



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

Efectos de la infestación de pulgones y de condiciones medioambientales sobre la liberación de néctar extrafloral de *Vicia faba L.*

MEMORIA DE TÍTULO

Carolina Rojas Torres

TALCA 2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

Aprobación:



**Profesor Guía: Ing. Agr. Dr. Blas Lavandero
Profesor del Instituto de Ciencias Biológicas
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Talca - Chile**



**Profesor informante: Lic. Biol. Dr. Eduardo Fuentes
Profesor Escuela de Agronomía
Departamento de Producción Agrícola
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca - Chile**

Fecha de presentación de memoria: 08 junio de 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres por mostrarme siempre su amor real e incondicional el cual me ha permitido transitar en la vida universitaria haciendo lo que deseo entregándome su apoyo independiente de mis decisiones. A mis hermanos, a Lena, a Samuel y a su hijo, por estar ahí siempre. A las mujeres hermosas que tuve la dicha de conocer durante este proceso, que me inspiran y que admiro profundamente.

Agradecer también al profesor Blas Lavandero y al equipo del Laboratorio de Control Biológico de la Universidad de Talca, por acogerme y enseñarme, hoy reconozco la importante labor que generan desde la Investigación para una agricultura más consiente y sostenible. Así también agradecer al profesor Eduardo Fuentes por su apoyo y a Louise por su dedicación, por su paciencia y sobre todo por su ejemplo, le deseo todo el éxito del mundo.

ABSTRACT

Agricultural intensification based on single-crop farming causes a severe loss of diversity at the farm scale, including nectariferous resources, needed for the survival and establishment of pest natural enemies of crops. Intercropping systems are an alternative to monoculture, considering ecologic principles such as conservation biological control, which promotes environment complexity using associated crops and beneficial intercrops (e.g.: legumes). In this study we used *Vicia faba L.*, a species that features extra floral nectaries with high potential to be used in association with non nectariferous crops like wheat and oat for the regulation of aphid pests by natural enemies. Extra floral nectar can play an important role on pest regulation by attracting natural enemies and an early resource for sustenance when these arrive to a crop. The objective of the current study was to characterize extra floral nectar release under controlled abiotic conditions (breeding chambers), under two different temperatures, "high" (20°C) and "low" (10°C) temperature, and two different light intensities, "high" (2300 lx) and "low" (1000 lx). We also evaluated the nectar induction on plants subjected to an infestation of the aphid *Acyrtosiphon pisum* and the presence of its parasitoid *Aphidius ervi*, also to mechanical damage to the leaves to simulate a leaf-chewing herbivore. The results show that temperature and luminosity would affect extra floral nectary's pigmentation, developing period length and time needed for the first extra floral nectar (EFN) release. As well, EFN release was not induced by the aphid infestation, as expected, the EFN consumption by parasitoid wasp females would not have a major impact on EFN induction.

RESUMEN

La intensificación de la agricultura en los sistemas de monocultivos ha generado una pérdida importante de diversidad en el paisaje y con ello de los recursos nectaríferos, necesarios para la sobrevivencia y establecimiento de enemigos naturales en los cultivos. El sistema de cultivos intercalados es una alternativa de producción con principios ecológicos que se basa en el control biológico de conservación, el cual incentiva a complejizar el paisaje utilizando cultivos asociados y entre hileras benéficas como lo son las leguminosas. En este estudio se utilizó *Vicia faba*, especie que provee néctar extra floral de manera temprana y tiene un alto potencial para ser utilizada en la asociación de cultivos no nectaríferos como el trigo y la avena para la regulación de plagas de pulgones con enemigos naturales. El néctar extra floral juega un rol importante en la mediación de varias de las interacciones en el campo ya que es una fuente de alimento atractivo y ampliamente disponible. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la liberación del néctar bajo condiciones externas controladas de temperatura, “alta” (20°C) y “baja” (10°C); y luminosidad “alta” (2300 lx) y “baja” (1000 lx); y evaluar una posible inducción del néctar en plantas sometidas a la infestación del pulgón *Acyrtosiphon pisum* y la presencia de su parasitoide *Aphidius ervi*, además de cortes mecánicos en las hojas simulando herbívoro masticador. Los resultados demuestran que la temperatura alta y la luminosidad alta afectarían tanto en la pigmentación de los nectarios EF, como en el aumento del tiempo utilizado para su formación y para la primera liberación de NEF. Así también, la liberación del NEF no es inducido por la infestación de áfidos, como se esperaba, ni tampoco su consumo por las hembras de avispas parasitoides las que no tendrían mayor incidencia en la inducción del NEF.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivo general	3
1.3 Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	4
2.1 Composición del Nectar extra floral	4
2.2 Fisiología y morfología de los nectarios extra florales	4
2.3 Función ecológica del NEF	5
2.4 Carácter inducible y comportamiento de liberación del néctar extra floral.....	6
2.5 Interacción del NEF y los áfidos	6
2.6 Interacción de la producción de NEF y los parasitoides	7
2.7 Uso de <i>Vicia faba</i> en cultivos intercalados.....	8
2.8 Influencia de la temperatura e intensidad lumínica en la liberación del NEF	8
3. MATERIALES Y METODOS	10
3.1 Muestreo de plantas de habas.....	10
3.1.1 Ubicación del estudio.....	10
3.1.2 Material vegetal	10
3.1.3 Insectos.....	11
3.2 Cuantificación de la producción de NEF liberado	11
3.3 Impacto de los factores bióticos.....	11
3.4 Impacto de los factores abióticos	13
3.5 Diseño del experimento y análisis estadístico	13
3.5.1 Cuantificación del volumen.....	13
3.5.2 Análisis estadístico.....	14
4. RESULTADOS	15
4.1 Impacto de los factores bióticos.....	15
4.1.1 Influencia de la infestación de áfidos sobre la liberación de NEF	15
4.1.2 Volumen promedio por planta	16
4.1.3 Análisis para los pares (2x2).....	17
4.2 Impacto de los factores abióticos	19

4.2.1	Influencia de la temperatura	19
4.2.2	Tiempo de formación de los nectarios	20
4.2.3	Liberación de NEF.....	20
4.3	Influencia de la intensidad de luz.....	22
4.3.1	Formación y pigmentación de los nectarios.....	22
4.3.2	Fecha de formación de los nectarios	22
4.3.3	Primera liberación de néctar.....	23
4.3.4	Experimento cruzado.....	24
4	DISCUSIÓN	25
5	CONCLUSIÓN	28
6	REFERENCIAS	29
7.	ANEXO	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Imagen de la extracción del néctar. Volumen obtenido denominado I y largo total denominado L.	11
Figura 3.2 Plantas de haba dentro de su “sistema” cerrado con 2 o más pares de nectarios visibles en proceso de medición dentro de su sistema.	12
Figura 3.3. Fórmula obtenida de la regresión, para calcular el volumen de néctar fotografiado a partir de la micropipeta rellena.	13
Figura 4.1 Volumen promedio liberado por planta (μL) bajo los tratamientos control, áfidos y cortes para las cuatro fechas de toma de muestra, las barras de error muestran el error estandar.	15
Figura 4.2. Gráfico de medias y barras de error para la variable volumen promedio por planta para los tratamientos control, cortes y áfidos en el primer, segundo, tercer y cuarto día de medición. Medias descritas por la misma letra en cada fecha no difieren según prueba de Kruskal-Wallis.	16
Figura 4.3. Efecto de la presencia de avispas parasitas sobre el porcentaje de nectarios liberando y no liberando para cuatro fechas de muestreo.	18
Figura 4.4. Respuesta general de las plantas de haba bajo dos tratamientos de temperatura: A , gota de néctar visible a 20°C , las plantas presentan tanto nectarios visibles como néctar liberado regularmente; B , plantas con entrenudos cortos y sin nectarios estipulares.	19
Figura 4.5. Tiempo medio (posterior a la siembra) necesario para que los primeros tres pares de nectarios EF sean visibles bajo dos temperaturas diferentes (solo una observación representada para el tercer par a 10°C). Las barras de error representan la desviación estándar. (1) $p = 1.079\text{e-}11$ Wilcox.test (2) $p = 2.763\text{e-}08$ Wilcox.test.	20
Figura 4.6. Proporción de nectarios liberando y no liberando NEF (1 y 0 respectivamente) a 20°C para todos los niveles de nectarios y para el nivel 1,2 y 3 en los 10 días del experimento.	21
Figura 4.7. Tiempo después de la siembra para la aparición del primer par de nectarios segundo de las plantas de haba bajo dos intensidades de luz. Los puntos negros son las observaciones y las barras de error representan el error estándar ($p < 0,05$).	22
Figura 4.8. Tiempo necesario para la primera liberación de NEF después de su formación (pigmentación) bajo dos intensidades de luz ($p < 0,05$). Los puntos negros son las observaciones y las barras de error representan el error estándar.	24
Figura 7.1. Histograma de frecuencias con distribución normal de la escala volumétrica para la obtención de volúmenes procesados en el programa R Cran Project función lm.	34
Figura 7.2. Gráficos de probabilidad normal de los volúmenes promedio por planta para cada día de medición. $P > 0,05$ para test de Levene.	34
Figura 7.3. Histograma de frecuencias para los volúmenes por planta para cada día de medición, con distribución asimétrica con tendencia a la derecha.	35

Figura 7.4. Porcentaje de plantas liberando néctar EF para cada fecha de medición. 35

Figura 7.5. Efecto de dos intensidades de luz sobre el volumen medio recolectado por nectario para cada día de muestra. Las barras muestran el error estándar. 36

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Efecto de los tratamientos control, áfidos y cortes sobre el volumen promedio por planta y la interacción entre los pares para cada día de medición según el procedimiento de Bonferroni.....**17**

Cuadro 1.2 Efecto del tratamiento de parasitoides y control sobre el porcentaje de nectarios liberando (valor p para test chi cuadrado) y volumen promedio por planta (valor p para test Kruskal-Wallis) para cada día de medición.**18**

Cuadro 1.3 Número medio de días necesarios para que los tres primeros niveles de nectarios extraflorales de las plantas de habas sean visibles bajo dos intensidades de luz.....**23**

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la intensificación de la agricultura en sistemas de monocultivo, se ha reducido fuertemente la diversidad de especies en el campo y con ello de los recursos nectaríferos disponibles, los que son mediadores de muchas interacciones con insectos benéficos, como la polinización y la protección indirecta. Esta simplificación del agroecosistema trae consigo la pérdida de enemigos naturales por falta de las fuentes de presas, hospederos alternativos, sitios de refugio, anidación e hibernación entre otras, convirtiendo a los cultivos susceptibles a la herbivoría y a las plagas resistentes por el uso indiscriminado de insecticidas sintéticos para su control (Gurr et al., 2017).

