

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Regulación de la diapausa y emergencia del ectoparásito aviar C*arnus hemapterus*: factores abióticos, microclima y mecanismos implicados.

Dña. Mª Teresa Amat Valero

2014

REGULACIÓN DE LA DIAPAUSA Y EMERGENCIA DEL ECTOPARÁSITO AVIAR *Carnus hemapterus*: FACTORES ABIÓTICOS, MICROCLIMA Y MECANISMOS IMPLICADOS.

María Teresa Amat Valero Estación Experimental de Zonas Áridas Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Estación Experimental de Zonas Áridas



Consejo Superior de Investigaciones Científicas

TESIS DOCTORAL Murcia, Noviembre 2014

Programa de doctorado en Ecopatología de la fauna silvestre y sus implicaciones en sanidad animal y salud pública Departamento de Sanidad Animal



Universidad de Murcia

REGULACIÓN DE LA DIAPAUSA Y EMERGENCIA DEL ECTOPARÁSITO AVIAR *Carnus hemapterus*: FACTORES ABIÓTICOS, MICROCLIMA Y MECANISMOS IMPLICADOS.

Memoria que la Licenciada María Teresa Amat Valero presenta para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Esta tesis ha sido dirigida por el Dr. Francisco Valera Hernández, científico titular de la Estación Experimental de Zonas Áridas (CSIC) y turorizada por D^a. Juana María Ortíz Sánchez, profesora titular de la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 17 de Noviembre de 2014

V°B° del director

Fdo: Francisco Valera Hernández

V°B° de la tutora

Fdo: Juana María Ortíz Sánchez

ACO.

La doctoranda

Fdo: María Teresa Amat Valero

TESIS POR LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

La presente tesis doctoral se ha escrito por la modalidad de compendio de artículos previamente publicados. Las referencias completas de las correspondientes publicaciones se muestran a continuación:

- Amat-Valero M, Vaclav R, Martínez T, Valera F (2012) Mixed life-history strategies in a local population of the ectoparasitic fly *Carnus hemapterus*. Parasitology 139(8): 1045-1053. DOI: 10.1017/S0031182012000534
- Amat-Valero M, Calero-Torralbo MA, Valera F (2013) Temperature during the free-living phase of an ectoparasite influences the emergence pattern of the infective phase. Parasitology 140: 1357-1367. DOI: 10.1017/S0031182013000929
- Amat-Valero M, Calero-Torralbo MA, Vaclav R, Valera F (2014) Cavity types and microclimate: implications for ecological, evolutionary, and conservation studies. International Journal of Biometeorology. 58: 1983-1994. DOI: 10.1007/S0048401408010

A mi familia,

a la persona que me ha apoyado diariamente.

AGRADECIMIENTOS

"No es lo que obtenemos, sino lo que contribuimos, lo que le da significado a nuestras vidas" - Anthony Robbins.

Ser agradecido es uno de los pilares fundamentales para estar feliz. Así pues, no hay mejor manera de comenzar que mostrar mi más sincero agradecimiento a un montón de personas.

Durante estos años se me ha brindado la oportunidad de conocer y experimentar de primera mano el mundo de la ciencia y la investigación. Esta oportunidad no hubiese sido posible sin mi tutora de la Universidad de Murcia, quien me empujó a adentrarme en esta etapa, ni sin mi director de Tesis, quien me mostró los pasos a seguir y confió en mi aprendizaje. A ellos doy las gracias!!

También tengo que agradecer a quien puso algunas bases sobre este estudio que yo he continuado. Con sus charlas de apoyo, buenos comentarios y sugerencias, y principalmente con su amistad, he ido avanzando en este intenso aprendizaje. Aprendizaje no solo a nivel profesional sino también personal.

A lo largo de este tiempo he experimentado multitud de situaciones, buenas y malas, que me han ido forjando. En cada una de estas situaciones había personas que han estado a mi lado y con las que he compartido tantos desayunos, almuerzos, cenas, tapas, charlas interminables, estrés, agobios y sobre todo risas. A todas estas personas tengo que agradecer enormemente, y particularmente a aquellas que me han mostrado la luz en mis momentos de oscuridad. He de destacar a una persona que me ha ayudado día a día y que con su infinita paciencia y cariño he tenido un apoyo incondicional y perseverante. Gracias a todos vosotros!!

Recuerdo con gratitud una situación en la que me comentaron que hacer una tesis es como montar un puzzle. De siempre me ha gustado formar puzzles, así que me pusé a ello y me enfrenté a la multitud de información recogida durante las diversas jornadas de campo y laboratorio. Así, poco a poco fui colocando las piezas y dando forma a lo que a continuación se muestra en interminables párrafos, que llegados a este punto, más bien podría considerarse un "rompecabezas"....siempre quedan piezas por colocar....

(Y yo que pensaba cuando comencé que el ANOVA era un software estadístico...).

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
Antecedentes	7
Parasitismo	7
Sincronización parásito-hospedador	9
Los factores abióticos en la regulación del ciclo de vida	11
Estrategias en condiciones adversas: la diapausa	15
Herramientas de predicción del desarrollo de ectotermos	18
Plasticidad fenotípica, estrategias vitales y adaptaciones locales	25
Introducción al sistema de estudio	27
Área de estudio	27
Especie parásita	28
Hospedadores	30
Microhábitats	31
Justificación del sistema de estudio	32
Objetivos-hipótesis	33
1. Microhábitats y microclimas (Capítulo I)	34
2. Ciclo de vida y efecto de las condiciones abióticas en la durac	ión de la
diapausa (Capítulos II y III)	35
Microhábitat y emergencia del parásito	36
Requerimientos térmicos de Carnus para el desarrollo de la post-	-diapausa
en diferentes microhábitats	38
Referencias	40
CAPÍTULO I: Cavitiy types and microclimate: implications for ec	ological,
evolutionary and conservation studies	51
Abstract	52
CAPÍTIII O II. Mixed life-history strategies in a local nonvestion	of the
ectoparasitie fly Carnus homantorus	53
Abstract	54

CAPÍTULO III: Temperature during the free living phase of an e	ectoparasite
influence the emergence pattern of the infective phase	55
Abstract	56
DISCUSIÓN INTEGRADORA	57
Referencias	67
CONCLUSIONES	73
CONSIDERACIONES ADICIONALES	75
ANEXO I: Microclimate and intraspecific differences in emergence	77
ANEXO II: Differential effect of temperature during diapause	95
ANEXO III: Thermal requirements for emergence	113
REFERENCIAS DE LOS ANEXOS	133

RESUMEN

El parasitismo es una estrategia ampliamente extendida y utilizada por multitud de especies en todos los ecosistemas del planeta. Por tanto, la interacción parásito-hospedador ha sido objeto de estudio desde múltiples campos, incluida la ecología evolutiva. Un paso fundamental para poder entender el efecto de los parásitos sobre los hospedadores y la evolución de las interacciones parásito-hospedador es comprender cómo los factores ambientales afectan a estos organismos y a la interacción de ambos. El objetivo principal de esta tesis se sitúa en el citado marco, ya que pretende estudiar el efecto de factores abióticos, fundamentalmente la temperatura, en la regulación de la diapausa y emergencia del ectoparásito *Carnus hemapterus*.

La diapausa es una estrategia de dormancia que ayuda a sobrevivir en condiciones adversas y que sincroniza el ciclo de los individuos de una población con las condiciones ambientales adecuadas y disponibilidad de recursos. La duración de la diapausa y el momento de la emergencia son aspectos cruciales para los parásitos, ya que de regulan la sincronización de la fase infectiva con la presencia del hospedador. Aunque sea una fase impuesta por la información genética, los factores abióticos, sobre todo fotoperiodo y temperatura, tienen un papel modulador muy importante. Su inducción está regulada por la información ambiental percibida en estadios sensibles (normalmente previos a la diapausa) y su terminación depende de la existencia y el nivel de estímulos ambientales (ej. choques de frío) que reanudan el desarrollo.

El estudio del efecto de las condiciones ambientales sobre la distribución y/o ciclos de vida de numerosos organismos ha adquirido ultimamente inusitada importancia. La mayoría de los trabajos al respecto se han realizado a amplias escalas geográficas. Sin embargo, recientemente se ha señalado la importancia de la escala de trabajo, ya que, de manera general, el tamaño de los organismos determina el microclima que ocupan y los individuos están fundamentalmente afectados por las condiciones ambientales íntimas de su entorno. Este estudio se realiza, por tanto, a pequeña escala, de microhábitat, puesto que son las variables abióticas a este nivel (el microclima) las más adecuadas según las características de nuestro organismo modelo.

Carnus hemapterus es un díptero hematófago generalista que parasita a los pollos de una amplia variedad de especies de aves, la mayoría de ellas trogloditas. Esta especie es particularmente adecuada para el objetivo planteado ya que: i) desarrolla buena parte

de su ciclo vital en una localización determinada, el nido del hospedador; ii) habita una variedad de microhábitats (tipos de cavidades) que pueden tener características específicas; iii) muestra una diapausa polimórfica (diapausa corta, invernal y de varios años); iv) se ha descrito cierto grado de sincronización entre la aparición del hospedador y la emergencia del parásito adulto, por lo que es de suponer la existencia de señales ambientales que regulen tal sincronía; y v) debido a las características de las cavidades en las que *Carnus* habita, y dado que las pupas suelen estar enterradas, se supone que el efecto del fotoperiodo es menor. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la temperatura puede jugar un papel importante en la regulación de la diapausa de *Carnus*. Por el contrario, se desconocen muchos aspectos de la historia natural de esta especie, sobre todo en relación a su ciclo vital. Por ello, esta tesis también contribuye a ampliar nuestro conocimiento de esta especie, cada vez más usada como modelo para estudios sobre interacciones parásito-hospedador.

