedero de esta especie no emergieron, independientemente del estadío al momento de la parasitación (datos no mostrados). La Tabla 1 muestra que la mayoría de los hospederos de *E. loftini* murieron durante la fase larval y aunque algunos alcanzaron los estadíos de prepupa y pupa, ni el hospedero ni el parasitoide sobrevivieron. La disección de los hospederos muertos reveló que los huevecillos de *C. flavipes* fueron encapsulados y destruidos por los hemocitos de *E. loftini* y ninguna larva del parasitoide se observó en el hemocele de las larvas de hospedero incluso después de ocho días de la ovoposición. Los huevos encapsulados de *C. flavipes* presentaron una apariencia más transparente cuando estos estaban agrupados. Observaciones personales indican que algunas de las larvas de los huevecillos encapsulados de *E. loftini* eran mucho más grandes en comparación con las larvas no parasitadas de la misma edad cronológica.

3.2. Duración del desarrollo larvario en *E. loftini* parasitada

Se encontró una diferencia en el número de días en que las larvas se desarrollaron desde el quinto instar a la fase de pupa en las larvas parasitadas y las

larvas no parasitadas de *E. loftini*. El número de días promedio transcurrido en el que las larvas parasitadas del quinto estadio pasaron a la fase de pupa fue de 22.6 ± 1.5 días (n = 20 larvas). En contraste en las larvas no parasitadas la duración de este periodo (quinto estadio de pupa) fue significativamente menor, 12.8 ± 0.1 días (n = 135) (t = 15.7, gl = 153, p <0.0001). Este retraso en alcanzar la fase de pupa, se debe posiblemente a los efectos inhibitorios del parasitismo sobre el desarrollo del hospedero. Sin embargo, nuestras observaciones demuestran las larvas parasitadas de *E. loftini* no sobreviven a después del proceso de la parasitación.

3.3. Efecto del parasitismo sobre la encapsulación

La encapsulación llevada a cabo por los hemocitos se determinó con base en la observación de una cápsula blanca de hemocitos formada alrededor de las esferas inyectadas, como se myestra en la Figura 17. Las esferas fueron clasificadas en base a la respuesta de encapsulación hemocítica que conlleva en diferentes niveles: (1) Esferas con encapsulación débil; (2) Esferas con encapsulación fuerte; (3) Esferas melanizadas; y (4) esferas sin encapsular. La encapsulación se definió en conjunto variable de una cobertura parcial conformada por hemocitos, pudiendo ser esta una encapsulación débil (Fig. 17 A), o una capsula con una cobertura del 50-100% conformada por una capa multicelular (encapsulamiento fuerte, Figs. 17 B y C).

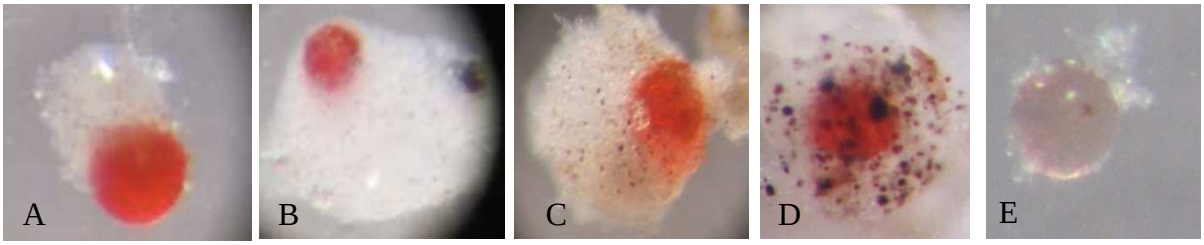


Fig. 17. Microfotografía de las esferas de Sephadex A-25 después de su recuperación a partir de larvas de *D. saccharalis* y *E. loftini* mostrando un sistema de escalas para la encapsulación: (A) Esferas con encapsulación débil; (B y C) Esferas con encapsulación fuerte; (D) Esferas melanizadas; y (E) esferas sin encapsular. Scale bar: 50 µm.

El porcentaje de esferas encapsuladas y la reacción de melanización se presentan en la Figuras 18 y 19 respectivamente. Se observa que este porcentaje se redujo significativamente veinticuatro horas después de la inyección de las esferas de Sephadex A-25 en larvas del quinto estadio de *D. saccharalis* (t = 4.84, gl = 25, = P <0.0001), presentándose un 63% de esferas encapsuladas en las larvas parasitadas en relación un 90% de las esferas encapsuladas encontradas en las larvas no parasitadas.

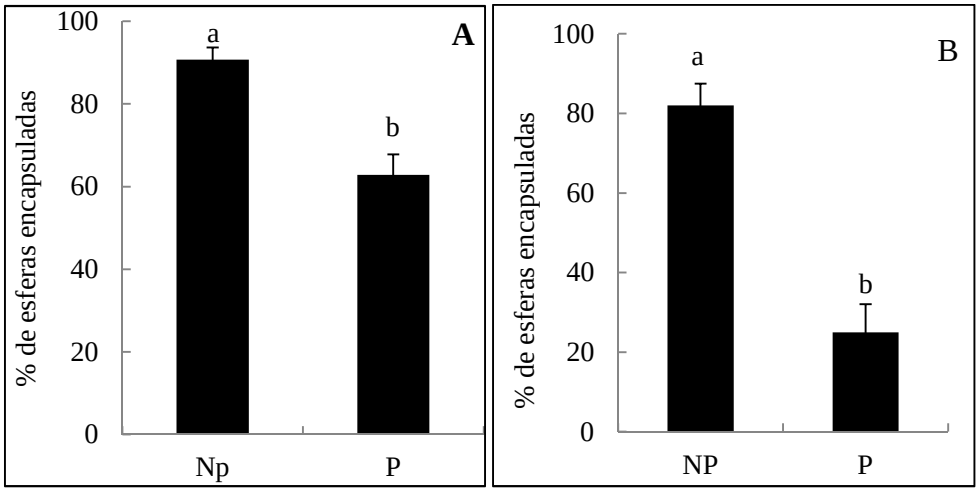


Fig. 18. Respuesta *in vivo* de la Encapsulación de esferas de Sephadex A-25 inyectadas en larvas parasitadas (P) y no parasitadas (Np) de *D. saccharalis* (A) y *E. loftini* (B). Cada larva recibió de 10-15 esferas, y solamente 10 de ellas fueron recuperadas para la evaluar el proceso de encapsulación. Los experimentos fueron repetidos 8 y 13 veces para *E. loftini* y *D. saccharalis*, respectivamente. Las barras de la gráfica representan el porcentaje promedio ± ES. Letras diferentes arriba de las barras de error indican la existencia de diferencia significativa (Prueba de la T de Student, P < 0.05).

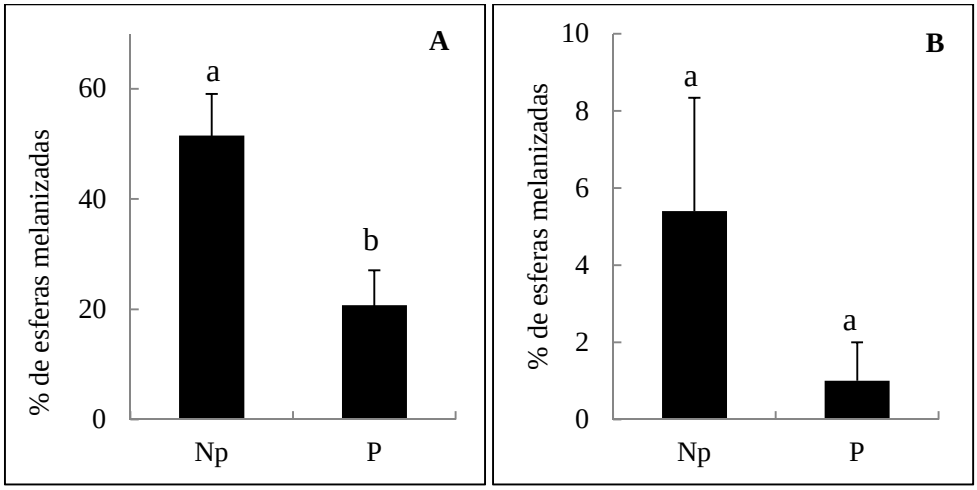


Fig. 19. Reacción de melanización de las esferas encapsuladas en larvas parasitadas y no parasitadas de *D. saccharalis* (A) y *E. loftini* (B). Las barras de la

gráfica representan el porcentaje promedio ± ES de esferas mostrado una melanización asociada. Letras diferentes debajo de las barras de error indica una diferencia significativa (Prueba T de Student, P < 0.05).

Por otra parte, las larvas parasitadas de *D. saccharalis* mostraron una disminución significativa (t = 3.05, gl = 25, = P <0.0053) en el porcentaje de esferas melanizadas en relación con el control (Fig. 19A). En el caso de *E. loftini* no hubo diferencias significativas en el porcentaje de esferas melanizada encontradas entre los ejemplares parasitados y no parasitados (Fig. 19 B) (t = 1.43, gl = 14, P = 0.17), así también en relación al porcentaje de esferas de encapsuladas se observó una reducción significativa (t = 6.96, gl = 14, = P <0.0001) en las larvas parasitadas (25%) en comparación con larvas no parasitadas (82%) (Fig. 18B). Estos resultados sugieren que el parasitismo de *C. flavipes*, inhibió la capacidad de encapsulación de hemocitos tanto en *D. saccharalis* como en *E loftini.*

3.4. Efecto del Parasitismo sobre la actividad Fenoloxidasa

El efecto del parasitismo de *C. flavipes* sobre la actividad fenoloxidasa de la hemolinfa total en larvas parasitadas y no parasitados de *D. saccharalis* y *E. loftini* se determinó in vitro. Como se muestra en la figura 20, después de seis días de la parasitación, las larvas parasitadas de *D. saccharalis* presentaron una actividad significativamente menor que en las no parasitadas. Sin embargo, hubo poca diferencia en la actividad fenoloxidasa en los ejemplares parasitados y no parasitados de *E. loftini*. Estos resultados indican que la reducción de la melanización presentada en la hemolinfa de las larvas parasitadas podría haber sido debido a la falta de activación de fenoloxidasa o debido a la ausencia de un sustrato apropiado en la hemolinfa.

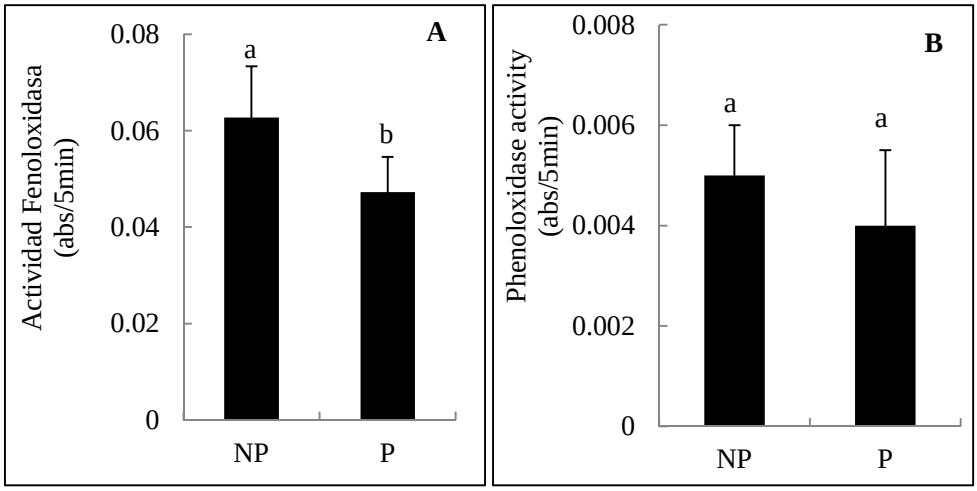


Fig. 20. Efecto de la parasitación por *C. flavipes* sobre la actividad fenoloxidasa de *D. saccharalis* (A) y *E. loftini* (B). Larvas del 4to instar fueron parasitadas por *C. flavipes.* La hemolinfa fue colectada a los 6 días post-parasitación, y la absorbancia fue medida a 490 nm cada 5 min durante una hora. Cada medición se realizó por triplicado. NP y P representa larvas no parasitadas y parasitadas, respectivamente. Letras diferentes arriba de las barras de error nos indica la existencia de una diferencia significativa. (Prueba T de Student, $P < 0.05$).

4. Discusión

El parasitismo de las larvas de los lepidópteros por *Cotesia spp*. generalmente se asocia con la supresión de la inmunidad celular y humoral del insecto hospedero (Schmidt, 2007; Amaya *et al*, 2005; Bae y Kim, 2004). La superfamilia Ichneumonoidea, en donde se localiza la familia Braconidae se ha estudiado extensamente en esta área (Strand y Pech, 1995a). Estos parasitoides han desarrollado una increíble variedad de mecanismos para manipular la respuesta inmune y el desarrollo de sus hospederos. Los polidnavirus (PDVs), el veneno, las proteínas del ovario y los teratocitos son los factores reguladores universales utilizados una gran diversidad de endoparasitoides para crear un entorno favorable para el desarrollo de su progenie (Schmidt, 2007).

Los factores inmunosupresores empleados por los parasitoides probablemente ayuden a determinar su rango de hospedero. Recientemente Cui *et al.* (2000) mostraron

que el rango de hospederos del parasitoide ichneumónido *Campoletis sonorensis* (Cameron) está determinada por el establecimiento de la infección con el polidnavirus en el hospedero permisivo, y no por la presencia de proteínas de ovario, ya que en todos los estudios realizados (en hospederos permisivos y no permisivos) inhiben la encapsulación en las primeras etapas de encapsulación (Cui *et al.*, 2000). Del mismo modo, la capacidad de *C. congregata* para desarrollarse dentro de las diferentes especies de insectos esfíngidos parece estar relacionada con la síntesis de proteínas específicas del parasitismo (Harwood *et al.*, 1998). Estas proteínas son probablemente los productos génicos de los polidnavirus, ya que también se sintetizan cuando las larvas son inyectadas con virus purificado (Harwood y Beckage, 1994).

En *D. saccharalis* el cual es el hospedero permisivo de *Cotesia flavipes*, los factores inmunosupresores iniciales derivados del parasitoide parecen funcionar eficientemente. La progenie del parasitoide evadió la respuesta inmune del huésped. Los estudios de los diferentes sistemas de hospedero- parasitoide han demostrado que después de cuatro a seis horas de la parasitación, la mayoría de los hemocitos del insecto permisivo llegan a ser infectados por el polidnavirus, y los productos de los genes virales empiezan a expresarse (Cui *et al*, 2000; Lavine y Beckage, 1996; Luckhart y Webb, 1996), tras lo cual el papel inmunosupresor a largo plazo de los polidnavirus comienza. Los mecanismos responsables de la supresión de la encapsulación se han estudiado en muchos sistemas parasitoide-hospedero (Ibrahim y Kim, 2006; Hu *et al*, 2003; Lavine y Beckage, 1996; Pech y Strand, 1996a, b).

Los estudios más recientes realizados por Lavine y Beckage (1995, 1996) y Amaya *et al*. (2005) demostraron que una de las principales consecuencias de la infección con el bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV) en los hemocitos de *M. sexta* parasitadas por *C. congregata* es la inducción de la apoptosis de los hemocitos. Tanto

los plasmatocitos, como los granulocitos parecen verse afectados. La encapsulación no puede ser llevada a cabo por estas células apoptóticas, lo que permite que el parasitoide se desarrolle, al evadir de esta respuesta inmune.

La melanización de la hemolinfa de las larvas fue severamente inhibida en el hospedero permisivo *D. saccharalis*, mientras que no se vio afectada en *E. loftini*, el hospedero no permisivo. La reducción del nivel de melanización de la hemolinfa en el huésped parasitado se ha visto acompañado por una actividad reducida de la fenoloxidasa (Lavine y Beckage, 1995). Se ha mencionado que el PDV de *C. sonorensis* juega un papel importante en el bloqueo de la melanización del plasma del hospedero y en el comportamiento de la propagación de los hemocitos (Shelby *et al*, 2000;. Luckhart y Webb, 1996). Los polidnavirus inducen una disminución de la melanización de la hemolinfa tanto originado por los bracovirus como por ichnovirus (Beckage *et al*, 1990, 1987; Stoltz y Cook, 1983). Los resultados mostrados aquí muestran que se lleva a cabo una inhibición de la melanización en el hospedero permisivo, mientras que el hospedero no permisivo no se ve afectado. La inhibición de la melanización puede no beneficiar directamente a los huevos o larvas del parasitoide no encapsulados, sino más bien indirectamente, apoyando de esta manera el desarrollo de parasitoides mediante la inhibición de la respuesta inmune humoral y mejorar así la persistencia del virus.