Las plantas han desarrollado un amplio repertorio de mecanismos de defensa y adaptación contra la herbivoría, para atraer y mantener a otros organismos que pueden defenderlas, uno de ellos son los nectarios extra florales, que a través del néctar producido generan una fuente atractiva de alimento disponible en el campo en épocas donde puede existir poca oferta, atrayendo a insectos mutualistas. Los nectarios extra florales son glándulas que secretan una sustancia nutritiva dulce y acuosa llamada néctar extra floral (NEF), compuesta mayoritariamente de azúcares, pero también de algunos aminoácidos. De esta manera el NEF podría tener más potencial para atraer a los enemigos naturales que el néctar floral ya que al ser producido por órganos no reproductivos puede mantenerse por más tiempo disponible (Choh et al., 2006; Heil, 2008; Jones et al. 2017). Esta fuente de alimentos atrae variados insectos (como hormigas, parasitoides y depredadores generalistas (Marazzi et al. 2013; Engel et al. 2001), que protegen las hojas, brotes y flores del ataque de los herbívoros y esto resulta en una interacción de tipo mutualista (Marazzi et al. 2010; Koptur, 1989). Estudios han demostrado que, en algunas especies de plantas, existe una inducción de la producción de néctar extrafloral después del daño causado en el tejido por los herbívoros, mientras que otros estudios no encontraron tal efecto asociado a este daño específico (Wäckers y Wunderlin 1999). Sin embargo, esta evidencia proviene de insectos masticadores y existen escasas investigaciones del efecto en la producción del néctar extra floral cuantitativa y cualitativa de los insectos picadores-chupadores como los áfidos.

La disponibilidad de néctar en el campo es indispensable para el control biológico ya que se demostró que los enemigos naturales como parasitoides son más efectivos en la postura de huevos mientras más cerca estén de la fuente de néctar (Tylianakis et al. 2004). Es por esto que las plantas que producen néctar extrafloral se están considerando cada vez más como fuente de alimento adicional para los enemigos naturales en los programas de control de plagas amigables

con el ambiente. Esta aplicación en la protección de los cultivos requiere establecer cuál es el papel ecológico del néctar extra floral, ya que pocas veces se ha aplicado este aspecto en el manejo de plagas en el campo.

Un grupo de plantas modelo para estudiar la fisiología del néctar extrafloral es la familia de las Leguminosas (Fabaceae), que también es buena candidata para asociarse con cultivos no nectaríferos (además de ser usadas para el control de malezas y como fuente de nitrógeno para el suelo). El haba (*Vicia faba* L.) es un cultivo frecuentemente asociado a cultivos como cereales (avena y trigo) que produce NEF como fuente de azúcares para los parasitoides de pulgones, una de las plagas ampliamente registradas a nivel mundial que atiende a una amplia variedad de especies cultivadas más importantes desde el punto de vista económico (Bugg et al. 1989; Giordanengo et al. 2010). Sin embargo, no se sabe mucho de la variación en la liberación de NEF por el haba según las condiciones medioambientales. Es así como, aún no se sabe cuándo los nectararios, una vez que se hayan formado, empiezan a liberar NEF bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Estas informaciones iniciarán nuestra comprensión de las modalidades de liberación de NEF durante el crecimiento del cultivo de haba en el campo. Ayudará para determinar a partir de cuándo y durante cuánto tiempo aproximadamente, el cultivo de haba empieza a ser atractivo para enemigos naturales y en particular para los parasitoides, en condiciones de campo.

Por consiguiente, se requiere mucho más conocimiento sobre los efectos de ciertas condiciones ambientales como luz, humedad o temperatura en la producción de NEF para comprender su relevancia ecológica. Esta información es necesaria para que estas interacciones puedan servir como una herramienta confiable en la agricultura. Por lo tanto, a continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1 Hipótesis

H1: La producción de néctar extra floral en *Vicia faba L.* es inducible por la infestación de *Acyrtosiphon pisum*.

H2: La producción de néctar extra floral en *Vicia faba L.* es inducible por el consumo del mismo néctar por su parasitoide *Aphidius ervi*.

H3: La liberación de néctar extra floral se ve favorecida por alta intensidad lumínica y alta temperatura.

1.2 Objetivo general

Determinar si la liberación de NEF en *Vicia faba L.* puede ser aumentada por insectos chupadores como el pulgón *Acyrtosiphon pisum* y por el consumo del mismo néctar por enemigos naturales como su parasitoide *Aphidius ervi*.

Cuantificar el tiempo necesario para la liberación de NEF en *Vicia faba L.* bajo condiciones externas de luz y temperatura.

1.3 Objetivos específicos

Cuantificar el volumen de NEF liberado por las plantas de haba bajo los diferentes tratamientos: con pulgones consumiendo, después del consumo de néctar por parasitoides.

Caracterizar la formación de nectarios y su liberación de NEF mediante el porcentaje de nectarios liberando néctar y número de días después de siembra (DDS) necesarios para su formación/pigmentación y posterior liberación bajo dos condiciones diferentes de temperatura y dos diferentes intensidades luminosas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Composición del Nectar extra floral

El néctar floral contiene altos niveles azúcares simples, mono y disacáridos (sacarosa, fructosa y glucosa). Las cantidades relativas de cada una están determinadas por la invertasa nectararia que hidroliza la sacarosa a glucosa y fructosa (Nicolson et al. 2007). Además, contiene niveles más bajos de aminoácidos, vitaminas, minerales y lípidos (Baker y Baker 1983; Nicolson et al. 2007). Pero también lo componen proteínas relacionadas con la patogénesis y otras enzimas protectoras, lo que hace al NEF una recompensa valiosa. Estos componentes pueden variar en cantidad y concentración entre las especies vegetales y según las condiciones medioambientales (Nicolson et al. 2007).

Variados estudios han demostrado que la composición y la cantidad glucosa y fructosa del néctar pueden tener un efecto importante en el comportamiento de las hormigas, así como también determinan qué insectos son atraídos por estos azúcares (Völkl et al. 1999; Fischer et al. 2001).

2.2 Fisiología y morfología de los nectarios extra florales

Un total de 3941 especies de plantas conocidas presentan nectarios extra florales, distribuidas en 745 géneros y 108 familias de las cuales casi la mitad de todas las especies portadoras de este tipo de nectarios pertenecen a solo tres familias de angiospermas. Entre ellas se destaca la familia de las leguminosas (Fabaceae), con un 30% de las especies portadoras (Weber y Keeler 2013), la cual presenta una gran importancia dentro de la agricultura a nivel mundial.

Los nectarios extra florales son glándulas secretoras de néctar ubicadas en órganos vegetativos fuera de las flores y los cuales se han observado en una gran diversidad de especies. En estas glándulas secretoras existen numerosos tricomas secretores y no secretores agregados en la superficie abaxial de cada estípula. Tanto el xilema como el floema están presentes en la estipulación debajo del nectario extrafloral y la liberación del líquido está limitada por la disponibilidad de sacarosa en el floema. En ambos tipos de nectarios florales y extra florales, grandes células acompañantes rodean al floema. Las células epidérmicas y parenquimatosas de las glándulas y las células acompañantes, desarrollan crecimientos en la pared y, por lo tanto, son células de transferencia (Davis et al. 1988). El néctar secretado siempre se encuentra de manera superficial en el nectario y este proviene directamente de la fotosíntesis realizada por el

nectario o los tejidos contiguos, generalmente sin almacenamiento de almidón. Por lo tanto, el néctar siempre se produce durante el día y en pequeñas cantidades.

Estas estructuras nectaríferas pueden variar en su abundancia y distribución dentro de una planta a lo largo de su desarrollo (Rogers et al., 2003). Algunas plantas pueden presentarlos en los márgenes de las hojas como algunas Rosáceas, sobre la vena media de las hojas como algunas Convolvuláceas o en las estipulas como *Vicia faba* (Fabaceae). También en algunas especies puede observarse un cambio inesperado en la ubicación de la planta durante su crecimiento, lo que atribuyen a posibles cambios en el programa de desarrollo de la hoja durante la etapa de plántulas (Kwok y Laird, 2012). En las investigaciones de Marazzi y colaboradores (2013) muestran que estos nectarios en las plantas del genero *Senna* están presentes desde las primeras etapas de la plántula hasta la planta adulta otorgándole una característica atractiva para su utilización como fuente de néctar de larga durabilidad.

2.3 Función ecológica del NEF

Los nectarios extra florales pueden cumplir diversas funciones ecológicas, generan una interacción insecto-planta a través de la atracción por alimento de mutualistas y en consecuencia protección contra los no mutualistas, este comportamiento es una defensa indirecta de atracción de insectos depredadores. Algunas veces actúan atrayendo artrópodos agresivos principalmente hormigas, que protegen las hojas, brotes y flores de los herbívoros, pero también atrayendo a algunos parasitoides (Marazzi, 2013; Heil, 2011; Bentley 1977; Koptur, 1992; Rosumek et al. 2009; Heil, 2015).

Las plantas presentan también otros tipos de defensa indirecta contra los herbívoros, como por ejemplo la producción de compuestos orgánicos volátiles. Pero Heil (2007) considera que los compuestos orgánicos volátiles atraen principalmente ácaros depredadores y avispas parasitoides, mientras que el NEF atrae principalmente a las hormigas, por lo que estas dos características podrían estar presentes en muchas interacciones entre animales y plantas.

Los nectarios extra florales pueden potenciar fuertemente la supervivencia de ciertas especies de plantas, dando forma a la comunidad vegetal siendo muy importantes para la construcción de comunidades de herbívoros, depredadores y parasitoides (Marazzi, 2013). A pesar de su importancia ecológica, la historia evolutiva de los nectarios extra florales es compleja y poco conocida.

2.4 Carácter inducible y comportamiento de liberación del néctar extra floral

Las plantas productoras de NEF pueden responder ante la presencia de algunas especies o compuestos, después de la herida del ataque de los herbívoros, se esperaría el aumento de la secreción del néctar y también un cambio en su composición, producida por la acción de la enzima invertasa presente en la pared celular que es inducida por el ácido jasmónico (Heil, 2015; Smith et al. 1990). Existen variados estudios de plantas que han respondido a este ataque como lo son las plantas de poroto lima quienes aumentaron la secreción de néctar extra floral después de la exposición a plantas sometidas a compuestos volátiles inducidos por *Tetranychus urticae* en estudios realizados por Choh (2006). Aunque en muchos estudios hubo un aumento en la producción de néctar extrafloral después del daño por los herbívoros, en muchos otros estudios no se han encontrado tal efecto (Koptur 1989; Wäckers et al. 2001). Es probable que esta cualidad esté presente en solo algunas especies vegetales además de que existe evidencia de Inducibilidad de NEF solo de insectos masticadores y hay escasos conocimientos del efecto que producirían los insectos picadores-chupadores.

2.5 Interacción del NEF y los áfidos

Además de las pérdidas por la alimentación de las plantas, los pulgones causan graves pérdidas en los cultivos al vectorizar los virus de estas. Su manejo hasta ahora ha sido principalmente mediante pesticidas sintéticos y es por esto que el control biológico es indispensable en huertos de producción ecológica o en el manejo integrado de plagas.