El trabajo se ha llevado a cabo principalmente en una zona árida del sureste de la Península Ibérica (desierto de Tabernas, Almería). En esta localización las cavidades disponibles para las aves hospedadoras de *Carnus* tienen diferentes características, siendo desde oquedades en los taludes arenosos de las ramblas, a grietas o agujeros en construcciones humanas (puentes de carretera o cortijos abandonados) y nidales artificiales (cajas nido). Estos tipos de cavidades se encuentran entremezcladas en el área de estudio.

La principal hipótesis de trabajo de esta tesis es que las condiciones microclimáticas, principalmente la temperatura, tienen un papel fundamental en la regulación del ciclo de vida de *Carnus*, concretamente en la duración de la diapausa, en el desarrollo de la post-diapausa y en el patrón de emergencia del adulto. A partir de ella nos planteamos los siguientes objetivos específicos: (1) caracterizar el microhábitat en el que tiene lugar la diapausa de *Carnus* con el fin de conocer cuáles son las principales variables abióticas que conforman el microclima en el que vive y la variabilidad de las mismas (Capítulo I); y (2) determinación del ciclo biológico del parásito (número de generaciones al año –voltinismo -) y estudio del efecto de las condiciones abióticas en la terminación de la diapausa y emergencia del parásito (Capítulos II y III). Aparte de estos objetivos también presentamos otra información adicional, que es: i) efecto del microhábitat en la variabilidad intraespecífica en la finalización de la diapausa y en el patrón de emergencia de *Carnus* y consistencia de tales efectos (Anexos I y II); y ii)

estimación de los requerimientos térmicos de *Carnus* para el desarrollo de la postdiapausa en diferentes microhábitats. Herramientas de predicción para la fecha de emergencia (AnexoIII).

El estudio del microclima de los tres tipos de cavidades usados por *Carnus* y sus hospedadores durante casi dos años (Capítulo I) desveló que las cajas nido presentan unas condiciones ambientales similares a las exteriores, destacando de manera general sus bajas temperaturas medias y su amplia oscilación térmica con respecto a las otras cavidades. Por el contrario, el microclima de oquedades de puentes y taludes es más estable, siendo las primeras en general, algo más frías y húmedas que las segundas. Estas marcadas diferencias pueden tener notables consecuencias tanto para las aves como para los insectos (comportamiento, selección de hábitat, supervivencia, duración y regulación del ciclo de vida...) así como para la interacción entre parásitos y hospedadores.

Mediante una aproximación experimental examinamos la duración de la diapausa y voltinismo de *Carnus* (Capítulo II), desvelando que algunos individuos desarrollan una diapausa corta en momentos determinados de la estación (diapausa facultativa), de forma que coexisten individuos uni y bivoltinos en un mismo nido, y por ende, en nuestra población. Esta última estrategia puede producirse como consecuencia del prolongado periodo de tiempo que los recursos (i.e. hospedadores) están disponibles en nuestra área de estudio y, probablemente, se ve favorecida por ciertas condiciones ambientales durante la estación. Se comprobó la existencia de bivoltinismo tanto en moscas parasitando a aves de reproducción temprana como tardía. Se observó un alto grado de sincronización de los individuos que siguen ambas estrategias capacita al insecto para ampliar su ventana temporal de emergencia, para explotar a diversos hospedadore.

La determinación de la duración de la fase de diapausa (y, por tanto, el momento de la emergencia) requiere conocer los diversos estímulos ambientales que regulan este periodo y que permiten la reanudación del desarrollo. La identificación de esta circunstancia suele ser difícil y requiere de un conocimiento detallado de la especie en estudio. Mediante una aproximación experimental consistente en someter pupas de *Carnus* en diapausa invernal a condiciones constantes de primavera con y sin choque de

frío (*chilling*) (Capítulo III) mostramos que tales choques no son necesarios para romper la diapausa aunque sí produjeron un adelanto en la emergencia y una aceleración de la tasa de emergencia con respecto al grupo sin este estímulo. Además, se evidenció la sensibilidad de la fase de diapausa a temperaturas vernales, ya que el adelanto artificial de las condiciones de primavera hizo que la emergencia fuese mucho más temprana aunque con una tasa de emergencia más lenta, probablemente por la ausencia de fluctuación térmica (ver abajo).

Los resultados obtenidos en los capítulos I y III sugerían que deberían existir diferencias intraespecíficas en la emergencia de *Carnus* en condiciones naturales. Con el fin de comprobar tal extremo se realizó el seguimiento en campo de la emergencia de moscas adultas en los tres tipos de cavidades (oquedades en puentes, taludes y cajas nido) (Anexo I). Nuestros resultados mostraron una marcada variación intraespecífica en la fenología de emergencia de Carnus. Las primeras moscas aparecieron en las cajas nido, siguiendo una tasa de emergencia más lenta que las moscas del resto de cavidades y, por lo tanto, con un periodo de emergencia más prolongado en la estación. Sin embargo, las moscas de puentes y taludes emergieron al mismo tiempo y con un patrón similar. Los factores abióticos que regulan la emergencia del parásito varían entre cavidades. La emergencia de moscas en las cajas nido estuvo regulada por la fuerte oscilación térmica y la combinación de eventos de frío, temperatura media y temperaturas altas. Sin embargo, en hábitats con condiciones estables (oquedades en taludes y en puentes) la temperatura media y algunos eventos de frío fueron los responsables de regular la emergencia. Por lo tanto, las diferentes presiones selectivas a las que están sometidas las moscas promoverían respuestas diferenciales y la descrita variación intraespecífica en fenología.

Con el fin de comprobar la consistencia de tales diferencias y de determinar el efecto específico de la temperatura en distintas fases de la diapausa de *Carnus* se realizaron diversos experimentos (Anexo II) con pupas provenientes de los tres tipos de cavidad. Estas pupas fueron sometidas a una homogenización de las condiciones (se anularon las diferencias entre microclimas) en dos momentos diferentes: i) durante la diapausa invernal, sometiéndose todas las muestras a condiciones constantes de primavera; y ii) justo antes de la emergencia (fase final de la post-diapausa), sometiendo las muestras a un aumento de la temperatura media y a una fluctuación térmica moderada. Los resultados muestran que, aunque las manipulaciones modificaron la

magnitud de las diferencias en la fenología de emergencia entre microhábitats, los patrones de emergencia resultantes fueron consistentes con los hallados en condiciones naturales. Las moscas de cajas nido emergieron nuevamente antes y con una tasa de emergencia más lenta que la de las moscas del resto de cavidades y no se encontraron diferencias en la emergencia de moscas de puentes y taludes. Los resultados también evidenciaron que la sensibilidad a los cambios ambientales fue diferente a lo largo de la diapausa, siendo la respuesta mayor cuando el cambio ambiental se produjo en la fase final de la post-diapausa. Esto puede indicar la capacidad del parásito para detectar la presencia del hospedador en el nido mediante cambios térmicos.

Por último, abordamos el estudio de los requerimientos térmicos que *Carnus* necesita para completar el desarrollo de la post-diapausa y emerger (Anexo III). Para ello, calculamos dentro de una misma ventana termal (umbrales mínimo y máximo de desarrollo) los grados día necesarios para la emergencia de pupas provenientes de los tres tipos de cavidades. Los resultados mostraron que las moscas de cajas nido precisaron menos grados días para emerger, pero que los acumulaban más lentamente en la estación, lo que concuerda con los patrones fenológicos vistos anteriormente. Por el contrario, en puentes y taludes las moscas acumularon grados día con la misma tasa debido a las similares condiciones ambientales que experimentan, pero las moscas de puentes requirieron menor cantidad de grados día para emerger que las de taludes, probablemente debido a la existencia de choques de frío en oquedades de puentes. Las diferencias microclimáticas pueden originar que no solo se requieran diferentes grados día para los individuos de cada tipo de cavidad, sino que también varíen los umbrales de desarrollo, ya que pueden estar promoviéndose procesos de aclimatación o adaptaciones a las distintas condiciones térmicas.

Los resultados obtenidos revelan que *Carnus* es una especie con una gran plasticidad, mostrando a pequeña escala geográfica marcadas diferencias intraespecíficas en su ciclo vital y más concretamente en la fase de la diapausa y posterior emergencia. Dicha plasticidad dotaría a este parásito generalista de la capacidad de reaccionar a la gran variedad de presiones selectivas (desde múltiples especies hospedadoras muy diversas a una notable variedad de microhábitats) a las que tiene que hacer frente. Los resultados pueden explicarse tanto en el marco de estrategias de *risk-spreading* como por efecto de la interacción genotipo y ambiente. Este estudio muestra la respuesta de un organismo a cambios microclimáticos y sugiere futuras vías

de trabajo en diversos campos (fisiológicos, ecológicos, evolutivos, biología de la conservación, biología aplicada...).

INTRODUCCIÓN GENERAL

ANTECEDENTES

El cuerpo de la tesis lo conforman las 3 publicaciones mostradas en sus respectivos capítulos. Además de estas publicaciones, se presenta información adicional en los correspondientes anexos.

