



TESIS O PROYECTO DE CREACIÓN

APROBADO COMO REQUISITO PARCIAL DEL
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE HONOR

COMITÉ DE TESIS O
PROYECTO DE CREACIÓN

NOMBRE

FIRMA

Mentor

José C. Verle Rodríguez

Director de Estudios

Ivelisse Rubio Canabal, Ph.D.

Lector

Eugenio Santiago Valentín

Lector

James Ackerman, Ph.D.

Lector

Visto Bueno

Elaine Alfonso Cabiya, Ed.D.
Director PREH o su Representante

10 de mayo de 2021

Fecha

Universidad de Puerto Rico

Recinto de Río Piedras

Programa de Estudios de Honor

Efecto de un hiperparasitoide en la implementación de un programa de control biológico de
Hypogeococcus sp. por parasitoides



Comité

Mentor: Dr. José C. Verle Rodrigues

Lectores: Dr. Eugenio Santiago, Dr. James D. Ackerman y Dra. Ivelisse Rubio

19 de mayo de 2021

Tabla de contenido

Resumen	3
I. Introducción	4
Objetivos	7
Preguntas de investigación	7
Definiciones	8
II. Teoría y revisión de literatura	8
Hiperparasitoides en control biológico	8
Deficiencias de estudios en estructuras simples	9
Hipótesis	10
Justificación	11
III. Metodología	11
Experimento I. Biología de <i>Chartocerus niger</i> asociado a <i>Leptomastidea hypogeococci</i>	11
Experimento II. Biología de <i>Chartocerus niger</i> asociado a <i>Leptomastidea hypogeococci</i> con modificaciones	13
Experimento III. Supervivencia de <i>Chartocerus niger</i> y <i>Leptomastidea hypogeococci</i>	14
Experimento IV. Biología de <i>Chartocerus niger</i> asociado a <i>Leptomastidea hypogeococci</i> con modificaciones y dieta	15
Experimento V. Tamaño y densidad poblacional, y parasitismo de <i>Hypogeococcus</i> sp. en Puerto Rico	15
Localidades de estudio y material recolectado	16
Procesamiento de muestras	20
Análisis de datos	21
IV. Resultados	22
Experimento I	22
Experimento II	22
Experimento III. Supervivencia de <i>Leptomastidea hypogeococci</i> y <i>Chartocerus niger</i>	23
Experimento IV	25
Experimento V	25
V. Discusión	29
I.	29
II.	30
Recomendaciones	32

Resumen

El chinche harinoso de los cactus, *Hypogeococcus* sp., es una amenaza para las especies de cactus en Puerto Rico, donde se está desarrollando un programa de control biológico usando parasitoides para controlar esta especie invasora. Los hiperparasitoides son un componente importante en los programas de control biológico y *Chartocerus niger* es un hiperparasitoide común de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico. En este estudio se investigó la biología de *C. niger* hiperparasitando a *Leptomastidea hypogeococci*, el parasitoide principal de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico. Además, se estudió la sobrevivencia de individuos de *C. niger* y *L. hypogeococci* provenientes del campo y el efecto de la disponibilidad de una dieta de solución de miel. Los individuos de *L. hypogeococci* emergieron mayormente entre 25 y 40 días luego de ovopositar a *Hypogeococcus* sp. No se logró reproducir a *C. niger*. La dieta de solución de miel aumentó significativamente la sobrevivencia a hembras de *L. hypogeococci* y *C. niger*, pero no la sobrevivencia de machos de *L. hypogeococci*.

También se realizó la primera determinación del tamaño y la densidad total de la población de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico y su tasa de parasitismo e hiperparasitismo en el campo. Analizando malformaciones de tres especies de cactus, causadas por *Hypogeococcus* sp., encontramos en promedio un total de 149,055 individuos de *Hypogeococcus* sp. por kilogramo de tejido de cactus; de los cuales 63% están en el primer estadio, 22% en el segundo estadio, 12% en el tercer estadio, 2% son hembras adultas, y 1% son hembras adultas en periodo reproductivo. Además de encontrar a *L. hypogeococci* y *C. niger*, se encontró una especie no-reportada hiperparasitoide de *Hypogeococcus* sp. Nuestros resultados estiman la tasa de

parasitismo e hiperparasitismo de *Hypogeococcus* sp. en 0.04% y 4%, respectivamente, en tres especies distintas de cactus en Puerto Rico. Esta información es vital para el manejo de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico.

I. Introducción

El chinche harinoso de los cactus, *Hypogeococcus* sp. (HCM), es una plaga invasiva originaria de Sudamérica devastadora de cactus en Puerto Rico. Su colonización causa cambios fisiológicos, malformaciones, en el tejido de los cactus que progresan hasta su muerte (Carrera-Martinez et al. 2015, La Quay et al. 2015). Estudios biológicos y moleculares determinaron que HCM originó en Brasil por un solo evento de invasión y es diferente a otros *Hypogeococcus* sp. que se alimentan de especies de las familias Amaranthaceae y Portulacaceae (Aguirre et al. 2016, Poveda-Martinez et al. 2020). El HCM fue inicialmente observado en la naturaleza en Puerto Rico infestando cactáceas en Guánica en 2005 (Zimmermann et al. 2010, Segarra-Carmona et al. 2010); ahora se encuentra en todo el ecosistema seco del sur de la Isla. En el 2015 se confirmó que logra infestar siete especies de cactus nativos: *Pilosocereus royenii*, *Leptocereus quadricostatus*, *Stenocereus fimbriatus*, *Harrisia portoricensis*, *Leptocereus grantianus*, *Hylocereus trigonus*, y *Melocactus intortus* (Carrera-Martínez et al. 2015).

Las plantas de la familia Cactaceae son plantas ecológicamente importantes en Puerto Rico. Son fuente de alimento para aves, de las que se destaca la mariquita de Puerto Rico, *Agelaius xanthomus*, un ave en peligro de extinción que además se ha observado anidando en los cactus (Barnés 1946). Las cactáceas también brindan néctar a varios animales y favorecen polinización cruzada mediada por una amplia gama de polinizadores como murciélagos, zumbadores y abejas carpinteras. Sin embargo, en ausencia de vectores, puede ocurrir auto

polinización mediada por el viento, mejor conocida como anemofilia (Rivera-Marchand & Ackerman 2006, Rojas-Sandoval & Meléndez-Ackerman 2009, Fagua & Ackerman 2011). Hay 17 cactáceas nativas, de las cuales dos son endémicas a la plataforma de Puerto Rico y tres están restringidas al archipiélago de Puerto Rico, estas últimas son: *H. portoricensis*, *L. quadricostatus* y *Opuntia borinquensis* (Acevedo-Rodríguez & Strong 2012). Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés), dos especies endémicas están en peligro de extinción: *Leptocereus quadricostatus* y *L. grantianus*. El U.S. Fish & Wildlife Service además incluye a *Harrisia portoricensis* (Gann & Taylor 2013, Taylor 2013). De forma similar, el valor ecológico de los cactus en Puerto Rico se torna más apremiante cuando se consideran las proyecciones sobre disminución en precipitación pluvial anual y aumento en temperatura promedio, así como frecuencias de eventos de sequía. Los modelos proyectan que como resultado los ecosistemas de bosque seco aumentarán considerablemente, reemplazando a los bosques húmedos subtropicales en la Isla entre el 2071 y 2099 (Khalyani et al. 2016).

Con la intención de mitigar daños de la invasión de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico, se ha establecido un programa de control biológico donde se introducirán dos parasitoides de *Hypogeococcus* sp. nativos de Argentina de (Triapitsyn et al. 2018). Un control biológico es una medida necesaria tomada cuando la proliferación de un organismo en un ecosistema altera el funcionamiento de este ecosistema. Esta medida puede ser impulsada cuando se observan consecuencias en intereses humanos como la agricultura, el turismo, la infraestructura y la seguridad de la sociedad. Los programas de control biológico clásicos utilizan frecuentemente insectos parasitoides como agentes de control biológico debido a su eficiencia reproductiva y alta especificidad de rango de hospederos. Los parasitoides a su vez tienen depredadores e hiperparasitoides (parasitoides secundarios).

Los hiperparasitoides son organismos que aprovechan la larva de un parasitoide primario que ya se desarrollaba en un huésped. En otras palabras, el hiperparasitoide es el cuarto nivel trófico en el sistema que incluye a la planta, el herbívoro (en nuestro caso, el chinche harinoso), el parasitoide y el hiperparasitoide. Los hiperparasitoides pueden ser obligados o facultativos. Un hiperparasitoide obligado solamente puede ser parte del cuarto nivel trófico del sistema anteriormente mencionado, uno facultativo puede ocupar el tercer (parasitoide) y cuarto nivel (hiperparasitoide), dependiendo de las condiciones presentes (Sullivan & Völkl 1999). Así mismo hay una vasta terminología que describe las diferencias en la forma de parasitar y cómo se alimentan sus larvas, entre otras. La presencia de hiperparasitoides puede disminuir, incluso anular la efectividad del parasitoide como agente de control biológico (Brodeur & McNeil 1994, Schooler et al. 2011). El ciclo de vida de hiperparasitoides se ha estudiado en algunos programas de control biológico. Ejemplos comunes son el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* y la cochinilla de la yuca, *Phenacoccus manihoti* (Goergen & Neuenschwander 1994, Bistline-east & Hoddle 2014, Bistline-East & Hoddle 2015). No obstante, históricamente no se ha enfatizado la investigación en los hiperparasitoides más allá de la identificación, por lo que actualmente se discute incluir el control de hiperparasitoides en el manejo integrado de plagas para asegurar el éxito del control biológico (Tougeron & Tena 2019).