Se estima que con solo aumentar la liberación de NEF siguiendo el ataque por insectos herbívoros o picadores como pulgones, una planta podría atraer más enemigos naturales.

El néctar producido en el nectario extra floral puede distraer a las hormigas de las fuentes de azúcar de los homópteros (áfidos) y, por lo tanto, puede funcionar como una defensa o interrupción contra el mutualismo de hormigas y homópteros (Stadeler y Dixon, 2005). Como consecuencia, las colonias de áfidos abandonadas sufrirían de una mayor depredación y parasitismo, y el daño a la planta huésped se reduciría o eliminaría.

En un contexto de cultivos la asociación de plantas que tienen muchos ataques por plagas con plantas que liberan NEF y que son sensibles a otros tipos de herbívoros presenta una gran ventaja para la protección de los cultivos, por la atracción y la retención de enemigos naturales al

procurarles todos los recursos tróficos que necesitan directamente dentro o alrededor del cultivo principal (Jamont et al. 2014).

2.6 Interacción de la producción de NEF y los parasitoides

Además de los mecanismos de defensa directa, las plantas pueden reclutar enemigos naturales de herbívoros, como los depredadores y parasitoides como defensa indirecta (Röse et al. 2006). Una de las formas de atracción es a través del alimento y humedad que proporcionan a través de el néctar floral, el néctar extra floral, el polen y la mielecilla, aunque al comienzo de la temporada, cuando el néctar floral líquido aún no está disponible, el néctar extra floral (NEF) ya está presente en las plantas jóvenes y disponible como fuente de alimento para los parasitoides. (Röse et al. 2006). Los parasitoides adultos, consumen preferentemente alimentos ricos en azúcares que encuentran en el entorno y podrían utilizar NEF como única fuente de alimento (Röse et al. 1998).

Estos recursos nutricionales son esenciales para su supervivencia y para su mantenimiento durante la búsqueda de huéspedes en el campo y su disponibilidad puede afectar la longevidad y fecundidad de los parasitoides y su distribución del tiempo utilizado en la exploración de los huéspedes o su eficiencia en el parasitismo, además podrían aumentar su longitud de alcance (Lewis et al. 1998). Algunos parasitoides pueden llegar a vivir varios meses y distribuyen sus huevos durante la mayor parte de este período, por esto necesitan tener alimentos adecuados para mantener esta búsqueda (Takasu y Lewis, 1995).

El néctar floral es fácilmente detectable por su fragancia floral y por ser muy abundante durante la temporada de flores, pero puede que no siempre sea accesible para especies con aparatos bucales cortos como muchas especies de avispas parasitoides (Raguso 2001, 2004; Jervis, 1998). Es por esto que los nectarios extra florales son una fuente potencial de alimento de acceso fácil y directo para estas avispas.

Hay estudios que sugieren que las avispas pueden localizar el NEF desde distancias cortas solo por su olor, y lo encuentran casi tan rápido como la miel, pero mucho más rápido que la sacarosa sin olor (Röse et al. 2006). Si los parasitoides pueden detectar el NEF por su olor, entonces con más NEF disponible la traza de olor será mayor, aunque no estamos seguros que solo necesitan el olor para encontrar al néctar; aunque más néctar sugiere no solo más atracción sino también más retención de los parasitoides. En la mayoría de los estudios analizados el papel del néctar extra floral en atraer y atender a los parasitoides ha sido bien establecido.

2.7 Uso de *Vicia faba* en cultivos intercalados

El haba (*Vicia faba*), una planta anual con nectarios extra florales en la base de las hojas, específicamente en las estipulas, produce NEF a partir de las glándulas estipulares (Köpke et al. 2010). Está regularmente infestada por dos especies de áfidos, *Aphis fabae* y *Acyrtosiphon pisum*. Los nectarios extraflorales y *A. fabae* son comúnmente atendidos por la hormiga, *Lasius niger*, mientras que *A. pisum* generalmente permanece sin atención de hormigas (Engel, 2001), más bien se ha observado que es atendido por las avispas parasitoides (Jones et al. 2017).

Los cultivos intercalados pueden ser asociaciones de diversas características independiente si es un cultivo anual o perenne, es así como los cereales pueden asociarse con leguminosas y los cultivos de raíz asociarse con cereales (Liebman, 1998). La asociación de cereales con leguminosas es bastante utilizada por las múltiples interacciones positivas que genera, como la fijación N₂ atmosférico, mejora las características del suelo, ayuda al control de malezas y en la reducción de plagas entre otras (Duchene et al., 2017). Para este caso la asociación de cultivos con plantas que liberan NEF que son sensibles a otros tipos de herbívoros presenta una gran ventaja para el control biológico de los cultivos, por la atracción y la retención de enemigos naturales al entregarle los recursos tróficos que necesitan dentro o alrededor del cultivo principal (Jamont et al. 2014).

Así también *Vicia faba*, es utilizada en el presente experimento ya que produce nectarios en sus estipulas mucho antes de la aparición de las flores (Kwok y Laird, 2012). Esta provisión temprana de néctar podría atraer enemigos naturales muy temprano en la temporada de crecimiento y potencialmente impedir el crecimiento temprano de la población de plagas de áfidos de la temporada.

2.8 Influencia de la temperatura e intensidad lumínica en la liberación del NEF

Para que el néctar sea liberado de manera eficaz necesita condiciones externas óptimas, las cuales dependerán de la especie y del lugar donde se desarrolle. Las características fisicoquímicas del néctar como el volumen y la concentración son reguladas por factores tanto bióticos como abióticos. Los factores abióticos son impredecibles y de difícil control, el estrés hídrico, la humedad relativa, que se presenta en forma de un perfil relativo constante; la temperatura ambiente e intensidad luminosa, reabsorción selectiva de solutos o agua (Heil, 2011; Corbet et al., 1979; Nicolson, 1995), nutrientes disponibles en el suelo, entre otros. Todos estos podrían influenciar el perfil de liberación, por ejemplo, podría alterar el volumen de liberación de

NEF y la concentración, sin embargo, para efectos de este experimento serán intensidad luminosa y temperatura aquellos que se analizarán a continuación.

La temperatura afectaría directa o indirectamente la tasa de secreción de néctar ya que esta afecta la capacidad fotosintética de la planta, es decir la liberación aumentaría con la temperatura, aunque también disminuiría a temperaturas demasiado altas (Nicolson et al. 2007). En algunos estudios se planteó que debido a que las plantas mediterráneas se adaptan a mayores temperaturas, su liberación óptima de néctar se dará a temperaturas más altas que la de las plantas templadas p. ej. para *Thymus capitatus* la temperatura optima es a los 32.5 ° C (Petanidou y Smets 1996). Aunque realmente el rango óptimo de liberación se conoce en muy pocas especies y *Vicia faba* no es una de ellas.

Del mismo modo la intensidad luminosa podría favorecer o interferir en la adecuada liberación de NEF dependiendo de su adaptación en cuanto a la información existente, las plantas mediterráneas se adaptan generalmente a altas intensidades de luz y su secreción de néctar no está limitada por la radiación solar en condiciones mediterráneas normales, pero bajo condiciones de luz desfavorables, la secreción de néctar puede disminuir fuertemente (Nicolson et al.2007).

Por estos motivos para confiar en el potencial de atracción del cultivo de habas en los parasitoides en cuanto a su consumo de NEF, necesitamos conocer la magnitud del impacto de las condiciones ambientales como la temperatura y la intensidad de luz percibida por la planta sobre la producción del NEF. Estos además son factores que varían a menudo en el campo y a lo largo de la temporada del cultivo con las que podremos simular condiciones normales de luz y condiciones bajo follaje en el campo y en distinta época del año. Dada toda la información es necesario caracterizar de manera certera la liberación del néctar extra floral en *vicia faba* para que sea una pieza útil en el control biológico de plagas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Muestreo de plantas de habas

3.1.1 Ubicación del estudio

Este estudio se desarrolló en las cámaras de crianza del Instituto de Ciencias Biológicas, perteneciente a la Universidad de Talca. Las mediciones se realizaron en el laboratorio de Interacciones Insecto-Planta perteneciente al Instituto de Ciencias Biológicas. Todas las instalaciones se encuentran ubicadas en la Universidad de Talca, campus Talca.

3.1.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de haba *Vicia faba L. var. 'Aguadulce'* (de precocidad media). Se cultivaron a partir de semillas en suelo de jardín y arena (1:1) en macetas de 8 cm de diámetro. Para la siembra, las semillas sufrieron un choque térmico con agua caliente durante 1 minuto antes de ser colocadas en agua fría durante 24 horas el día anterior a la siembra para aumentar la velocidad de germinación. Justo después de sembradas, fueron colocadas en cámaras de crianza (cámara Pitec) que dieron lugar a los experimentos. Para todos los experimentos; el fotoperiodo fue de 16 horas día/8 horas noche. El riego se realizó día por medio a capacidad de campo, se dejó escurrir por 5 min y se eliminó el excedente de agua de las bandejas para evitar los cambios de la humedad relativa dentro de las cámaras. Las plantas se utilizaron para el experimento tan pronto como aparecieron 2 o 3 pares de nectarios extra florales para analizar los factores bióticos. Así también para los factores abióticos se anotó el tiempo de aparición de cada par de nectarios de hasta 3 pares por planta, y el tiempo de primera liberación de néctar extrafloral por cada nectario. A partir de los estudios de Heil (2011) una vez medido su volumen el néctar fue almacenado para medir la concentración de los azúcares que serán analizados en otro experimento.

3.1.3 Insectos

Tanto la colonia de avispas parasitoides *A. ervi* como la de pulgones *A. pisum* se mantuvo en el laboratorio de control biológico de la Universidad de Talca, Talca, Chile. Anterior a la postura dentro de los sistemas *A. pisum* fue alimentada de plantas de haba y *A. ervi* con agua, miel y NEF de haba.

3.2 Cuantificación de la producción de NEF liberado

Para todos los experimentos se utilizó el mismo método de extracción y cuantificación: el NEF se recolectó directamente del nectario extrafloral utilizando una micropipeta de volumen 2 μ l. Se tomó una fotografía idéntica a cada punta de la micropipeta para obtener el volumen exacto extraído a través de la fórmula obtenida de una regresión lineal (Figura 3.1 y 3.2).