Esta tesis tiene por objeto estudiar los factores y mecanismos implicados en la regulación de la diapausa y la emergencia de un díptero hematófago parásito de una amplia variedad de aves. Específicamente nos centramos en los factores abióticos, y fundamentalmente en la temperatura, que estudiamos esencialmente a una escala microclimática, la que nos parece más adecuada para este parásito.

Una introducción a este tema de estudio requiere revisar someramente la relación parásito-hospedador y algunos de sus principales rasgos (sincronización de ciclos vitales, estrategias implicadas, factores selectivos, escala de actuación de los mismos) desde un punto de vista ecológico y evolutivo. Dado que la principal variable respuesta que estudiamos (el periodo de emergencia de un organismo) tiene implicaciones económicas (sobre todo en el campo de la agronomía), también atendemos a aspectos relacionados con la predicción del desarrollo y emergencia de insectos.

Tras la exposición de estos antecedentes presentamos el sistema de estudio, *Carnus hemapterus* y algunos de sus hospedadores, así como el escenario en el que se ha desarrollado este trabajo. Esta información nos permite resaltar a continuación los principales rasgos del sistema, lo que se conoce y lo que no, y la bondad del mismo para intentar responder algunas preguntas importantes. Éstas se concretan seguidamente, especificándose de manera razonada los objetivos de la tesis, las hipótesis y predicciones en estudio y los capítulos en los que se trata cada una de ellas.

Parasitismo

Muchas especies de animales, plantas, protozoos, bacterias, hongos y todos los virus son parásitas (Madigan et al. 2003; Bobson et al. 2008). Así pues, el parasitismo se podría considerar la estrategia más extendida en el mundo natural (de Meeûs et al. 1998). El parasitismo es un tipo de relación simbiótica en la que el parásito se beneficia de otro organismo (hospedador) obteniendo los nutrientes directamente de éste y causándole algún tipo de daño, lo que conlleva una reducción en su eficacia biológica (*fitness*) o en su supervivencia (Bush et al. 2001). La relación que se establece entre ambos organismos es muy íntima ya que la perpetuación de la especie parásita depende directamente de la presencia del hospedador y la eficacia biológica del hospedador depende de sus "armas" para combatir la parasitación. De esta manera, se produce una tensión evolutiva en la que el hospedador incrementa su resistencia al parasitismo, mientras que el parásito genera mecanismos para evitar las respuestas del hospedador. Por lo tanto, se promueven procesos co-evolutivos dentro de las poblaciones, linajes y/o taxones determinados por diversos aspectos como las estrategias vitales y características (morfológicas, fisiológicas, ecológicas...) de ambos organismos, la relación de estos rasgos con factores abióticos circundantes y el nivel de variación espacial y temporal de dichos rasgos y factores.

Los insectos parásitos como modelo de estudio

El modo de vida parásito es una estrategia vital preponderante entre los artrópodos. Askew (1971) estimó que los insectos que parasitan a animales constituyen aproximadamente el 10% de las especies conocidas en el Reino Animal aunque esta cifra es, con certeza, una infravaloración. Por su parte, Price (1975) calculó que al menos la mitad de los animales de la Tierra son artrópodos parásitos de plantas y/o animales.

De entre las múltiples características interesantes de los insectos destacaremos aquí, por su relación con el tema de estudio, la metamorfosis. Ésta puede ser del tipo sencillo (hemimetabolismo) o completo (holometabolismo). La mayor parte de la diversidad de los insectos se debe a las especies holometábolas, que realizan una metamorfosis completa en una fase de pupa entre la larva y el adulto (Yang 2001). Solo cuatro órdenes (Lepidóptera, Díptera, Himenóptera y Coleóptera) cuentan con 750.000 especies holometábolas, lo que implica las tres cuartas partes de todos los insectos nombrados y más de la mitad de todas las especies vivas. Una característica importante de los organismos holometábolos es que las larvas y los adultos se separan en dos estadios, dando la posibilidad al mismo individuo de especializarse en diferentes nichos, tener hábitos alimenticios distintos y ocupar otros hábitats en cada uno de estos estadios (Jacobs & Renner 1988). El desarrollo holometábolo evidencia la diversidad fenotípica, incluyendo rasgos morfológicos, fisiológicos y comportamentales que pueden ser

ajustados por un solo genoma. Aún más destacada es la increíble plasticidad fenotípica que, con los genes apropiados y las pistas ambientales adecuadas, transforman un gusano en un individuo alado (Moczek 2010).

Otro rasgo importante de los insectos, en el contexto de esta tesis, es su carácter ectotermo, tema que desarrollaremos más adelante. Baste decir ahora que el uso de los insectos como modelos para estudiar los efectos de los factores abióticos sobre ciertos estadios del ciclo de vida (emergencia, pupación...) o aspectos como la distribución, la capacidad de adquirir tolerancia a condiciones extremas o la tasa de supervivencia ha sido constante a lo largo de la historia científica.

Los estudios realizados con insectos parásitos destacan fundamentalmente su importancia epidemiológica, ecológica y económica, justificándose así el desarrollo de modelos predictivos para el control de enfermedades y/o plagas. Pero aún hay un gran número de cuestiones desconocidas o que requieren una mayor profundización, como por ejemplo, las adaptaciones estacionales de insectos ectoparásitos de animales de sangre caliente (Härkönen & Kaitala 2013). En este trabajo nos centramos en la interacción parásito-hospedador-condiciones ambientales usando un insecto como organismo modelo. Dada la tremenda amplitud del tema, este estudio se centra en unas fases concretas del ciclo de vida del parásito: su diapausa y fenología de emergencia. Esta decisión se justifica por dos motivos: i) son momentos clave de tal interacción, como explicamos a continuación, y ii) están fuertemente determinadas por variables climáticas. En el contexto actual de Cambio Global, los estudios destinados a esclarecer las relaciones de los organismos con factores abióticos y sus múltiples interacciones son, a nuestro juicio, valiosos y necesarios.

Sincronización parásito-hospedador

La sincronización de ciclos vitales con la disponibilidad de recursos es básica para multitud de organismos. Los parásitos son un buen ejemplo de ello, ya que en general se alimentan de recursos efímeros que pueden estar disponibles muy irregularmente tanto en el tiempo como en el espacio. Además, los ciclos infectivos deben estar sincronizados con el periodo en el que los hospedadores provean los recursos más adecuados y maximicen la eficacia biológica del parásito (Tauber et al. 1986; Wharton 1999). Por tanto, los parásitos están sometidos a fuertes presiones selectivas que han originado que muchos de estos organismos hayan desarrollado mecanismos de dispersión y de desarrollo (por ejemplo fases de dormancia como la diapausa) con el fin de asegurar su éxito en la detección y explotación del hospedador adecuado en el momento idóneo (Danks 1987, 2007).

El estudio de la sincronización entre parásitos y hospedadores es una parte esencial de la relación entre ambos organismos que, a nuestro juicio, se ha estudiado con menor intensidad de lo que merece (ver, sin embargo, Danks 1987; Poulin 1998; Masaki 2002; van Asch & Visser 2007; Calero-Torralbo & Valera 2008), excepto en lo referente a sus implicaciones económicas (ver a continuación). De los estudios realizados se desprende que existe una notable variabilidad en grados de sincronización (Thomas & Blanford 2003; Danks 2007; van Asch & Visser 2007; Yukawa et al. 2013 y referencias aquí dadas). Esta variabilidad se debe, en buena medida, a la complejidad de la interacción, influida por multitud de factores que, a su vez, varían en el espacio y en el tiempo y que afectan a ambos organismos e incluso a los recursos del hospedador (Tauber et al. 1986). La respuesta de los parásitos frente a la variabilidad de sus recursos a menudo se concreta en estrategias de dispersión temporal y/o espacial (usando otros hospedadores alternativos), pretendiendo la sincronización o ajuste de su ciclo vital, emergencia y reproducción con el ciclo de sus hospedadores (Tauber et al. 1986).

Los parásitos generalistas con una amplia distribución geográfica, como ocurre con la especie objeto de este estudio, están afectados por gran variedad de fuerzas selectivas cuya intensidad varía en el espacio y en el tiempo (Lajeunesse & Forbes 2002; Thomson 2005; Poulin et al. 2008). Algunos de estos agentes selectivos son: i) las características de las estrategias vitales del hospedador, ii) el rango disponible de hospedadores, pudiendo cambiar ampliamente dentro del área de distribución del parásito (Janz & Nylin 2008), y iii) las condiciones locales que rodean a los parásitos.