En un censo realizado por el proyecto desde enero 2018 hasta febrero del 2019, se demostró que *Chartocerus niger* es el hiperparasitoide más frecuente en Puerto Rico (West et al., datos no publicados). El hiperparasitoide se ha encontrado en varias localidades del sur de Puerto Rico: Guánica, Cabo Rojo y Salinas, además demuestra emergencia múltiple (Triapitsyn et al. 2020), con observaciones de hasta siete avispas emergiendo de un huésped de HCM (West et al., datos no publicados). *Chartocerus niger* tiene una amplia distribución, se ha encontrado en

América del Norte, el Caribe, Sudamérica, África, Europa y Rusia (Bernal 2000, Prado et al. 2015, Noyes 2015, Abd-Rabou & Evans 2016). Su función ecológica podría ser clave posiblemente afectando negativamente el desarrollo del programa de control biológico de HCM.

Objetivos

Se estudió la biología de *Chartocerus niger* (Hymenoptera: Signiphoridae) con el propósito de:

1. Entender aspectos básicos de la biología del hiperparasitoide *Chartocerus niger*.
2. Conocer relación entre *Chartocerus niger* y *Leptomastidea hypogeococci*, el parasitoide más frecuente de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico.
3. Estudiar la interacción entre *Chartocerus niger* y el parasitoide candidato a la introducción, *Anagyrus cachamai*.

Preguntas de investigación

1. ¿Puede *C. niger* parasitar directamente a *Hypogeococcus* sp.?
2. ¿Puede *C. niger* parasitar a *A. cachamai* y/o a *L. hypogeococci*? ¿Cuál es el ciclo de vida de *C. niger* luego de ovoposición a ambos parasitoides? ¿Cuál es la razón de sexo de emergencia en ambas situaciones?
3. La hembra de *C. niger*, ¿es capaz de reproducirse sin apareamiento (partenogénesis)? Si logra esto, ¿cuánto tiempo tarda en emerger y cuál es la naturaleza de este fenómeno? Se estudiará comparativamente con *L. hypogeococci* y *A. cachamai*.
4. ¿Cuál es la longevidad de machos y hembras de *C. niger*? ¿Cuánto viven los adultos fecundados y no fecundados?
5. ¿Cuál huésped prefiere parasitar *C. niger* entre *L. hypogeococci* y *A. cachamai*? ¿Hay un factor de adaptación hacia el parasitoide *A. cachamai*?

Definiciones

- **Programa de control biológico.** Utilización de uno o varios organismos para disminuir la población de otra especie por medio de interacciones de depredación, parasitismo, competencia o simbiosis.
- **Agente de control biológico.** Organismo utilizado para disminuir poblaciones de plaga.
- **Herbívoro.** Organismo que se alimenta de plantas.
- ***Hypogeococcus* sp.** Nombre científico de insecto invasivo considerado como una plaga de cactus en Puerto Rico.
- **Parasitoide.** Insecto que depende de otro organismo para completar parte de su ciclo de vida, deposita huevos en (ecto) o dentro del huésped (endo), comúnmente causándole la muerte.
- ***Leptomastidea hypogeococci.*** Parasitoide principal de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico.
- ***Anagyrus cachamai.*** Parasitoide de *Hypogeococcus* sp. nativo de Argentina y candidato a introducción a Puerto Rico como agente de control biológico.
- **Hiperparasitoide.** Insecto que completa parte de su ciclo de vida en o dentro de una larva de un parasitoide, la cual se encuentra en o dentro del huésped primario.
- ***Chartocerus niger.*** Avispa encontrada en Puerto Rico, clasificada preliminarmente como hiperparasitoide o parasitoide secundario.

II. Teoría y revisión de literatura

Hiperparasitoides en control biológico

La presencia de hiperparasitoides se puede considerar destructiva en un primer instante para un programa de control biológico (Schooler et al. 2011, Nofemela 2013, Tougeron & Tena

2019). Sin embargo, Rosenheim argumenta que los hiperparasitoides en algunas ocasiones podrían beneficiar a los controles biológicos impidiendo que oscilen demasiado las poblaciones de parasitoides y herbívoros (Rosenheim 1998). Un fenómeno que apoya este argumento surge cuando se observó cómo los parasitoides responden a la densidad de parasitismo. El parasitoide no explota un área con muchos herbívoros para evitar el sobre hiperparasitismo de su progenie, el cual depende de la densidad, sino que busca otros hospederos (Rosenheim 1998, Frago 2016, Tougeron & Tena 2019). No acabar la población del hospedero es importante para la sobrevivencia de la población del parasitoide. Para los programas de control biológico, el fin es acabar o reducir substancialmente la población de un hospedero. En esta situación, la presencia de un hiperparasitoide puede resultar negativa para un programa de control biológico.

Se puede inferir el impacto de un hiperparasitoide estudiando su fecundidad y su longevidad, como fue demostrado por el experto en parasitoides de áfidos Brodeur y su colaborador McNeil en estudios hechos sobre el control biológico del áfido de las papas en Canadá en el año 1994. Una fecundidad baja del hiperparasitoide indica que este no hará mucho daño, pero lo opuesto no significa que será muy dañino al programa de control biológico (Brodeur & McNeil 1994). No encontramos literatura que mencione las dinámicas del cambio de huésped de un hiperparasitoide.

Deficiencias de estudios en estructuras simples

La mayoría de los estudios sobre las consecuencias de un hiperparasitoide sobre un control biológico son realizados en estructuras simples con cuatro niveles tróficos, entiéndase: planta, herbívoro, parasitoide e hiperparasitoide (Brodeur & McNeil 1994, Goergen & Neuenschwander 1994, Askar & El-Husseini 2016, Bistline-East & Hoddle 2014). Estudios en laboratorios pueden demostrar que un hiperparasitoide puede incluso extinguir a un parasitoide.

Estos estudios son, sin embargo, con estructuras simples que no reflejan el impacto del hiperparasitoide en un control biológico (Schooler et al. 2011). Una investigación hecha por Nofemela (2013) en Sudáfrica, reporta que en los sistemas complejos puede haber otros parasitoides que no son vulnerables al hiperparasitoide, estos proliferan cuando la población del hiperparasitoide aumenta, lo que en un efecto neto del hiperparasitoide sobre la plaga. No obstante, en un artículo de Harvey et al. (2014), se prueba que los hiperparasitoides de una comunidad separan sus nichos a escala espacial para coexistir. Por otra parte, en una colaboración de investigadores de Australia y Wisconsin, E.U., Schooler et al. (2011) argumentan que perturbaciones en el ecosistema, como una cosecha en este caso, es otro factor que puede impedir el desarrollo de la población del hiperparasitoide. Debido a todas las variables en la naturaleza que pueden invalidar resultados de experimentos con estructuras simples, Frago recomienda los experimentos con estructuras complejas para así tener una mejor idea de la importancia del hiperparasitoide en la comunidad (Frago 2016). Este tipo de estudios debería ocurrir luego de que el investigador confirme que el hiperparasitoide puede utilizar a los agentes de control biológicos, en este caso a *L. hypogeococci* y *A. cachamai*, para un mayor entendimiento de las posibles consecuencias de *C. niger* en Puerto Rico.

Hipótesis

Hipótesis 1 - *Chartocerus niger* resultará ser un hiperparasitoide obligado de *L. hypogeococci* y *A. cachamai*. Esto significa que no puede parasitar directamente a *Hypogeococcus* sp. pero sí logra parasitar a *L. hypogeococci* y *A. cachamai*.

Hipótesis 2 - *Chartocerus niger* es capaz de reproducirse por partenogénesis en *L. hypogeococci* y *A. cachamai*. Esto significa que las hembras pueden reproducirse sin apareamiento.

Justificación

El estudio de varios factores del hiperparasitoide asociados a su impacto en el programa de control biológico aportaría en la conservación de los cactus y otras plantas en Puerto Rico, así como en todos los programas de control biológicos utilizando parasitoides. La innovación de este estudio yace en que se estudiará la biología del hiperparasitoide principal antes de introducir el agente de control biológico; esto permitirá definir el impacto del hiperparasitoide al introducir el agente candidato de control biológico. Los programas de control biológico frecuentemente son aplicados en campos agrícolas como alternativa a otros medios de control de plagas, como plaguicidas químicos y quema de cultivos, los cuales son más dañinos al medio ambiente. Por esta razón, esta investigación tendrá repercusiones prácticas en la conservación, la agricultura (especialmente la agroecología) y la seguridad alimentaria. De igual manera, del punto de vista científico, es un reto académico considerable estudiar una especie poco conocida y una interacción multitrófica tan compleja.