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales funciones fisiológicas de los parasitoides asociados a braco e ichnovirus es suprimir la respuesta inmune del huésped, ya sea alterando el comportamiento del sistema de hemocitos y la adhesividad (Beck y Strand, 2005, 2003, Lavine y Strand, 2002; Asgari *et al*, 1997, 1996) o mediante la inducción de la apoptosis de las células, o afectando la movilización de las células de tal manera que no se dé una respuesta efectiva de encapsulación (Amaya *et al*, 2005; Teramoto y Tanaka, 2004; Pech y Strand, 2000; Lavine y Beckage, 1996,

1995, Strand y Pech, 1995b). Rodríguez-Pérez *et al.*, (2005) sugiere que después de la parasitación de *M. sexta* por *C. flavipes*, los bracovirus fueron incapaces de inducir alteraciones en los hemocitos que se requieren para evitar la encapsulación de esta especie, y que la potencia viral probable se reduce en *M. sexta*, el hospedero no permisivo de este parasitoide. En base a ello, se piensa que los bracovirus de *Cotesia flavipes* no se unen a los receptores virales en la superficie de los hemocitos de *M. sexta* o no pueden entrar a través de los poros nucleares en el núcleo (Stoltz, 1993; de Burón y Beckage, 1992). Como se mencionó anteriormente, otro factor responsable de este fenómeno podría ser el fracaso de la expresión de los genes de los PDVs en un alto nivel en los hemocitos infectados de *M. sexta* a pesar de que el virus entre con éxito en el citoplasma y núcleo de las células.

Muchos de los ejemplares de la progenie del parasitoide son encapsulados en *E. loftini* durante la fase de huevecillo y larva, bloqueando de esta manera el desarrollo de los parasitoides (Tabla 2). Varios estudios han mostrado que distintos factores están relacionados con el bloqueo del desarrollo de los parasitoides como los es la encapsulación del parasitoide o la falla en la emergencia del insecto (Beckage *et al*, 2003; Beckage y Tan, 2002; Lovallo *et al*, 2002; Harwood *et al*, 1998). En el presente estudio se pudo apreciar que ninguna larva del parasitoide pudo emerger de las larvas de *E. loftini*, y además se pudo evidenciar que los huevecillos son encapsulados rápidamente después de la parasitación. Dushay y Beckage (1993) demostraron que la dosis mínima del CcBV necesaria para interrumpir el desarrollo del hospedero era un menor mil veces que la necesaria para suprimir el sistema inmune mismo hospedero y prevenir la encapsulación del parasitoide.

5. Conclusiones

En resumen, nuestros resultados mostraron que *D. saccharalis* es verdaderamente un hospedero más adecuado para *C. flavipes* permitiendo el desarrollo del parasitoide y la emergencia con éxito, mientras que *E. loftini* fue un hospedero no apto para el parasitoide, ya que los huevecillos del parasitoide siempre fueron encapsulados y no sobrevivieron. Este estudio indicó que dos lepidópteros barrenadores del tallo de la caña de azúcar, los cuales son taxonómica y ecológicamente muy similares difieren en su capacidad para encapsular una especie parasitoide. Mediante la comprensión de la respuesta de encapsulación podemos ser capaz de hacer mejores predicciones acerca de la gama de huéspedes de una especie parasitoide antes de su lanzamiento como un agente de control biológico.

Capítulo 4: Efecto del parasitismo de *Cotesia flavipes* sobre el crecimiento y la eficiencia metabólica de *Diatraea saccharalis*

Resumen

El parasitismo de larvas *Diatraea saccharalis* por el endoparasitoide *Cotesia flavipes* genera en una reducción en la cantidad de alimento consumido por las larvas del hospedero. Después de parasitación de las larvas de quinto estadío, las larvas más fuertemente parasitadas crecieron más en comparación con aquellos que contenían un menor número de parasitoides debido a un aumento de peso en seco de los parasitoides. Las diferencias en la masa hospedero parecen surgir después de la ovoposición. Un aumento dependiente de la dosis del peso en seco del hospedero parece nutricionalmente beneficioso para los parasitoides en desarrollo. La eficiencia de conversión de alimento ingerido y digerido a masa corporal y la digestibilidad aproximada de la dieta ingerida por el insecto hospedero se redujo significativamente en los hospedadores parasitados. El efecto del parasitismo sobre la capacidad de las larvas de *D. saccharalis* de utilizar los alimentos ingeridos se redujo parcialmente por el parasitismo. Las larvas parasitadas no logran convertir la mayor parte de la comida en biomasa corporal como lo presentaron las larvas no parasitadas. El desarrollo de los parasitoides en presencia de varios competidores pesaron hasta un 50% menos que los que se desarrollaron en larvas con un número menor de parasitoides, aunque el peso de los hembras adultas de los parasitoides no variaron con el tamaño del número de parasitoides. La relación de número de parasitoides emergidos y los no emergidos disminuyó a medida que el número de parasitoides fue mayor, con pocos o ningún parasitoides emergidos cuando el hospedero cuando la larva fue parasitada fuertemente con más de 100 parasitoides.

Palabras Clave: Parasitismo, Eficiencia metabólica, parasitoide gregario, *Diatraea saccharalis, Cotesia flavipes*

1. Introducción

Las larvas de los endoparasitoides alteran el crecimiento y el desarrollo de su hospedero con la finalidad de satisfacer sus necesidades nutricionales. Los hospederos parasitados por especies koinobiontes siguen creciendo y desarrollándose incluso después de la parasitación (Gauld, 1988). Sin embargo, en muchas especies, el crecimiento de los ejemplares parasitados se inhibe (Adamo *et al*, 1997; Tanaka *et al*, 1992; Beckage y Riddiford, 1983). Como resultado, las larvas parasitoides presentan el riesgo de tener menos recursos nutrimentales disponibles para apoyar su crecimiento y desarrollo. Se cree que los parasitoides regulan la fisiología del hospedero para obtener en un nivel máximo los nutrientes necesarios para facilitar el desarrollo de su progenie. De igual manera se ha reportado que los parasitoides incrementan los procesos de digestibilidad aproximada (AD) para obtener más alimentos, a pesar de que disminuye el consumo de alimentos (FC), la eficiencia de conversión del alimento digerido (ECD) en biomasa del ejemplar parasitado y la tasa de crecimiento (Alleyne y Beckage, 1997; Thompson, 1993; Bentz y Barbosa, 1990; Thompson, 1982a). La interacción nutricional entre el hospedero y el endoparasitoide relacionada con el crecimiento y desarrollo deben ser analizados en la mayoría de las especies endoparasitoides (Thompson, 1993, 1983). Las diferencias en las estrategias entre los parasitoides solitarios y gregarios son que el endoparasitoides gregario compite por los recursos disponibles con los demás, así como también con el huésped, sin embargo, la competencia del parasitoide solitario es sólo con el insecto hospedero.

El parasitismo de la avispa Braconidae *Cotesia flavipes* altera la fisiología del barrenador de la caña, *Diatraea saccharalis* y produce cambios bioquímicos a nivel de las proteínas, carbohidratos y lípidos de la hemolinfa y la grasa corporal (Salvador y Consoli, 2007). También la inmunidad celular y humoral del insecto hospedero es

suprimida y las larvas parasitadas muestran una alta susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis* (Mahmoud *et al*., 2011). Sin embargo, relativamente pocos estudios se han centrado en los efectos de tamaño del número de parasitoides relacionándolo con el crecimiento y el metabolismo de los insectos hospederos, particularmente en aquellas especies koinobiontes las cuales continúan creciendo y desarrollándose después de la parasitación. Los datos presentados en este documento se describen los efectos del tamaño del número de parasitoides de *Cotesia flavipes* sobre el crecimiento, el consumo de alimentos y la eficiencia metabólica después de la parasitación de las larvas de *Diatraea saccharalis*.

2. Material y Métodos

2.1. Cría de insectos

El establecimiento de las crías se siguió tomando la metodología descrita en el capítulo 2.

2.2. Estudio del crecimiento y del tamaño de la masa de parasitoides

Para examinar los efectos del parasitismo en el crecimiento del insecto hospedero, se pesaron tanto las larvas parasitadas como las no parasitadas cada 24 h en una balanza analítica (Denver Instruments. Mod. PI-314, resolución= 0.0001g). Los ejemplares parasitados fueron monitoreados hasta una vez presentada la emergencia de parasitoides, mientras que los individuos no parasitados fueron monitoreados hasta una vez iniciada la etapa de pupación.

El número surgido de parasitoides de *C. flavipes* se fue registrando hasta una vez finalizada la emergencia de larvas para pupar. En ocasiones, si los parasitoides son alterados antes de la formación del capullo, las larvas ven afectadas y se interrumpe el proceso de pupación, por lo tanto las avispas que puparon como las que interrumpieron

este proceso, fueron contabilizadas y se registró el dato. Posteriormente, el hospedero fue disectado para determinar el número de parasitoides que no pudieron emerger del hemocele del insecto. La suma de los parasitoides emergidos como los no emergidos fue representado como el número total de parasitoides emergidos (Godfray, 1994).

2.3. Determinación del peso seco

Los individuos parasitados fueron pesados cada 24 horas empleando una balanza analítica, justo hasta el momento en observarse una reducción del peso del insecto, lo que generalmente ocurre un día antes de la emergencia de las avispas. Para obtener el peso seco de los hospederos, los parasitoides fueron disecados del hemocele. Las larvas fueron disectadas en una placa de Petri pre-pesadas la cual poseía en la parte superior un disco de papel filtro (Whatman # 1) para disminuir la pérdida de hemolinfa. Las larvas del parasitoide de cada huésped se colocaron sobre el papel filtro y posteriormente se transfieren a las cajas de Petri pre-pesadas. Para obtener el peso seco, cada insecto hospedero y sus respectivos parasitoides se secaron hasta peso constante en un horno de tiro forzado a 50 ºC y finalmente el peso fue registrado. Los hospederos fueron secados durante 10 días hasta que el peso se mantuvo estabilizado dentro del rango de ± 0.01 g, mientras que los parasitoides se secaron durante aproximadamente 5 días hasta que su peso se estabilizo dentro del rango de ± 0.001 g

2.4. Medición del consumo de alimentos y la eficiencia de su utilización.

La técnica gravimétrica de Waldauer (1968) se utilizó para determinar la cantidad de alimento consumido, las heces producidas y la ganancia de biomasa. Larvas no parasitadas del cuarto o quinto estadio fueron pesadas cada 24 h hasta que justo antes de pasar al estadio de pupa, mientras que los individuos parasitados los pesos fueron registrados hasta una vez que los parasitoides emergieron. Las larvas fueron alimentadas con dieta fresca la cual fue proveída diariamente en copas plásticas de 1 onza. El

alimento no ingerido al final del período de 24 horas fue secado en un horno de tiro forzado bajo las condiciones descritas anteriormente. Los parasitoides sin emerger fueron disectados de los hospederos y finalmente fueron contabilizados con la finalidad de determinar el tamaño de la nidada de los parasitoide. Se realizaron disecciones en placas de Petri las cuales contenían un disco de papel filtro Whatman No 1 previamente pesado, luego las larvas del parasitoide fueron cuidadosamente secadas en el papel filtro y trasladadas en una placa Petri para registrar el peso seco final. Las larvas del hospedero se secaron en una estufa de tiro forzado (a 50 ºC) hasta obtener un peso constante (aproximadamente al décimo día una vez que el peso fue estabilizado dentro del margen de ± 0.005 g). Un grupo de control de larvas en el día 1 del cuarto estadio fue pesado y secado en el horno de tiro forzado siguiendo el protocolo descrito previamente, con la finalidad de estimar el porcentaje inicial de peso seco de las larvas experimentales. Las heces de las larvas parasitadas se recolectaron y se pesaron diariamente. Después las heces de cada larva fueron secadas en el horno de tiro forzado hasta obtener un peso constante. Al final del experimento, la totalidad de heces se combinaron y se pesaron de manera conjunta durante el periodo experimental (alrededor de 9 días) hasta que el peso de la masa total de las heces se mantuvo estabilizado dentro del margen de ± 0.005 g.

Con los registros anteriores, se calcularon los siguientes índices:

(1) El índice de consumo (IC), representa el rango relativo del alimento fresco ingerido en relación al peso promedio del insecto durante un periodo de alimentación (Waldauer, 1968) el cual fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{F}{(BA)\,T}$$

Donde F representa el peso freso de la dieta consumida, BA el promedio aritmético del peso corporal durante periodo experimental ($BA=B_{final}+B_{start}/2$) y T es el periodo de alimentación en días.

(2) El Rango relativo de crecimiento (CR) fue calculado empleando la ecuación siguiente:

$$CR = \frac{G}{(BA)\,T}$$

Donde G representa la ganancia en peso del insecto durante un periodo de tiempo.

(3) La eficiencia de conversión del alimento ingerido a masa corporal (ECI), representa la habilidad de la larva a utilizar la comida ingerida, la cual es calculada mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$ECI = \left(\frac{\text{dw ganado}}{\text{dw comida ingerida}} \right) \times 100$$

donde dw= peso seco

(4) La eficiencia de la conversión de la comida digerida a masa corporal (ECD) fue calculada de la siguiente manera:

$$ECD = \left(\frac{\text{dw ganado}}{\text{dw comida ingerida- dw heces}} \right) \times 100$$

(5) La digestibilidad aproximada (DA) el tamaño de la masa de parasitoides fue calculado de la siguiente manera:

$$AD = \left(\frac{\text{dw comida ingerida} - \text{dw heces}}{\text{dw comida ingerida}} \right) \times 100$$

Todos los pesos fueron medidos en gramos.

2.5. Determinación del tiempo de desarrollo de las larvas y registro del peso de los parasitoides adultos.

Para determinar como el tamaño del tamaño de la nidada de parasitoides afecta el tiempo de desarrollo de los parasitoides en el hospedero, 10 larvas del 5to instar fueron parasitadas. Las larvas fueron pesadas diariamente para determinar el peso máximo alcanzado por el hospedero, de igual manera la fecha y hora en que los parasitoides emergieron también fueron registrados. Todos los parasitoides que formaron exitosamente el capullo fueron recogidos y se colectaron registros de los parasitoides adultos eclosionados. Todas las avispas que emergieron de un hospedero fueron colectadas y secadas en un horno de tiro forzado (50 ºC) hasta obtener un peso constante. Debido al tamaño pequeño de las avispas, estas fueron agrupadas de 10 en 10 ejemplares. Si se utilizó más de 10 ejemplares para formar un grupo, el peso total registrado fue dividido entre el número de ejemplares para estimar el peso individual.

2.6. Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de varianza simples o de una vía para evaluar la diferencia significativa para los índices de Waldauer existente entre las larvas parasitadas y las no parasitadas. Los contrastes de las diferencias entre los pares de tratamientos fueron examinadas mediante la prueba F de Scheff's (Zar, 1984). Para evaluar el efecto relativo del tamaño de la nidada, se realizaron análisis de regresión. El nivel de significancia fue

del 95% (α = 0.05) para todas las comparaciones. Los cálculos fueron elaborados usando el software Microsoft Excel 2010.

3. Resultados

3.1. Crecimiento de las larvas del 5to instar de *D. saccharalis* después de la parasitación.

Larvas individuales del instar L4-L5 parasitadas en el día 0 después de la muda fueron dejadas por 24 horas. Las larvas de los parasitoides emergieron en el quinto o sexto día de los ejemplares del sexto estadio. El tiempo total requerido para que *C. flavipes* se desarrollara desde el estadio de huevecillo hasta su emergencia fue 10.9 días (Figura 21). Hubo poca diferencia en relación a las tasas de crecimiento de las larvas parasitadas y no parasitadas del quinto estadío, pero después de muda del sexto estadio los parasitados empezaron a ganar peso notablemente más por día (Fig. 21). Después de la emergencia de las avispas se detuvo desarrollo del insecto hospedero y finalmente las larvas murieron, esto posiblemente debido a una alteración del sistema endocrino o neuroendocrino combinado con la falta de alimentación (Adamo *et al*, 1997; Beckage y Riddiford, 1982a). El peso promedio de larvas parasitadas durante la emergencia (102 mg ± 37) fue superior que los pesos medios alcanzados por larvas no parasitadas (97 mg ± 31).