Los parásitos generalistas se caracterizan por presentar múltiples respuestas alternativas para adaptarse al amplio rango de hospedadores a los que afectan (Gandon & Van Zandt 1998), a la impredecibilidad o irregularidad de los hospedadores (West-Eberhard 2003) y/o a cambios repentinos e impredecibles de las condiciones ambientales (Tauber et al. 1986; Via & Conner 1995). Algunas de estas respuestas son estrategias de regulación estocástica (como las estrategias *coin-flipping* o *risk-spreading*) que producen asincronías en los ciclos parásito-hospedador (West-Eberhard 2003). Por lo tanto, al contrario que ocurre con parásitos especialistas, que necesitan una

alta sincronización con el ciclo de las pocas especies hospedadoras a las que afectan, los parásitos generalistas pueden presentar baja sincronía, poca especificidad y adaptaciones no precisas para sus especies hospedadoras (Gandon & Van Zandt 1998; Calero-Torralbo 2011). Las distintas respuestas adoptadas dentro de una población podrían dar como resultado una variación intraespecífica, que suele estar determinada por una variación fenotípica y/o genotípica individual por la que se pretende maximizar la eficacia biológica. Por lo tanto, las presiones de selección en ambientes heterogéneos favorecerán la expresión de distintos rasgos fenotípicos, beneficiando a especies con plasticidad fenotípica y amplia gama de respuestas y/o promoviendo la fijación de caracteres específicos para ambientes determinados. De esta manera, el estudio de las diferentes repuestas fenotípicas en poblaciones de especies generalistas habitando un área donde los factores actuantes son diversos (ej. existencia de distintos microhábitats y ocupación de los mismos por el parásito) nos ayudaría a conocer el grado de ajuste de la fase infectiva con el hospedador, las estrategias que regulan los ciclos de vida y que optimizan la sincronización y los requerimientos ambientales que favorecen el mencionado ajuste. Estos escenarios también nos ofrecen la posibilidad de estudiar las consecuencias que estas estrategias y condiciones ambientales podrían tener en la relación parásito-hospedador. Finalmente nos permiten estudiar las respuestas de los organismos a nuevos ambientes o a cambios rápidos en los mismos, que pueden ocasionar desde un mero desplazamiento de las fenologías de hospedadores y parásitos a un notable cambio en el grado de sincronización (van Asch & Visser 2007).

Los factores abióticos en la regulación del ciclo de vida

Para entender el efecto de los parásitos sobre sus hospedadores y la evolución de las interacciones parásito-hospedador es necesario comprender primero cómo afectan determinados factores ambientales a los organismos implicados y a la interacción de ambos (Thomas & Blanford 2003). El curso de una interacción puede estar determinado por factores como la temperatura ambiente, el fotoperiodo, la humedad ambiente o la temperatura corporal del hospedador (Thomas & Blanford 2003). Los factores ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo principalmente) influyen de modo decisivo en los organismos, teniendo efectos muy diversos, desde cambios en el comportamiento (desplazamientos, búsqueda de lugares adecuados, migración,...) hasta cambios hormonales (regulación de la época reproductiva, estrategias de resistencia a

condiciones desfavorables,...). De forma general, los factores abióticos pueden influir en la relación parásito-hospedador de dos maneras: i) limitando la distribución y abundancia de los parásitos; es bien conocido que la distribución y las tasas demográficas de los parásitos son sensibles a las variaciones en temperatura y humedad (Ostfeld et al. 2005), y ii) modificando la conducta y desarrollo del parásito para aumentar su supervivencia o sincronizar su ciclo vital con el de sus hospedadores. En respuesta a condiciones abióticas desfavorables muchos organismos han desarrollado mecanismos que previenen efectos deletéreos de tales factores ambientales mediante un retardo o supresión de las tasas de desarrollo (ver Lloyd & Soulsby 1988; Ostfeld et al. 2005). Tales mecanismos también estan diseñados para lograr una sincronización con los recursos disponibles.

Un hospedador dado puede estar afectado simultáneamente por diversas especies de parásitos que pueden interaccionar entre sí afectando a la eficacia biológica de cada una de las especies parásitas así como a la del propio hospedador (Seppäla et al. 2009). Para una mayor comprensión de las relaciones parásito-hospedador es fundamental estudiar el efecto de variables abióticas sobre cada uno de estos organismos. De forma paralela, los diversos estadios de un parásito pueden responder de forma distinta a unas mismas condiciones ambientales. Por ejemplo, las fases de vida libre de un ectoparásito se encuentran más expuestas a tales condiciones que otros estadios del ciclo vital (Wharton 1999; Bush et al. 2001). En tanto que la importancia de los factores ambientales sobre los parásitos es conocida desde hace tiempo, es sorprendentemente escaso el trabajo dedicado a investigar su efecto en la variabilidad en la sincronización de los ciclos de vida (Thomas & Blanford 2003; Danks 2007) y, por extensión, el trabajo realizado sobre la interacción parásito-hospedador-factores ambientales. Es igualmente insuficiente nuestro conocimiento del efecto de las condiciones abióticas del ambiente más íntimo (microclima) en el ciclo de vida de los parásitos (ver como ejemplo Kingsolver 1979; Weiss et al. 1993; Vermunt et al. 2012). Son diversos los motivos de estas carencias: bien porque se requiera una amplia aproximación biogeográfica, por dificultades inherentes a los sistemas de estudio o por las limitaciones que la información obtenida bajo condiciones artificiales tiene para reflejar la realidad de los procesos que ocurren en condiciones naturales (Bonhomme 2000; Thomas & Blanford 2003; Danks 2007; van Asch & Visser 2007). Es importante señalar que, en muchos casos, los mecanismos fisiológicos y los rasgos fenológicos

sobre los que los factores abióticos actúan son pobremente comprendidos (ver, como ejemplo de estos estudios, Dawson et al. 2005), aun cuando el entendimiento de tales mecanismos y rasgos es básico para explicar la distribución, abundancia y epidemiología de muchos parásitos así como la evolución de los sistemas parásito-hospedador.

La temperatura en insectos ectoparásitos

Aunque las respuestas fenológicas requieren de la combinación de varios factores ambientales (Visser et al. 2010), se reconoce que la temperatura es un elemento fundamental en la regulación de ciclos de vida y fenómenos fisiológicos, sobre todo en ectotermos (Sharpe & Demichele 1977; Merino & Potti 1996; Thomas & Blanford 2003; Maiorano et al. 2012). Los organismos poiquilotermos, entre los que se encuentran los artrópodos (muchos de ellos parásitos), se caracterizan por el hecho de que la variación de su temperatura interna es una consecuencia de la variación en la temperatura ambiental. Por tanto, el factor abiótico más importante para estos seres es la temperatura, que tiene un papel crucial en su distribución, crecimiento y desarrollo (Marshall 1981; Dawson et al. 2005). Además, la temperatura es un factor clave en la regulación de los ciclos de vida de los organismos ectotermos, debido a su efecto como pista ambiental mostrando los cambios estacionales (Tauber et al. 1986) y, particularmente, por su efecto en la conformación y respuesta enzimática que controla el metabolismo (Sharpe & DeMichele 1977; Bonhomme 2000). Aunque se sabe que muchos parásitos usan otras variables ambientales, como la humedad o el fotoperiodo, como pistas para sincronizarse con el momento adecuado del ciclo vital del hospedador (Marshall 1981), numerosos estudios han mostrado la gran importancia que las características térmicas tienen sobre el ritmo de desarrollo como moduladoras de su velocidad.

El factor abiótico que de manera general denominamos temperatura engloba en realidad una multitud de facetas de gran importancia biológica. La descripción de las características térmicas de un hábitat determinado debe incluir variables como temperatura media, oscilación térmica, valores extremos... Cada una de estas facetas tiene importantes implicaciones en la fisiología de los organismos ectotermos. Por ejemplo, se sabe que la fluctuación térmica provoca una aceleración del desarrollo

13

(Beck 1983; Ratte 1984; Radmacher & Strohm 2011; Marshall & Sinclair 2012; Inoue 2012), aunque se ha visto que la amplitud de la fluctuación (es decir, las temperaturas extremas) puede tener un efecto contrario (Petavy et al. 2001; Carrington et al. 2013). Además, la temperatura media sobre la que se produce la oscilación térmica también es relevante (Petavy et al. 2001; Inoue 2012). Los eventos de frío pueden igualmente actuar como estímulo en el desarrollo (Tauber et al. 1986; Dong et al. 2013), o bien pueden producir situaciones de estrés térmico (Marshall & Sinclair 2012) y/o promover tolerancias a condiciones extremas (Bale et al. 2002). Cabe destacar la influencia de las condiciones térmicas en las fases de resistencia, como la diapausa, ya que su duración está determinada por pistas ambientales entre las que la temperatura tiene un papel importante. Los cambios y señales térmicas son detectados por fases o estadios sensibles que modulan la inducción y la terminación de la diapausa, promoviendo sincronización en la población y emergencia en los momentos óptimos (Tauber et al. 1986; Kostal 2006).

Importancia del microclima

Potenciado en los últimos años por el fenómeno del cambio climático, el estudio del efecto de las condiciones abióticas sobre la distribución y/o ciclos de vida de numerosos organismos ha adquirido gran importancia. La mayoría de los trabajos al respecto se han realizado a amplias escalas geográficas (Oldenborgh et al. 2009; Holusa et al. 2012; Maiorano et al. 2012) ya que el macroclima da una idea de cómo se están produciendo los cambios a nivel global y las consecuencias que estos cambios pueden tener en los ecosistemas. Sin embargo, estudios recientes (Araújo & Luoto 2007; Kingsolver et al. 2011; Pincebourde & Woods 2012; Potter et al. 2013; Andrew et al. 2013 y referencias aquí dadas) señalan la importancia de la escala de trabajo, ya que, de manera general, el tamaño de los organismos determina el microclima que ocupan y los individuos están, en última instancia, afectados por las condiciones ambientales íntimas de su entorno (Pincebourde & Woods 2012; Potter et al. 2013). Por tanto, son necesarios estudios a escalas menores para poder comprender las estrategias y respuestas de las especies a cambios en las condiciones del ambiente, y para esclarecer los efectos que tienen las condiciones ambientales específicas en las poblaciones y en los individuos dentro de dichas poblaciones.