III. Metodología

Experimento I. Biología de *Chartocerus niger* asociado a *Leptomastidea hypogeococci*

Para estudiar la biología de *C. niger* asociado al parasitoide *L. hypogeococci*, se realizaron viajes de campo a Salinas (18.041685, -66.22554) y Guánica (17.95666, -66.85515), en Puerto Rico, para obtener malformaciones del cactus *Pilosocereus royenii*. Estas malformaciones son producto de la presencia de *Hypogeococcus* sp. (HCM). Se disecaron los pedazos de cactus bajo un estereoscopio en el laboratorio para encontrar hembras grávidas de HCM. Se trasladaron aproximadamente 40 hembras de HCM a esquejes de *Leptocereus quadricostatus* (12 esquejes en total). Luego, cada esqueje se colocó individualmente en una caja rectangular hermética (Rubbermaid TakeAlongs® Large Rectangle 1gallon Mod).

7A96RETCHEL, USA), tapada con una malla de nilón y se mantuvo en una incubadora (Panasonic Versatile Environmental Test Chamber Mod. MLR-352H-PA, Japón) a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, humedad relativa de $58\% \pm 5$, y periodo de 12:12 (luz: oscuridad). Estas hembras produjeron ninfas de HCM que seguramente no fueron parasitadas en el campo. Luego de aproximadamente 4 días se contaron 45 ninfas en primer y segundo estadio que estuvieran asentadas y alimentándose (no en movimiento). Se removió toda ninfa adicional y se transfirió a otro esqueje, así como hembras de HCM.

Por otra parte, de nuestra colonia de *Leptomastidea hypogeococci* se obtuvieron individuos de *Hypogeococcus sp.* con síntoma de parasitismo. Estos se guardaron en cápsulas de gelatina (Capsule Connection, Empty Capsules "O", USA), se insertaron cuales fueron insertadas en tubos de ensayo cubiertas con algodón, que se examinaron diariamente hasta observar la emergencia de machos y hembras del parasitoide. Al emerger una hembra de *L. hypogeococci*, esta se colocó en una placa Petri con miel en el fondo junto a varios machos de *L. hypogeococci*, y se tapó por un día para aumentar la probabilidad de apareo. Luego, la hembra de *L. hypogeococci* se introdujo a la caja, que contiene 45 ninfas de HCM, por un promedio de 22 horas, y se removió. Después de un máximo de dos días luego de remover a *L. hypogeococci*, se colocó una hembra de *Chartocerus niger* en la misma caja por un promedio de 24 horas. Cada *C. niger* provenía de una colonia asociado a *L. hypogeococci* y se recuperó de la colonia por medio de individuos de HCM con síntoma de parasitismo aislados en capsulas de gelatina. Solo una hembra de *C. niger* tuvo contacto con un macho, el resto (3) no.

Al transcurrir un mínimo de 14 días desde la introducción de *L. hypogeococci*, se reviso la caja y se encapsularon todos los individuos de HCM que se encontraron con síntoma de parasitismo. Luego, semanalmente se inspeccionó para buscar HCM con síntoma de parasitismo.

Las cápsulas de gelatina se introdujeron a tubos de ensayos, tapados con algodón y colocados en la misma incubadora. Las cápsulas se revisaron semanalmente esperando la emergencia de *L. hypogeococci* o *C. niger*.

Experimento II. Biología de *Chartocerus niger* asociado a *Leptomastidea hypogeococci* con modificaciones

Debido a que *C. niger* no emergió del Experimento I, se repitió el procedimiento de la metodología anterior con las siguientes tres diferencias:

-Del material del campo también se aspiraron individuos vivos del parasitoide *L. hypogeococci* y el hiperparasitoide *C. niger*, en vez de obtenerla mediante *Hypogeococcus* sp. con síntomas de parasitismo.

-Se introdujeron tres hembras y tres machos de *L. hypogeococci* a las cajas por 2-3 días. Esto con el propósito de que emerjan más hembras de *L. hypogeococci*, que las que se obtuvieron en el experimento pasado.

-Luego de remover *L. hypogeococci*, se esperaron distintos tiempos para introducir al hiperparasitoide *Chartocerus niger*. El tiempo entre introducir el parasitoide primario *L. hypogeococci* e introducir el hiperparasitoide *C. niger*, determina el tiempo y etapa de desarrollo del endoparasitoide de *L. hypogeococci* dentro de HCM. El endoparasitoide de *L. hypogeococci* en el Experimento I tenía solamente 1-3 días y no emergió *C. niger*. por lo que se aumentaron los días de la siguiente manera:

- tres repeticiones de endoparasitoide con 7 días,
- cuatro repeticiones de endoparasitoide con 12 días,
- tres repeticiones de endoparasitoide con 18 días,

bajo condiciones similares: temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, humedad relativa de $59\% \pm 12$, y periodo de 12:12 (luz: oscuridad).

Experimento III. Supervivencia de *Chartocerus niger* y *Leptomastidea hypogeococci*

Se estudió la supervivencia de *C. niger* y *L. hypogeococci* con la disponibilidad de una dieta de solución de miel para conocer si esto es un factor importante en la longevidad, y fecundidad. Este experimento se dividió en tres grupos: 1. Hembras de *Leptomastidea hypogeococci*, 2. Machos de *L. hypogeococci*, y 3. Hembras de *Chartocerus niger*. Primero, se recolectaron malformaciones de *Pilosocereus royenii* en Salinas (18.041685, -66.22554) con presencia de *Hypogeococcus* sp. Se escogió Salinas porque allí se han encontrado consistentemente las especies de interés. Las malformaciones se mantuvieron en una jaula con malla de nilón al aire libre y cubierto de la lluvia para observar la emergencia de parasitoides e hiperparasitoides. Se obtuvieron ejemplares de cada especie por el método de aspirado y se colocaron individualmente dentro de viales (Genesee Scientific, Drosophila Vials Narrow, USA), cubiertos con tapa porosa (Genesee Scientific, Flugs for Narrow Vials, USA) y en bandejas (Genesee Scientific, Narrow Fly Vial Reload Tray, USA). Cada grupo se dividió y se designó como “dieta” y “no-dieta”. Al grupo con dieta se les proveyó una solución de miel y agua destilada (1:1), humedeciendo un papel de filtro con tal solución. No fue necesario humedecer el papel de filtro nuevamente con la solución ya que se podían observar gotas de la solución en los tubos hasta terminar el experimento. El grupo sin dieta fue el grupo control y no se le suplió ningún alimento.

El experimento se mantuvo en una incubadora (Panasonic Versatile Environmental Test Chamber Mod. MLR-352H-PA, Japón) a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 0.2$, humedad relativa de $29\% \pm 7$, y periodo de 12:12 (luz: oscuridad) por 7 días. Esto se revisó diariamente para

determinar la fecha de muerte. Siempre fue acompañado con un sensor de temperatura y humedad relativa (Onset, HOBO U23 Pro v2 Temperature/RH Data Logger, USA). Sin embargo, luego en el 17 de marzo de 2020, el experimento se trasladó a mi casa debido al toque de queda implementado por la pandemia provocada por el COVID-19. El experimento fue colocado en un área fresca por 70 días donde obtuvo luz natural, y siempre fue acompañado por el sensor de temperatura y humedad relativa. La temperatura fue $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y humedad relativa de $65\% \pm 9$.

Experimento IV. Biología de *Chartocerus niger* asociado a *Leptomastidea hypogeococci* con modificaciones y dieta

Debido a que no emergió *C. niger* en el Experimento II, se repitió el procedimiento del Experimento II con los siguientes cambios:

-Se mantuvo en un cuarto fresco a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0.6$ y humedad relativa $55\% \pm 6$, 12:12 (luz: oscuridad).

-Luego de remover *L. hypogeococci*, se introdujo una hembra de *C. niger* al mismo día.

-El *C. niger* se removió dos días luego de ser introducido ($n= 3$); para otro tratamiento el *C. niger* fue dejado por vida ($n= 4$); y en el tercer tratamiento no se introdujo *C. niger* luego de remover al *L. hypogeococci* ($n= 3$). A todos los tratamientos se les proveyó continuamente una dieta con una solución de miel y agua destilada [1:1], ya que probamos que aumenta la longevidad de los parasitoides e hiperparasitoides en el Experimento III.

Experimento V. Tamaño y densidad poblacional, y parasitismo de *Hypogeococcus* sp. en Puerto Rico

En los tres intentos para estudiar la biología del hiperparasitoide *C. niger* con *L. hypogeococci* como parasitoide primario, no se logró progenie de *C. niger*. Se decidió entender mejor la situación en el campo. Ningún estudio ha estimado el tamaño, la densidad, y la tasa de

parasitismo e hiperparasitismo de la población de *Hypogeococcus* sp. (HCM) en Puerto Rico. Con este estudio atendemos esta falta de conocimiento.