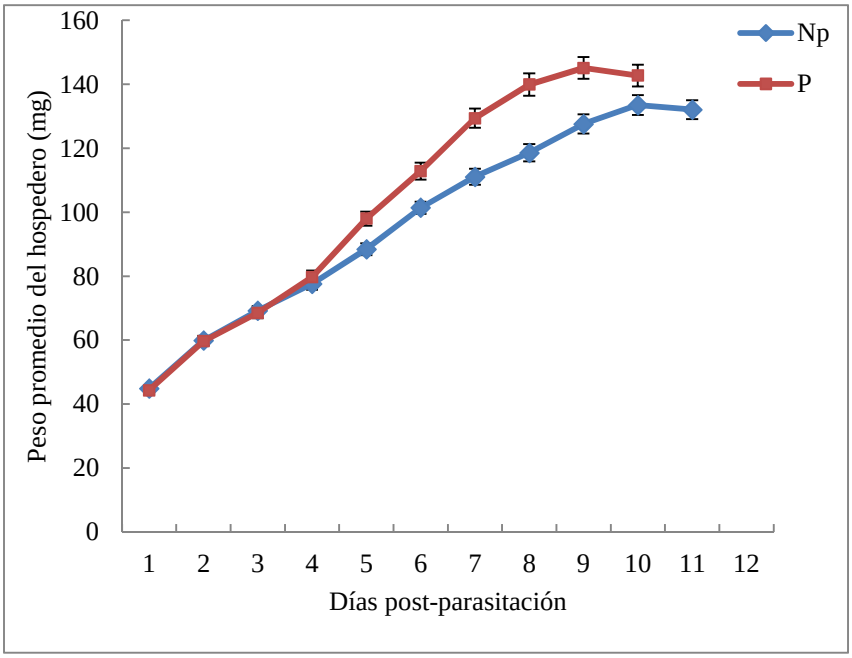


Fig. 21. Peso promedio diario (±ES) de larvas del 5to-6to instar de *D. saccharalis* no parasitadas (n=40) y parasitadas (n=39) fueron expuestas a la ovoposición de hembras de *C. flavipes*. Las larvas fueron pesadas diariamente hasta que las larvas no parasitadas (Np) puparon o hasta que se presentó la emergencia de las larvas de la avispas en las larvas parasitadas.

Sin embargo, a pesar del efecto global inhibitorio de parasitismo sobre el crecimiento del hospedero, los pesos de los individuos más fuertemente parasitados fueron mayores en relación a los parasitoides provenientes de nidadas de tamaño menor como se ve en la figura. 22 (coeficiente de correlación = 0.7354, P <0.001)

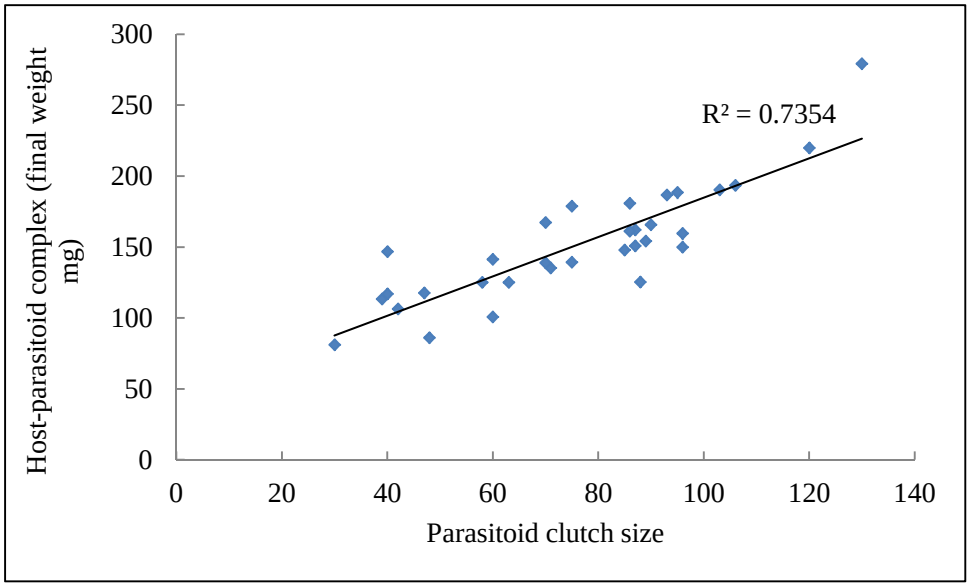


Fig. 22. Correlación del peso de las larvas de *D. saccharalis* (n=32) y el tamaño de la nidada de los parasitoides (avispas emergidas y sin emerger). Las larvas fueron expuestas a 1-4 oviposturas de la hembra de *C. flavipes*. Esta figura muestra los pesos máximos del complejo parasitoide-hospedero 1 día previo a la emergencia de larvas graficadas en función del tamaño del número de parasitoides. Los individuos que recibieron parasitación múltiple alcanzaron pesos mayores que las larvas con menor número de parasitoides (coeficiente de correlación = 0.7352).

Conforme el número de parasitoides presentes fue mayor, el porcentaje de parasitoides que emergieron con éxito disminuyó, como se observa en la Figura 23A. Cuando el tamaño de la nidada de los parasitoide fue de entre 40 y 70 ejemplares se presentó una relación positiva entre el tamaño de la nidada de parasitoides y el número de parasitoides emergidos (Figura 23.B). Los datos mostraron que al parecer hay una cantidad máxima de carga de alrededor de 100 avispas, las cuales son capaces de emerger con éxito, independientemente del número de parasitoides que atacan al hospedero del quinto estadío (Fig. 23B).

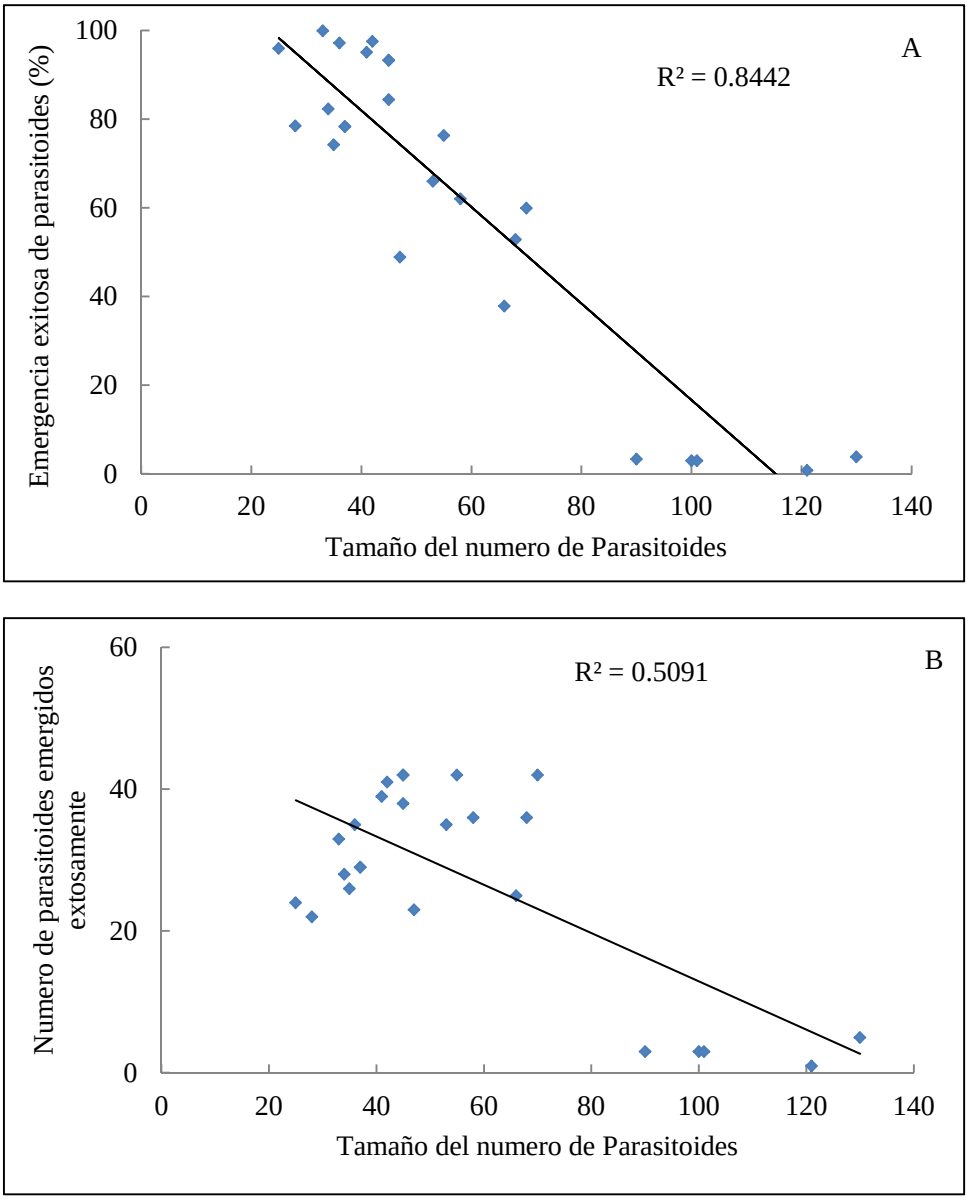


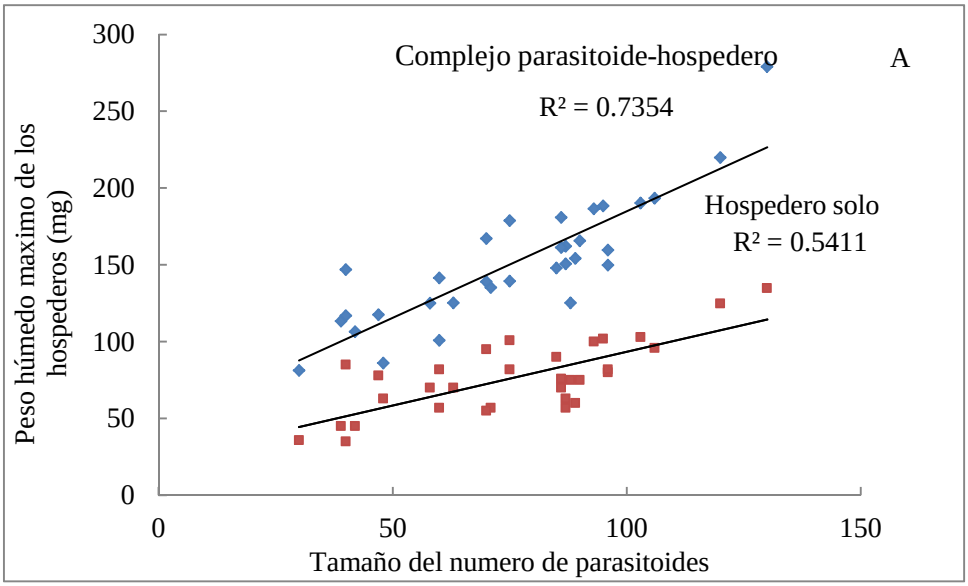
Fig. 23. Porcentaje del número total de avispas emergidas de *C. flavipes* en función del tamaño del número de Parasitoides (avispas emergidas y sin emerger). (A) El porcentaje de parasitoides exitosamente emergidos disminuyo con el incremento del tamaño del número de parasitoides (R^2 = 0.8442). (B) El número de parasitoides emergidos exitosamente correlacionados con el tamaño del número de parasitoides (R^2 = 0.5901).

En general, el número promedio de parasitoides que emergieron fue de 27 ± 13. De manera general fue observado que cuando una larva *D. saccharalis* contenía alrededor de 130 parasitoides alcanzaba un peso de 151 mg y solamente 5 parasitoides lograban emerger. Las disecciones revelaron que la gran mayoría de las larvas que no emergieron

estaban viables, no estaban encapsuladas, y habían madurado al segundo o tercer estadio; considerando esto se apreció que no habían síntomas evidentes de anomalías.

3.2. Correlación de la tamaño del hospedero y el número de parasitoides

La emergencia de parasitoides se llevó a cabo durante un período de dos días y fue precedido siempre por la pérdida de peso de los hospederos 1 o 2 días antes de la emergencia de los parasitoides, lo que indica que el consumo de alimentos por el hospedero había terminado. Para determinar si la correlación positiva entre el tamaño de la nidada de los parasitoides y el peso máximo de hospedero refleja un aumento de la biomasa en la mayoría de las larvas más fuertemente parasitadas, el peso seco fue obtenido para los individuos parasitados una vez que estos alcanzaron un peso máximo; el cual generalmente se presentó un día antes de emerger los parasitoides o cuando el hospedero empezaba a perder peso. Tanto el peso húmedo (del complejo hospedero-parasitoide y del hospedero solo) ($R2 = 0.7354$, $P < 0.001$, fig. 24A) y el peso seco (representado por el peso del hospedero solo) ($R2 = 0.5411$, $P < 0.001$, Figura. 24B) fueron positivamente correlacionados con el tamaño de la ovipostura del parasitoide.



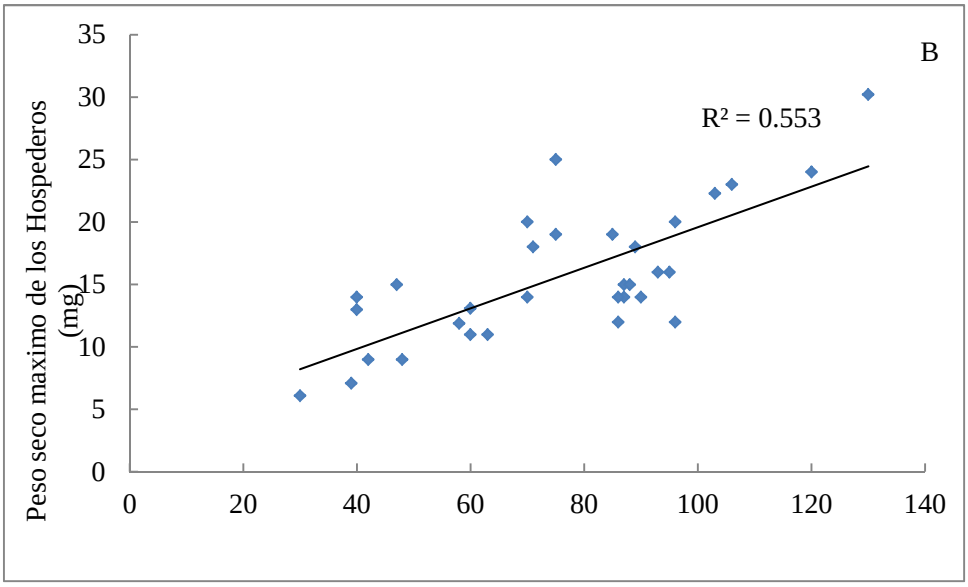


Fig. 24. Peso final del complejo parasitoide hospedero graficado en función del tamaño del número de parasitoides. Las larvas de *D. saccharalis* (n=32) fueron parasitadas y los ejemplares de *C. flavipes* fueron obtenidos por disección de los hospederos en los días en que la perdida en peso del hospedero empezó a disminuir y las larvas dejaron de alimentarse. Los datos fueron analizados usando regresión lineal. (A) Los pesos en fresco del complejo hospedero-parasitoide y el peso en fresco del hospedero fueron graficados en función del tamaño del número de parasitoides (R^2 =0.7354 y 0.5411, respectivamente*). (*B) El peso seco de las larvas hospedero fueron graficadas en función del tamaño del número de parasitoides (R^2*=0.553).* Los pesos fueron correlacionados positivamente con el tamaño del número de parasitoides tanto en el complejo (A) y el hospedero (B) conforme los parasitoides eran más grandes.

El peso en seco de los parasitoides individuales disminuyó a medida que aumentaba el tamaño de la ovipostura del parasitoide (Fig. 25). Los datos mostrados en la figura. 25 corresponden a los pesos de las larvas de las avispas.

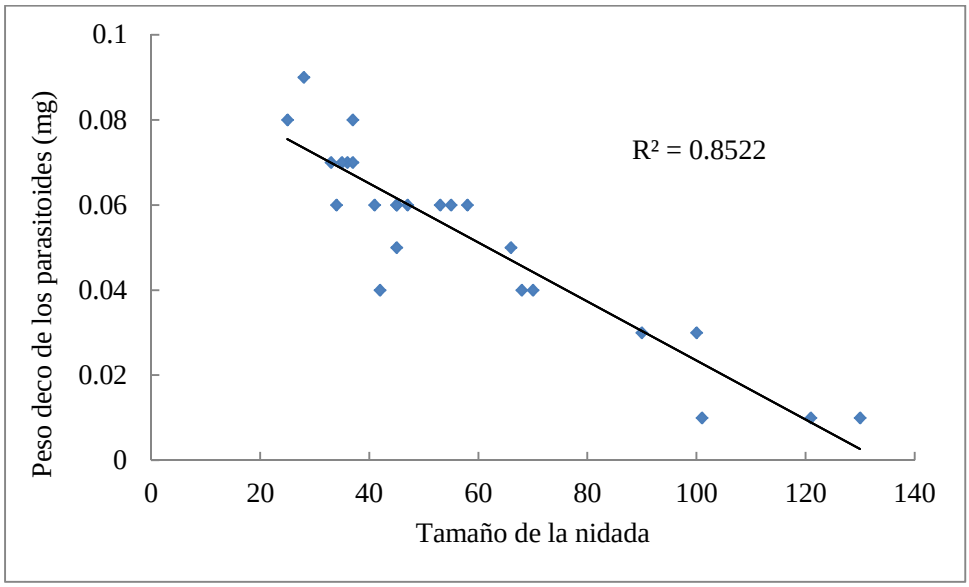


Fig. 25. Correlación negativa (de R^2=0.8522) del peso seco de los parasitoides individuales con relación al incremento del número de parasitoides. Los hospederos fueron parasitados y una vez que los pesos del complejo parasitoide-hospedero empezaron a decrecer se extrajeron los parasitoides del hospedero mediante disección. El peso seco del grupo de larvas de los parasitoides fue registrado y posteriormente fue dividido entre el número de ejemplares contados con la finalidad de estimar el peso individual.