Las condiciones microclimáticas de un área pueden ser muy heterogeneas y diferentes del macroclima que las envuelve (Bartholomew 1966; Willmer 1982; Oke 1987; Helmuth et al. 2005; Geiger et al. 2009; Scherrer & Korner 2010, 2011). De esta manera, los datos climáticos a pequeña escala y teniendo en cuenta las dimensiones de la especie bajo estudio son muy valiosos, ya que ayudan a entender mejor la biología de dichas especies y los procesos ecológicos y evolutivos actuantes, además de garantizar mejoras en programas de conservación, control de plagas o estudios de distribución espacial. Por ejemplo, según Bonhomme (2000) los datos térmicos para ajustar y mejorar los modelos de predicción basados en la dependencia de la tasa de desarrollo a la temperatura (ver a continuación), deben obtenerse del lugar más próximo posible donde se encuentran los individuos.

En concreto, en los sistemas parásito-hospedador, tanto en la fase de vida libre como en la fase parásita, el ambiente circundante al parásito (el hospedador entendido como ambiente), puede tener perfiles de temperatura específicos que pueden variar notablemente del ambiente en sentido amplio y, por tanto, influir en los ciclos de los parásitos (Danks 2007; Calero-Torralbo et al. 2013). Por otra parte, diferencias en el tamaño o la forma del parásito pueden hacer que organismos ectotermos compartiendo el mismo hábitat tengan distintas temperaturas corporales (Gates 1980; Broitman et al. 2009; Sears et al. 2011).

Estrategias en condiciones adversas: la diapausa

Muchos organismos han desarrollado estrategias destinadas a asegurar o aumentar su supervivencia evitando los periodos desfavorables o promoviendo la sincronización de su ciclo vital con el momento en que los recursos son más abundantes (Kennedy et al. 1975; Wharton 1999). Esto es particularmente cierto en el caso de los parásitos, muchos de los cuales han desarrollado mecanismos de resistencia como la hibernación, hipobiosis o diapausa (Lloyd & Soulsby 1988; Ostfeld et al. 2005).

La diapausa se trata de una adaptación temporal y es una forma de dormancia usada por multitud de organismos (Tauber et al. 1986), sobre todo insectos, para sobrevivir a condiciones abióticas desfavorables para el desarrollo y la reproducción. Contribuye a una mejor sincronización de la fase de vida activa con condiciones favorables y a una más eficaz distribución y colonización de lugares extremos (Danks 1987; Kostal 2006). Se define como un proceso de regulación altamente dependiente de las condiciones ambientales, mediado por hormonas (componente genético) que produce supresión profunda del desarrollo y conlleva una sucesión de eventos fisiológicos; se incrementa la resistencia a condiciones ambientales extremas, y la conducta está alterada o reducida (Tauber & Tauber 1982; Kostal 2006). Además de un mecanismo de resistencia, se considera también una estrategia en la que el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de los miembros de una población se sincronizan (Tauber et al. 1986; Danks 1987; Leather et al. 1993; Dambroski & Feder 2007).

En el periodo de diapausa se dan tres etapas principales (pre-diapausa, diapausa y post-diapausa) que responden a factores ambientales y/o ecológicos (entre los que destacan la temperatura, fotoperiodo, humedad, reservas de alimento o densidad poblacional, Tauber et al. 1986) que modulan directa o indirectamente diferentes estados fisiológicos (Kostal 2006; Danks 2007), regulando su duración e intensidad (Danks 1987, 2007; Masaki 2002). Muchos de estos procesos fisiológicos todavía son desconocidos (Kostal 2006). Las fases de la diapausa deben ocurrir en los periodos oportunos: el comienzo precede a condiciones adversas, pero su terminación no coincide necesariamente con el fin de tales condiciones. La inducción de la diapausa se desencadena por estímulos ambientales durante periodos muy específicos frecuentemente restringidos a estadios sensibles del ciclo vital de los insectos previos a la fase durante la que se produce la diapausa (ej. el estadio larvario si la diapausa ocurre en el estadio de pupa) (Tauber & Tauber 1970). La última etapa de la diapausa (postdiapausa) sincroniza el ciclo de la población, siendo la fase más sensible de todo el proceso a los estímulos necesarios para la reanudación y progreso del desarrollo (Tauber et al. 1986; Danks 1987; Kostal 2006). A modo de ejemplo, en muchas especies la diapausa invernal es inducida por el acortamiento en la duración de los días (fotoperiodo) y la bajada de las temperaturas, que predice la llegada del invierno, mientras que el incremento del fotoperiodo y de las condiciones térmicas anuncian el acercamiento de la primavera, promoviendo la terminación de la dormancia (Tauber et al. 1986; Bradshaw & Holzapfel 2007). En definitiva, a lo largo de las fases de la diapausa la sensibilidad, la percepción y la respuesta a los factores ambientales cambia (Kostal 2006), aumentando dicha sensibilidad en los momentos finales de las fases sensibles (Danks 1987, 2007).

Un aspecto particularmente importante de la diapausa es que condiciona el número de ciclos vitales que se pueden completar anualmente. La duración estacional

16

influye, a su vez, en el periodo de diapausa pudiendo ser más o menos larga (diapausa corta, larga o prolongada). Por lo tanto, la duración de los ciclos de vida y el número de ciclos completados al año (voltinismo) es variable. Los ciclos largos incluyen diapausas prolongadas y son comunes en insectos que dependen de la disponibilidad de los recursos (Danks 1987, 1992; Soula & Menu 2005). En el caso de los parásitos, puesto que la disponibilidad de hospedadores adecuados es, a menudo, impredecible y, por tanto, genera una presión de selección que afecta a las estrategias del parásito (Hakalahti et al. 2004), es de esperar que sus ciclos de vida incluyan con frecuencia diapausas prolongadas de incluso varios años (Valera et al. 2006). No obstante, también pueden darse diapausas cortas, de apenas unas semanas, si el recurso está disponible durante un periodo de tiempo razonablemente largo. Además, si las condiciones favorables se perpetúan y el hospedador sigue estando disponible, algunas especies son capaces de acotar el ciclo, con un desarrollo rápido, pudiendo completar una generación en pocos días (Campbell & Mackauer 1975; Tillman & Powell 1991; Sabelis & Janssen 1994), lo que se conoce como multivoltinismo. Sin embargo, en regiones con estaciones cortas (frecuentemente en zonas templadas) o con presencia de recursos en un corto periodo de tiempo, las organismos solo son capaces de completar un ciclo al año (univoltinismo), mediante diapausas largas de varios meses (Danks & Foottit 1989; Danks 2002). Por otro lado, si las condiciones son variables o impredecibles, la duración del ciclo puede ser diferente entre los individuos de una misma población (Townsend & Pritchard 1998; Aoki 1999), promoviendo diapausas facultativas que determinan el número de generaciones por año. En definitiva, las variables abióticas y la disponibilidad de recursos determinan el ciclo de vida de los parásitos, teniendo importantes implicaciones tanto a nivel evolutivo como a nivel ecológico para los parásitos y sus hospedadores.

La variabilidad intraespecífica de la diapausa es muy común en multitud de organismos (Tauber et al. 1986; Leather et al. 1993). Los diferentes fenotipos de la diapausa y su regulación pueden ser consecuencia de un polimorfismo genético fijado entre linajes debido a la respuesta plástica a las condiciones ambientales y/o ecológicas experimentadas por los individuos de forma directa o indirecta (Tauber et al. 1986; Menu 1993). Por tanto, las interacciones genotipo-ambiente modularán las respuestas y estrategias vitales afectando de distinta manera a los individuos de la población dependiendo de las condiciones íntimas a las que están sometidos (Via & Conner 1995).

La diapausa puede darse en cualquier estadio del insecto, pero es muy frecuente que sea en la fase de pupa. De esta manera, tras la fase de dormancia se produce la emergencia de los individuos adultos, momento que, como hemos visto, es de notable significado biológico. Aunque la fenología de emergencia está gobernada por el genotipo, los factores abióticos, entre ellos la temperatura, tienen un importante efecto modulador en las respuestas de dicha emergencia y sincronizan a la población por medio de la regulación de la diapausa (van Asch & Visser 2007). Se ha mostrado que una terminación sincronizada de la diapausa requiere en muchos casos periodos de frío, determinando cuando el desarrollo de la post-diapausa debe comenzar (Beck 1980; Tauber et al. 1986). Aún más, el transcurso de la emergencia en una población está determinado por la velocidad de desarrollo, teniendo esta última una alta dependencia de las condiciones térmicas. Según diversos autores el desarrollo (y consecuentemente el patrón de emergencia) es rápido cuando las condiciones son adecuadas, mientras que se retarda cuando las condiciones son adversas (Singh et al. 2014 y referencias aquí dadas). Por tanto, la identificación de los factores abióticos que afectan al progreso de la diapausa, al desarrollo en la última fase, al momento de la emergencia y al patrón de dicha emergencia es de gran importancia por sus implicaciones ecológicas, evolutivas, de conservación y económicas (ej. desarrollo de modelos predictivos para control de enfermedades y/o plagas).