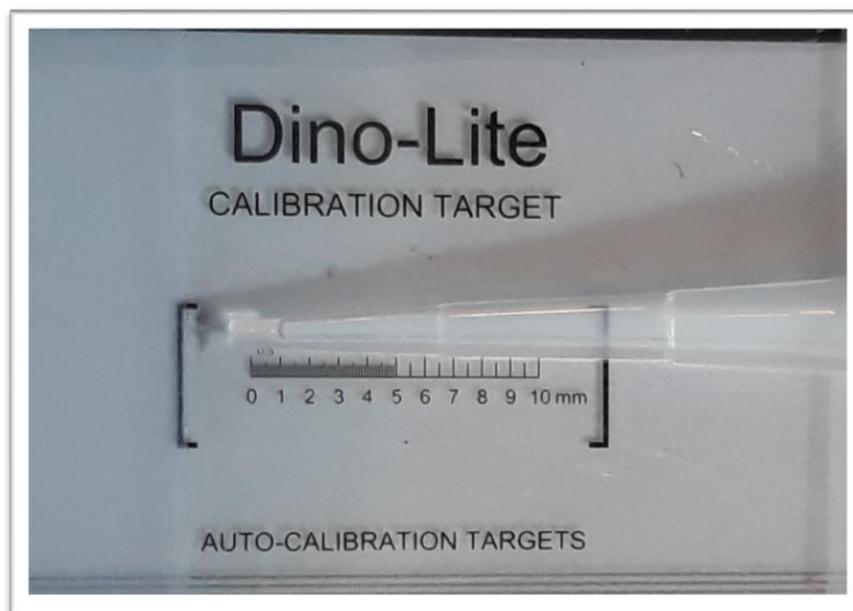


Figura 3.1 Imagen de la extracción del néctar. Volumen obtenido denominado I y largo total denominado L.

3.3 Impacto de los factores bióticos

El experimento se ubicó en la cámara con fotoperiodo 16 horas día/8 horas noche, con un régimen de temperatura de 21°C, con un perfil de humedad relativa con variación constante, aumentando levemente por la noche (medida por un datalogger Kestrel D2), y una intensidad de luz de 3200lx (bombilla E, 250W). Se utilizarán 20 plantas por tratamiento (n=20 plantas) que

hayan llegado de 2-4 nectarios extra florales. Se aplicaron 3 tratamientos y un tratamiento control, de las cuales se cuantificó la liberación de néctar al segundo, cuarto, sexto y octavo día después de la aparición y cada día a la misma hora. La liberación de néctar extrafloral para los factores bióticos se midió en las siguientes 4 situaciones: i) Control, sin presencia de insectos; ii) Con presencia de pulgones, se introducirán en el sistema 30 ejemplares de *Acyrtosiphon pisum* por planta en todos los estados posibles. iii) Con parasitoides, se introdujeron 5 hembras de *Aphidius ervi* por planta, de edades y experiencias aleatorias de crianza, después de 24 horas se realizaron las mediciones; iv) Cortes mecánicos: se realizó la rotura manual de la mitad de la hoja sobre las 2 hojas más grandes para simular el efecto de un herbívoro cortador como un gusano o larva a modo de control positivo. Según los estudios de Koptur y Wäckers (1989, 2001) estos insectos inducirían la producción de NEF. Para los tratamientos con insectos se introdujo cada planta en un sistema cerrado respirable de polipropileno, en tubo tapado con tul para el paso del aire (incluyendo el control para que no existan diferencias en la humedad relativa entre los tratamientos). Se separó las réplicas con pulgones de las con parasitoides para que no existan volátiles generando alteraciones en la reacción de las plantas.

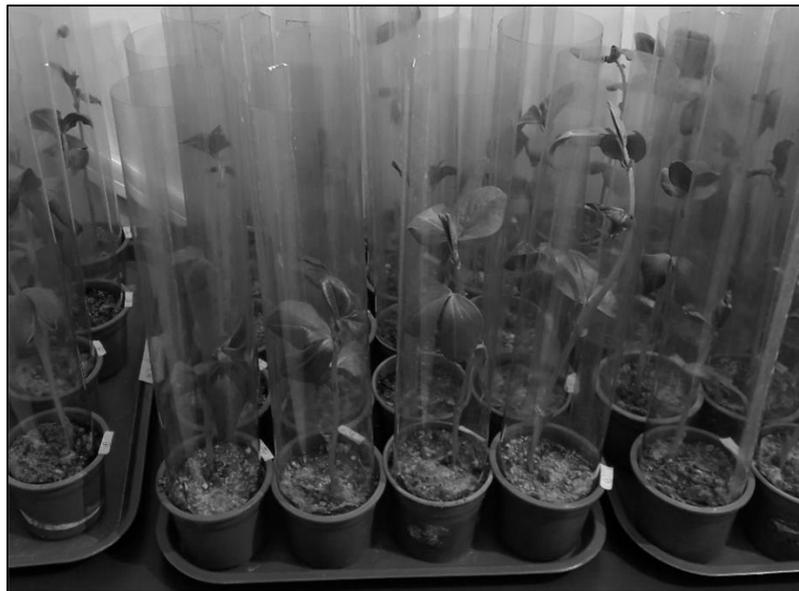


Figura 3.2 Plantas de haba dentro de su “sistema” cerrado con 2 o más pares de nectarios visibles en proceso de medición dentro de su sistema.

3.4 Impacto de los factores abióticos

A continuación de la primera observación de liberación de néctar se observó la variación de la producción cada día durante diez días en cada nectario y cada observación se realizó a la misma hora que el día anterior. La liberación de néctar extrafloral para los factores abióticos fue medido en las siguientes situaciones; i) Temperatura, las plantas fueron colocadas en una cámara PiTec con dos temperaturas diferentes en tiempos separados, a temperatura “alta” sometida a 20°C y a temperatura “baja” sometida a 10°C; ii) Intensidad lumínica, las plantas fueron colocadas en una cámara (PiTec) con dos intensidades luminosas distintas en tiempos distintos, a intensidad “alta” de 2300 lx. y a intensidad “baja” de 1000 lx. bajo 20°C y bajo el mismo perfil de humedad (el 70% durante el día y el 95% durante la noche, comprobado con el datalogger Kestrel D2). Se realizó con el objetivo de evaluar que los factores abióticos luz y temperatura no solo influyeran el crecimiento del haba, sino que puedan mejorar o perjudicar a la emisión de NEF.

3.5 Diseño del experimento y análisis estadístico

3.5.1 Cuantificación del volumen

Se realizó una escala volumétrica para extraer una “proporción” de 30 fotos de micropipeta rellena de cada volumen cada 0,1 µL entre 0,1 y 1,5 µL y así a través de una regresión lineal obtener la fórmula que nos dará el volumen exacto de NEF recolectado en cada muestra del experimento. Para esta regresión se utilizó la proporción I/L (ver figura 3.1) en el programa RStudio (R Cran Project, versión 3.5.3, función *lm* del package lme4) donde fue aceptada la distribución normal de los residuos y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{volumen } (\mu\text{L}) = -0.437137 + 2.631679 * \text{proporción}$$

Figura 3.3. Fórmula obtenida de la regresión, para calcular el volumen de néctar fotografiado a partir de la micropipeta rellena.

3.5.2 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas usadas para determinar diferencias entre tratamientos fueron las siguientes: Verificación los supuestos de normalidad con el test de Shapiro-Will y homocedasticidad con el test de Levene de la variable volumen de NEF liberado por planta.

Para el ensayo de los factores bióticos, la diferencia entre los tratamientos se analizó a través del test no paramétrico de Kruskal-Wallis y posteriormente se realizó el test no paramétrico de Wilcoxon para análisis de los pares. En el caso del experimento de plantas con avispa parasitoides la liberación fue analizada además como una variable binaria con el test de chi cuadrado. Todos ellos en donde la unidad experimental correspondió a 20 plantas con 3 repeticiones, donde fueron analizados por lo menos tres pares de nectarios por planta. Los datos recopilados fueron procesados y analizados en el programa STATGRAPHICS 18 X-64.

Para el ensayo de factores abióticos se utilizó el programa RStudio (R Cran Project, versión 3.5.3). Se utilizó el test no paramétrico prueba de los rangos de Wilcoxon, comparando el número de nectarios liberando NEF y los días después de siembra (DDS) necesarios para la aparición/coloración de los nectarios EF, en donde la unidad experimental correspondió a 20 plantas con 2 repeticiones, donde fueron analizados tres pares de nectarios por planta.

4. RESULTADOS

4.1 Impacto de los factores bióticos

Al comenzar con el ensayo las plantas tenían en promedio 15 días después de siembra (DDS) y 0,2 m de altura. El volumen mínimo, que visualmente se aprecia como un nectario húmedo, pero imposible de extraer con una micropipeta, fue estandarizado para efectos de análisis a 0,05 μL .

4.1.1 Influencia de la infestación de áfidos sobre la liberación de NEF

Se extrajo el volumen de cada nectario para calcular el volumen liberado por planta a los cuales se analizaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad para los datos obtenidos en cada día de la toma de muestra y para cada experimento, en ambos casos los supuestos fueron rechazados (Levene, $p > 0,05$). Se observó que las varianzas de los grupos son fuertemente heterogéneas y no se puede modelar adecuadamente la normalidad de los datos.

El volumen más alto observado en un nectario fue 2,9 μL y el más bajo fue el estandarizado en 0,05 μL . Para este experimento el 28% de las plantas infestadas por áfidos nunca liberaron néctar, mientras que el 9% de las plantas a las que se le realizó corte mecánico en las hojas tampoco lo hizo y solo el 5% de las plantas tratamiento control tampoco liberó néctar durante el experimento.

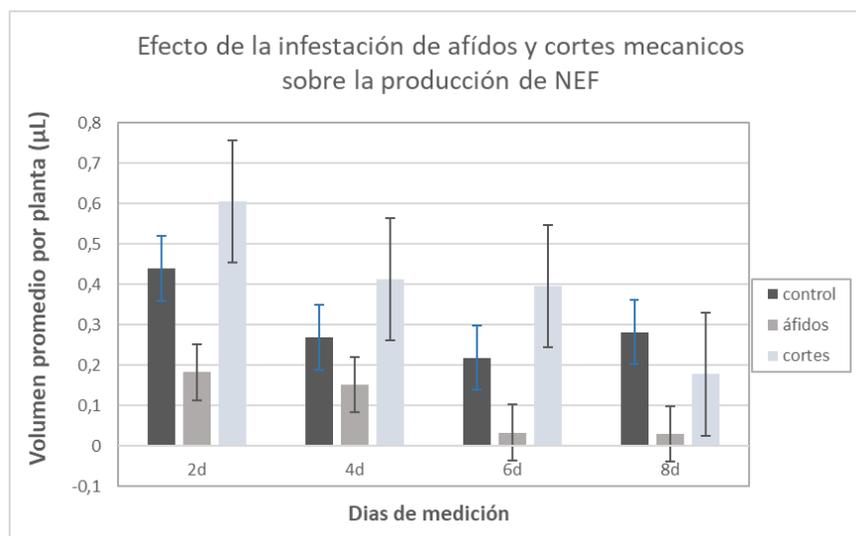


Figura 4.1 Volumen promedio liberado por planta (μL) bajo los tratamientos control, áfidos y cortes para las cuatro fechas de toma de muestra, las barras de error muestran el error estándar.