3.3. Rango de consumo alimenticio y crecimiento del hospedero

Los datos de los diferentes índices de consumo se muestran en la Tabla 2. El índice de consumo (IC), basado en el peso fresco de los alimentos ingeridos y los insectos, es una medida de la respuesta funcional de la conducta alimenticia (Waldauer, 1964). Las larvas no parasitadas consumen mucho más alimento que los individuos parasitados por cada gramo de peso corporal (Tabla 2) y la tasa de crecimiento relativo (GR) para las larvas parasitadas fue mayor en comparación al de las larvas parasitadas (Tabla 2). El efecto del parasitismo sobre la capacidad de las larvas para utilizar el alimento

consumido también fue evidente durante varios días después de la ovoposición. Los valores de la digestibilidad aproximada (AD) mostrada en la Tabla 2 para larvas parasitadas del quinto estadio fueron significativamente menores que el valor de AD reportado para larvas no parasitadas sugiere una disminución de la capacidad para digerir los alimentos. La menor eficiencia de conversión de alimento ingerido a masa corporal (ECI) y la eficiencia de conversión del alimento digerido a masa corporal (ECD) en las larvas del quinto estadío parasitadas por *C. flavipes* reflejan la incapacidad de las larvas para ganar peso. Estos datos muestran que la cantidad total de alimento consumido por las larvas parasitadas por *C. flavipes* femenino fue significativamente menor que la cantidad consumida por las larvas no parasitadas.

Tabla 2. Valores promedio de los índices de Waldauer de las larvas no parasitadas (n=32) y parasitadas de *D. saccharalis* (n=32). Ejemplares sin parasitar tuvieron altos valores de CI, GR, ECI y ECD en comparación de los ejemplares parasitados.

Índice de Waldauer	No parasitadas (n=32)	Parasitadas (n=32)
Índice de Consumo (IC)	0.44 a	0.20 b
Rango de crecimiento relativo (GR)	12.77 a	9.08 b
Digestibilidad Aproximada (AD)	39.14 % a	27.69 b
Eficiencia de conversión del alimento digerido a masa corporal (ECD)	28.57 a	19.70 b
Eficiencia de conversión del alimento ingerido a masa corporal (ECI)	12.43 a	5.45 b

Letras diferentes al lado de los valores promedio indican diferencias significativas.

4. Discusión

La alteración del crecimiento del hospedero parasitado se puede observar en gran variedad de especies animales (Phares, 1997), incluyendo algunos insectos (Kumar y Ballal, 1992; Strand, 1989). En algunas especies de insectos atacados por

endoparasitoides gregarios, logran una mayor masa final en comparación con los insectos que han sido parasitados ligeramente, lo que hace indicar que el crecimiento de hospedero puede ser manipulado por los parasitoides para compensar la competencia y con ello optimizar la transferencia de nutrientes a la descendencia de las avispas (Tanak *et al*., 1992). Al aumentar el tamaño del hospedero fuertemente parasitados, los parasitoides por lo tanto aumentan el potencial de crecimiento y los adultos llegan a ser de mayor tamaño (Smith y Smilowitz. 1976). Sin embargo, otras variables, tales como el tamaño de hospedero al momento de la ovoposición, también influyen en la tasa de desarrollo y tamaño final de los parasitoides que emergerán (Godfray, 1994). Los resultados de esta serie de experimentos demostraron que la alimentación y el crecimiento de las larvas de cuarto instar del barrenador de la caña, *D. saccharalis* se inhibió después de la parasitación *C. flavipes*. Beckage y Riddiford (1982) demostraron que el crecimiento de larvas de *M. sexta* parasitadas por *C. congregata* y larvas no parasitadas se lleva a cabo a la misma velocidad hasta el inicio del cuarto estadio, tiempo en el cual las larvas no parasitadas comenzaron a ganar más peso por día en comparación de como lo hicieron los ejemplares parasitados de *M. sexta*. Aquí no se observaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre las larvas parasitadas y no parasitadas hasta el quinto estadío, a pesar de que la muda de estadío se retrasó. Bentz y Barbosa (1990) reportaron resultados similares en ejemplares parasitados del tercer estadío de *M. sexta.* Sin embargo, tras la parasitación de las larvas de quinto estadío, el hospedero muestra una inhibición del crecimiento casi inmediato en relación con las larvas no parasitadas (Beckage y Riddifor, 1983). En base a ello podemos apreciar que las tasas de crecimientos de los hospederos presentan algo de plasticidad, influenciado no sólo por su etapa de desarrollo en la que se presenta la parasitación inicial, sino también por la forma en que muchos de los parasitoides se

desarrollan dentro del hospedero. La tasa de consumo de alimentos (CI) y la tasa de crecimiento (GR) fueron significativamente mayores en los ejemplares parasitados (Tabla 2), el descenso drástico en la tasa de crecimiento visto en parasitados *D. saccharalis* parece ser atribuido a la disminución en el consumo de alimentos durante el quinto estadío; estos resultados son similares a los resultados reportados por Adamo *et al*. (1997) en larvas de *M. sexta* parasitadas por *C. congregata*.

La relación hospedero-parasitoide implica claramente un escenario más complejo que la competencia entre el hospedero y sus parasitoides por los nutrientes (Thompson, 1982a). El metabolismo energético del hospedero a menudo cambia dramáticamente después de la parasitación, lo cual es indicativo de la influencia de parasitoides sobre la tasa de consumo y la eficiencia de utilización de los alimentos por parte de sus hospederos (Thompson, 1993). El parasitismo del falso mediador de la col *Trichoplusia ni* por *Hyposoter exiguae* aumenta la eficiencia de asimilación del hospedero (Thompson, 1982b); por otro lado, Slansky (1978) encontró que las larvas de *Pieris rapae* parasitadas por *Cotesia glomerata* incrementaron la masa total de más rápido que las larvas no parasitadas. A pesar de que las larvas del hospedero se alimentan menos, ellas aumentaron de peso más rápidamente porque el metabolismo de las larvas parasitadas fue 21% menor, lo que acelera el aumento de peso. Cloutier y Mackauer (1979) de manera parecida encontraron este comportamiento en el pulgón del guisante *Acyrthosiphon smithi*, al observar que estos se alimentaban más rápido y además que la asimilación de nutrientes fue más eficiente que en los pulgones no parasitados.

Pocos estudios han abordado cómo el tamaño de la ovipostura de parasitoides afecta el crecimiento del hospedero y la eficiencia metabólica a nivel fisiológico y mecanisticamente. El superparasitismo en *A. pisum* parasitado por *A. smithi* aumenta la eficiencia de la utilización de la energía por parte del hospedero (Cloutier y Mackauer,

1980). Del mismo modo, la biomasa del gusano común, *Pseudaletia separata*, se correlaciona positivamente con el número de huevecillos de *Cotesia kariyai* depositados en el hemocele y con el peso total de los parasitoides en desarrollo dentro del hospedero (Sato y Tanaka, 1984).

El parasitismo puede dar lugar a más cambios bioquímicos complejos que en última instancia, estimula en el hospedero a crecer más rápido a través del metabolismo de la grasa corporal (Haunderland y Shirk, 1995) u otros factores. Tendencias similares se observaron para el sistema de *Pseudaletia separata-Cotesia kariyai* (Tanaka *et al*., 1992) en la que los hospederos fuertemente parasitados crecían más rápido sin el correspondiente efecto del incremento en el consumo de alimentos o de la eficiencia de utilización de los alimentos. En el presente estudio, los parasitoides en desarrollo sobre hospederos fuertemente parasitados les tomo un poco más de tiempo en emerger, como se puede apreciar en la figura 22, se podría predecir que la ampliación del período de alimentación, incluso podría haber deberse a que esto permitiría a que un mayor número de parasitoides puedan emerger. La comparación de los parámetros de la eficiencia de conversión del alimento digerido a biomasa y la digestibilidad aproximada entre las larvas de no parasitadas y las parasitadas se ha realizado en muchas especies (Alleyne y Beckage, 1997; Thompson, 1983). La reducción en la cantidad de alimento consumido en las larvas parasitadas como se demuestra aquí es al menos parcialmente a consecuencia de la inoculación de material del sistema reproductor de la hembra parasitoide durante la ovoposición. La inyección del fluido del cáliz (PDV), de la glándula de veneno, o una mezcla de los dos fueron los responsables de reducir la cantidad de alimento consumido por las larvas de *H. virescens* (Guillot y Vinson, 1972). Nakamatsu *et al*. (2001) mostró que el PDV y el veneno extraído de *Cotesia kariyai* aumentaba la digestibilidad aproximada y disminuye la eficiencia de conversión del

alimento digerido a biomasa en *Pseudaletia separata*. Por otra parte, Hegazi *et al*. (2005) encontró una disminución significativa en el consumo de alimentos, el peso de las heces expulsadas y el aumento del peso en *Spodoptera littoralis* cuando se les inyectó el líquido del cálix y el veneno del parasitoide *Microplitis rufiventris*. Curiosamente, Alleyne y Beckage (1997) mostraron que la eficiencia de conversión del alimento ingerido y digerido y la digestibilidad aproximada en *Manduca sexta* parasitada por *C. congregata* no varió significativamente con el tamaño de la ovipostura del parasitoide. Las larvas de *M. sexta* fuertemente parasitadas se observó que crecen fuertemente sin el correspondiente efecto en el consumo de alimentos o en la eficiencia de la utilización de los alimentos.

5. Conclusiones

El parasitismo de la *C. flavipes* afecta el desarrollo en las larvas de *D. saccharalis* causando una disminución en la ganancia de peso y el consumo de alimento, lo que resulta en una ganancia menor del peso final de los ejemplares parasitados. Parámetros como la digestibilidad y la eficiencia de la conversión de los alimentos digeridos en los ejemplares parasitados también fueron más bajos.

Capítulo 5: Efecto del parasitismo de *Cotesia flavipes* sobre la susceptibilidad de las larvas de *Diatraea saccharalis* a la infección bacteriana causada por *Bacillus thuringiensis*

Resumen

Los huevecillos y las larvas del Braconidae *Cotesia flavipes* no fueron encapsulados en el hemocele de su hospedero habitual, *Diatraea saccharalis*. Los experimentos se realizaron para evaluar la respuesta inmune antibacterial de las larvas de *D. saccharalis* parasitadas por este endoparasitoide gregario. Diferentes cepas de *B. thuringiensis* tales como la HD73, HD125, HD133, HD-551 y *Bt*-1154 fueron utilizadas durante este estudio. Las larvas recién eclosionadas se alimentaron sobre dos concentraciones de *Bt* (50 mg *Bt*/ml y 500 mg *Bt*/ml) y la mortalidad larvaria se calculó después de 7 días. Los porcentajes de mortalidad para la dosis de 50 mg/ml dieta fueron de 9.6, 10.2, 11.8, 72.4 y 84.8 para las cepas HD551, HD133, HD125, HD73 y *Bt*-1154, respectivamente. Mientras que a la dosis de 500 μg *Bt*/ml dieta los porcentajes de mortalidad fueron de 14.6, 27.9, 36.3, 94.6 y 91.8 para las cepas HD551, HD125, HD133, HD73 y *Bt*-1154, respectivamente. Se seleccionó la cepa HD73 para determinar la susceptibilidad de las larvas parasitadas y no parasitadas de *D. saccharalis*. Larvas del quinto estadio fueron parasitadas por *C. flavipes*, y tanto las larvas parasitadas como las no parasitadas fueron alimentadas con una dieta contaminada con las cepas HD-73, HD 551 y HD-133 a una dosis de 500 mg/ml de dieta. Las larvas parasitadas de *D. saccharalis* mostraron una mayor sensibilidad a la cepa HD-73 en comparación con las larvas no parasitadas y el porcentaje de mortalidad fue de 92 y 70 para las larvas parasitadas y no parasitadas respectivamente. Estos resultados sugieren que la parasitación por parte de las avispas aumenta la susceptibilidad a los agentes entomopatógenos debido a la inmunosupresión del hospedero, por los que los polidnavirus y el veneno de los ovarios puede jugar un papel importante en el aumento de la susceptibilidad.

Palabras Clave: Susceptibilidad, *Bacillus thuringiensis*, entomopatógeno, polidnavirus, parasitismo, *Cotesia flavipes, Diatraea saccharalis*

1. Introducción

El éxito inicial de la reproducción de los parasitoide depende principalmente de la fecundidad de la hembra, la disponibilidad de un huésped adecuado, y la capacidad de la hembra para encontrar al insecto hospedero (Price, 1980). Después de la ovoposición, la supervivencia de huevos y larvas del parasitoide es determinada en parte por la susceptibilidad a las defensas celulares y humorales del insecto hospedero (Ross y Dunn, 1989). La mayoría de las veces se presenta con frecuencia una encapsulación de los huevecillos del parasitoide himenóptero por acción de los hemocitos una vez que son ovopositados en la cavidad hemocélica del lepidóptero hospedero no habitual. Sin embargo, en el hemocele del hospedero habitual, los huevecillos eclosionan y las larvas del parasitoide se desarrollan mientras consume los reservas (Rodríguez-Pérez *et al*., 2006). Las secreciones del tracto reproductivo de la hembra del parasitoide, en conjunto con los teratocitos liberados de la membrana que rodea los embriones del parasitoide han sido implicados en la inmunosupresión de la respuesta de defensa del insecto hospedero y la modificación de la composición de la hemolinfa (Pennachio y Strand 2009, Bae y Kim, 2004). La protección de los huevecillos y las larvas del endoparasitoide ichneumónido de la encapsulación mediada por los hemocitos se ha demostrado directamente mediante la inyección de líquido del cáliz y un polidnavirus purificado (Edson y Vinson, 1981). El hospedero parasitado, como todos los insectos, están sujetos a la infección por una variedad de patógenos y microorganismos potencialmente patógenos. Si el huésped muere antes de la emergencia del parasitoide adulto, el parasitoide también morirá. Por lo tanto, se prevé que las modificaciones que induce el parasitismo con relación a la respuesta de defensa del huésped, no debería tener un efecto negativo en la supervivencia del huésped. Sin embargo, si las defensas del huésped mediado por los hemocitos serán afectadas, es de suponer que la

susceptibilidad del huésped a los patógenos bacterianos también se verá afectada. Por lo tanto, la investigación de los sistemas de defensa puede ayudar a llevar a cabo una correcta comprensión general de la función de las respuestas antibacterianas de los insectos.