Herramientas de predicción del desarrollo de ectotermos

Factores abióticos predecibles

La mayoría de las respuestas fisiológicas en organismos ectotermos se dan como resultado de estímulos externos fiables y pistas que modulan directa o indirectamente diversos procesos (ej. desarrollo, crecimiento o reproducción), así como las fases de diapausa, regulando su duración e intensidad (Danks 1987, 2007; Masaki 2002). Estas señales deben permitir al individuo conocer el estado ambiental en cada momento (Tauber et al. 1986). Numerosos estudios citan al fotoperiodo y a la temperatura ambiental como los principales factores reguladores de la diapausa. El fotoperiodo es un factor importante en la terminación de la diapausa debido a su periodicidad anual y regulación de ciclos (Tauber et al. 1986), como se muestra en multitud de experimentos (William & Adkisson 1964; Anderson 1970; Tauber & Tauber 1975; Kato & Sakate 1981; Danks 1987). La temperatura ambiental también tiene una alta fiabilidad como

señal por su periodicidad anual a nivel regional. Por ello resulta un predictor importante en especies con diapausas estacionales de varios meses, o en las que los cambios del fotoperiodo son cortos (trópicos) o no apreciables (Danks 1987, 2006; Kostal 2006). Además, la temperatura tiene un efecto modulador en la duración de la diapausa, acelerándola o ralentizándola (Leather et al. 1993; Gray et al. 2001; Teixeira & Polavarapu 2002, 2005).

La mayoría de los estudios experimentales sobre los mecanismos reguladores de la diapausa en parásitos se han centrado en factores ambientales (ver, por ejemplo, Wharton 1999). Sin embargo, muchos de los estudios realizados hasta la fecha se han hecho bajo condiciones artificiales y, mientras que son válidos para comprender aspectos fisiológicos de la regulación de la diapausa y del desarrollo, es incierto hasta qué punto reproducen situaciones naturales (Beck 1983; Marshall & Sinclair 2012). Por tanto, es necesaria la realización de experimentos que simulen circunstancias naturales sobre la base de un amplio conocimiento de las mismas para lograr una mayor comprensión de la forma en que los factores ambientales pueden afectar a las relaciones parásito-hospedador vía diapausa en un contexto ecológico (Danks 2007). Como hemos mencionado anteriormente, estos estudios han de desarrollarse a diversas escalas, siendo fundamental el trabajo a nivel de microhábitat (Heeb et al. 2000; Dawson et al. 2005) así como el estudio de la interacción entre diversos factores (Tauber et al. 1986; Bonhomme 2000).

Tasa de desarrollo

Los insectos, organismos ectotermos, son capaces de sobrevivir dentro de un cierto rango de temperaturas que permiten realizar actividades básicas como la alimentación, la dispersión, la reproducción, la puesta o el desarrollo (Campbell 1974; van der Have 2002; Jarosik et al. 2002, 2004). De hecho, la temperatura es uno de los factores abióticos que más influye en el tiempo de desarrollo (Kipyatkov & Lopatina 2010). La relación fisiológica entre las condiciones térmicas y el desarrollo se basa en la dependencia que la actividad enzimática tiene de la temperatura. Es necesaria una cierta conformación en las enzimas para que éstas sean funcionales y dicha conformación solo tiene lugar en un determinado rango de temperaturas (Sharpe & DeMichele 1977; Bonhomme 2000).

Para entender el efecto modulador de la temperatura sobre el desarrollo de los organismos ectotermos numerosos trabajos se han centrado en la relación directa entre la tasa de desarrollo y la temperatura. La tasa de desarrollo se define como la inversa del tiempo de desarrollo que se necesita para completar una fase o estadio del ciclo vital. Esta tasa mide la proporción de desarrollo lograda por unidad de tiempo (desarrollo/tiempo) y, generalmente, se representa en el eje Y, frente a la temperatura en el eje X (Figura 1). La relación entre ambas variables suele ser no lineal (sigmoidea) (Stinner et al. 1974; Curry et al. 1978; Briere et al. 1999; Allen & Jason 2000). La curva para un organismo concreto se puede calcular sometiendo a los individuos a un amplio régimen de temperaturas constantes. En dicha curva destacan tres momentos; en la parte inferior, cuando la tasa de desarrollo es más baja (se enlentece), la curva corta en dos puntos al eje X (Figura 1). Estas son las temperaturas donde el desarrollo es nulo y donde se sitúan las temperaturas umbral mínima y máxima (T_{min} y T_{max} en la figura 1) que determinan el rango térmico adecuado para el desarrollo (Campbell 1974; Dixon 2009) en el que las enzimas están activas. Por el contrario, en la parte superior de la curva se sitúa la temperatura óptima (Topt en la figura 1), en la cual el desarrollo es máximo (David et al. 1983; Trudgill et al. 2005). La tasa de desarrollo se incrementa desde un punto basal, conocido como umbral mínimo de desarrollo. En este umbral la curva se acerca al eje X asintóticamente, produciéndose un retardamiento del desarrollo progresivo al bajar la temperatura (sección R1 de la figura 1). Esto se debe a que normalmente los insectos son capaces de sobrevivir periodos largos a temperaturas bajas con un desarrollo muy lento (Marco 2001). A medida que la temperatura se eleva la tasa de desarrollo aumenta ajustándose a una línea recta justo antes de llegar a su máximo (sección R2 en la figura 1), que se produce a una cierta temperatura llamada temperatura óptima o umbral óptimo (Trudgill et al. 2005). A temperaturas mayores de la óptima se produce una caída brusca del desarrollo llegando a ser nulo cuando las condiciones térmicas superan el umbral máximo (sección R4 en la figura 1). En este momento es cuando más efectos deletéreos se producen y aumenta el porcentaje de mortalidad, aunque unos pocos individuos pueden seguir desarrollándose, si bien muy lentamente (Campbell 1974).

Aunque criticados por los desajustes que se producen (excepto en la sección R2 de la figura 1), muchos estudios sobre los requerimientos térmicos se basan en que la relación entre tasa de desarrollo y temperatura es lineal (modelos lineales) (Honek &

Kocourek 1990; Trudgill 1994; Trudgill & Perry 1994; Gilbert & Raworth 1996; Honek 1996, 1999; Charnov & Gillooly 2003; Lopatina et al. 2011; Maiorano et al. 2012). Con estos modelos el "umbral mínimo", ahora nombrado como umbral base, es sobrestimado (T_{base} en la figura 1), así como la tasa de desarrollo en el umbral óptimo (sección R3 en la figura 1). Esta aproximación hace que la tasa de desarrollo siga aumentando hasta llegar al umbral máximo (sección R4 en la figura 1). Pero a pesar de estos inconvenientes, se considera que las adaptaciones locales al ambiente en el que viven ciertas especies de insectos, hacen que el régimen de temperaturas en la naturaleza se sitúe casi exclusivamente en la parte lineal de la curva de desarrollo (sección R2 de la figura 1) (Campbell 1974) y, por lo tanto, la estimación del tiempo de desarrollo con modelos lineales no sería tan desacertada (Fan et al. 1992; Maiorano et al. 2012). Finalmente, los modelos curvilíneos tienen una serie de incovenientes que hacen que, en ocasiones, sean menos precisos que los lineales (ver Worner 1992; Liu & Meng 1999).



Figura 1: Representación de la tasa de desarrollo frente a la temperatura. Se muestra el ajuste de la aproximación lineal (linea recta intermitente) sobre la curva sigmoidea (linea continua) que describe una tasa de desarrollo realista. En la gráfica se especifican los distintos umbrales térmicos (T_{min} , T_{base} , T_{opt} y T_{max}) con lineas verticales punteadas, así como las secciones de ajuste de ambas aproximaciones (R1, R2, R3 y R4). Figura tomada de Maiorano et al. (2012).

Independientemente del modelo usado para estimar el tiempo de desarrollo, merece la pena señalar que, al ser la tasa de desarrollo una función no lineal de la temperatura, se ve afectada por la desigualdad de Jensen. Ésta es una propiedad matemática de las funciones no lineales que describe y predice implicaciones directas de la varianza ambiental que no pueden ser inferidas de las condiciones ambientales promedio (ver Ruel & Ayers 1999). Específicamente, dado que las tasas metabólicas de los poiquilotermos tienden a aumentar exponencialmente en función de la temperatura, la varianza en la temperatura elevará las tasas metabólicas de estos organismos. Los efectos de la variación de temperatura como resultado de la desigualdad de Jensen son una fuente reconocida de error en los modelos de grados día de desarrollo de insectos (efecto Kaufmann).

Requerimientos térmicos para completar el desarrollo (grados día y ventana térmica)

El estudio del paso de una fase del desarrollo de un insecto a otra y la posibilidad de predicción de sucesivos eventos es de notable interés por sus múltiples aplicaciones prácticas e implicaciones económicas. Por tanto, en las últimas décadas se han desarrollado numerosas herramientas y modelos predictivos que buscan estimar de la forma más sencilla y precisa posible eventos biológicos concretos (ej. emergencia de un insecto) (Pruess 1983). Una de las herramientas más ampliamente utilizadas en agronomía para predecir el desarrollo de insectos y aplicar un correcto manejo en el control de plagas ha sido los grados-día (de aquí en adelante GD) (Aliniazee 1975; Reissig et al. 1979; Pruess 1983; Bernal & Gonzalez 1993; Régnière & Logan 2003).