Localidades de estudio y material recolectado

El 14 de noviembre de 2020, se recolectó material vegetativo en el Bosque Estatal de Guánica, en el municipio de Guánica, Puerto Rico, de tres especies de cactus: *Stenocereus fimbriatus*, *Pilosocereus royenii*, y *Leptocereus quadricostatus*. Cada especie se encontraba en una localidad distinta dentro de las inmediaciones del Bosque Estatal de Guánica. La especie de cactus columnar se encontraba bajo sol directo en una cuesta (17.9578056,-66.8718139) con una altura aproximada de 51 metros sobre el nivel del mar (Fig. 1 A, D). Por su parte, *L. quadricostatus* se encontró en el área de la playa Jaboncillo (17.953775,-66.9034472) a una altura aproximada de 19 metros sobre el nivel del mar, bajo la cubierta del bosque en las inmediaciones de la playa Jaboncillo (Fig. 1 B, E). Finalmente, *P. royenii* se encontró cerca de la playa Ballena (17.9568917,-66.8562778) a una altura de aproximadamente 10 metros sobre el nivel del mar, en el borde del bosque cercano a la carretera bajo una cubierta leve de sombra (Fig. 1 C, F).



Fig. 1. Localidades de recolecta de malformaciones de tejido de cactus, causado por *Hypogeococcus* sp., de tres especies: *Stenocereus fimbriatus* (A), *Leptocereus quadricostatus* (B), *Pilosocereus royenii* (C).

Las estructuras recolectadas de los cactus como unidad de muestreo fueron malformaciones, o intumescencias, creadas por la presencia de HCM. Estas se colocaron en bolsas de papel individuales y se transportaron al laboratorio en una caja insulated. Las malformaciones se recolectaron enteras (sin cortar o dividir) y se clasificaron en distintas unidades de muestreo por especie para simular las agregaciones de HCM en el campo. Por esto, los pesos de las unidades de muestreo varían. Se obtuvieron tres unidades de muestreo de *S. fimbriatus* (Fig. 2 A), tres de *P. royenii* (Fig. 2 B), y cuatro de *L. quadricostatus* (Fig. 2 C).





Fig. 2. Cuatro puntos de vista de las maformaciones de tejido de cactus, causado por *Hypogeococcus* sp., de cada especie recolectada: *Stenocereus fimbriatus* (A), *Leptocereus quadricostatus* (B), *Pilosocereus royenii* (C). Barras verticales blancas de la primera columna miden aproximadamente 1 m cada una, y barras horizontales negras de la segunda columna miden 5 cm cada una.

Procesamiento de muestras

Cada unidad de muestreo fue primero disecada bajo estereoscopio para encontrar todos los individuos de HCM con síntoma de parasitismo. Estos individuos obtenidos fueron encapsulados en cápsulas de gelatina (Capsule Connection, Empty Capsules “O”, USA) y colocados en una incubadora (Panasonic Versatile Environmental Test Chamber Mod. MLR-352H-PA, Japón) junto a un sensor de temperatura y humedad relativa (Onset, HOBO U23 Pro v2 Temperature/RH Data Logger, USA) por 84 días a una temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.8$, humedad relativa de $40\% \pm 24$, y periodo de 12:12 (luz: oscuridad) para observar la emergencia de parasitoides e hiperparasitoides. Luego de disecar las unidades de muestreo, se colocaron en cajas por 44 días para observar la emergencia de parasitoides o hiperparasitoides, para detectar cualquier HCM parasitado que no había demostrado síntomas de parasitismo al momento de disección.

Después, para separar los individuos de HCM de los cactus en cada unidad de muestreo, se enjuagaron los pedazos disectados en una solución de jabón y se filtraron por una columna de tamices de 4mm a 0.125mm (TestSieve KimLab ASTM E11). En el tamiz más pequeño se recolectaron los individuos de HCM. Este proceso se repitió tres veces con cada pedazo disecado por unidad de muestreo, para asegurar la separación del HCM de las malformaciones de cactus. Los individuos de HCM recolectados se mantuvieron en alcohol 60%. Al momento de contar los individuos de HCM en cada unidad de muestreo, se homogenizó la muestra y se transfirió la solución conteniendo la población de HCM equitativamente en tres placas de Petri grandes con cuadrantes. En cada placa de Petri, se seleccionaron cinco cuadros aleatoriamente, donde se contó el total de individuos de HCM por estadio más las adultas grávidas bajo un estereoscopio. Los chinches harinosos tienen tres estadios de ninfas, la adultez es el cuarto estadio. Decidimos

también contar las adultas hinchadas, que significa que se encuentran en el periodo reproductivo (Fig. 3).

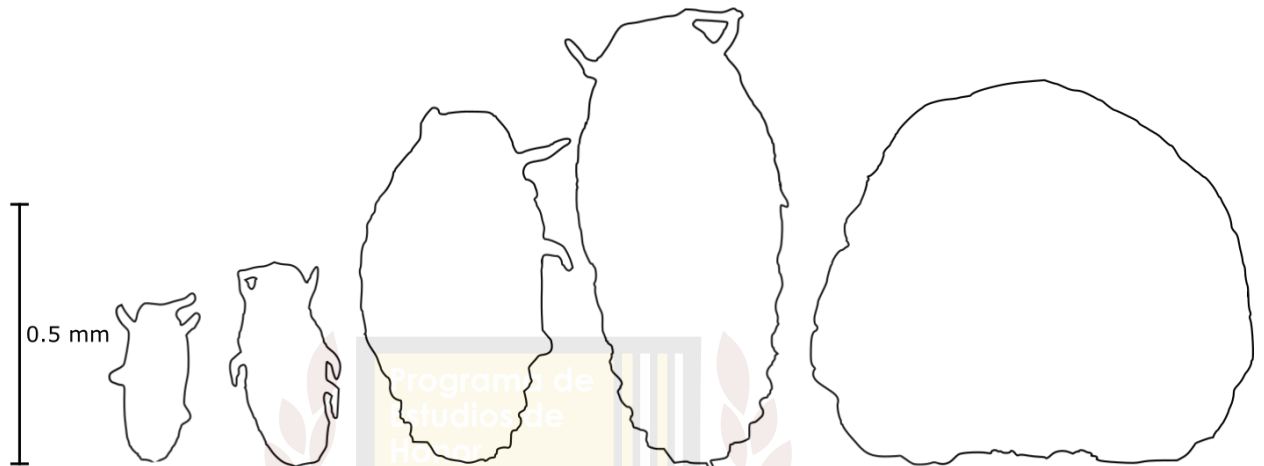


Fig. 3. Cinco estadios de *Hypogeococcus* sp. contados en este estudio. De izquierda a derecha: primer estadio de ninfas, segundo estadio de ninfas, tercer estadio de ninfas, hembra adulta, hembra adulta en periodo reproductivo.

Análisis de datos

Se utilizó el programa R (R Core Team, 2020) para el análisis de datos. Todos los datos fueron extrapolados a 1 kilogramo de malformación de cactus. En el conteo de individuos de HCM por unidad de muestreo, antes de normalizar a 1 kilogramo, se obtuvo la media de los 15 cuadros contados, esto se multiplicó por el área relativa de un cuadro a la placas de Petri grandes con cuadrantes y luego por tres, ya que la muestra se dividió en tres.

Luego, para realizar pruebas estadísticas paramétricas y cumplir con el requisito de una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica ($\ln + 1$) a los datos. La distribución normal de los valores transformados fue confirmada visualmente con gráficas y con

la prueba estadísticas de normalidad Shapiro. La varianza equitativa también fue confirmada con las pruebas estadísticas Levene, y Fligner, antes de realizar cualquier prueba de análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés). Se realizó una prueba de ANOVA bidireccional para conocer los efectos de las especies de cactus y los distintos estadios de HCM y su interacción en el número de individuos de HCM. Finalmente, se realizaron pruebas de ANOVA unidireccional para conocer si hay diferencia significativa, de acuerdo con el umbral de *p valor* 0.05, entre las especies de cactus y los individuos de HCM, entre los estadios de HCM y los individuos de HCM, y entre las especies de cactus y los individuos de HCM encontrados con síntomas de parasitismo. En las situaciones donde se encontró una diferencia significativa, se realizó la prueba Tukey, que indica entre cuáles grupos hubo diferencia significativa.

IV. Resultados

Experimento I

No emergió *Chartocerus niger* en ninguna repetición. Se encontraron 56 machos y 6 hembras del parasitoide *Leptomastidea hypogeococci*, brindando una razón de sexo de aproximadamente 9.3:1 (M:H).

Experimento II

En total emergieron 61 machos y 31 hembras del parasitoide *Leptomastidea hypogeococci*, por ende, la razón de sexo fue aproximadamente 2:1 (M:H). En todas las repeticiones hubo emergencia de *L. hypogeococci*, sin embargo, no así para *C. niger* en ninguna repetición. Para *L. hypogeococci*, se puede observar que los machos emergieron en promedio antes que las hembras (Fig. 4). La diferencia entre tiempos de emergencia de machos y hembras del parasitoide *Leptomastidea hypogeococci* no fue significativa ($F(2,7)= 2.697, p= 0.135$).