Los insecticidas microbianos a parir de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner se han utilizado durante décadas para el control de plagas de insectos en una amplia gama de cultivos. Gran cantidad de información está disponible en donde la mayoría de ellos no reportan ningún impacto ecológico y en la mayoría de los casos no tienen efectos negativos directos sobre los parasitoides (Glare y O'Callaghan, 2000). Las diferentes cepas de *Bt* que se emplean comúnmente representan el 90% del mercado mundial de los bioplaguicidas (Rowe, 2004). *Bt* es una bacteria Gram-positiva, formadora de endosporas, la cual contiene una serie inclusiones proteicas reconocidas como δ-endotoxinas (Jenkins y Dean, 2000). Estos cristales están formados por proteínas las cuales poseen una cualidad interesante, ya que son tóxicas sólo contra insectos (Aronson, 2001). Los insectos infectados con *Bt* muestran una lisis celular de los tejidos epiteliales del intestino medio y signos característicos fatales, como lo es la parálisis intestinal, el cese de la alimentación, y finalmente la generación de una septicemia (Bravo *et al*., 2005). Los insectos pueden sin embargo defenderse de la infección bacteriana mediante reacciones de defensa inmunes del tipo celular y humoral (Rahman *et al*., 2004a, b). *Cotesia flavipes* es un endoparasitoide larval gregario importante utilizado para llevar a cabo el control del barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis*, una plaga dañina de la caña de azúcar, sorgo, maíz y arroz en los cultivos agrícolas de Estados Unidos y México (Reay-Jones *et al*., 2008). La parasitación del barrenador de la caña induce una inmunosupresión celular y humoral del hospedero (Mahmoud *et al*., 2011). En este caso, podría plantearse la hipótesis de que la

inmunosupresión aumenta la entomopatogenicidad de *Bt*. En este capítulo de la tesis analizamos los efectos del endoparasitoide Braconidae, *C. flavipes* en la respuesta antibacteriana del hospedero *D. saccharalis*. Se realizaron bioensayos para evaluar los efectos de diferentes cepas de *Bt* (HD-73, HD-125, HD-551, HD-133 y *Bt*-1154) sobre larvas neonatas de *D. saccharalis* para determinar la toxicidad de cada cepa. Después de que se seleccionó la cepa más tóxica, esta se utilizó para determinar la susceptibilidad de las larvas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cría de Insectos

Larvas de *D. saccharalis* fueron criadas en una dieta artificial bajo una atmosfera de 27 ° C, y un fotoperíodo de 16:8 h luz- obscuridad (Mahmoud *et al*., 2011). Larvas del cuarto estadio de *D. saccharalis* fueron parasitadas manualmente por hembras de *C. flavipes* en una proporción 1:1 (avispa/ hospedero) respecto a la población. Posteriormente las larvas parasitadas fueron criadas de la misma forma que las larvas no parasitadas (control). Los capullos de la avispa fueron recogidos y conservados en cajas de Petri hasta su aparición. Una vez emergidas las avispas se alimentan con una solución de miel, y estas fueron propagas utilizando larvas del cuarto estadío de *D. saccharalis*.

2.2. Cepas Bacterianas

Diferentes cepas bacterianas de *Bt* (HD73, HD133, HD125 y HD551) fueron obtenidas del cepario interno del laboratorio de Biomedicina Molecular, mientras que la cepa *Bt*-1154 empleada en este estudio fue obtenida del International Entomopathogenic *Bacillus* Center (IEBC) del Instituto Pasteur de Paris.

2.3. Bioensayo de Preliminar de Patogenicidad

Se emplearon dieta artificial fresca y larvas neonatas de *D. saccharalis* para realizar el bioensayo. Dos concentraciones de *B. thuringiensis*, 50 y 500 µg *Bt*/ml dieta fueron empleadas. Cinco copas plásticas con dieta contaminada fueron utilizadas y cinco larvas neonatas se depositaron en cada copa. El experimento fue realizado por triplicado para cada cepa de *Bt*. Un total de 75 larvas neonatas fueron empleadas para cada concentración de cada cepa. Las copas de plásticos con los tratamientos fueron almacenadas en bolsas de papel dentro de una cámara ambiental mantenida a 27±1°C, 50% de humedad relativa, y un fotoperiodo de L16:D8. El número de larvas muertas fue registrado al séptimo día de iniciado el bioensayo.

2.5. Bioensayo de Susceptibilidad

Los experimentos preliminares con las diferentes cepas de *Bt* (HD73, HD125, HD133, HD551, y *Bt*-1154) contra larvas neonatas de *D. saccharalis* nos indican que las cepas HD73 y *Bt*1154 fueron las más tóxicas. Larvas del quinto instar de *D. saccharalis* fueron divididas en dos grupos; las parasitadas con *C. flavipes* y las no parasitadas (control). Ambos grupos fueron dejados en inanición (sin alimento) durante 12 horas antes de emplearse en el experimento, para después tanto las larvas parasitadas como las no parasitadas ser alimentadas con una dieta contaminada con *B. thuringiensis* (500 µg HD73/ml dieta). Cada larva fue mantenida de manera individual en copas plásticas e incubadas en una atmosfera a 27±1°C, 50% RH, y un fotoperiodo de L16:D8. El número de larvas muertas fue registrado diariamente, y los porcentajes de mortalidad larvaria fueron calculados. Este experimento se realizó por triplicado empleando 10 larvas por réplica.

3. Resultados

3.1. Selección de cepas de *B. thuringiensis* contra *D. saccharalis*

Los datos de mortalidad larvaria son mostrados en las figuras 26 y 27 para la dosis de 50 y 500 µg *Bt*/ml dieta respectivamente. De las cinco cepas de *B. thuringiensis* evaluadas, la HD73 y la *Bt*-1154 fueron las más tóxicas y produjeron una considerable mortalidad sobre larvas de *D. saccharalis*. Nuestros bioensayos muestran que la cepa *Bt*-1154 fue la más patogénica hacia *D. saccharalis* presentando una mortalidad arriba del 84 y 91 porciento a las dosis de 50 y 500µg *Bt*-1154/ml dieta respectivamente. La segunda cepa más tóxica para *D. saccharalis* fue la HD73 y los porcentajes de mortalidad generados fueron de 72.4 y 94.6 para las dosis de 50 y 500µg HD73/ml dieta respectivamente. Las otras cepas de *Bt*, tales como la HD125, HD133 y HD551 presentaron una toxicidad menor y los porcentajes de mortalidad fueron de 11.8, 10.2 y 9.6, respectivamente a la concentración baja de 50 µg *Bt* /ml dieta. Sin embargo, la mortalidad se incrementó conforme se incrementó la concentración del extracto de *Bt* en la dieta y los porcentajes de mortalidad a la concentración de 500 µg *Bt*/ml dieta fueron de 27.2, 36.3 y 14.6% para las cepas HD125, HD133 y HD551 respectivamente.

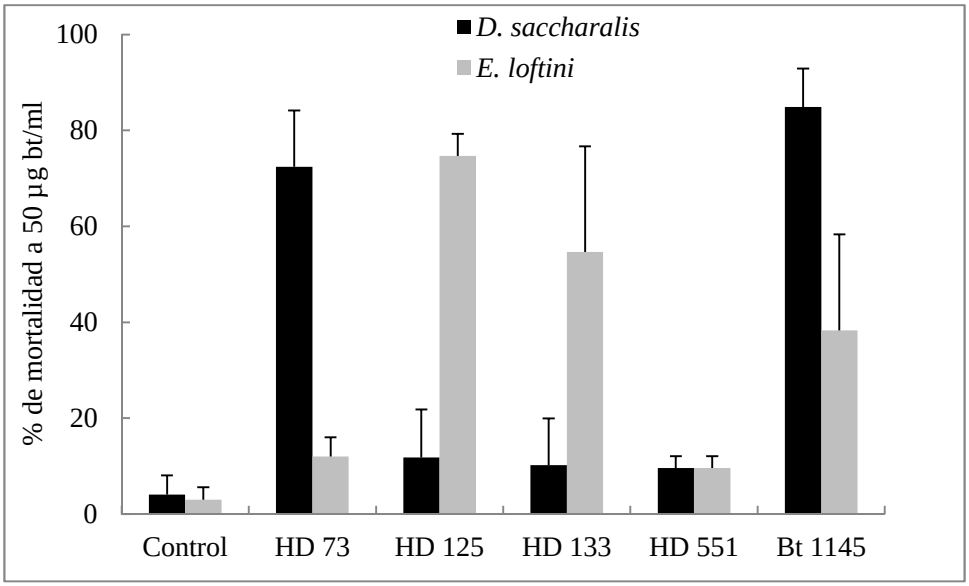


Fig. 26. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *D. saccharalis* y *E. loftini* tratadas con diferentes cepas de *Bt* a la concentración de 50 µg *Bt*/ml dieta.

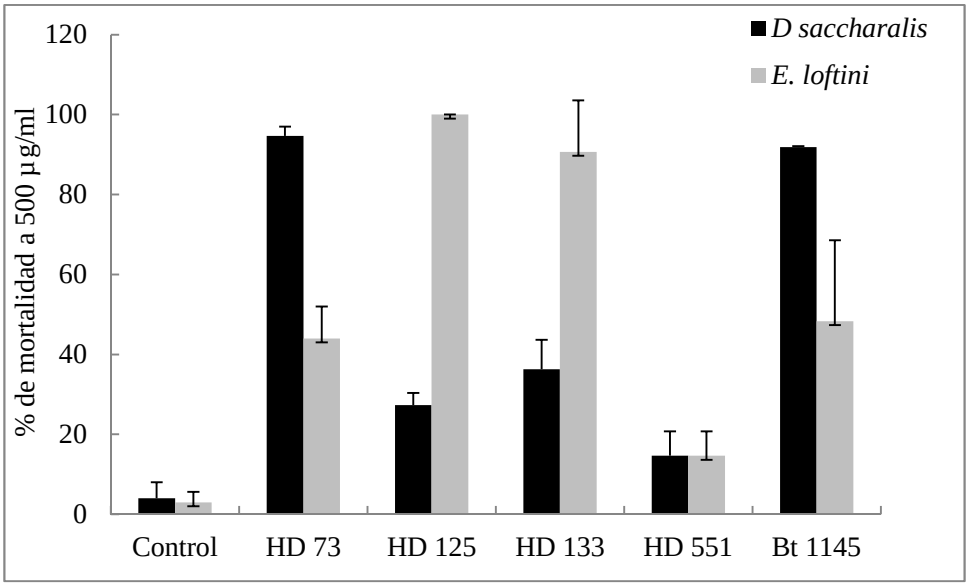


Fig. 27. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *D. saccharalis* y *E. loftini* tratadas con diferentes cepas de *Bt* a la concentración de 500 µg *Bt*/ml dieta.

Estos resultados sugieren que la cepa HD551 presenta la más baja toxicidad, mientras que la cepa *Bt*-1154 seguida de la HD73 mostraron ser las más tóxicas hacia larvas neonatas de *D. saccharalis*. Curiosamente, estas dos cepas mostraron la más baja

toxicidad hacia otro insecto cámbrido, *Eoreuma Loftini* (Barrenador mexicano del arroz), el cual vive en los mismos hábitats (nichos) con *D. saccharalis* alimentándose de las mismas plantas hospederas. Contrariamente, las cepas HD125 y HD133 mostraron la más alta toxicidad contra las larvas de *E. loftini* y estos resultados contrastan con el efecto de estas cepas hacia *D. saccharalis*.

3.2. Parasitismo de *C. flavipes* induce una alta susceptibilidad de *D. saccharalis* hacia *B. thuringiensis*

Después de la parasitación de *C. flavipes, las* larvas del quinto instar de *D. saccharalis* permanecieron vivas durante 10 días a 27 °C y finalmente murieron sin presentar alguna metamorfosis, mientras las larvas no parasitadas si presentaron la metamorfosis al estadio pupal al día número 8. Las larvas parasitadas de *D. saccharalis* mostraron una susceptibilidad mayor a la infección por *Bt* en comparación con las larvas no parasitadas (Fig. 28). Los porcentajes de mortalidad de las larvas parasitadas alimentas sobre dieta infestada con las cepas HD551, HD133 y HD73 se incrementaron significativamente comparadas con las larvas no parasitadas ($t = 18.6794$, $gl= 58$, $P < 0.0001$; $t= 8.4264$, $gl = 58$, $P < 0.001$ y $t = 15.9636$, $gl = 58$, $P < 0.0001$, respectivamente, Fig. 28). Las larvas de los controles no tratados con la cepa HD73 no mostraron mortalidad alguna tanto para las larvas de *D. saccharalis* parasitadas como en las no parasitadas.

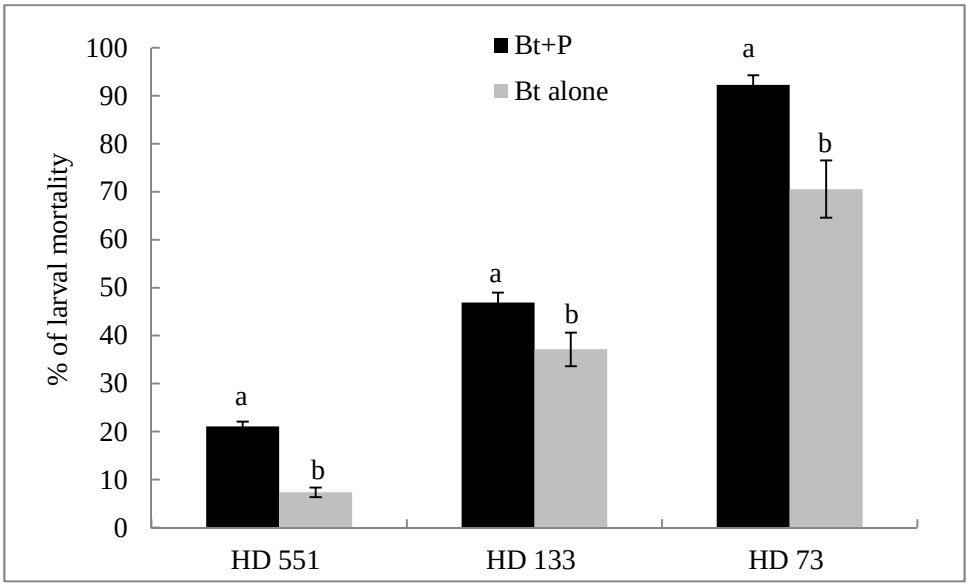


Fig. 28. Susceptibilidad de larvas del 5to instar de *D. saccharalis* a diferentes cepas de *B. thuringiensis*

La Figura 29 muestra que tanto las larvas parasitadas como las no parasitadas alimentadas sobre una dieta contaminada con la cepa HD73 fueron extremadamente afectadas en términos del porcentaje de pupación y del porcentaje de larvas parasitadas que produjeron parasitoides. Por el contrario, las cepas HD551 y HD133 no muestran un efecto elevado en relación al porcentaje de pupación y la producción de parasitoides tanto para las larvas no parasitadas, como en las larvas parasitadas comparadas con las larvas control que se alimentaron con la dieta libre de *Bt*.

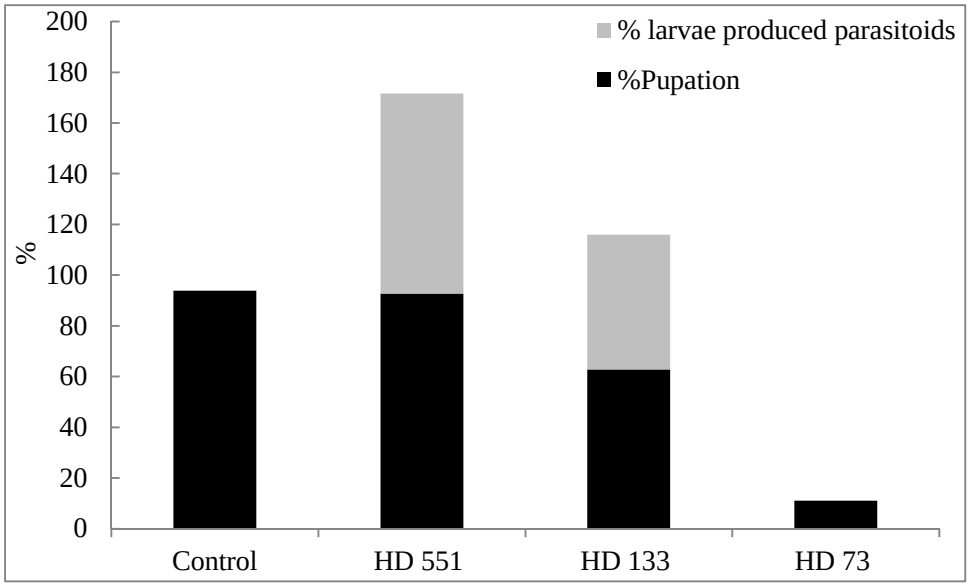


Fig. 29. Porcentaje de larvas no parasitadas que produjeron pupas y de larvas no parasitadas que produjeron parasitoides. Ambas larvas fueron alimentadas sobre una dieta infestada con *B. thuringiensis*.