4.1.2 Volumen promedio por planta

Para el primer día de muestreo, el tratamiento control presentó la mayor cantidad de nectarios liberando con 39%, mientras que el mayor volumen liberado promedio por planta lo obtuvo el tratamiento de cortes con 0,45 μL , así también los volúmenes más bajos y menor cantidad de nectarios liberando los obtuvo el tratamiento de áfidos con 24% y 0,2 μL respectivamente (Cuadro 4.1). Para los siguientes tres días de muestreo el tratamiento cortes presentó el mayor porcentaje de nectarios liberando y el mayor volumen liberado para cada día. De este modo, existen diferencias estadísticamente significativas en las medianas de las observaciones entre los 3 tratamientos en las cuatro fechas de muestreo.

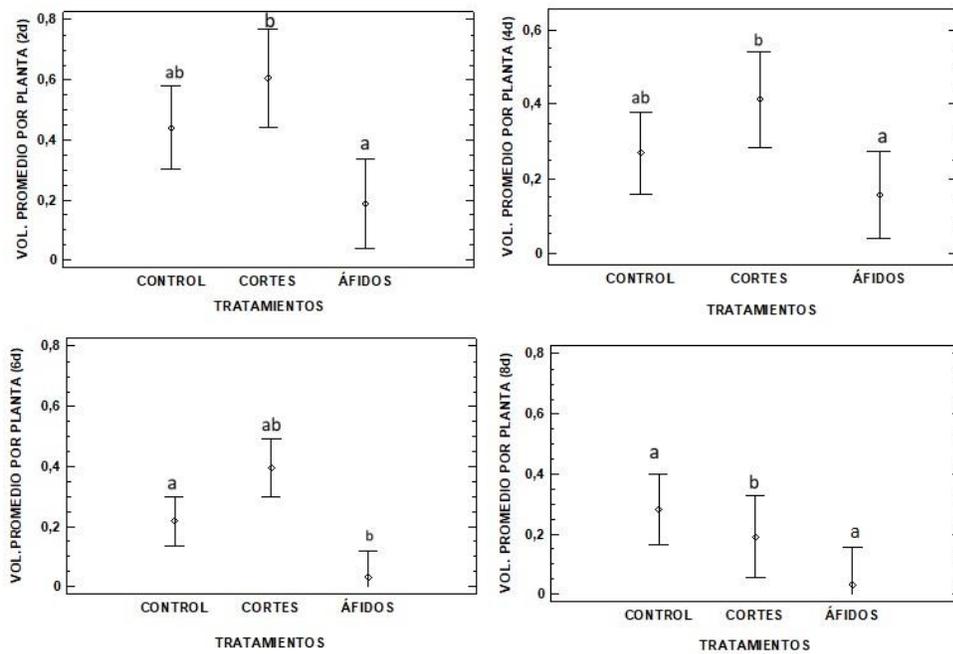


Figura 4.2. Gráfico de medias y barras de error para la variable volumen promedio por planta para los tratamientos control, cortes y áfidos en el primer, segundo, tercer y cuarto día de medición. Medias descritas por la misma letra en cada fecha no difieren según prueba de Kruskal-Wallis.

4.1.3 Análisis para los pares (2x2)

Para las comparaciones de volumen liberado por planta entre los pares de los 3 tratamientos a través de la prueba de Wilcoxon, existen diferencias significativas entre los tratamientos cortes-áfidos para cada día de la medición, así también existen diferencias significativas entre los tratamientos control-áfidos para los últimos tres días de medición, mas no para el primero. Mientras que, para el par control-cortes no existen diferencias significativas para ningún día de muestra excepto para el sexto día (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Efecto de los tratamientos control, áfidos y cortes sobre el volumen promedio por planta y la interacción entre los pares para cada día de medición según el test de Wilcoxon.

Volumen promedio por planta				
(μL)				
<i>Tratamiento /Día de medición</i>	2d	4d	6d	8d
<i>Control</i>	0,44 ab	0,27 a	0,21 c	0,28 a
<i>Áfidos</i>	0,18 b	0,15 b	0,03 b	0,03 b
<i>Cortes</i>	0,60 a	0,41 a	0,39 a	0,18 a
<i>Valor p</i>	0,0347054	0,0254035	<0,05	<0,05
Interacción de los pares				
<i>Control - Áfidos</i>	-	*	*	*
<i>Control - Cortes</i>	-	-	*	-
<i>Cortes - Áfidos</i>	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

4.1.4 Influencia del consumo previo de NEF por avispas parasitoides

Para impedir que la presencia de compuestos orgánicos volátiles emitidos por las plantas infestadas por áfidos alterara los resultados del tratamiento con avispas parasitas (Köpke y Nemecek, 2010) fueron separados en tiempo y lugar. Es por esto que este tratamiento tiene su propio control con el cual fueron comparados. En este caso los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre control y tratamiento para el volumen liberado por planta en cada día de muestra (Cuadro 4.2). Para comparar los resultados anteriormente obtenidos la liberación como una variable cualitativa a través del test de chi cuadrado quien lanzó diferencias significativas para el segundo y cuarto día de medición, es decir existe relación entre la presencia de avispas parasitas y la liberación de NEF para la mitad de los días muestreados en este experimento.

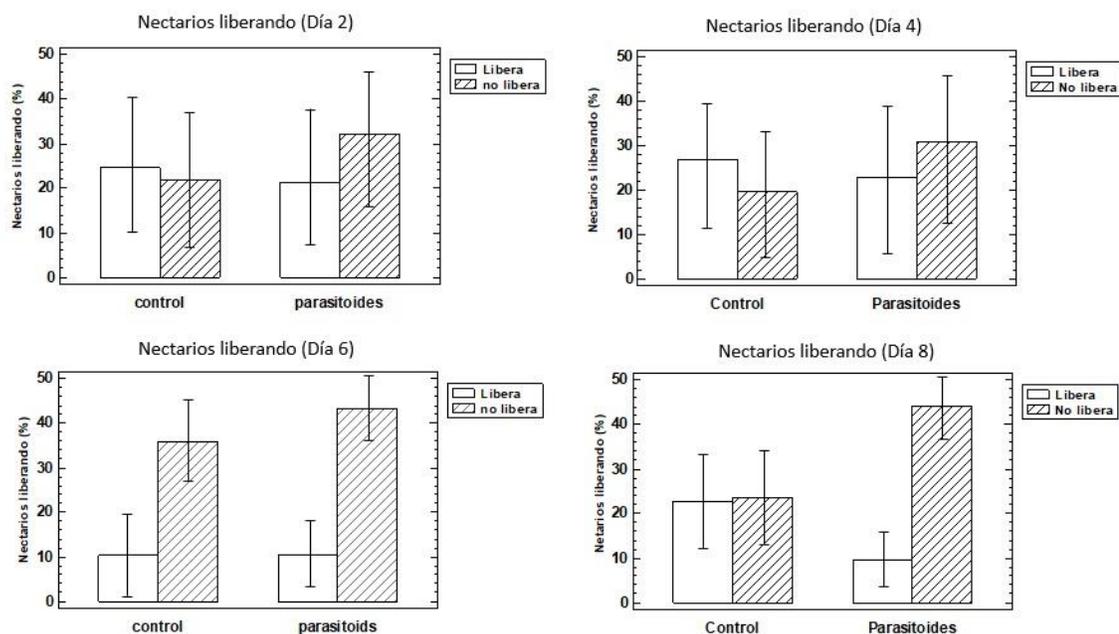


Figura 4.3. Efecto de la presencia de avispas parasitas sobre el porcentaje de nectarios liberando y no liberando para 2,4,6 y 8 días posterior a la postura de las avispas.

Cuadro 4.2 Efecto del tratamiento de parasitoides y control sobre el porcentaje de nectarios liberando (valor p para test chi cuadrado) y volumen promedio por planta (valor p para test Kruskal-Wallis) para cada día de medición.

Nectarios liberando (%)				
<i>Tratamiento /Día de medición</i>	2d	4d	6d	8d
<i>Control</i>	52,9 a	57,8 a	22,5 a	49,0 a
<i>Parasitoides</i>	39,8 a	42,4 a	19,5 a	17,8 a
<i>Valor p</i>	0,0517	0,0221	>0,05	<0,05
Volumen promedio por planta (µL)				
<i>Control</i>	0,43 a	0,57 a	0,08 a	0,33 a
<i>Áfidos</i>	0,58 a	0,14 a	0,07 a	0,24 a
<i>Valor p</i>	>0,05	0,0798954	>0,05	0,0615482

4.2 Impacto de los factores abióticos

Se evaluó comparando la fecha de formación/coloración del nectario, la primera fecha de liberación de NEF y el volumen liberado de NEF durante 10 días (volumen de néctar por nectario recolectado todos los días). Para este experimento solo se consideraron los tres primeros niveles de nectarios.

4.2.1 Influencia de la temperatura

El efecto de dos tratamientos de temperatura, de 10 ° C y 20 ° C (a 2300 lx de luminosidad), fue bastante claro en este experimento. En general, 95% de las plantas presentaron nectarios visibles alrededor de los 20 ° C, frente a 65% de plantas a 10 ° C. El 45% de las plantas cultivadas a 10 ° C no presentaron nectarios visibles en las estípulas y nunca liberaron néctar durante el experimento (ni después de un mes).

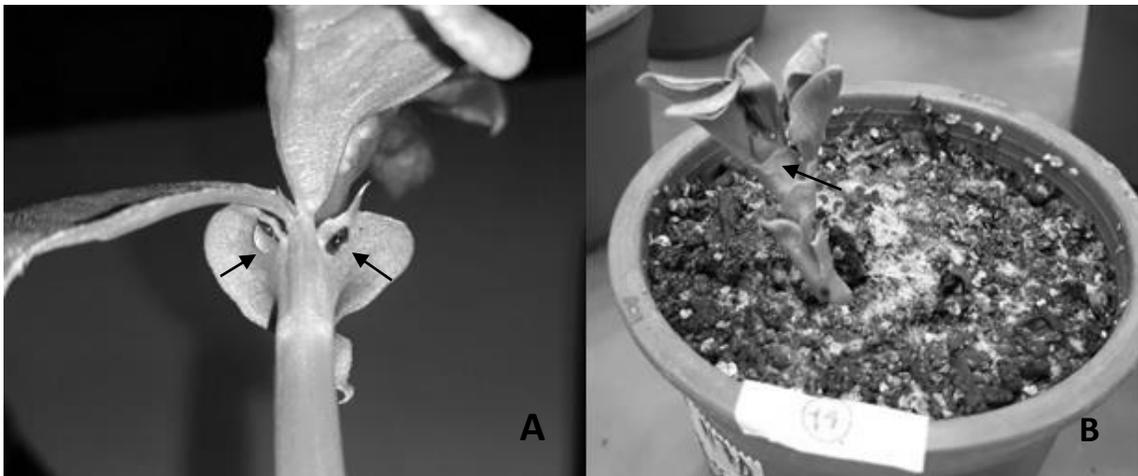


Figura 4.4. Respuesta general de las plantas de haba bajo dos tratamientos de temperatura: **A**, gota de néctar visible a 20 ° C, las plantas presentan tanto nectarios visibles como néctar liberado regularmente; **B**, plantas con entrenudos cortos y sin nectarios estipulares.