Los GD se basan en la relación entre la tasa de desarrollo de un estadio concreto y la temperatura. Réaumur (1735, 1736) estableció por primera vez el concepto de suma de grados de calor ("sum of heat degrees", hoy conocido como GD) al reconocer que los organismos no podían desarrollarse por debajo de cierta temperatura y que la suma de temperaturas requeridas para completar el desarrollo era básicamente constante. Estableció los requerimientos térmicos necesarios de la relación de la tasa de desarrollo y la temperatura para el tiempo de maduración de cereales en distintas localizaciones con condiciones térmicas específicas. De esta manera, los GD representan la acumulación de unidades de calor por encima de una cierta temperatura, conocida como umbral mínimo de desarrollo, durante un periodo de un día (Pruess 1983; Bonhomme 2000). Por tanto, para predecir cuándo va a tener lugar un evento determinado es

necesario conocer, al menos, el umbral mínimo de desarrollo para ese estadio y la integral térmica, que se define como el número de GD que se necesita acumular (Bonhomme 2000). Esta información permite estimar la fecha de dicho evento (eclosión, pupación, emergencia del adulto...), hasta que se alcance el valor de la integral térmica bajo unas condiciones de temperatura dadas.

Para determinar tanto los umbrales como los GD se han propuesto numerosos modelos empíricos y biofísicos basados en la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura. El primer modelo desarrollado fue el lineal (Candolle 1885; Reibisch 1902; Sanderson & Peairs 1913; Arnold 1960; Baskerville & Emin 1969; Abrami 1972; Allen 1976; Sevacherian et al. 1977), en el que el umbral mínimo se determina ajustando una recta a la curva de la tasa de desarrollo en el rango de temperaturas en que la relación es lineal (sección R2 en la figura 1) y estimando su corte con el eje de abscisas (T_{base} en la figura 1). Sin embargo, se produce el inconveniente de que no refleja adecuadamente la realidad cuando se trabaja a temperaturas bajas y altas (debido a la relación no lineal, secciones R1, R3 y R4 de la figura 1), impidiendo una estima precisa de los umbrales (mínimo, máximo y óptimo) así como de los GD. A pesar de este inconveniente, es un modelo muy utilizado debido a su sencillez y porque en algunos casos se ha visto que la aproximación con modelos lineales es aceptable (Maiorano et al. 2012). Los modelos no lineales de Lactin et al. (1995, ecuación 1 con cuatro parámetros) y Briere et al. (1999, segundo modelo modificado con tres parámetros) son los más aceptados actualmente debido a que describen con un buen ajuste toda la curva de desarrollo (curva sigmoidea de la figura 1).

Según Bohomme (2000) la determinación de los umbrales térmicos (mínimo, máximo y óptimo) solo es posible si se conoce la tasa de desarrollo medida en un amplio rango de variación de temperaturas y en ausencia de otros factores que limiten el crecimiento. Por lo tanto, los parámetros de los modelos descritos, y particularmente los de los modelos no lineales, se obtienen en condiciones de laboratorio mediante la combinación de un rango amplio de temperaturas constantes. Esto significa que no se tienen en cuenta las condiciones que realmente se dan en la naturaleza, por lo que su aplicabilidad en el campo es cuestionable (Beck 1983; Manel & Debouzie 1995; Bonhomme 2000; Marco 2001). En condiciones de campo, la estimación precisa del umbral mínimo de desarrollo se ve dificultada cuando la temperatura de referencia (temperaturas medias en diferentes áreas geográficas) varía o cuando las temperaturas

son fluctuantes (Bonhomme 2000). Por otro lado, el umbral máximo también es difícil de estimar debido al incremento de la mortalidad a altas temperaturas (Pedigo 1996). Además, es bien conocido el efecto sobre la velocidad de desarrollo que tienen diferentes factores como las condiciones térmicas fluctuantes (Behrens et al. 1983, Beck 1983; Ruel & Ayers 1999; Bonhomme 2000), los repetidos choques de frío (Marshall & Sinclair 2012), la cantidad y calidad del alimento (Frutiger & Buergisser 2002; Charnov & Gillooly 2003; Sun et al. 2013), la humedad y la densidad de la población (Tauber et al. 1986). Por tanto, es necesario un conocimiento preciso de la especie en estudio y del ambiente en el que vive, teniendo en cuenta los principales factores que pueden influir en su tiempo de desarrollo (Pruess 1983; Bonhomme 2000).

Estudios de artrópodos con amplia distribución geográfica muestran la gran capacidad de éstos para adquirir tolerancia termal a condiciones extremas (Hoffmann & Sgrò 2011; Sinclair et al. 2012). También se ha comprobado que el desarrollo de individuos expuestos a diferentes ambientes varía dentro de la misma población (Kingsolver 1979; Weiss et al. 1993) y, como consecuencia, necesitan acumular diferentes GD. Algunos trabajos han mostrado cómo diferentes condiciones ambientales pueden hacer que la acumulación de GD difiera para una misma especie (Lillehammer 1987; Frutiger & Buergisser 2002). Otros han hallado diferencias intraespecíficas en los umbrales (Kingsolver 1979; Bonhomme 2000), y Lopatina et al. (2011) mostró que tanto los GD como los umbrales pueden variar para una especie en concreto.

Un último aspecto a considerar en cuanto al cálculo de los GD es que una estimación correcta requiere un conocimiento específico del momento en el que se produce la finalización del estadio previo, en nuestro caso la terminación de la diapausa. Recordemos que durante ésta se produce una supresión del desarrollo en la que se anulan las respuestas a las condiciones ambientales y en la que la sensibilidad es muy baja. Esta información, desconocida para muchas especies, es a menudo difícil de determinar (Tauber et al. 1986). En su defecto, se utilizan fechas arbitrarias a partir de las cuales se calcula la acumulación de GD (ver, por ejemplo, Tokeshi 1985; DuRant 1990; Tío et al. 2006; Gonçalves & Torres 2011). Por otro lado se sabe que ciertos estímulos, como por ejemplo un periodo de temperaturas frías o diversos choques de frío, pueden provocar que la diapausa termine y que comience el desarrollo de la post-diapausa (Tauber et al. 1986). La ocurrencia de estos estímulos se puede usar como pista para iniciar el cálculo de los GD.
Plasticidad fenotípica, estrategias vitales y adaptaciones locales

Los insectos son ejemplos claros de polifenismo debido a su capacidad de expresar fenotipos alternativos, como ocurre en los estadios de larva y adulto. Forman un taxón que combinan una riqueza y diversidad tremenda de especies con una marcada plasticidad en el desarrollo. La plasticidad representa una respuesta compleja y evolucionada para enfrentarse a importantes cambios ambientales, permitiendo a los organismos mantener una eficacia biológica alta frente a la variabilidad del ambiente (Schlichting & Pigliucci 1995). Esto implica ajustes a muchos niveles de organización biológica: expresión de genes, fisiología endocrina, regulación del crecimiento y desarrollo e incluso comportamientos (Wilson 1976; Wheeler & Nijhout 1983, 1984; Evans & Wheeler 1999, 2001a,b; Abouheif & Wray 2002). Pero la plasticidad también es la base de respuestas homeostáticas y de la regulación del desarrollo (Scharloo 1991). Las respuestas plásticas se encuentran limitadas a un rango de ambientes a los que los individuos son capaces de responder y varían dependiendo del genotipo. Si existe sensibilidad de los genotipos a distintas condiciones ambientales, y por lo tanto hay interacción genotipo-ambiente, la variación fenotípica entre los ambientes se promueve. Esto es común en especies generalistas y aún más cuando se exponen a ambientes novedosos y desafiantes en los que se requiere algún tipo de cambio en el fenotipo (Via & Conner 1995). La plasticidad fenotípica contribuye a la diversificación de los organismos, facilitando la evolución de rasgos nuevos, nuevas especies y ciclos de vida complejos, aunque también se ha sugerido que puede actuar como inhibidor de dicha divergencia (Schlichting & Pigliucci 1998; Pigliucci 2001).

En general, los individuos intentan disminuir la variación de su eficacia biológica con el objetivo de mantener un *fitness* adecuado y asegurar su éxito a largo plazo sean cuales sean las condiciones ambientales (Olofsson et al. 2009). Mientras que en especies generalistas, la eficacia biológica se mantiene más o menos constante a lo largo de las generaciones, las especies especialistas suelen mostrar diferentes eficacias biológicas como consecuencia de la variación en las condiciones ambientales (por ejemplo entre un año seco y otro húmedo) (Hopper 1999; Olofsson et al. 2009). Debido a la incertidumbre del ambiente (variable e impredecible) y a la interacción de éste con el genotipo, los insectos desarrollan diversas estrategias vitales que garantizan la supervivencia y una eficacia biológica estable en el tiempo. Por ejemplo, la estrategia de *risk-spreading* o *bet-hedging* ha sido muy utilizada para explicar el patrón de comportamiento y la historia vital de los insectos. Se interpreta como un modo que tienen los individuos de una población de optimizar el *fitness* en condiciones ambientales impredecibles.

Existen diferentes estrategias de respuesta a las condiciones ambientales en las poblaciones. Por un lado, los individuos de una población sujetos a las mismas condiciones abióticas pueden utilizar siempre la misma estrategia (se expresa un único fenotipo), siendo común en diapausas o migraciones obligadas. Por otro lado, individuos de una población bajo las mismas condiciones ambientales pueden desarrollar diferentes estrategias expresadas por un único genotipo, promoviendo variación fenotípica. Este mecanismo es muy común en especies con diapausa facultativa en la que algunos individuos entran en diapausa mientras que otros no, aun estando todos bajo las mismas pistas ambientales. Las estrategias de dormancia han sido consideradas como una respuesta adaptativa a ambientes estocásticos (Cohen 1966; Philippi 1993 a,b; Clauss & Venable 2000; Evans et al. 2007), y en particular, cuando la duración de la dormancia varia, se consideran como estrategias *risk-spreading* (Menu & Debouzie 1993; Menu 1993; Danforth 1999; Menu & Desouhant 2002). Por tanto, el estudio de la diapausa facultativa y la variación en su duración pueden ser especialmente adecuados para entender mejor este tipo de estrategias.