4. Discusiones

La bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es el bioplaguicida más ampliamente utilizado, como una alternativa a los insecticidas químicos. Las delta endotoxinas de los cristales proteicos parasporales (Cry) de *B. thuringiensis* tienen la gran ventaja de ser agentes muy seguros que no afectan a otros organismos, presentan una alta especificidad para el insecto plaga a controlar y son ampliamente diversos. La actividad tóxica especifica hacia los diferentes familias y tipos de insectos se relaciona con la presencia de los cristales los cuales presentan diferentes morfologías, tamaños, cantidades y composiciones de acuerdo a cada cepa de *Bt* (Jalali *et al*., 2004). Los cristales contienen diferentes proteínas, los cuales son codificados por genes distintos. Varias décadas de investigación relacionada al estudio del modo de acción de *Bacillus thuringiensis* en los lepidópteros han revelado una considerable diversidad de información con referencia a la forma en que este patógeno mata a los hospederos. El

modo de acción de δ-endotoxinas implica la activación proteolítica, la unión de la toxina a los receptores, la formación de poros que conducen a un desequilibrio iónico, el cese de la alimentación, la septicemia como resultado de crecimiento de esporas, y eventualmente la muerte (Gill *et al*., 1992). Cualquier interferencia en la cascada de eventos asociados con el modo de acción favorece a los insectos para puedan sobrevivir y así desarrollar la resistencia (Tabashnik, 1992). Sin embargo, el mecanismo dominante depende de una serie de factores, incluyendo la especie hospedadora, la etapa de desarrollo del hospedero, la cepa de la bacteria patógena, la dosis del patógeno, etc (Suzuki *et al*., 2004). Ross y Dunn (1989) demostraron que las larvas de *Manduca sexta* parasitadas por *Cotesia congregata* exhibían un dramático aumento en la susceptibilidad a *Pseudomonas aeruginosa* la cual se manifestó una hora después de la parasitación. La aparición rápida de la susceptibilidad sugiere que este fenómeno es mediado directamente por la sustancia inyectada en el insecto hospedero durante la ovoposición. El papel de la larva del parasitoide en provocar la susceptibilidad es poco clara ya que algunas veces los huevecillos del parasitoide no eclosionan después de 3-4 días posterior a la ovoposición. Por lo tanto, parece que el incremento en la susceptibilidad es causada por los huevecillos o algún otro componente presente en el fluido de la ovoposición. Ross y Dunn (1989) sugieren que dos componentes muy probablemente son los responsable de la inmunosupresión, el polidnavirus que está presente en el líquido del cáliz *C. congregata*, y el veneno. El polidnavirus y veneno asociado al sistema reproductor de las avispas hembras puede contribuir a una mayor susceptibilidad del insecto parasita dado a las bacterias. En los capítulos anteriores hemos demostrado que la parasitación de *C. flavipes* induce inmunosupresión en *D. saccharalis.* Los factores inmunosupresores de los endoparasitoides involucrados son el PDV, el veneno, las proteínas de ovario, y los teratocitos. La inmunosupresión podría

afectar la capacidad de defensa hacia los entomopatógenos microbianos, lo que resultaría en aumento de la susceptibilidad hacia ellos. Utilizando esta hipótesis, esta investigación ha puesto a prueba que un patógeno puede aumentar su patogenicidad en un hospedero inmunodeprimido. Se encontró que las larvas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* mostraron una mayor mortalidad cuando se infectaron con la cepa HD73 en comparación con las larvas no parasitados. Estos resultados son similares a los reportados por Jung *et al*. (2006), quienes encontraron que *Plutella xylostella* parasitadas por *C. glomerata* o *C. plutellae* mostraron una mayor susceptibilidad a la bacteria entomopatógena, *Xenorhabdus nematophila* (Xn), y al patógeno viral, *Autographa californica nucleopolyhedrosis virus* (AcNPV). Se ha reportado que el PDV es el principal factor involucrado en la inmunosupresión (Dushay y Beckage, 1993). Tres genes del polidnavirus de *C. plutellae* fueron evaluados por Jung *et al.* (2006), e indicó que la lectina de CpBV no aumentó significativamente la susceptibilidad del patógeno. Sin embargo, dos genes de CpBV15 aumentaron significativamente la susceptibilidad a los patógenos, en el cual la construcción CpBVl5β era más potente que la CpBVl5α. Estos resultados sugieren que los genes de los polidnavirus están asociados a la inmunodepresión, lo que resulta en la inducción significativa de la susceptibilidad de *P. xylostella* al patógeno. Brooks (1993) demostró que la susceptibilidad a los patógenos con frecuencia se incrementa durante el parasitismo. *D. saccharalis* fue altamente susceptible a las cepas *Bt* HD-73, HD-551 y HD-133 de *Bacillus thuringiensis*.

5. Conclusiones

La cepa HD73 de *Bt* mostro un incremento significativo en la mortalidad de *D. saccharalis*, mientras que la cepa HD125 presento un efecto más tóxico en las larvas de

Eoreuma loftini. Las larvas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* mostraron una mayor susceptibilidad a las cepas HD73, HD133 y HD551 de *Bacillus thuringiensis* en comparación cuando estas fueron evaluadas sobre larvas no parasitadas.

Conclusiones generales

Este estudio muestra que el parasitismo de *C. flavipes* regula negativamente la población de hemocitos de *D. saccharalis* y suprime las reacciones de encapsulación y nodulación inmunológica. En las larvas no parasitadas de *D. saccharalis*, las células granulares representan el principal tipo de hemocitos (35%) y plasmatocitos también estuvieron presentes en alrededor del 30% del total de hemocitos. Después de la *parasitación* por *C. flavipes*, las proporciones relativas de estos dos grandes hemocitos cambiaron ligeramente, sin embargo, el recuento de hemocitos totales mostraron una reducción significativa en las larvas parasitadas. Los porcentajes de encapsulación y nodulación fueron significativamente mayores en las larvas no parasitadas comparación con larvas parasitadas por *C. flavipes*. La reducción de la encapsulación fue evidente en las larvas parasitadas uno y seis días posteriores a la parasitación después de 3, 12 y 24 h después de la inyección de las esferas de Sephadex A-25. Curiosamente, en las larvas no parasitadas hubo una reducción significativa del número esferas encapsuladas al día 1 en comparación a las esferas encapsuladas en el día 6 posteriores a la parasitación. Por otra parte, el porcentaje de esferas de Sephadex A-25 que mostraron melanización se redujo en el día 6 posterior a la parasitación en relación al obtenido en el primer día después de la parasitación, en donde las tasas de melanización no mostraron grandes diferencias. Las larvas parasitadas mostraron una disminución significativa en la capacidad inmune humoral como lo demuestra la reducción de la actividad fenoloxidasa. El plasma presento una mayor actividad fenoloxidasa que el o*bt*enido por los hemocitos, y las larvas parasitadas mostraron menor actividad fenoloxidasa e comparación al resultado obtenido con las larvas no parasitadas.

Las larvas parasitadas consumen menos alimentos y ganan una menor cantidad de peso en comparación con las larvas no parasitadas. Después de parasitación de las larvas de quinto estadío, las larvas que fueron más fuertemente parasitadas crecieron más que las larvas que contenían menos parasitoides debido a un aumento de peso en seco de los hospederos. La eficiencia de conversión de alimento ingerido y digerido a masa corporal, y la digestibilidad aproximada de la dieta ingerida por el insecto hospedero se redujo significativamente en las larvas parasitadas. El radio de los parasitoides emergidos y no emergidos disminuyó a medida que se incrementó el tamaño de la ovipostura, presentándose una emergencia disminuida o nula cuando el hospedero fue fuertemente parasitado con más de 100 parasitoides.

Biblografia

Adamo, S.A., Linn, C.E., Beckage, N.E., 1997. Correlation between changes in host behaviour and octopamine levels in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, parasitized by the gregarious braconid wasp *Cotesia congregata*. J. Exp. Biol. 200, 117-127.

Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. Rev. Immunol. 17, 593-623.

Alleyne, M., Wiedenmann, R.N., 2001a. Suitablility of Lepidópteran stemborers for parasitization by novel-association endoparasitoids. Biol. Cont. 46, 1-23.

Alleyne, M., Wiedenmann, R.N., 2001b. Encapsulation and total hemocyte numbers in three Lepidópteran stemborers parasitized by *Cotesia flavipes*-complex endoparasitoids. Entomol. Exp. Appl. 100, 279-293.

Alleyne, M., Beckage, N.E., 1997. Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. J. Insect Physiol. 43, 407-424.

Amaya, K., Asgari, S., Jung, R., Hongskula, M., Beckage, N.E., 2005. Parasitization of *Manduca sexta* by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host inmune response. J. Insect Physiol. 51, 505-512.

Aronson, A.I., Shai, Y., 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiol. Lett. 195, 1-8.

Asgari, S., Hellers, M., Schmidt, O., 1996. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polidnavirus gene. J. General Virol. 77, 2653-2662.

Asgari, S., Schmidt, O.U. Theopold., 1997. A polidnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an inmune suppressor. J. General Virol. 78, 3061-3070.

Ashida, M., Yamazaki, H.I., 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation in *Molting and Metamorphosis*, E. Ohnishi and H. Ishizaki, eds. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 239-265

Ashida, M., Brey, P.T., 1995. Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10698-10702.

Ashida, M., Brey, P.T., 1997. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade in *Molecular Mechanisms of Inmune Responses in Insects*, P. T. Brey and D. Hultmark, eds. Chapman and Hall, London. Pp. 135-172.

Ashida, M., Brey, P., 1998. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P., Hultmark, D. (Eds.), Mechanisms of Inmune Responses in Insects. Chapman and Hall, London. pp. 135-172.

Bae, S., Kim, Y., 2004. Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Comp. Bioch. Physiol. 138A, 39-44.

Baldwin, M.R., Barbieri, J.T., 2005. The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. Cur. Topics in Microbiol. Immunol. 291, 147-166.

Basio, N. and Kim, Y., 2005. A short review of teratocytes and their characters in *Cotesia plutellae* (Braconidae: Hymenoptera). J. Asia-Pacific Entomol. 8, 211-217.

Beck, M., Strand, M.R., 2005. Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect High- Five and S2 cells. J. Virol. 79, 1861-1870.

Beckage, N.E., Riddiford, L.M., 1982. Effects of parasitism by *Apanteles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm *Manduca sexta.* Gen. Comp. Endocr. 47, 308 322.

Beckage, N.E., Gelman, D.B., 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. Annu. Rev. Entomol. 49, 299-330.

Beckage, N.E, Tan, F., 2002. Development of the braconid wasp *Cotesia congregata* in a semi-permissive noctuid host, *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 81, 49-52.

Beckage, N.E, Kanost, M.R., 1993. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. Molecular Biol. 23, 643-653.

Beckage, N.E., 1985. Endocrine interactions between endoparasitic insects and their hosts. Annu. Rev. of Entomol. 30, 371-413.

Beckage, N.E., 1993. Games parasites play: the dynamic roles of proteins and peptides in the relationship between parasite and host. In: Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A. (Eds.), Parasites and Pathogens of Insects, vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Beckage, N.E., Hongskula, M., Vickerman, D., Tan, F., 2003. Development of the solitary braconid endoparasitoid *Cotesia marginiventris* in the sphingid host, *Manduca sexta*. J. Inverteb. Pathol. 83, 253-256.

Beckage, N.E., Metcalf, J.S., Nesbit, D.J., Schleifer, K.W., Zetlan, S.R., DeBuron, I., 1990. Host hemolymph monophenoloxidase activation in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence of inhibition by the wasp polidnavirus. Insect Biochem. 20, 285-294.

Beckage, N.E., Riddiford, L.M., 1983. Growth and development of the endoparasitic wasp *Apanteles congregatus*: dependence on host nutritional status and parasite load. Physiolog. Entomol. 8, 231-241.

Beckage, N.E., Tan, F.F., Schleifer, K.W., Lane, R.D, Cherubin, L.L., 1994. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polidnavirus on host larvae of the tobacco horn worm, *Manduca sexta*. Arch. Insect Bioch. Physiol. 26, 165-195.

Beckage, N.E., Templeton, T.J., Nielsen, B.D., Cook, D.I, Stoltz, D.B., 1987. Parasitism-induced hemolymph polypeptidesin *Manduca sexta* (L.) larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata* (Say). Insect Bioch. 17,439-455.

Bentz, J., Barbosa, P., 1990. Effects of dietary nicotine (0.1%) and parasitism by *Cotesia congregata* on the growth and food consumption and utilization of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Entomologia Experimentalis et Applicata 57, 1-8.

Bogaert, T., Brown, N., Wilcox, M., 1987. The Drosophila PS2 antigen is an invertebrate integrin that, like the fibronectin receptor, becomes localized to muscle attachments. Cell 51, 929-940.

Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity.Curr. Opin. Immunol. 12, 64-76.

Botelho, P.S., Macedo, N., 2002. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Correˆa- Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. (Eds.), Controle Biolo´gico no Brasil: Parasito´ides e Predadores. Editora Manole, Sa˜o Paulo, SP, Brasil, pp.409-425.

Bravo, A., Soberón, M., Gill, S.S., 2005. *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science, vol. 6. Elsevier, Oxford, UK, pp. 175-205.

Brehelin, M., Zachary, D., 1986. Insect hemocytes: a new classification to rule out controversy: In Immunity in Invertebretes (M. brehelin, ed.) Speinger verlag. Berlin-Heidelberg.

Brooks, W., 1993. Host-parasitoid-pathogen interactions. In: Thompson, S., Beckage, N. (Eds.), Parasites and Pathogens of Insects. Academic Press, New York, pp. 231-272.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.C., Hoffmann, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. Dev. Comp. Immunol. 23, 329-344.

Buron, I.D., Beckage, N.E., 1992. Characterization of a polidnavirus (PDV) and virus-like filamentous particle (VLFP) in the braconid wasp *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). J. Inverteb. Pathol. 59, 315-327.

Cai, J., Ye, G.Y, Hu, C., 2004. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidóptera: Pieridae) by a Pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. J. Insect Physiol. 50, 315-322.

Castro, B.A., Riley, T.J., Leonard, B.R., Baldwin, J., 2004. Borers galore: emerging pests in Luisiana corn, grain sorghum and rice. LA Agric. 47, 4-6.

Choi, J.Y., Roh, J.Y., Kang, J.N., Shim, H.J., Woo, S.D., Jin, B.R., Li, M.S., Je, Y.H., 2005. Genomic segments cloning and analysis of Cotesia plutellae polidnavirus using plasmid
capture system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332, 487-493.

Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., 2002. Immunity-related genes and gene families in nopheles gambiae. Sci. 298, 159-165.

Cloutier, C., Mackauer, M., 1980. The effect of superparasitism by *Aphidius smithi* Hymenoptera: Aphidiidae) on the food budget of the Pea aphid *Acyrthosiphon Pisum* (Homoptera: Aphididae). Can. J. Zool. 58, 241-244.

Cloutier, C., Mackauer, M., 1979. The effect of parasitism by *Aphidius smithi* (Hymenoptera: Aphidiidae) on the food budget of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). Canad. J. Zoology 57, 1605-1611.

Consoli, F.L., Brandt, S.L., Coudron, T.A., Vinson, S.B., 2005. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps-Heliothis virescens*. Comp. Biochem. Physiol. 142B, 181-191.

Cranshaw, W.S., 2008. *Bacillus thuringiensis*. Colorado State University bioagricultural sciences and pest management. (http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05556.html).

Cui, L., Soldevila, A.I, Webb, B.A., 2000. Relationships between polidnavirus gene expression and host range of the parasitoid wasp, *Campoletis sonorensis*. J. Insect Physiol. 46:1397-1407.

Dahlman, D.L., Greene, J.R., 1981. Larval hemolymph protein patterns in tobacco hornworms parasitized by *Apanteles congregatus*. Annal. Entomological Society of America 74, 130-133.

Dahlman, D.L., Rana, R.L., Schepers, E.J., Schepers, T., DiLuna, F.A., Webb, B.A., 2003. A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis. Insect Molecular Biology 12, 527-534.

Dahlman, D.L., Vinson, S.B., 1993. Teratocytes: developmental and biochemical characteristics. In: Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici,B.A. (Eds.), Parasites and Pathogens of Insects. Parasites, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 145-166.

Davies D.H, Vinson, S.B., 1988. Interference with function of plasmatocitos of *Heliothis virescens in vivo* by calyx fluid of the parasitoid *Campoletis sonorensis.* Cell Tissue Research, 251, 467-475.

Davies, D.H., Strand, M.R., Vinson, S.B., 1987. Changes in differential haemocyte count and in vitro behavior of plasmatocitos from host Heliothis virescens caused by Campoletis sonorensis polidnavirus. Journal of Insect Physiology 33, 143-153.

Davies, D.H., Vinson, S.B., 1986. Passive evasion by eggs of Braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation in vitro by hemocytes of host *Heliothis virescens.* Possible role for fibrous layer in immunity.

Doucet, D., Cusson, M., 1996. Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. Comp. Biochem. Physiol. 114A, 311-317.

Dunphy, G.B., Downer, R.G.H., 1994. Octopamine, a modulator of the haemocytic nodulation response of non-inmune *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 40, 267-272.

Dushay, M.S, Beckage, N.E., 1993. Dose-dependent separation of *Cotesia congregata*-associated polidnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. J. Insect Physiol. 39, 1029-1040.

Edson, K.M., Vinson, S.B., Stoltz, D.B, Summers, M.D., 1981. Virus in a parasitoid wasp: suppression of celular inmune response in the host. Sci. 211, 582-583.