4.2.2 Tiempo de formación de los nectarios

Como se esperaba, el tiempo necesario para que aparecieran los primeros nectarios fue significativamente más largo a 10 ° C que a 20 ° C. Esto se explica fácilmente por el hecho de que, a 10 ° C, la tasa de crecimiento de las habas es más lenta que cercano a los 20 ° C. Sin embargo, cuando el experimento duró más de 20 días, y las plantas de habas alcanzaron un estado fisiológico al menos equivalente al que se puede ver a 20°C con un par o más de nectarios, solo un 35% de plantas alcanzaron 2 niveles de nectarios visibles, y un 5% alcanzaron 3 niveles. Absolutamente ninguna planta ha liberado néctar a 10 ° C.

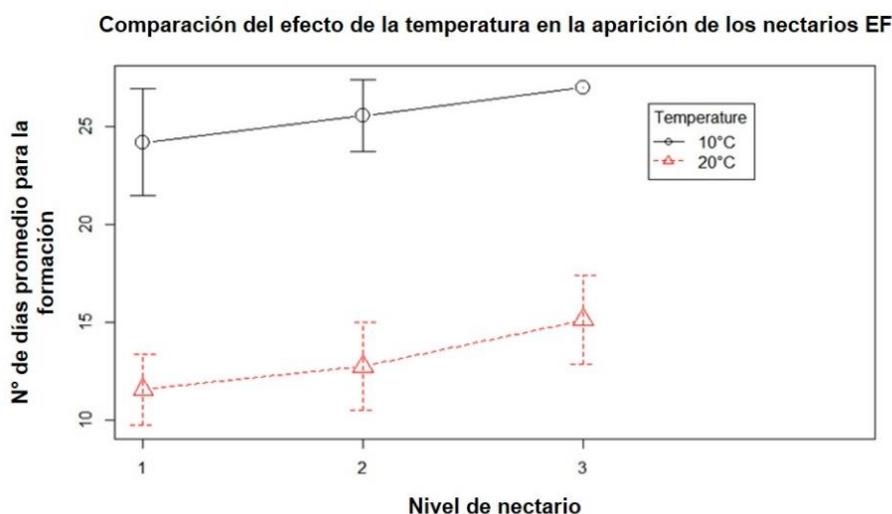


Figura 4.5. Tiempo medio (posterior a la siembra) necesario para que los primeros tres pares de nectarios EF sean visibles bajo dos temperaturas diferentes (solo una observación representada para el tercer par a 10 ° C). Las barras de error representan la desviación estándar. (1) $p = 1.079e-11$ Wilcox.test (2) $p = 2.763e-08$ Wilcox.test.

4.2.3 Liberación de NEF

En el 70% de las plantas de haba que germinaron durante el experimento (porcentaje total de germinación), absolutamente ninguna liberó NEF durante los 10 días del estudio a 10 ° C. Mientras que el 95% de las plantas cultivadas a 20 ° C germinaron durante el experimento, y solo 3 nectarios sobre 112 observados nunca liberaron néctar en los 10 días del experimento.

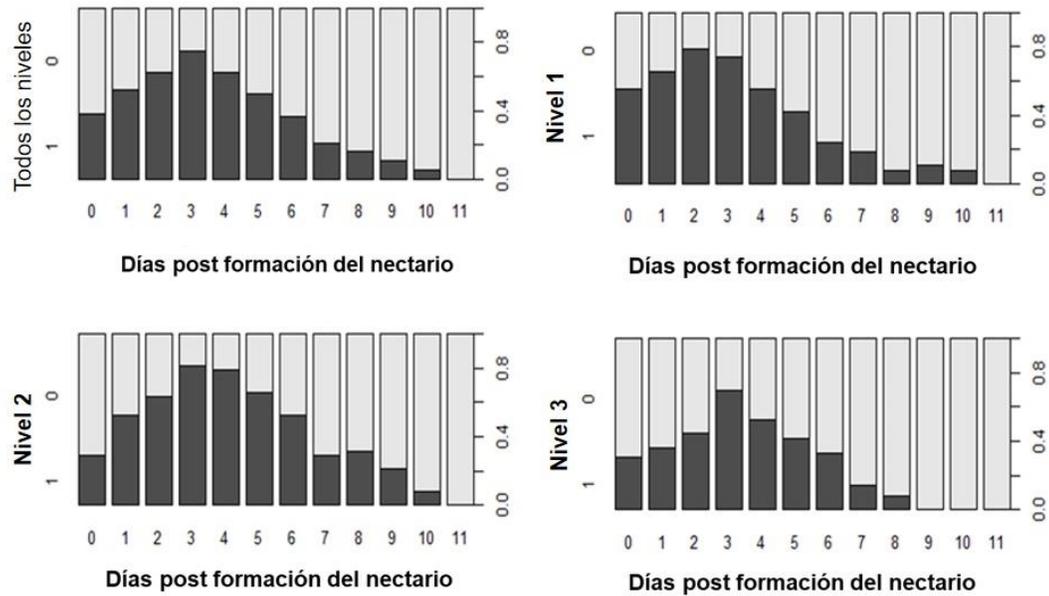


Figura 4.6. Proporción de nectarios liberando y no liberando NEF (1 y 0 respectivamente) a 20°C para todos los niveles de nectarios y para el nivel 1,2 y 3 en los 10 días del experimento.

Estos resultados muestran que, alrededor de los 20 ° C, los nectarios son principalmente productivos los primeros días después de su formación, durante el crecimiento de la hoja. Después de tres días, la proporción de nectarios que liberan NEF disminuyó progresivamente. Para todos los niveles nectarios, no se registró liberación de NEF después de 10 días después de la formación.

Las plantas sometidas a 10°C nunca liberaron néctar, por lo que lo que los resultados obtenidos a 20°C no fueron comparados.

La diferencia en el número de días para que los nectarios sean visibles fue significativa entre ambas intensidades de luz para los tres primeros niveles de nectarios de las plantas de habas. Para el primer par de nectarios, se necesitaron en promedio 11.5 días y 13.4 días respectivamente bajo 2300lx y 1000lx para poder ver la coloración.

Cuadro 4.3 Número medio de días necesarios para que los tres primeros niveles de nectarios extraflorales de las plantas de habas sean visibles bajo dos intensidades de luz.

NIVEL DE NECTARIO	1000 LX	2300 LX
1	13.39286	11.50000
2	14.36364	12.73684
3	16.58824	15.11111

4.3.3 Primera liberación de néctar

Todos los niveles incluidos, el tiempo que necesita el nectario para liberar NEF por primera vez es significativamente diferente entre ambas intensidades de luz, siendo más largo de casi un día, en promedio, a una intensidad más baja. Sin embargo, las observaciones son muy variables. Para tratar de reducir esta variabilidad, la primera versión de NEF se representó de acuerdo con el nivel del nectario de la planta: nuevamente, los datos son variables dentro de los niveles del nectario.

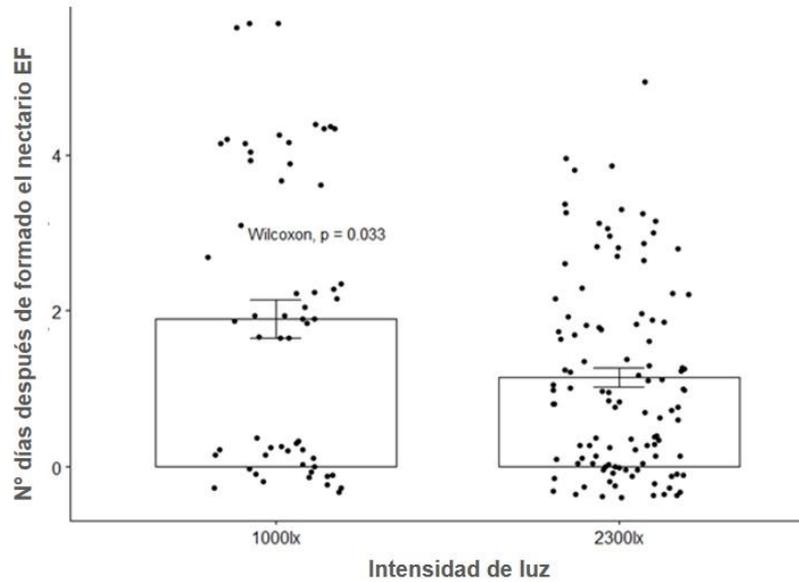


Figura 4.8. Tiempo necesario para la primera liberación de NEF después de su formación (pigmentación) bajo dos intensidades de luz ($p < 0,05$). Los puntos negros son las observaciones y las barras de error representan el error estándar.

4.3.4 Experimento cruzado

Se realizó un experimento adicional con 20 plantas bajo baja intensidad de luz (1000lx) y baja temperatura (10 ° C), lo que resultó en una baja tasa de germinación (20%) y sin aparición de nectarios en 14 días, después de lo cual se detuvo el experimento.

4 DISCUSIÓN

Sin duda los factores que regulan la liberación del néctar son muy diversos y variados, es por esto que intentar explicar la alta variabilidad de los volúmenes dentro y entre plantas es muy complejo. La liberación de NEF se rige según el modelo de defensa óptima, al secretarse principalmente en los órganos más valiosos, es decir, los órganos que serán una importante contribución a la sobrevivencia de la planta y de altos costos de producción como hojas jóvenes, frutos inmaduros, etc., y que además son más susceptibles a la herbivoría (Jones et al. 2017).

En base a la observación, el nectario se mantendría activo durante todo el periodo de crecimiento de la hoja adyacente y cesaría su actividad en cuanto haya completado su maduración, así es como los nectarios más antiguos se inactivan mientras los más jóvenes se activan a medida que van apareciendo los siguientes niveles de hojas, y son frecuentemente los pares de nectarios más jóvenes los que más néctar liberan (Heil, 2015). Esto implica que las plantas de habas pueden ser atractivas mientras se formen nectarios y la planta se desarrolle, pero su atractivo por NEF debería cesar una vez que la planta haya crecido por completo. Es así como la liberación de NEF podría variar con la edad de la planta y con la edad de la hoja individual y evidentemente por las condiciones de temperatura e intensidad de luz favorables para la planta y su liberación; esto explicaría gran parte de la dinámica de los resultados (volúmenes observados).