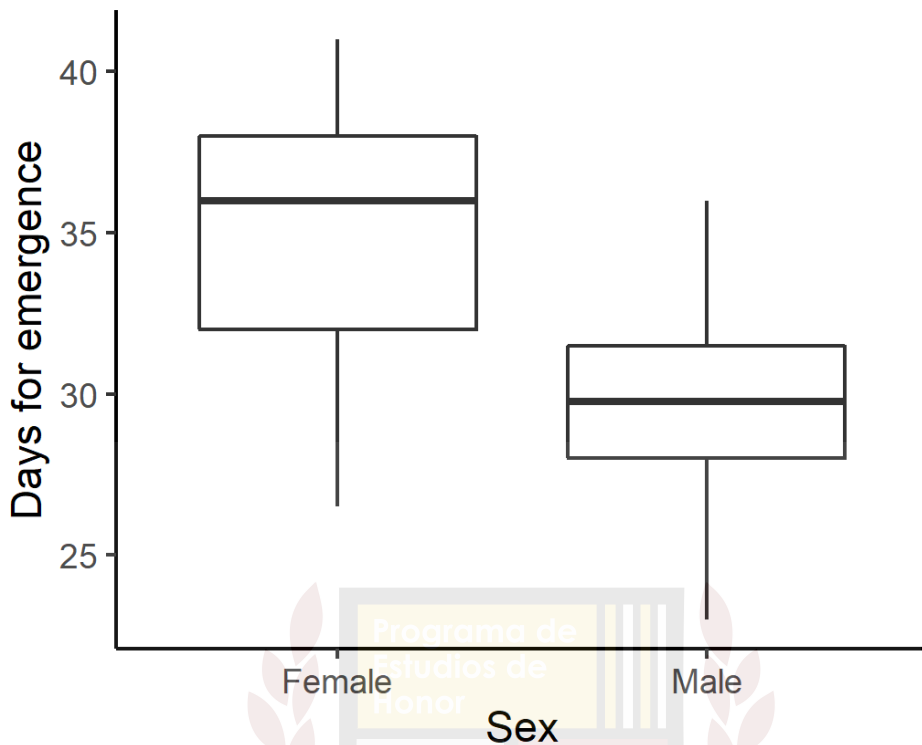


Fig. 4. Tiempo de emergencia, en días, de cada sexo del parasitoide *Leptomastidea hypogeococci* luego de ovoposición en el huésped *Hypogeococcus* sp.

Experimento III. Supervivencia de *Leptomastidea hypogeococci* y *Chartocerus niger*

Proveer una fuente de miel aumentó significativamente el tiempo de vida de las hembras de *L. hypogeococci* ($p < 0.001$) (Fig. 5, A). En el segundo día, la probabilidad de supervivencia de los individuos sin miel disminuyó a 6.6% mientras que individuos con miel se redujo a 60%. Considerando a los machos, aunque el primer día las probabilidades de supervivencia de machos con miel y sin miel disminuyeron a 53% y 20%, respectivamente, la diferencia no fue significativa ($p = 0.05$) (Fig. 5, B). Por otra parte, las hembras de *C. niger* también demostraron un aumento significativo en tiempo de vida (Fig. 5, C) ($p < 0.01$). Los cinco individuos del control (sin miel) murieron a dos días. Sin embargo, tres individuos con miel murieron antes de

los siete días, y los otros cuatro sobrevivieron por más de veinte días, incluso uno sobrevivió 30 días y los otros dos más de 45 días (Fig. 5, C).

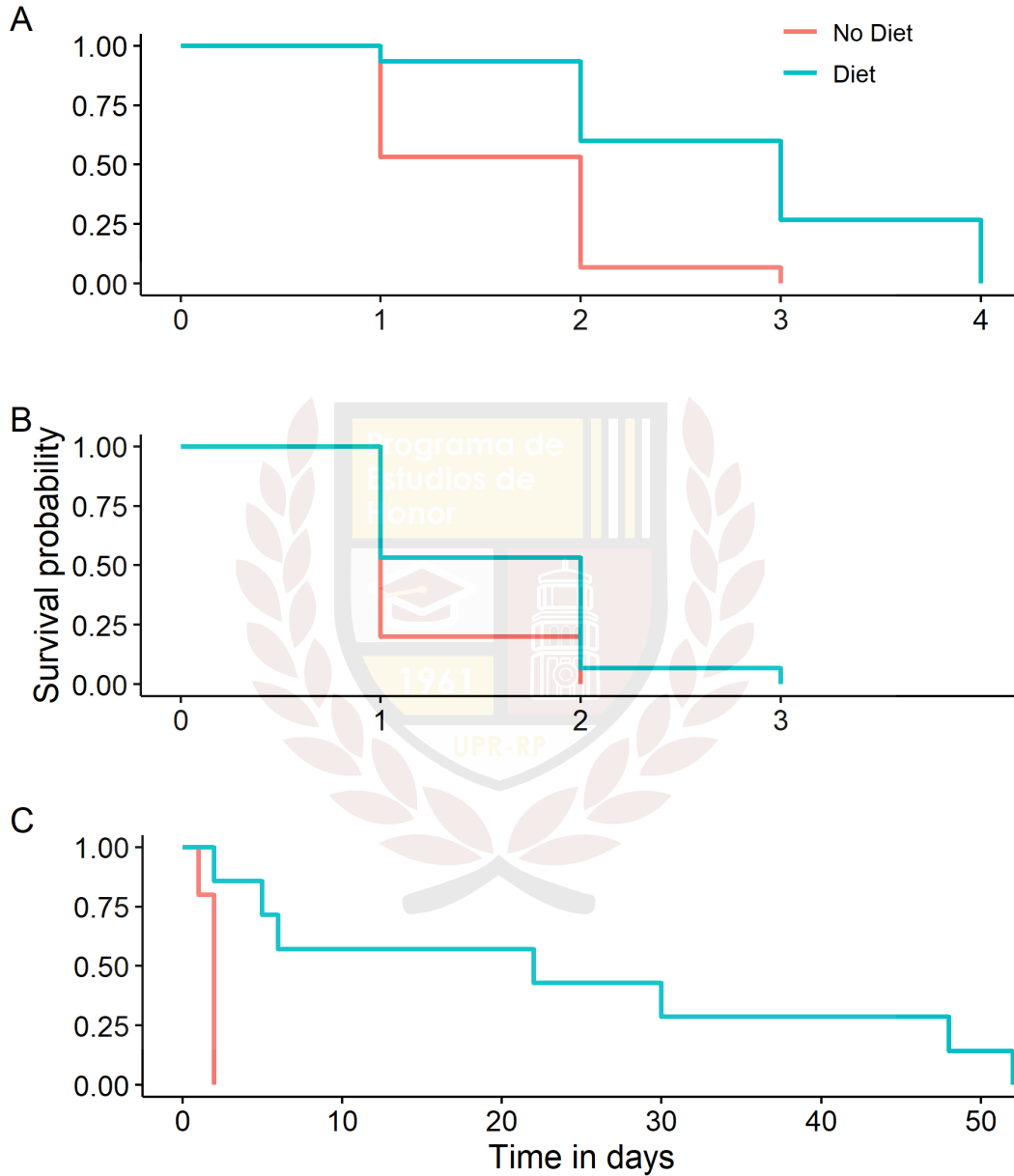


Fig. 5. Tasa de sobrevivencia diaria observada para hembras de *Leptomastidea hypogeococci* (A), machos de *L. hypogeococci* (B), y hembras de *Chartocerus niger* (C) recolectadas del campo. El tiempo fue medido por días. La línea azul indica el tratamiento con

dieta (solución de miel y agua destilada [1:1]). El grupo control se indica en rojo, a estos no se le proveyó dieta. Hubo diferencia significativa entre los grupos con distintas dietas en las hembras de *L. hypogeococci* (A) (Pvalue < 0.001), y en las hembras de *C. niger* (C) (Pvalue < 0.01), mientras que los machos de *L. hypogeococci* no demostraron diferencia significativa (B) (Pvalue = 0.05).

Experimento IV

No emergió *C. niger*. Se encontraron 46 machos *L. hypogeococci* y 18 hembras de *L. hypogeococci* brindando una razón de sexo de 2.5:1 (M:H).

Experimento V

Se obtuvo información cuantitativa sobre los individuos de HCM en una agalla de 1 kilogramo, así como la proporción de los distintos estadios de HCM. En una agalla de 1 kilogramo de cactus infestado con HCM hay 149,055 individuos de HCM, de los cuales 63% están en el primer estadio, 22% en el segundo estadio, 12% en el tercer estadio, 2% en adultez, y 1% en periodo reproductivo de adultez (Tabla 1).

Tabla 1. Individuos de *Hypogeococcus* sp. por kg de malfomación de cactus y su desviación estandar, agrupado por estadios de *Hypogeococcus* sp. Las tres especies de cactus son: *Stenocereus fimbriatus* (A), *Leptocereus quadricostatus* (B), y *Pilosocereus royenii* (C).

Estadio	Especie de cactus			Media (n=10)
	A (n=3)	B (n=4)	C (n=3)	
1	124,581 ±66,041	58,652 ±35,739	111,314 ±22,759	94,229 ±49,769
2	40,466 ±21,911	19,757 ±13,892	42,613 ±15,910	32,827 ±18,830
3	29,866 ±9,094	8,861 ±5,601	16,465 ±1,401	17,444 ±10,666
4	4,748 ±3,307	3,120 ±2,793	2,492 ±1,462	3,420 ±2,533
5	550 ±305	1,421 ±1,246	1,339 ±483	1,135 ±869
Total	200,211 (ns)	91,812 (ns)	174,223 (ns)	149,055

No hubo interacción estadísticamente significativa entre las especies de cactus y los estadios de HCM en el resultado de individuos de HCM por kg de agalla ($F(8,35) = 1.681, p = 0.138$). Además, no hubo un efecto significativo entre las especies de cactus y el número de individuos de HCM ($F(2, 47) = 0.545, p = 0.584$) (Fig. 6A). Por otro lado, hubo un efecto significativo entre los estadios de HCM y los individuos de HCM ($F(4,45) = 56.7, p < 0.000$), excepto entre los estadios 2 y 3 (Fig. 6B).