Elrod-Erickson, M., Mishra, S., Schneider, D., 2000. Interactions between the celular and humoral inmune responses in *Drosophila*. Curr. Biol. 10, 781-784.

Fearon, D.T., 1997. Seeking wisdom in innate immunity. Nature 388, 323-324.

Fleming, J.G., Summers, M.D., 1991. Polidnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9770- 9774.

Gardiner, E.M.M., Strand, M.R., 1999. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth, *Pseudoplusia includens*. J. Insect Physiol. 45, 113-126.

Gauld, I.D., 1988. Evolutionary patterns of host utilization by ichneumonoid parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae and Braconidae). Biological Journal of the Linnean Society 35, 351-377.

Ghosh, D., Chakraborty, P., 2002. Involvement of protein tyrosine kinases and phosphatases in uptake and intracelular replication of virulent and avirulent Leishmania donovani promastigotes in mouse macrophage cells. Bioscience Reports 22, 395-406.

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E., 1999. Integrin signaling. Science 285, 1028-1033.

Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37, 615-636.

Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42, 611-643.

Glare, T. R., O´Callaghan, M., 2000. "*Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety". John Wiley and Sons Ltd, Chichester, U.K.

Glatz, R.V., Asgari, S., Schmidt, O., 2004. Evolution of polidnaviruses as insect inmune suppressors. Trends in Microbiology, 12, 545-554.

Godfray, H.C.J., 1994. Parasitoids: behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton University press, Princeton, NJ.

Guillot, F.S., Vinson S.B., 1972. The role of the calyx and poison gland of *Cardiochiles nigricceps* in the host-parasitoid relationship. J. insect physiol. 18, 1315-1321.

Guzo, D., Stoltz, D.B., 1987. Observations on celular immunity and parasitism in the tussock moth. J. Insect Physiol. 33, 19-31.

Harwood, S.H, Beckage, N.E., 1994. Purification and characterization of an early-expressed polidnavirus-induced protein from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata.* Insect Biochem. Molecular Biol. 24, 685-698.

Harwood, S.H., Grosovsky, A.J., Cowles, E.A., Davis, J.W., Beckage, N.E., 1994. An abundantly expressed hemolymph glycoprotein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polidnavirus gene product. Virology, 205, 38 l-392.

Harwood, S.H., McElfresh, J.S., Nguyen, A., Conlan, C.A., Beckage, N.E., 1998. Production of early-expressed parasitism-specific proteins in alternate sphingid hosts of the braconid wasp *Cotesia congregata*. J. Inverteb. Pathol. 71, 271-279.

Haunerland, N.H., Shirk, P.D., 1995. Regional and functional differentiation in the insect fat body. Ann. Rev. entomol. 40, 121-145.

Hayakawa, Y., 1994. Celular immunosuppressive protein in the plasma of parasitized insect larvae. J. Biol. Chem. 269, 14536-14540.

Hegazia, E.M., Abol Ellab, S.M., Bazzazc, A., Khamisd, O., Abo Abd-Allah, L.M.Z., 2005. The calyx fluid of *Microplitis rufiventris* parasitoid and growth of its host *Spodoptera littoralis* larvae J. Insect Physiol. 51, 777-787.

Hilgarth, R.S., 1997. Effects of *Campoletis sonorensis* calyx fluid on tyrosine, lysozyme and protein in the host *Heliothis virescens*. M.S. thesis, Kensas State University.

Hoffmann, J.A., Reichert, J.M, Hetru, C., 1996. Innate immunity in higher insects. Curr. Op. Immunol. 8, 8-13.

Hu, J., Xiong, X., Wen, Z, Fu, J., 2003. Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guene´e (Lepidóptera: Pyralidae). J. Insect Physiol. 49, 367-375.

Huang, F., Leonard, B.R., Baldwin, J., 2006. Corn borers and transgenic *Bt* corn technology. Luisiana Agriculture. Vol. 49 No. 4, pp. 25-26.

Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G., 1980. Insect immunity: purification and properties of three inducible antibacterial proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur. J. Biochem. 106, 7 -16.

Huxham, I.M., Lackie, A.M., 1988. Behaviour in vitro of separated haemocytes from the locust, *Schistocerca gregaria*. Cell Tissue Res. 251, 677-684.

Ibrahim, A.M.A., Kim, Y., 2006. Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth *Plutella xylostella*. J. Insect Physiol. 52, 943-950.

Imler, J.L., Hoffmann, J.A., 2000. Signaling mechanism in the antimicrobial host defense of Drosophila. Curr. Opin. Microbiol. 3, 16-22.

Jalali, S.K., Mohan, K.S., Singh, S.P., Manjunath, T.M., Lalitha, Y., 2004. Baseline-usceptibility of the old-world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidóptera: Noctuidae) populations from India to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal protein. Crop Prot. 23, 53-59.

Jenkins, J.L., Dean, D.H., 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. In: Setlow, K. (Ed.), Genetic Engineering: Principles and Methods, vol. 22. Plenum, New York, pp. 33-54.

Jones, D., Coudron, T., 1993. Venoms of parasitic hymenoptera as investigatory tools. In: Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A., (Eds.), Parasites and Pathogens of Insects, Vol. 1. Parasites. Academic Press, New York, pp. 227-244.

Jung, S., Kwoen, M., Choi, J.Y., Je, Y.H., Kim, Y., 2006. Parasitism of *Cotesia* spp. Enhances Susceptibility of *Plutella xylostella* to Other Pathogens. J. Asia-Pacific Entomol. 9(3), 255-263.

Kadono-Okuda, K., Weyda, F., Okuda, T., 1998. Dinocampus (= Perilitus) coccinellae teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. J. Insect Physiol. 11, 1073-1080.

Kaeslin, M., Pfister-Wilhelm, R., Molina, D., Lanzrein, B., 2005. Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polidnavirus and physiological implications. J. Insect Physiol. 51, 975-988.

Kanost, M.R., Jiang, H., Yu, X.Q., 2004. Innate inmune responses of a Lepidópteran insect, *Manduca sexta.* Immunological Reviews, 198, 97-105.

Kim, Y., Basio, N.A., Ibrahim, A.M.A., Bae, S., 2006. Gene structure of *Cotesia plutellae*
bracovirus (CpBV)-IκB and its expression pattern in diamondback moth, *Plutella xylostella*, parasitized by *Cotesia plutellae*. Kor. J. Appl. Entomol. 45, 1-10.

Kim, K., Park, Y., Kim, Y., Lee, Y., 2001. Study on the inoculation augmentation of Paecilomyces japonicus to the silkworm, Bombyx mori, using dexamethasone. Kor. J. Appl. Entomol. 40, 51-58.

Kitano, H., 1986. The role of *Apanteles glomeratus* venom in defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*. J. Insect Physiol. 32, 369-375.

Krell, P.J., Summers, M.D., Vinson, S.B., 1982. Virus with a multipartite superhelical DNA genome from the ichneumonid parasitoid, *Campoletis sonorensis*. J. Virol. 43, 859-870.

Kumar, P., Ballal, C.R., 1992. The effects of parasitism by Hyposoter didymator (Hymenoptera: Ichneumonidae) on food consumption and utilization by *Spodoptera littura* (Lepidóptera: Noctuidae). Entomophaga 37, 197-203.

Lackie, A.M., 1988. Haemocyte behavior. Advances in Insect Physiol. 21, 85-177.

Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister, M., 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. Developmental Biology, 230, 243-257.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Bioch. Mol. Biol. 32, 1295-1309.

Lavine, M.D, Beckage, N.E., 1995. Polidnaviruses: potent mediators of host insect inmune dysfunction. Parasitol. Today 11, 368-378.

Lavine, M.D., Beckage, N.E., 1996. Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata.* J. Insect Physiol. 42, 41-51.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Molecular Biol. 32, 1295-1309.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2003. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple a and b integrin subunits. Insect Molecular Biol. 12, 441-452.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. J. Insect Physiol. 47, 965-974.

Lee, S., Kim, Y., 2004. Juvenile hormone esterase of diamondback moth, *Plutella xylostella*, and parasitism of *Cotesia plutellae*. J. Asia-Pacific Entomol. 7, 283-287.

Legaspi, J.C., Legaspi, B.C., Jr., King, E.G, Saldaña, R.R., 1997. Mexican rice borer, *Eoreuma loftini* (Lepidóptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas: its history and control. Su *Bt*rop. Plant Sci. 49, 53-64.

Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., Kafatos, F.C., 2001.

Li, S., Falabella, P., Kuriachan, I., Vinson, S.B., Borst, D.W., Malva, C., Pennacchio, F., 2003. Juvenile hormone synthesis, metabolism, resulting hemolymph titre in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*. J. Insect Physiol. 49, 1021-1030.

Li, X., Webb, B.A., 1994. Apparent functional role for a cysteine-rich polidnavirus protein in suppression of the insect celular inmune response. J. Virol. 68, 7482-7489.

Ling, E., Yu, X.Q., 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melaniztion in *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 1356-1366.

Liu, C.T., Hou, R.F., Chen, C.C., 1998. Formation of basement membrane-like structure terminates the celular encapsulation of microfilariae in the haemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. Parasitology, 116, 511-518.

Lovallo, N., McPherson, B.A., Cox-Foster, D.L., 2002. Effects of the polidnavirus of *Cotesia congregata* on the inmune system and development of non-habitual hosts of the parasitoid. J. Insect Physiol. 48, 517-526.

Lowenberger, C., 2001. Innate inmune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Molecular Biol. 31, 219-229.

Luckhart, S., Webb, B.A., 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polidnavirus in host inmune suppression. Devel. Comp. Immunol. 20, 1-21.

Ma, C., Kanost, M.R., 2000. 1-3-glucan-recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. J. Biol. Chem. 275, 7505-7514.

Mackauer, M., Sequira, R., 1993. Patterns of development in insect parasites. In: Beckage, NE, Thompson, SN, Federici, BA, eds. Parasites and pathogens of insects 1, 1-24.

Mahmoud, A.M.A., De Luna-Santillana, E.J., Rodríguez-Pérez, M.A., 2011. Parasitism by the endoparasitoid wasp *Cotesia flavipes* induces celular immunosuppression and enhances the susceptibility of *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringenisis*. Accepted in J. of insect science (in press).

Mandato, C.A., Diehl-Jones, W.L., Moore, S.J., Downer, R.G.H., 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in Galleria mellonella. J. Insect Physiol. 43, 1-8.

Mavrouli, M.D., Tsakas, S.,Theodorou, G.L., Lampropoulou, M., Marmaras, V.J., 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. Biochim. Biophys. Acta 1744: 145-156.

Meister, M., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2000. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. In: Du Pasquier, L., Litman, G.W. (Eds.), Origin and Evolution of the

Vertebrate Inmune System. Current Topics in Microbiology, vol. 248. Springer-Verlag, Berlin, pp.17-36.

Michel, K., Budd, A., Pinto, S., Gibson, T., Kafatos, F., 2005. *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghie*. European Molecular Biology Organization Reports, 6, 891-897.

Michel, K., Suwanchaichinda, C., Morlais, I., Lambrechts, L., Cohuet, A., Awono-Ambene, P.H., Simard, F., Fontenille, D., Kanost, M.R, Kafatos, F.C., 2006. Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 16858-16863.

Miller, J.S., Nguyen, T., Stanley-Samuelson, D.W., 1994. Eicosanoids mediate insect nodulation esponses to bacterial infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12418-12422.

Miller, J.S., Stanley, D.W., 2001. Eicosanoids mediate microaggregations reactions to bacterial challenge in isolated hemoctye preparations. J. Insect Physiol. 47, 1409-1417.

Morales, J., Chiu, H., Oo, T., Plaza, R., Hoskins, S., Govin, S., 2005. Biogenesis,structure, inmune-suppressive effects of virus-like particles of a *Drosophila* parasitoid, *Leptopilina victoriae.* J. Insect Physiol. 51, 181-195.

Muta, T., Iwanaga, S., 1996. The role of hemolympyh coagulation in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 8, 41-47.

Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M., Kamimura, M., 2003. In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm: cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. J. Insect Physiol. 49, 907-916.

Nakamatsu, Y., Gyotoku, Y., Tanaka, T., 2001. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polidnavirus. J. Insect Physiol. 47, 573-584.

Nakamatsu, Y., Tanaka, T., 2004. Correlation between concentration of hemolymph nutrients and amount of fat body consumed in lightly and heavily parasitized hosts (*Pseudaletia separata*). J. Insect Physiol. 50, 135-141.

Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y., 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. Eur. J. Cell Biol. 68, 450-456.

Ngi-Song, A.J., 1995. Parasitization of selected African stemborers by *Cotesia flavipes* Cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), with emphasis on host selection and host suitability. PhD Thesis. University of Ghana, Legon. p 198.

Ngi-Song, A.J., Overholt, W.A., Ayertey, J.A., 1995. Suitability of African gramineous stemborers for development of *Cotesia flavipes* and C.*sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae). Envir. Entomol. 24(4), 978-984.

Overholt, W.A., Ngi-Song, A.J., Kimani, S.W., Mbapila, J., Lammers, P.M, Kioko, E., 1994a. Ecological considerations of the introduction of *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidóptera: Pyralidae), in Africa. Biocontrol news and information 15(2), 19N-24N.

Overholt, W.A., Ochieng, J.O., Lammers, P, Ogedah, K., 1994b. Rearing and field release methods for *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of tropical gramineous stem borers. Insect Sci. Appl. 15(3), 253-259.

Pech, L.L., Strand, M.R., 1995. Encapsulation of foreign targets by hemocytes of the moth *Pseudoplusia inchdens* (Lepidóptera: Noctuidae) involves an RGD-dependent cell adhesion mechanism. J. Insect Physiol. 41, 481-488.

Pech, L.L., Strand, M.R., 1996. Encapsulation in the insect *Pseudoplusia includes* (Lepidóptera: Noctuidae) requires cooperation between granular cells and plasmatocitos. J. Cell Sci. 109, 2053-2060.

Pech, L.L., Strand, M.R., 1996b. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. J. Cell Sci. 109, 2053–2060.

Pech, L.L., Strand, M.R., 2000. Plasmatocitos from the moth P*eudoplusia includes* induce apoptosis of granular cells. J. Insect Physiol. 46, 1565-1573.

Pennacchio, F., Strand, M.R., 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. Annu. Rev. Entomol. 51, 233-258.

Phares, C.K., 1997. the growth hormone-like factor from plerocercoids of the tapeworm Spirometra mansonoides is a mutltifunctional protein. Parasites and Pathogens: effects on host hormones and behavior (Ed. Beckage N.E). Chapman and Hall, New york. P. 25-57.

Porter, P., Troxclair, N., Schuster, G., Porter, D.O., Cronholm, G., Bynum, E., Patrick, C., Davis, S.G., 2005. Texas corn production: emphasizing pest management and irrigation. Texas Cooperative Extension, The Texas A&M University System, B-6177, p. 71.

Posey, F.R., White, W.H., Reay-Jones, F.P.F., Gravois, K., Salassi, M.E., Leonard, B.R, Reagan, T.E., 2001. Integrated pest management in sugarcane. LA Agric. 44, 16-18.

Price, P., 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton, N J: Princeton University Press.

Pruissjers, A.J., Falabella, P., Eum, J.H., Pennacchio, F., Brown, M.R., Strand, M.R., 2009. Infection by a symbiotic polidnavirus induces wasting and inhibits metamorphosis of the moth *Pseudoplusia includens*. J. Exp. Biol. 212, 2998-3006.

Rahman, M.M., Roberts, H.L.S., Sarjan, M., Asgari, S., Schmidt, O., 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2696-2699.

Rahman, M.M., Roberts, H.L.S., Sarjan, M., Asgari, S., Schmidt, O., 2004a. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the Xour moth *Ephestia kuehniella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2969-2999.

Rahman, M.M., Roberts, H.L.S., Schmidt, O., 2004b. The development of the endoparasitoid *Venturia canescens* in *Bt*-tolerant, inmune induced larvae of the Xour moth *Ephestia kuehniella*. J. Invertebr. Pathol. 87, 129-131.

Ratcliffe, N.A., Gagen, S.J., 1976. Celular defense reactions of insect hemocytes in vivo:nodule formation and development in Galleria mellonella and Pieris brassicaelarvae. J. Invertebr. Pathol. 28, 373-82.

Ratcliffe, N.A., Gagen, S.J., 1977. Studies on the in vivo celular reactions of insects: anultrastructural analysis of nodule formation in Galleria mellonella. Tissue Cell 9, 73-85.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P., 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int. J. Cytol. 97, 186-350.

Reagan, T.E., 2001. Integrated pest management in sugarcane. LA Agric.44, 16-18.

Reagan, T.E., 2006. Sugarcane borer (Lepidóptera:Crambidae) management threshold assessment on four sugarcane cultivars. J. Econ. Entomol. 99, 966-971.