Bajo las condiciones dispuestas en este experimento no hemos encontrado evidencias suficientes para decir que la liberación de NEF en las plantas de *Vicia faba* serían inducidas por la infestación de áfidos ni por la presencia de parasitoides, pero esto no significa que si pudiesen serlo otras especies del genero *Vicia*. Los resultados obtenidos para los factores bióticos como la disminución del volumen de néctar liberado en las plantas infestadas por áfidos podría ser explicada por una disminución importante del flujo de fotoasimilados circulantes por una alta infestación comparada con el tamaño y estadio fisiológico de las plantas en experimento. Mientras que, si bien los cortes mecánicos podrían ser considerado un ataque más agresivo, este fue suficiente para inducir la liberación del néctar sin disminuir la capacidad de la planta para fotosintetizar y traslocar adecuadamente los recursos, considerando que el daño mecánico significó la pérdida de la mitad de dos de las hojas más grandes. Entonces la capacidad de la planta para producir y liberar néctar EF adecuadamente se llevará a cabo dependiendo de la magnitud del ataque por los herbívoros. Cabe destacar que el ataque de los herbívoros masticadores y la inducción del mismo está ampliamente estudiado y fue este el motivo de incluir los cortes mecánicos, simulando a un insecto masticador como tratamiento a modo de control positivo.

La capacidad de las plantas para reaccionar ante la herbivoría mediante el NEF es una característica de resistencia, sin embargo, estos rasgos podrían en alguna medida haber sido eliminados o minimizados a través de la selección genética sistemática a la que han sido sometidas las especies cultivadas con fines comerciales enfocados principalmente en aumentar la producción de frutos. De esta forma podría esperarse que una mayor producción de NEF significaría una menor producción reproductiva, aunque está descrito que el costo metabólico de NEF es muy bajo y no hay evidencia de una disminución de la producción ante un aumento de la liberación de NEF. Aunque se ha encontrado que las plantas cultivadas tienden a liberar un menor volumen de NEF respecto a sus parientes silvestres (Jones et al. 2017).

Los resultados obtenidos para los factores abióticos fueron los esperados, asumiendo que todos los procesos metabólicos de las plantas, incluida la formación y liberación de néctar, dependen de la temperatura y la intensidad lumínica, al estar directamente relacionados con la fotosíntesis. Cabe destacar que para este experimento debió haberse analizado no solo los tres primeros nectarios si no también los nectarios más jóvenes lo cual fue un error por lo mencionado anteriormente acerca la durabilidad y actividad de los nectarios. Este es un estudio preliminar del efecto de la temperatura y luminosidad bajo condiciones controladas sobre la liberación de NEF, donde los resultados sugieren que la temperatura durante el desarrollo temprano de la planta puede tener un fuerte efecto en la formación y coloración de los nectarios y en la liberación actual de néctar por parte de la planta, mas no futura. Esto quiere decir que el néctar liberado corresponde a los fotoasimilados recientes o inmediatos, ya que en la mayoría de los casos el néctar no fluye ni se pierde ya que este se reabsorbe si no es consumido por alguna especie nectarífaga (Cruden et al., 1983). Los resultados obtenidos para la luminosidad son similares a los de temperatura, aunque las plantas a 10° C nunca liberaron néctar, contrario a las plantas sometidas a luminosidad “baja” que, si lo hicieron en menor medida que luminosidad “alta”. A estas condiciones de laboratorio se debe aplicar un termoperíodo variable para poder describir de mejor manera los perfiles de liberación de NEF del haba a condiciones de campo reales.

De esta forma, podríamos considerar elaborar una herramienta para la estimación de la fecha después de siembra de la primera versión de NEF y en consecuencia, de la fecha en que el cultivo de habas comienza a ser atractivo para enemigos naturales en condiciones de campo, así podremos enfrentar la incidencia de plagas como los pulgones y la abundancia de enemigos naturales como los parasitoides con esta fecha, y ver cómo la disponibilidad de NEF cambia su fecha de llegada, reduce el tiempo de respuesta defensiva y su capacidad de regulación de las poblaciones de plagas, en comparación con un cultivo sin néctar.

Un factor limitante importante que debe ser considerado en una futura repetición del experimento es la forma de obtención y medición del volumen, este podría realizarse por ejemplo mediante microcapilares, primero para extraer completamente el néctar presente en el nectario, que en algunas ocasiones no se pudo con la micropipeta y segundo para obtener directamente la cantidad de volumen y no a través de una fórmula que, si bien es bastante precisa para volúmenes altos, es también en parte imprecisa para volúmenes tan pequeños como los liberados por las plantas en los nectarios extra florales. En la ecuación obtenida en este experimento, para los valores más pequeños de la “proporción” lanzó volúmenes de valores negativos que fueron reemplazados por 0,05 μL y que fue estandarizado como volumen mínimo observado. Como este factor pudo haber alterado en alguna medida los resultados, la liberación del néctar se evaluó además como una variable cualitativa donde la relación entre porcentaje de nectarios liberando/volumen promedio por planta fueron similares (anexos).

No cabe duda que el aumento de los recursos nectaríferos a los agroecosistemas a través del manejo del hábitat mejora la regulación de las plagas a través del apoyo no solo a los parasitoides sino también a diversos enemigos naturales e incluso a polinizadores, es así como la implementación de cultivos asociados con *Vicia faba* podría impactar no solo en el manejo de plagas si no generar efectos más amplios en los sistemas agrícolas, por esto para conocer el rol que cumple el néctar extra floral es necesario que sea observado a nivel de comunidad. Existe un enorme potencial del uso del haba como cultivo nectarífero para aprovechar las interacciones mediadas por néctar extra floral en una gran cantidad de cultivos para reducir o eliminar el uso de pesticidas perjudiciales para los humanos y el medio ambiente para que sea integrada en diferentes tipos de programas de control biológico.

5 CONCLUSIÓN

Basados en las condiciones establecidas en el presente estudio se concluye que:

- I. La liberación del néctar extra floral en las plantas de *Vicia faba L.* no es inducida por la infestación del áfido *A. pisum*.
- II. La liberación del néctar extra floral en las plantas de *Vicia faba L.* no es inducida por el consumo del mismo por las avispas parasitoides *A. ervi*.
- III. La temperatura baja e intensidad luminosa baja, aumenta el tiempo necesario para la formación de los nectarios extra florales y para la primera liberación de néctar extra floral. Además, ambas disminuyen el volumen de néctar liberado por planta, así como también la capacidad de generar y pigmentar los nectarios.

6 REFERENCIAS

Baker H., Baker I. 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. Handbook of experimental pollination biology. New York: Van Nostrand Reinhold, 117-141.

Bentley B. (1976) Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community: interhabitat differences in the reduction of herbivore damage. *Ecology* 57:815–820.

Bugg R., Ellis R. and Carlson R. 1989. Ichneumonidae (Hymenoptera) Using Extrafloral Nectar of Faba Bean (*Vicia faba L.*, Fabaceae) in Massachusetts. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*, 6:2, 107-114.

Búrquez A., and Corbet S. (1991). Do flowers reabsorb nectar? *Functional Ecology*, 5, 369– 379.

Choh Y., Kugimiya S., and Takabayasi J. 2006. Induced production of extrafloral nectar in intact lima bean plants in response to volatiles from spider mite-infested conspecific plants as a possible indirect defense against spider mites. *Plant- animal interactions*, 147: 455–460.

Corbet S. 2003. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie*, 34, 1–10.

Corbet S., Willmer P., Beament J., Unwin D., and Prys-Jones O. 1979. Post-secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant Cell & Environment*, 2: 293–308.

Cruden R., Hermann S. and Peterson S. 1983. Patterns of nectar production and plant pollinator coevolution. In: B. Bentley, and T. Elias (Eds.), *The biology of nectaries*, 80 – 125.

Davis A., Peterson R. and Shuel R. 1988. Vasculature and ultrastructure of the floral and stipular nectaries of *Vicia faba L.* (Leguminosae). Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ont., Canada. 14 p.

Duchene, O., Vian J., Celette, F. 2017. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementary and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 240: 148–161.

Engel V., Fischer M., Wäckers W. and Völkl W. 2001. Interactions between extrafloral nectaries, aphids and ants: are there competition effects between plant and homopteran sugar sources? *New Phytologist* Trust, 129:577–584.

Giordanengo P., Brunissen L., Rusterussi C., 2010. Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *Comptes Rendus Biologies*, 333: 516-523.

Fischer M. and Shingleton A. 2001. Host plant and ants influence the honeydew sugar composition of aphids. *Functional Ecology* 15: 544-550.

Gurr, G., Wratten, S., Landis, D., and You, M. 2017. Habitat Management to Suppress Pest Populations: Progress and Prospects. *Annual Review of Entomology*, 62 (1), 91–109.

Heil M, Silva Bueno JC. 2007. Within-plant signalling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:5467–72.

Heil M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* Trust 178: 41 – 61.

Heil M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological function. *Trends in Plant Science* 16: 191.

Heil M. 2015. Extrafloral Nectar at the Plant-Insect Interface: A Spotlight on Chemical Ecology, Phenotypic Plasticity, and Food Webs. *Annual Review of Entomology* 60:213-232.

Jakobesen H. and Kristjánsson K. 1994. Influence of temperature and floret age on nectar secretion in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* 74: 327-334.

Jamont M., Crepelliere S. and Jaloux B. 2014. Effect of extrafloral nectar provisioning on the performance of the adult parasitoid *Diaeretiella rapae*. *Biological Control* 65:271–77.

Jervis M. 1998. Functional and evolutionary aspects of mouthpart structure in parasitoid wasps. *Biological Journal of the Linnean Society* 63: 461–493.

Jones I., Koptur S. and Wettberg E. 2017. The use of extrafloral nectar in pest management: Overcoming context dependence. *Journal of Applied Ecology* 54: 489-499.

Koptur S. 1989. Is extrafloral nectar an inducible defense? The evolutionary ecology of plants. Boulder, CO, USA: Westview Press, 323–329.

Koptur S. 1992. Extra floral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: Bernays E, ed. *Insect-plant interactions*. Boca Rotan: CRC Press, 81-129.

Kwok K. and Laird R. 2012. Plant age and the inducibility of extra floral nectaries in *Vicia faba*. *Plant Ecology* 213: 1823–1832.

Köpke U., Nemecek T. 2010. Ecological services of faba bean. *Field crops research* 115: 217 – 233.

Lewis W., Stapela O., Cortesero A., Takasu K. 1998. Understanding How Parasitoids Balance Food and Host Needs: Importance to Biological Control. *Biological Control* 11: 175-183.

Liebman, M. 1988. Ecological suppression of weeds in intercropping systems: a review. In: *Weed Management in Agroecosystems: Ecological Approaches*. Altieri, M. A., and M. Liebman, eds. Florida: CRC Press.

Matthew I., Koptur S. and von Wettberg E. 2017. The use of extrafloral nectar in pest management: overcoming context dependence. *Journal of Applied Ecology* 54: 489–499.