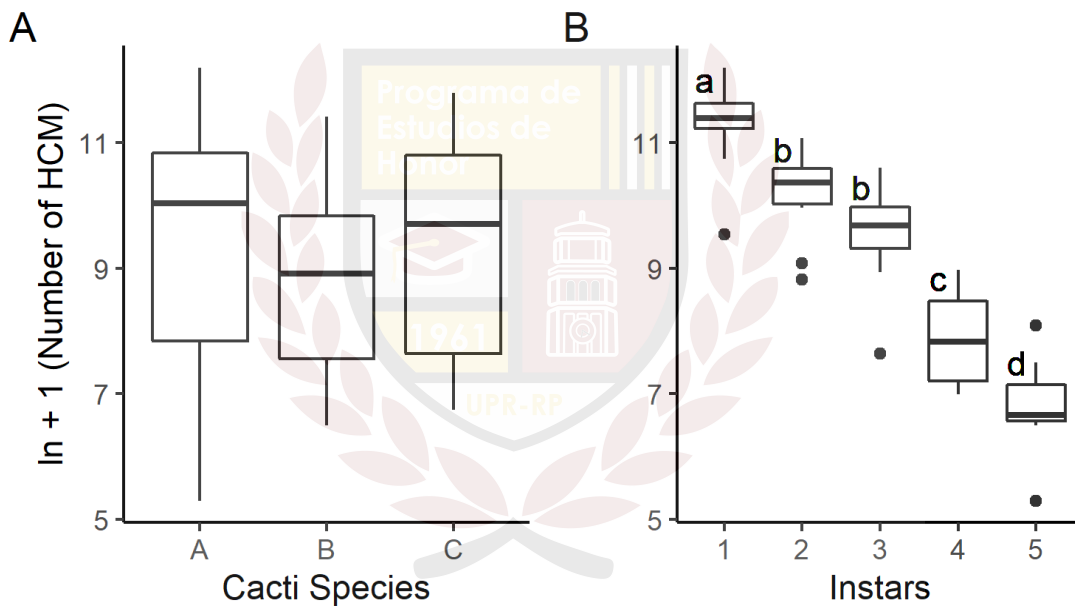


Fig. 6. Boxplots comparando la cantidad de individuos de *Hypogeococcus* sp. encontrados en un kg de malformación de cactus por especie de cactus (A), y estadio (B), con una transformación de logaritmo natural + 1.

La media de individuos de HCM encontrados con síntoma de parasitismo por kg de agalla en *Stenocereus fimbriatus* (n=3) fue 0 ($s=0$), en *Leptocereus quadricostatus* (n=4) fue 110.7 ($s=99.6$), y en *Pilosocereus royenii* (n=3) fue 140.7 ($s=194.5$); según la prueba de t test, entre *L. quadricostatus* y *P. royenii*, no se encontró diferencia significativa ($t(2.6) = 0.145, p =$

0.89). Por consiguiente, la cantidad de HCM con síntoma de parasitismo por kg de malformación de cactus, independientemente de la especie de cactus, es 86.5 ($s=124.3$), de las cuales 51.2 ($s=88.7$), un 59%, demostraron emergencia de parasitoides o hiperparasitoides. De los individuos de HCM con síntoma de parasitismo, se observó la emergencia de tres especies de parasitoides o hiperparasitoides. El parasitoides *Leptomastidea hypogaeococci* fue la especie con más emergencia de los HCM con síntomas de parasitismo con 96% (49.09) del 51.1 anteriormente mencionado (Fig. 8B). Luego sigue un hiperparasitoides no reportado, y aún no identificado, a estar asociado con HCM con 2.7% (1.4) (Fig. 8D), y *Chartocerus niger* con 1.4% (0.70) (Fig. 8C). Adicionalmente en la observación de emergencia de parasitoides en las repeticiones (cualquier HCM sin síntoma de parasitismo al momento de inspección), se observaron 15.3 ($s=29.5$) parasitoides emergiendo. Llevando el total de parasitoides, o hiperparasitoides, emergiendo en 1 kg de agalla de cactus a 66.5 ($s=115.6$), de las cuales todas fueron *L. hypogaeococci*.

Se pueden combinar los datos de los individuos de HCM y los parasitoides emergidos por kg de agalla de cactus para obtener la tasa de parasitismo. Al considerar que hay 149,055 individuos de HCM y 66.5 parasitoides e hiperparasitoides emergiendo por kg de malformación de cactus, la tasa de parasitismo es de 0.04%. en tres especies de cactus en Puerto Rico. En otras palabras, hay 2241 individuos de HCM por parasitoides, o hiperparasitoides, en un kg de agalla de cactus. Nuestros datos también determinan la tasa de hiperparasitismo en 4%.

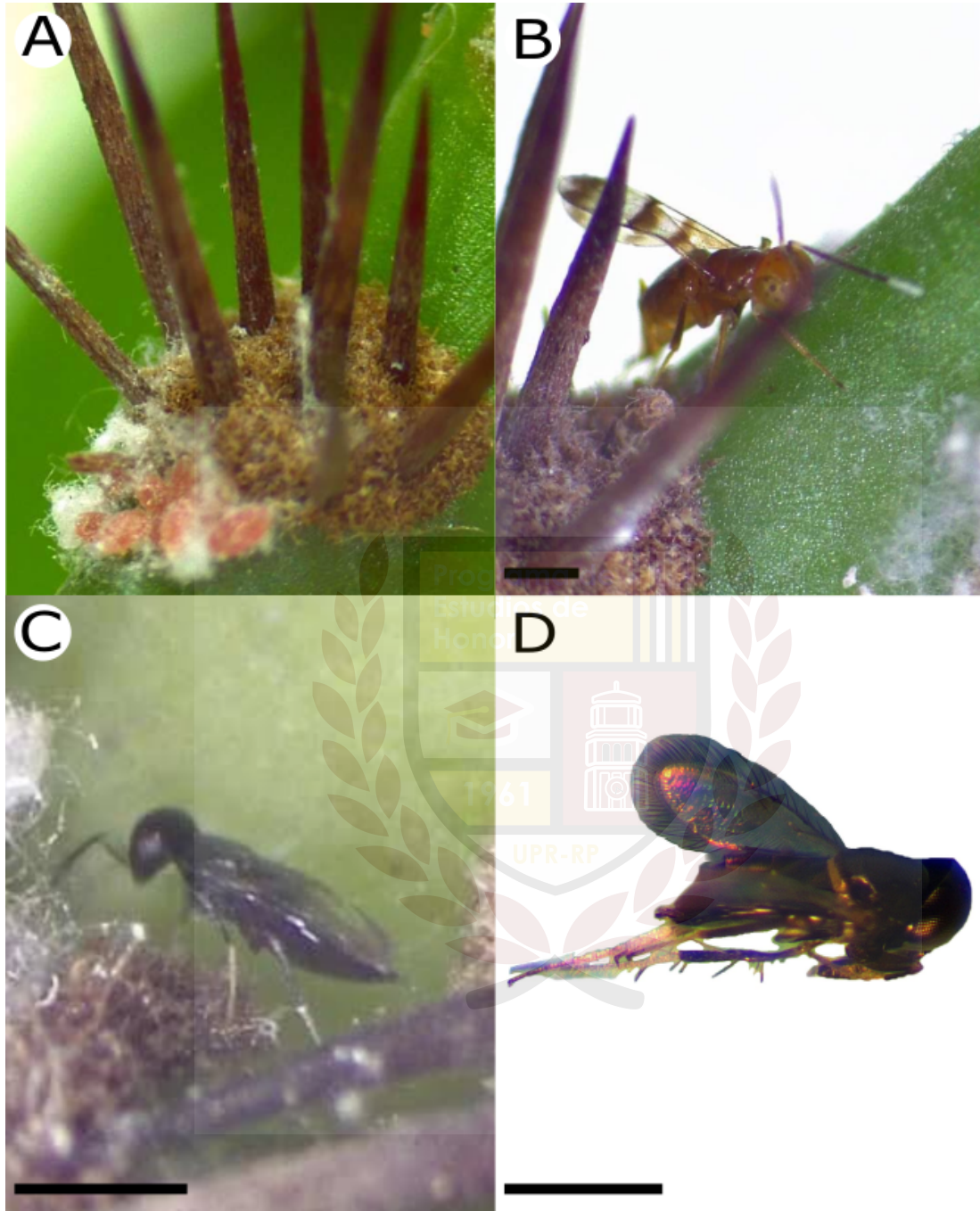


Fig. 7. Imágenes del chinche harinoso de los cactus, *Hypogeococcus* sp., colonizando *Leptocereus quadricostatus* (A), un parasitoide *Leptomastidea hypogeococci* (B), un hiperparasitoide *Chartocerus niger* (C), y el espécimen desconocido que parasita, o hiperparasita, a *Hypogeococcus* sp. (D). Barras horizontales negras miden 0.25 mm cada una.