Reay-Jones, F.P.F., Showler, A.T., Reagan, T.E., Legendre, B.E., Way, M.O, Moser, E.B., 2005. Integrated tactics for managing the Mexican rice borer (Lepidóptera: Crambidae) in sugarcane. Env. Entomol. 34, 1558-1565.

Reay-Jones, F.P.F., Way, M.O., Setamou, M., Legendre, B.L., Reagan, T.E., 2003. Resistance to the Mexican rice borer (Lepidóptera: Crambidae) among Luisiana and Texas sugarcane cultivars. J. Econ. Entomol. 96, 1929-1934.

Reay-Jones, F.P.F., Wilson, L.T., Reagan, T.E., Legendre, B.E, Way, M.O., 2008. Predicting economic losses from the continued spread of the Mexican rice borer (Lepidóptera: Crambidae). J. Econ. Entomol. 101, 237-250.

Reay-Jones, F.P.F., Wilson, L.T., Showler, A.T., Reagan, T.E., Way, M.O., 2007a. Role of oviposition preference in an invasive crambid impacting two graminaceous host crops. Environ. Entomol. 36, 938-951.

Reay-Jones, F.P.F., Wilson, L.T., Way, M.O., Carlton, C.E, Reagan, T.E., 2007b. Movement of the Mexican rice borer (Lepidóptera: Crambidae) through the Texas rice belt. J. Econ. Entomol. 100, 54-60.

Richards, E.H., Parkinson, N.M., 2000. Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability, inmune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. J. Invertebr. Pathol. 76, 33-42.

Rodríguez-Pérez, M.A., Dumpit, R.F., Lenz, J.M., Powell, E.N., Tam, S.Y., Beckage, N., 2005. Host Refractoriness of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*, to the Braconid Endoparasitoid *Cotesia flavipes*. Arch. Insect Bioch. Physiol. 60, 159-171.

Ross, D.R., Dunn, P.E., 1989. Effect of parasitism by Cotesia congregate on the susceptibility of *Manduca sexta* to bacterial infection. Develop. Comp. Immunol. 13, 205-216.

Rotheram, S.M., 1973. The surface of the egg of a parasitic insect. I. The surface of the egg and Wrst instar larva of *Nemeritis*. Proc. R. Soc. Lond. B. 183, 179-184.

Rowe, G.E, Margaritis, A., 2004. Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from Bacillus thuringiensis HD-1 kurstaki. Biotechnol. Bioeng., 86(4), 377-88.

Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A., 1981. Insects. In: N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley (eds.), Invertebrate Blood Cells. Academic Press, New York. 471-490.

Ruoslahti, E., 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 697-715.

Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D., 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Sci. 23, 491-497.

Salvador, G., Coˆnsoli, L.F., 2008. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidóptera: Crambidae) parasitized by Cotesia flavipes (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). Biolog. Cont. 45, 103-110

Sato, Y., Tanaka, T., 1984. Effect of the number of parasitoid (*Apanteles kariyai*) eggs (Hymenoptera: Braconidae) on the growth of host (*Leucania separata*) (Lepidóptera: Noctuidae). Entomophaga 29, 21-28.

Schmidt, O., 2007. Insect inmune recognition and suppression. In: Beckage, N.E.(Ed.), Insect Immunology. Elsevier Academic Press, San Diego. 271-294.

Schmidt, O., Asgari, S., Beck, M., Theopold, U., 2000. Host defence manipulation by parasitoid wasps and the problem of assessing host specificity. pp. 29-37, in Hymenoptera: evolution, biodiversity and biological control, Eds. A.D.Austin and M. Dowton. 467pp. CSIRO publishing, Collingwood, Victoria, Australia.

Schmidt, O., Glatz, R.V., Asgari, S., Roberts, H.S.L., 2005. Are insect inmune suppressors driving celular uptake reactions? Arch. Insect Biochem. Physiol. 60, 153-158.

Schmidt, O., Theopold, M., Strand, M.R., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. BioEssays 23, 344-351.

Shelby, K.S, Webb, B.A., 1999. Polidnavirus-mediated suppression of insect immunity. J. Insect Physiol. 45, 507-514.

Shelby, K.S., Ade yeye, O.A., Okot-Kotber, B.M, Webb, B.A., 2000. Parasitism-linked block of host plasma melanization. J. Invertebr.Pathol.75, 218-225.

Shelby, K.S., Webb, B.A., 1997. Polidnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. Insect Biochem. Molecular Biol. 27, 263-270.

Showler, A.T., Castro, B.A., 2010. Influence of drought stress on Mexican rice borer (Lepidóptera: Crambidae) oviposition preference in sugarcane. Crop Protect. 29, 415-421.

Slansky, F., 1978. Utilization of energy and nitrogen by larvae of the imported cabbage worm, *Pieris rapae*, as affected by parasitism by *Apanteles glomeratus*. Environ. Entomol. 7, 179-185.

Smith C. L., Smilowitz, Z., 1976. Growth and development of Pieris rapae larvae parasitized by Apanteles glomeratus. Entomol. Exp. Appl. 19, 189-195.

Smith, J.W., Jr., Wiedenmann, R.N., Overholt, W.A., 1993. Parasites of Lepidópteran Stemborers of Tropical Gramineous Plants. ICIPE Science Press, Nairobi, Kenya.

So¨derha¨ll, K., Cerenius, L., 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10, 23-28.

SPSS Inc. 2001. SPSS 11.0 Syntax reference guide: Volume 1.

Stanley-Samuelson, D.W., 1994. Prostaglandins and related eicosanoids in insects. Adv. Insect Physiol. 24, 115-212.

Stanley-Samuelson, D.W., Jensen, E., Nickerson, K.W., Tiebel, K., Ogg, C.L., Howard, R.W., 1991. Insect inmune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids.

Stettler, P., Trenczek, T., Wyler, T., Pfister-Wilhelm, R., Lanzrein, B., 1998. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. J. Insect Physiol. 44, 817-831.

Stoltz, D. B., 1993. The polidnavirus life cycle. In *Parasites and Pathogens of Insects* (Eds Beckage N. E., Thompson S. N, Federici B. A.). Academic Press, San Diego. pp. 167-I 87

Stoltz, D.B., Cook, D., 1983. Inhibition of host phenoloxidase activity by parasitoid Hymenoptera. Experientia. 39, 1022-1024.

Stoltz, D.B., Guzo, D., 1986. Apparent haemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma disstria* larvae. J. insect Physiol. 32, 377-388.

Stoltz, D.B., Guzo, D., Belland, E.R., Lucarotti, C.J., MacKinnon, E.A., 1988. Venom promotes uncoating in *vitro* and persistence *in vivo* of DNA from a braconid polidnavirus. J. Gener. Virol. 69, 903-907.

Strand, M.R., 1989. Development of the polyembryonic parasitoid *Copidosoma floridanum* in *Trichoplusia ni*. Entomol. Exp. Appl. 50, 37-46.

Strand, M.R., Beck, M.H., Lavine, M.D., Clark, K.D., 2006. *Microplitis demolitor* bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 61, 134-145.

Strand, M.R., Pech, L.L., 1995a. *Microplitis demolitor* polidnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*. J. Gen. Virol. 76, 283-291.

Strand, M.R., Pech, L.L., 1995b. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Annu. Rev. Entomol. 40, 31-56.

Strand, M.R., Noda, T., 1991. Alterations in the haemocytes of *Pseudoplusia in&dens* after parasitism by *Microplitis demoliror*. J. Insect Physiol. 37, 839-850.

Strand, M.R., 1986. The physiological interactions of parasitoids with their hosts and their influence on reproductive strategies. In: Waage, J., Greathead, D. (Eds.), Insect Parasitoids. Academic Press, New York, USA, pp. 97-136.

Strand, M.R., McKenzie, D.I., Grassl, V., Dover, B.A., Aiken, J.M., 1992. Persistence and expression of *Microplitis demolitor* polidnavirus in *Pseudoplusia includens*. J. Gen. Virol. 73, 1627-1635.

Stuart, L.M., Ezekowitz, R.A.B., 2005. Phagocytosis: elegant complexity. Immunity, 22, 539-550.

Sugumaran, M., 1998. Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. Adv. Insect Physiol. 27, 227-334.

Sugumaran, M., Kanost, M. R., 1993. Regulation of insect hemolymph phenoloxidases in *Parasites and Pathogens of Insects*, vol. 1, N. E. Beckage, S. N. Thompson, B. A. Federici, eds.Academic Press, New York. pp. 317-342.

Sun, S.C., Faye, I., 1995. Transcription of inmune genes in the giant silkmoth, Hyalophora Cecropia, is augmented by H2O2 and diminished by thiol reagents. Eur. J. Biochem. 231, 93-98.

Suzuki, M.T., Lereclus, D., Arantes, O.M., 2004. Fate of *Bacillus thuringiensis* strains in different insect larvae. Canad. J. Microbiol. 50, 973-975.

Suzuki, M, Tanaka, T., 2006. Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis. J. Insect Physiol. 52, 602-613.

Tabashnik, B.E., 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3343-3346.

Tanaka, K., Matsumoto, H., Hayakawa, I., 2002. Detailed characterization of polidnavirus immunoevasive proteins in an endoparasitoid wasp. Europ. J. Biochem. 269, 2557-2566.

Tanaka, T., 1987. Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanreles kariyai* Watanabe, on the celular defence reaction of the host, *Pseudaleria separara* Walker. J. Insect Physiol. 33, 4 13420.

Tanaka, T., 1986. Effects of the calyx and venom fluids of Apanteles kariyai Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) on the fat body and hemolymph protein contents of its host Pseudaletia separate (Walker) (Lepidóptera: Noctuidae). Applied Entomol. Zool. 21, 220-227.

Tanaka, T., Yagi, S., Nakamatsu, Y., 1992. Regulation of parasitoid sex allocation and host growth by *Cotesia* (*Apanteles*) *kariyai* (Hymenoptera: Braconidae). Annals of the Entomological Society of America 85, 310-316.

Teramoto, T., Tanaka, T., 2004. Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*. J. Insect. Physiol. 50, 1103-1111.

Terwilliger, N.B., 1999. Hemolymph proteins and molting in crustaceans and insects. Am. Zool. 39, 589-599.

Theopold, U., Li, D., Kinuthia, W., Schmidt, O., 2000. Protection by inmune disguise: a new lesson from a parasitoid wasp. In: Austin, A.D., Dowton, M. (Eds.), Hymenoptera - Evolution, Biodiversity and Biological Control. CSIRO, Collingwood, Australia, pp. 23-37.

Thompson S.N., Lee, R.W.K., Beckage, N.E. 1990. Metabolism of parasitized larvae examined by nuclear magnetic resonance. Archs. Insect Biochem. Physiol. 13, 127-143.

Thompson, S.N., 1982a. Effects of parasitization by the insect parasite *Hyposoter exguiae* on the growth, development and physiology of its host *Trichoplusia ni*. Parasitology 84, 491-510.

Thompson, S.N., 1983. Biochemical and physiological effects of metazoan endoparasites on their host species. Comparative Biochem. Physiol. 74B, 183-211.

Thompson, S.N., 1986. Effect of the insect parasite *Hyposoter exiguae* (Viereck) on the carbohydrate metabolism of its host, *Trichoplusia ni* (Hu¨bner). J. Insect Physiol. 32, 287-293.

Thompson, S.N., 1993. Redirection of host metabolism and effects on parasite nutrition. In: Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A. (Eds.), Parasites and Pathogens of Insects, vol. 1. Academic Press, SanDiego, CA, USA, pp. 125-144.

Turnbull, M., Webb, B., 2002. Perspectives on polidnavirus origins and evolution. Adv. Virus Res. 58, 203-254.

Vass, E., Nappi, A.J., 2001. Fruit fly immunity. BioEssays 51, 529-535.

Vinson, S.B., 1974. The role of the foreign surface and female parasitoid secretions on the inmune response of an insect. Parasitology, 68, 27-33.

Vinson, S.B., 1971. Defence reaction and hemocytic changes in *Heliothis virescens* in response to its habitual parasitoid *Cardiochiles nigriceps*. J. Insect Physiol. 18, 94-100.

Vinson, S.B., 1990. Physiological interactions between the host genus Heliothis and its guild of parasitoids. Archs. Insect Biochem. Physiol. 13, 63-81.

Vinson, S.B., Barbosa, P., 1987. Interrelationship of nutritional ecology of parasitoids. In: Slansky, F., Jr., Rodriguez, J.G. (Eds.), Nutritional Ecology of Insects Mites and Spiders. Wiley & Sons, New York, USA, pp. 673-695.

Vinson, S.B., Pennacchio, F., Coˆnsoli, F.L., 2001. The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective. In:Edwards, J.P., Weaver, R.J. (Eds.), Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 187-206.

Waldbauer, G.P., 1964. The comsumption, digestion and utilization of solanaceous and non-solanaceous plants by larvae of the tobacco hornworm, Protoparce sexta (Johan.) (Lepidóptera: Sphingidae). Entomol. Exp. Appl. 7, 253-269.

Waldbauer, G.P., 1968. The consumption and utilization of food by insects. Adv. Insect Physiol. 5, 229-288.

Walzer, T., Galibert, L., De Smedt, T., 2005. Poxvirus semaphoring A39R inhibits phagocytosis by dendritic cells and neutrophils. Euro. J. Immunol. 35, 391-398.

Webb, B.A., Luckhart, S., 1994. Evidence from an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. Archs. Insect Biochem. Physiol. 26, pp. 147-163.

Webb, B.A., Beckage, N.E., Hayakawa, Y., Krell, P.J., Lanzrein, B., Strand, M.R., Stoltz, D.B., Summers, M.D., 2000. Polydnaviridae, in: Regenmortel, M.H.V. *et al.* (Eds.) Virus Taxonomy. Academic Press, San Diego, pp. 253-259.

Webb, B.A., Strand, M.R., 2005. The biology and genomes of polidnaviruses. In: Gilbert, LI, Iatrou, K, Gill, SS (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 6, Elsevier, New York, pp. 323-360.

Webb, B.A., Strand, M.R., Dickey, S.E., Beck, M.H., Hilgarth, R.S., Barney, W.E., Kadash, K., Kroemer, J.A., Lindstrom, K.G., Rattanadechakul, W., Shelby, K.S., Thoetkiattikul, H., Turnbull, M.W., Witherell, R.A., 2006. Polidnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. Virololgy 347, 160-174.

Webb, B.A., Luckhart, S., 1996. Factors mediating short- and long-term inmune suppression in a parasitized insect. J. Insect Physiol. 42, 33-40.

Webb, B.A., Summers, M.D., 1990. Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp Campoletis sonorensis share epitopes and related sequences.The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87, 4961-4965.

Webb, B.A., Beckage, N.E., Hayakawa, Y., Krell, P.J., Lanzrein, B., Stoltz, D.B., Strand, M.R., Summers, M.D., 2000. Polydnaviridae. In: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner, Editors, *Virus Taxonomy*, Academic Press, New York, pp. 253-260.

Weisner, A., Wittwer, D., Gotz, P., 1996. A small phagocytosis stimulating factor is released by and act on phagocytosing Galleria melonella hemocytes in vitro. J. Insect Physiol. 42, 829-835

Wertheim, B., Kraaijeveld, A.R., Schuster, E., Blanc, E., Hopkins, M., Pletcher, S.D., Strand, M.R., Godfray, H.C.J, Partridge, L., 2005. Genome wide expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. Genome Biology, 6, R94, 1-20.

Wyler, T., Lanzrein, B., 2003. Ovary development and polidnavirus morphogenesis in the parasitic wasp *Chelonus inanitus*. II. Ultrastructural analysis of calyx cell development, virion formation and release. J. General Virol. 84, pp. 1151-1163.

Yu, X.Q., Gan, H., Kanost, M.R., 1999. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, , stimulates activation of plasma prophenoloxidase. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 585-97.

Yu, X.Q., Kanost, M.R., 2000. Immulectin-2, a lipopolysaccharide specific lectin from an insect, , is induced in response to Gram-negative bacteria. J. Biol. Chem. 275, 37373-81.

Yu, X.Q., Prakash, O., Kanost, M.R., 2001. Structure of a paralytic peptide from an insect, . Med. Chem. Res. 10, 493-501.

Yu, X.Q., Tracy, M.E., Ling, E., Scholz, F.R., Trenczek, T., 2005. A novel C-type immulectin-3 from is translocated from the hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 285-295.

Zhang, D., Dahlman, D.L., Gelman, D.B., 1992. Juvenile hormone esterase activity and ecdysteroid titer in Heliothis virescens larvae injected with Microplitis croceipes teratocytes. Archs. Insect Biochem. Physiol. 20, 231-242.