Marazzi B, Sanderson MJ. 2010. Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectaries. *Evolution* 64: 3570–3592.

Marazzi B., Bronstein J. and Koptur S. 2013. The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. *Annals of Botany* 111: 1243–1250.

Nicolson S. 1995. Direct demonstration of nectar reabsorption in the flowers of *Grevillea robusta* (Proteaceae). *Functional Ecology*, 9: 584–588.

Nicolson S., Nepi M. and Pacini E. 2007. *Nectaries and Nectar*. Springer, Siena, Italy, 395 p.

- Petanidou T., and Smets E. (1996). Does temperature stress induce nectar production in Mediterranean plants? *New Phytologist*, 133, 513–518.
- Raguso, R. 2001. Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior. *Cognitive Ecology of Pollination* (eds L. Chittka & J.D. Thomson) 83–105. Cambridge University Press, Cambridge.
- Raguso, R. 2004. Why are some floral nectars scented? *Ecology* 85: 1486–1494.
- Rogers W., Siemann E., Lankau R., 2003. Damage induced production of extrafloral nectaries in native and invasive seedlings of Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). *American Midland Naturalist* 149:413–17.
- Rosumek F., Silveira F., Neves F., Barbosa N., Diniz L. 2009. Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160:537–49.
- Röse U., Lewis J. and Tumlinson J. 1998. Specificity of systemically released cotton volatiles as attractants for specialist and generalist parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology* 24: 303–319.
- Röse U., Lewis J. and Tumlinson J. 2006. Extrafloral nectar from cotton (*Gossypium hirsutum*) as a food source for parasitic wasps. *Functional Ecology* 20: 67-74.
- Smith L., Lanza J. and Smith GC. 1990. Amino acid concentrations in extra floral nectar of *Impatiens sultani* increase after simulated herbivory. *Ecology* 71: 107-115.
- Stadeler and Dixon, 2005. Ecology and Evolution of Aphid-Ant Interactions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 20(36):345-72.
- Tylianakis J., Didham R. and Wratten S. 2004. Improved fitness of aphid parasitoids receiving resource subsidies. *Ecology* 85:658–666.
- Takasu, K. and W. J. Lewis. 1995. Importance of adult food sources to host searching of the larval parasitoid *Microplitis croceipes*. *Biological Control* 5: 25-30.

Völkl W., Woodring J., Fischer M., Lorenz M. and Hoffmann K. 1999. Ant-aphid mutualisms: the impact of honeydew production and honeydew sugar composition on ant preferences *Oecologia*. 118: 483-491.

Weber M., Keeler K., 2013. The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants. *Annals of Botany* 111:1251–61.

Wäckers F. and Wunderlin R. 1999. Induction of cotton extrafloral nectar production in response to herbivory does not require a herbivore-specific elicitor. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91:149–154.

Wäckers F., Zuber D., Wunderlin R. and Keller F. 2001. The Effect of Herbivory on Temporal and Spatial Dynamics of foliar Nectar Production in Cotton and Castor. *Annals of Botany* 87: 365-370.

7. ANEXO

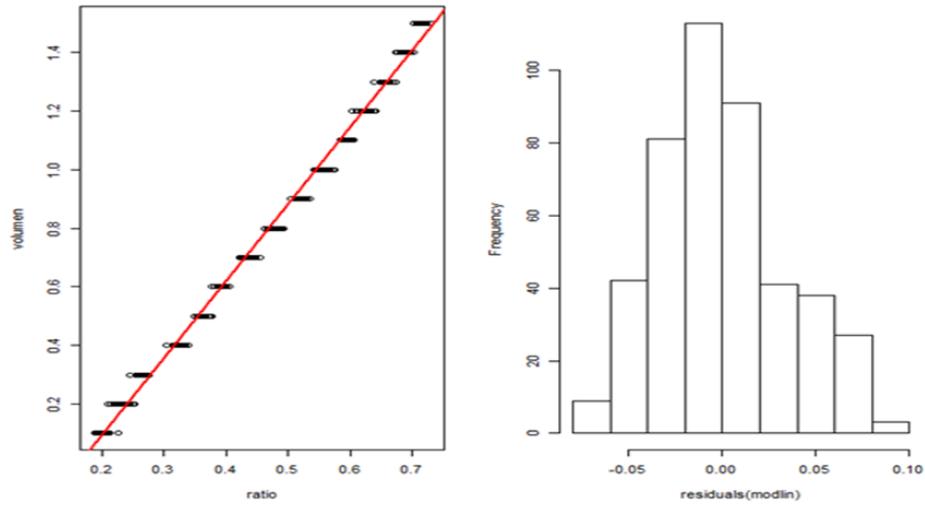


Figura 7.1. Histograma de frecuencias con distribución normal de la escala volumétrica para la obtención de volúmenes procesados en el programa R Cran Project función lm.

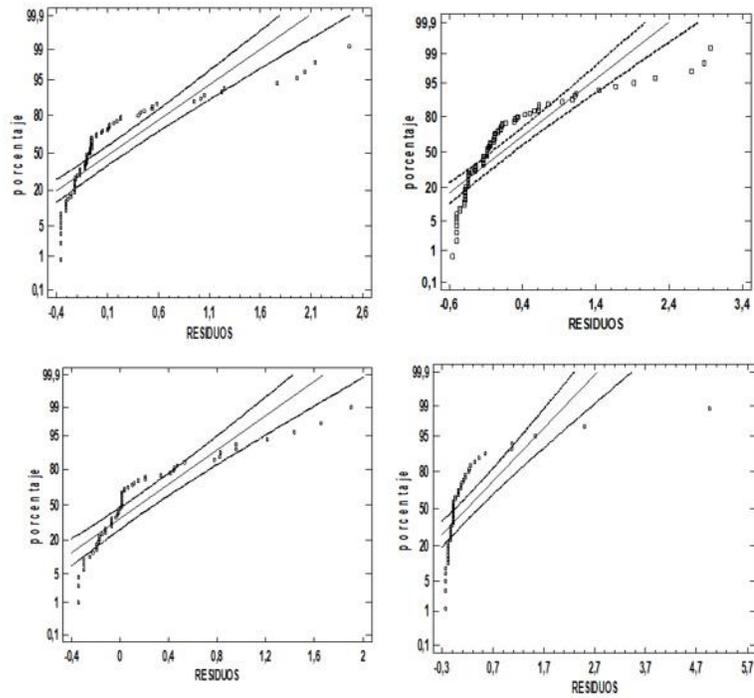


Figura 7.2. Gráficos de probabilidad normal de los volúmenes promedio por planta para cada día de medición. $P > 0,05$ para test de Levene.

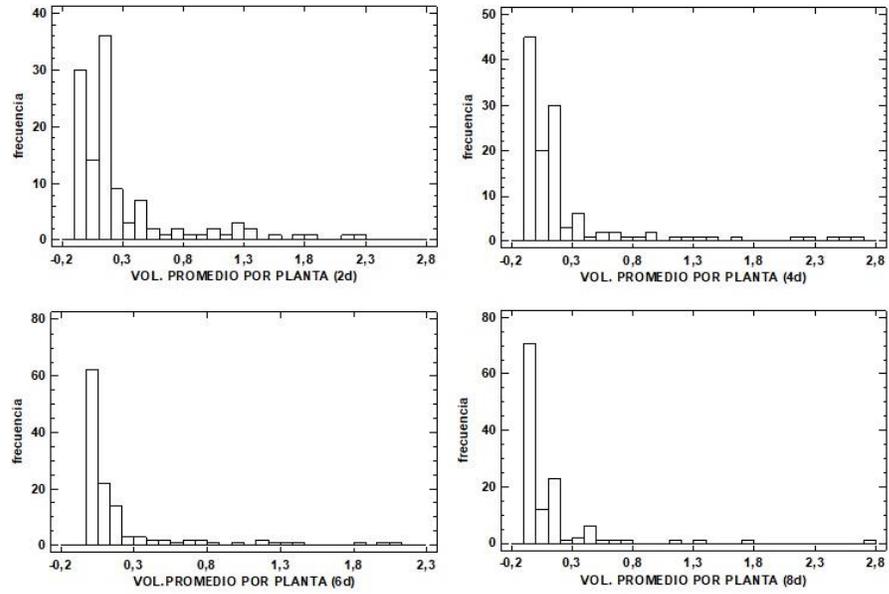


Figura 7.3. Histograma de frecuencias para los volúmenes por planta para cada día de medición, con distribución asimétrica con tendencia a la derecha.

Figura 7.4. Porcentaje de plantas liberando néctar EF para cada fecha de medición.

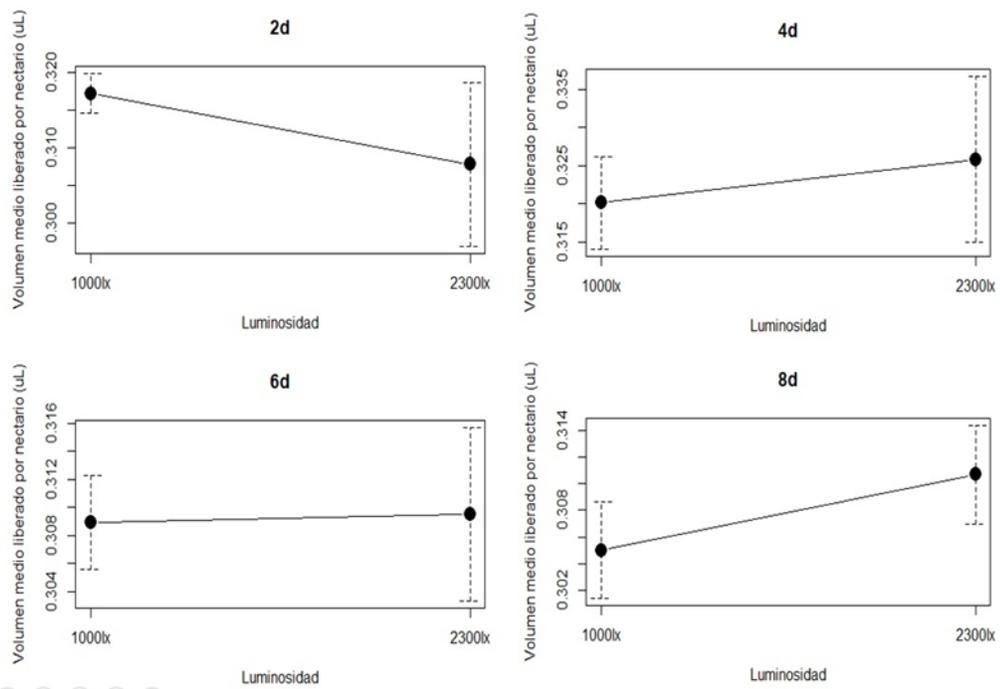


Figura 7.5. Efecto de dos intensidades de luz sobre el volumen medio recolectado por nectario para cada día de muestra. Las barras muestran el error estándar.