V. Discusión

I.

Los experimentos no fueron exitosos en reproducir el hiperparasitoide *Chartocerus niger*. Al finalizar el primer experimento entendíamos que probablemente no permitimos suficiente tiempo transcurrir entre el parasitismo de *Leptomastidea hypogeococci* y el hiperparasitismo de *C. niger*. Por esto, el hiperparasitoide se encontraría con una larva de *L. hypogeococci* aún no desarrollada a el estado de su preferencia. Además, encontramos una abundancia de machos de *L. hypogeococci* emergiendo y muy pocas hembras. Para repetir el experimento, se optimizó la metodología para el Experimento II para regular la razón de sexo pero más importante, para proveer distintos estados de desarrollo de la larva de *L. hypogeococci* al hiperparasitoide. No se encontró literatura científica que detalle la importancia de esta variable, pero lógicamente podría afectar el experimento. Sin embargo, el segundo experimento tampoco resultó en emergencia de hiperparasitoide, aunque sí normalizo la razón de sexo.

Al analizar cada paso de la metodología, identificamos que no se les suplió miel a los parasitoides ni a los hiperparasitoides. Para explorar la importancia de un recurso de carbohidratos para la longevidad de *L. hypogeococci* y *C. niger*, se realizó el Experimento III. Las hembras de *C. niger* demostraron un aumento en longevidad considerable, este tipo de aumento ha sido demostrado con otros hiperparasitoides (Harvey 2008, Harvey et al. 2012). Harvey y colaboradores determinaron que suplir una solución de azúcares aumenta la longevidad y fecundidad de algunos hiperparasitoides pero no a otros, y, dependía de la fenología del hiperparasitoide. Por esto, se realizó un último experimento donde se le suplió una dieta con miel a *L. hypogeococci* y a *C. niger*. Esto tampoco fue capaz de reproducir a *C. niger*, por lo que se

regresó al campo para entender cuál es la tasa de hiperparasitismo de *C. niger* en comparación a la cantidad de individuos de HCM en una malformación de cactus. Esto se discute en la próxima sección.

II.

Aunque no se encontró ningún estudio sobre la biología de HCM en Puerto Rico, si hay un estudio de este tipo sobre otra especie de *Hypogeococcus* en Argentina que infesta a la familia Amaranthaceae. En este estudio se demostró que cada hembra adulta produce aproximadamente 37 ninfas; y las hembras de este *Hypogeococcus* tienen una sobrevivencia alta durante las etapas iniciales y medianas de su vida, mientras que hay una disminución rápida de sobrevivencia a finales de su vida (Aguirre et al. 2016). Si la biología de HCM es similar, esta producción de muchas ninfas y la alta sobrevivencia de esas ninfas podría explicar la gran cantidad de individuos en el primer, segundo y tercer estadio de HCM comparado a las adultas y las adultas en periodo de reproducción (Tabla 1, Fig. 5). Las proporciones altas en estadios tempranos y bajas en estadios tardíos también se observa en otros estudios de densidad de poblaciones de chinches harinosos (Meyerdirk et al. 2004, Muniappan et al. 2006, Elbahrawy et al. 2020). Por otro lado, en nuestros datos se encontró una disminución significativa entre individuos en el primer y segundo estadio; una posible explicación podría ser la dispersión. El primer estadio de HCM (llamados *crawlers*) es la etapa más móvil y pueden dispersarse mediante el viento, por animales o simplemente moviéndose de un huésped a otro (Jenkins et al. 2014, Zimmerman et al. 2010).

Es muy difícil trabajar en el laboratorio con ciertos cactus debido a sus espinas grandes y duras, mientras que otros cactus son manejables. Conocer que la cantidad de HCM es similar en las tres especies de cactus puede permitir la creación de protocolos estándar para mejorar la

comodidad en los trabajos de laboratorio, así como la crianza de HCM, los parasitoides e hiperparasitoides.

De acuerdo con varios censos de parasitoides de HCM en Puerto Rico, hay dos parasitoides primarios: *Anagyrus quilmes*, *Leptomastidea hypogeococci*; y cuatro hiperparasitoides: *Chartocerus niger*, *Chartocerus elongatus*, *Pachyneuron* sp., y *Prochiloneurus narendrani* de HCM (Triapitsyn et al. 2020, Triapitsyn et al. 2018). En nuestro estudio encontramos a *L. hypogeococci* y *C. niger*, el parasitoide y el hiperparasitoide de HCM más común en Puerto Rico (Triapitsyn et al. 2020, Triapitsyn et al. 2018). Además, el nuevo hiperparasitoide que emergió asociado a HCM en este estudio aumenta el total de hiperparasitoides a cinco. De acuerdo con las observaciones de esta investigación, esta especie se distingue de *C. niger* por ser más grande, tener una franja amarilla en la parte dorsal y no tener una franja negra en las alas. Además, *C. niger* mayormente demuestra una emergencia múltiple por individuo de HCM, mientras que esta especie solo demostró emergencia solitaria.

Por otro lado, en nuestro estudio no se encontró ningún parasitoide ni hiperparasitoide en las muestras pertenecientes al cactus *Stenocereus fimbriatus*. Sin embargo, una muestra contenía HCM con aperturas indicando que hubo parasitismo. En otros censos realizados en Puerto Rico se han encontrado parasitoides en muestras de *S. fimbriatus* aunque estos reportes son limitados (Triapitsyn et al. 2020). Esto podría deberse a una prioridad de recolecta hacia *P. royenii* sobre *S. fimbriatus*, evidenciado en los censos de parasitoides de HCM en Puerto Rico (Triapitsyn et al. 2020, Triapitsyn et al. 2018), probablemente porque *P. royenii* es más abundante que *S. fimbriatus* (Carrera-Martinez et al. 2018).

Nuestros resultados estiman la tasa de parasitismo de HCM en 0.04% en tres especies de cactus en Puerto Rico. Una tasa de parasitismo de 0% también se observa en eventos de invasión

de chinches harinosos donde ningún parasitoide local aún se ha asociado a este (Meyerdirk et al. 2004, Muniappan et al. 2006, como ejemplos). Por otro lado, se había estimado la tasa de hiperparasitismo de HCM de Puerto Rico en aproximadamente 9% (Triapitsyn et al. 2020), nuestro estudio determinó una tasa de hiperparasitismo de 4%, del cual solo 1.4% fue *C. niger*. Este dato posiblemente explica la dificultad en nuestros experimentos para reproducir a *C. niger*. Este estudio es clave para el desarrollo del programa de control biológico de HCM y describe la primera determinación del tamaño y la densidad de la población total y la tasa de parasitismo de *Hypogeococcus* sp. por unidad de masa en Puerto Rico.

No se logró cumplir los objetivos ni respaldar o rechazar las hipótesis planteadas. Sin embargo, se proveyeron datos importantes sobre la población de HCM en tres especies de cactus en Puerto Rico, su tasa de parasitismo e hiperparasitismo. Además, se investigó la sobrevivencia de *C. niger* y *L. hypogeococci*, y se encontró un hiperparasitoide no reportado a estar asociado con HCM, que posiblemente es una especie nueva para la literatura científica.

Recomendaciones

Ahora se puede analizar las fluctuaciones de las poblaciones de parasitoides e hiperparasitoides de HCM en el campo, pesando la malformación del cactus para obtener la tasa de parasitismo. Se debería identificar el nuevo hiperparasitoide asociado a HCM. Los hiperparasitoides son difíciles de reproducir en un laboratorio. Al investigar la biología de un hiperparasitoide, primero se debería tener una colonia del parasitoide en buenas condiciones. Luego, se deberían de introducir varios individuos del hiperparasitoide para confirmar la reproducción del hiperparasitoide. Finalmente, se puede remover alguna variable de este estudio, mientras continúe el éxito de la reproducción, para ir entendiendo aspectos de su biología.

VI. Bibliografía

Abd-Rabou, S., & Evans, G. A. (2016). Family Signiphoridae (Chalcidoidea) in Egypt. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 51(1), 145-155.

Acevedo-Rodriguez, P., & Strong, M. T. (2012). Catalogue of seed plants of the West Indies. *Smithsonian Contributions to Botany*. 98 (98):1–1192.

Aguirre, M. B., Diaz-Soltero, H., Claps, L. E., Saracho Bottero, A., Triapitsyn, S., Hasson, E., & Logarzo, G. A. (2016). Studies on the biology of *Hypogeococcus pungens* (sensu stricto) (Hemiptera: Pseudococcidae) in Argentina to aid the identification of the mealybug pest of Cactaceae in Puerto Rico. *Journal of Insect Science*, 16(1).

Askar, S. I., & El-Hussieni, M. M. (2016). On the biology of *Tetrastichus galactopus* (Ratzeburg) (Hymenoptera: Eulophidae) a hyperparasitoid of *Sinophorus xanthostomus* (Gravenhorst) parasitizing *Pieris rapae* L. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(3).

Barnés Jr, V. (1946). The birds of Mona Island, Puerto Rico. *The Auk*, 318-327.

Bernal, J. S. (2000). Key to the primary and secondary parasitoids of citrus-inhabiting Coccus (Coccidae) of California. In *Proceedings of the 2nd California Conference on Biological Control*. University of California, Riverside, CA (pp. 117-120).

Bistline-East, A., & Hoddle, M. S. (2014). *Chartocerus* sp. (Hymenoptera: Signiphoridae) and *Pachyneuron crassiculme* (Hymenoptera: Pteromalidae) are obligate hyperparasitoids of *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) and possibly *Tamarixia radiata*

(Hymenoptera: Eulophidae). *Florida Entomologist*, 562-566.

Bistline-East, A., & Hoddle, M. S. (2015). Biology of *Psyllaphycus diaphorinae* (Hymenoptera: Encyrtidae), a hyperparasitoid of *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) and *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 109(1), 22-28.

Brodeur, J., & McNeil, J. N. (1994). Life history of the aphid hyperparasitoid *Asaphes vulgaris* Walker (Pteromalidae): possible consequences on the efficacy of the primary parasitoid *Aphidius nigripes* Ashmead (Aphidiidae). *The Canadian Entomologist*, 126(6), 1493-1497.

Carrera-Martínez, R., Aponte-Díaz, L., Ruiz-Arocho, J., & Jenkins, D. A. (2015). Symptomatology of infestation by *Hypogeococcus pungens*: contrasts between host species. *Haseltonia*, 2015(21), 14-19.

Carrera-Martínez, R., Ruiz-Arocho, J., Aponte-Díaz, L., & Jenkins, D. A. (2018). Natural history notes for the columnar, globular and semi-epiphytic cactus species of the island of Puerto Rico. *Haseltonia*, 2018(24), 24-27.

Elbahrawy, A. M., Hammad, K. A. A., Elsobki, A. E., & Abd-Raboul, S. (2020). Seasonal incidence of the cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae) infesting tomato in correlation with certain biotic and abiotic factors. *Plant Archives*, 20(1), 483-492.

Fagua, J. C., & Ackerman, J. D. (2011). Consequences of floral visits by ants and invasive honeybees to the hummingbird-pollinated, Caribbean cactus *Melocactus intortus*. *Plant Species Biology*, 26(3), 193-204.

- Frago, E. (2016). Interactions between parasitoids and higher order natural enemies: intraguild predation and hyperparasitoids. *Current opinion in insect science*, 14, 81-86.
- Gann, G.D. & Taylor, N.P. 2013. *Leptocereus quadricostatus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013:
e.T44008A2991465. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T44008A2991465.en>. Downloaded on 19 November 2018.
- Goergen, G., & Neuenschwander, P. (1994). *Chartocerus hyalipennis* (Hayat) (Hym.: Signiphoridae), a gregarious hyperparasitoid on mealybugs (Hom.: Pseudococcidae): Biology and host range in West Africa. *Bull. Soc. Entomol. Suisse*, 67, 297-308.
- Harvey, J. A. (2008). Comparing and contrasting development and reproductive strategies in the pupal hyperparasitoids *Lysibia nana* and *Gelis agilis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Evolutionary Ecology*, 22(2), 153-166.
- Harvey, J. A., Cloutier, J., Visser, B., Ellers, J., Wäckers, F. L., & Gols, R. (2012). The effect of different dietary sugars and honey on longevity and fecundity in two hyperparasitoid wasps. *Journal of Insect Physiology*, 58(6), 816-823.
- Harvey, J. A., Snaas, H., Malcicka, M., Visser, B., & Bezemer, T. M. (2014). Small-scale spatial resource partitioning in a hyperparasitoid community. *Arthropod-Plant Interactions*, 8(5), 393-401.
- Jenkins, D. A., Mizell III, R. F., Van Bloem, S., Whitmire, S., Wiscovitch, L., Zaleski, C., & Goenaga, R. (2014). An analysis of arthropod interceptions by APHIS-PPQ and customs and border protection in Puerto Rico. *American Entomologist*, 60(1), 44-57.
- Khalyani, A. H., Gould, W. A., Harmsen, E., Terando, A., Quinones, M., & Collazo, J. A. (2016). Climate change implications for tropical islands: Interpolating and interpreting

- statistically downscaled GCM projections for management and planning. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, 55(2), 265-282.
- La Quay-Velazquez, G., Ciomperlik, M., & Rodrigues, J. C. V. (2015). Gall formation on the endangered cactus, *Leptocereus quadricostatus* caused by the invasive mealybug, *Hypogeococcus pungens* (Hemiptera: Pseudococcidae). In: *51st Annual Meeting, July 19-24, 2015, Paramaribo, Suriname* (No. 253117). Caribbean Food Crops Society.
- Meyerdirk, D. E., Muniappan, R., Warkentin, R., Bamba, J., & Reddy, G. V. P. (2004). Biological control of the papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Guam. *Plant Protection Quarterly*, 19, 110-114.
- Muniappan, R., Meyerdirk, D. E., Sengebau, F. M., Berringer, D. D., & Reddy, G. V. P. (2006). Classical biological control of the papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in the Republic of Palau. *Florida Entomologist*, 212-217.
- Nofemela, R. S. (2013). The effect of obligate hyperparasitoids on biological control: differential vulnerability of primary parasitoids to hyperparasitism can mitigate trophic cascades. *Biological Control*, 65(2), 218-224.
- Noyes, J. S. (2019): Universal Chalcidoidea Database. World Wide Web electronic publication. <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>. (Accessed: 5/21/2021)
- Prado, E., Alvarenga, T. M., & Santa-Cecília, L. V. C. (2015). Parasitoids associated with the black scale *Saissetia oleae* (Olivier) (Hemiptera: Coccidae) in olive trees in Minas Gerais State, Brazil. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(4), 411-416.

- Poveda-Martínez, D., Aguirre, M. B., Logarzo, G., Hight, S. D., Triapitsyn, S., Diaz-Sotero, H., Diniz Vitorino, M., & Hasson, E. (2020). Species complex diversification by host plant use in an herbivorous insect: the source of Puerto Rican cactus mealybug pest and implications for biological control. *Ecology and evolution*, *10*(19), 10463-10480.
- Rivera-Marchand, B., & Ackerman, J. D. (2006). Bat pollination breakdown in the Caribbean columnar cactus *Pilosocereus royenii*. *Biotropica*, *38*(5), 635-642.
- Rojas-Sandoval, J., & Meléndez-Ackerman, E. (2009). Pollination biology of *Harrisia portoricensis* (Cactaceae), an endangered Caribbean species. *American Journal of Botany*, *96*(12), 2270-2278.
- Rosenheim, J. A. (1998). Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. *Annual Review of Entomology*, *43*, 421.
- Schooler, S. S., De Barro, P., & Ives, A. R. (2011). The potential for hyperparasitism to compromise biological control: Why don't hyperparasitoids drive their primary parasitoid hosts extinct? *Biological Control*, *58*(3), 167-173.
- Segarra-Carmona, A. E., Ramírez-Lluch, A., Cabrera-Asencio, I., & Jiménez-López, A. N. (2010). First report of a new invasive mealybug, the *Harrisia* cactus mealybug *Hypogeococcus pungens* (Hemiptera: Pseudococcidae). *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, *94*(1-2), 183-187.
- Sullivan, D. J., & Völkl, W. (1999). Hyperparasitism: multitrophic ecology and behavior. *Annual review of entomology*, *44*(1), 291-315.

- Taylor, N.P. 2013. *Leptocereus grantianus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013: e.T152095A596656. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T152095A596656.en>. Downloaded on 19 November 2018.
- Tougeron, K., & Tena, A. (2019). Hyperparasitoids as new targets in biological control in a global change context. *Biological control*, 130, 164-171.
- Triapitsyn, S. V., Aguirre, M. B., Logarzo, G. A., Hight, S. D., Ciomperlik, M. A., Rugman-Jones, P. F., & Rodrigues, J. C. V. (2018). Complex of primary and secondary parasitoids (Hymenoptera: Encyrtidae and Signiphoridae) of *Hypogeococcus* spp. mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) in the New World. *Florida Entomologist*, 101(3), 411-434.
- Triapitsyn, S. V., Hight, S. D., Logarzo, G. A., Aguirre, M. B., Verle Rodrigues, J. C., Trjapitzin, V. A., Rivera Ocasio, Z., Rivera-Vázquez M. L., West Ortiz, M. J., Rodríguez Reyes, Y. 2020. Natural enemies of the *Harrisia* cactus mealybug and other *Hypogeococcus* species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Puerto Rico: Identification and taxonomic notes on primary and secondary parasitoids. *Neotropical Entomology* 49 (3): 369–391.
- U.S. Fish & Wildlife Service, 2015. Environmental conservation online system <https://ecos.fws.gov/ecp0/reports/species-listed-by-state-report?state=PR&status=listed>
- Zimmermann, H. G., Pérez, M., Cuen, S., Mandujano, M. C., & Golubov, J. (2010). The South American mealybug that threatens North American cacti. *Cactus and Succulent Journal*, 82(3), 105-108.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.