Otra estrategia alternativa es la denominada *coin-flipping*, en la que el individuo determina su fenología de acuerdo con las condiciones actuales, usando éstas como pistas para predecir las condiciones futuras y expresar un fenotipo u otro. La posibilidad de que un individuo muestre un fenotipo específico se basa en la probabilidad de que un tipo de condiciones se produzcan. Si una respuesta es adecuada y está presente en muchos individuos resultará exitosa para la población incluso si alguno de ellos elige una respuesta fallida.

La heterogeneidad ambiental espacial puede favorecer la evolución de plasticidad fenotípica adaptativa, ya que no todos los individuos se ven afectados ni estimulados de la misma manera debido a las diferentes interacciones genotipo-ambiente (Via & Conner 1995). Si la plasticidad no supone costes ni desventajas para la eficacia biológica, se fijaría cierto polimorfismo genético común en la población que en cada hábitat produciría el fenotipo óptimo. Por lo tanto, se originaría una diferenciación fenotípica adaptativa, pero sin diferenciación genética. Sin embargo, los ambientes heterogéneos en un área determinada también pueden reducir la dispersión y favorecer la fidelidad por el hábitat (ej. Hastings 1983), lo que puede beneficiar procesos de adaptación local. Las adaptaciones locales en un conjunto de subpoblaciones conectadas por flujo genético se producen cuando ciertos fenotipos son favorecidos por ambientes específicos y estos ambientes se mantienen estables en el tiempo. Si una población dada no llega a la plasticidad ideal descrita arriba, se pueden producir adaptaciones locales que pueden mantener variación genética entre subpoblaciones. La variación geográfica de las estrategias de la diapausa (Bradford & Roff 1995) o los tipos de pistas ambientales utilizadas dependiendo de la estabilidad de las condiciones (Girvan & Braithwaite 1998) son buenos ejemplos para el estudio de la evolución de adaptaciones locales.

En definitiva, los sistemas parásito-hospedador y su interacción con los factores abióticos son muy adecuados para estudiar las diferentes estrategias vitales adoptadas, así como estrategias de *risk-spreading* o procesos de adaptaciones locales. Además, el papel de la plasticidad fenotípica y el grado de interacción genotipo-ambiente puede ser crucial para la supervivencia de los parásitos. Esto es particularmente aplicable a los parásitos generalistas que muestran una gran variedad de estrategias para adaptarse a unas condiciones ambientales específicas.

INTRODUCCIÓN AL SISTEMA DE ESTUDIO

El sistema de estudio está formado por el díptero ectoparásito *Carnus hemapterus*, sus hospedadores, principalmente la carraca (*Coracias garrulus*), y los distintos microhábitats en los que el parásito desarrolla la mayor parte de su ciclo de vida.

Área de estudio

La zona de estudio se localiza en el sureste de la Península Ibérica, en concreto en el desierto de Tabernas (37°05'N, 2°21'W, términos municipales de Tabernas, Tahal y Uleila del Campo, provincia de Almería). Tiene una extensión aproximada de unos 50 km² y un rango de altitud de 400-640 msnm. El paisaje está constituido por tierras áridas con escasa vegetación y multitud de ramblas. También hay algunos cultivos, principalmente de almendro y olivo, distribuidos por el terreno. El clima es mediterráneo árido en el que destaca la gran variabilidad intra e interanual de las

temperaturas y escasas precipitaciones (unos 200 mm de media al año) (Lázaro et al. 2001, 2004). Los eventos de lluvia son cortos y en ocasiones torrenciales en otoño y primavera. Los veranos suelen ser largos, secos y calurosos, mientras que los inviernos son templados.

Se realizó un único muestreo en la provincia de Jaén, a 156 km al noroeste de Almería en diciembre de 2009 (Tabla 1, Capítulo III). En concreto se muestrearon nidos de diversas especies en los términos municipales de Linares, Baeza, Úbeda y Jaén (rango 37°49 N, 3°39 W y 38°2 N, 3°36 W), situados en un rango de 416-769 msnm. El clima de esta zona es mediterráneo, con veranos calurosos y secos e inviernos templados.

Especie parásita

Carnus hemapterus (Nitzsch 1818, Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Diptera, Familia Carnidae) pertenece a un género que comprende cinco especies, principalmente con distribución holártica (Brake 2011). El resto de miembros de la familia son moscas saprófitas, asociadas mayoritariamente a heces, carroña o nidos de aves (Papp 1998; Brake 2011), mientras que *Carnus* es el único parásito (Brake 2011). Este díptero tiene una distribución muy amplia que abarca desde la región Paleártica (Europa, Asia al norte del Himalaya, África septentrional y las zonas norte y central de la Península Arábiga), hasta el este y norte de Norte América (Papp 1988; Grimaldi 1997; Brake 2011). Se la describe como un parásito generalista debido a su amplio rango geográfico y a que parasita a un alto número de especies de aves (Dawson & Bortolotti 1997; Grimaldi 1997), aunque parece tener una marcada preferencia por especies trogloditas (Grimaldi 1997).

Carnus hemapterus realiza su ciclo completo, a excepción de la fase de dispersión (no obligatoria), en los nidos de sus hospedadores. Tras la emergencia, el adulto (de apenas unos dos mm de tamaño), tiene alas que le capacitan para volar y dispersarse en busca de nidos ocupados y colonizar, de esta manera, nuevas cavidades (aunque también pueden permanecer en el nido donde ha emergido si el hospedador está disponible). La capacidad de dispersión es limitada, ya que, según Matyukhim & Krivosheina (2008), no puede realizar vuelos de larga distancia. Además, los adultos viven poco tiempo sin alimentarse (unos tres días, Calero-Torralbo, observación personal). *Carnus* parasita a los pollos (preferentemente no emplumados) de sus

hospedadores y se alimenta de su sangre (Dawson & Bortolotii 1997; Grimaldi 1997; Roulin et al. 2003; Martín-Vivaldi et al. 2006; Chakarov et al. 2008; Václav et al. 2008), y posiblemente también de secreciones cutáneas. Puede causar daños severos en los pollos (Whitworth 1976; Marshall 1981; Cannings 1986; Schulz 1990), aunque otros estudios no han encontrado efecto negativo alguno sobre los hospedadores (Kirkpatrick & Colvin 1989; Dawson & Bortolotti 1997; Roulin 1998; Liker et al. 2001). Una vez que el hospedador adecuado es localizado la mosca adulta suele perder las alas (Roulin 1998, 1999). Diversos estudios muestran que la población del parásito crece desde el momento de la incubación y durante el desarrollo de los pollos, y disminuye una vez que éstos empiezan a emplumarse (Roulin 1998; Dawson & Bortolotti 1997; Liker et al. 2001; Valera et al. 2004). La cópula tiene lugar en íntimo contacto con el hospedador (Guiguen et al. 1983) y las hembras grávidas distienden el abdomen dos o tres veces el tamaño del resto del cuerpo (fisograstria), donde producen y almacenan los huevos. Los huevos, blancos, ovalados y de apenas un mm de longitud (obs. pers.) se ponen en el material del nido y eclosionan tras unos cinco días (Guiguen et al. 1983). Tras su eclosión salen las larvas, que son blancas y de aproximadamente un mm, siendo el último estadio (el tercero), el que se puede identificar al poseer de cinco a siete protuberancias digitiformes en los espiráculos anteriores (Papp 1998). Las larvas se alimentan de la materia orgánica que hay en el nido, pasando por tres estadios larvarios de 21 días en total bajo condiciones experimentales concretas (Guiguen et al. 1983). Ni los adultos ni las larvas se han encontrado en aves adultas, por lo que se asume que las moscas colonizan nuevos nidos de hospedadores durante la fase alada de su ciclo (Grimaldi 1997; Roulin 1998, 1999).

La pupación se produce en el interior del nido, de forma que las pupas se suelen encontrar enterradas en la mezcla de materia orgánica y tierra de las oquedades ocupadas por los hospedadores. La pupa es ovalada de aproximadamente dos mm con un color que va desde marrón oscuro a claro y se caracteriza por tener unos espiráculos caudales visibles a la lupa (Papp 1998). Durante la fase de pupa experimentan una diapausa que regula la duración del ciclo de vida y les capacita para resistir a las condiciones ambientales adversas y a la ausencia del hospedador en el nido (Guiguen et al. 1983; Grimaldi 1997).

La identificación de la especie se basa en la presencia de una sola vena alar transversal radio-mediana muy corta, próxima a la base del ala (ver la nomenclatura de Castner 2000). Las claves propias del género están publicadas por Papp & Darvas (1998). Los sexos se diferencian porque el macho posee un aparato copulador con múltiples segmentos que recubren al pene, dando un aspecto redondeado en la parte final del abdomen, mientras que en la hembra destaca el aparato ovopositor, dando una apariencia puntiaguda al abdomen (Maa 1968; Grimaldi 1997; Papp 1998).

Nuestro conocimiento de esta especie tiene grandes lagunas, en particular en relación con su ciclo de vida y los factores que lo regulan. Salvo los trabajos de Calero-Torralbo y Valera (2008) y Calero-Torralbo (2011) no conocemos ningún estudio específico al respecto y se ignora por tanto qué factores promueven el inicio de la diapausa, su intensidad y duración, el nivel de recepción y respuesta a estímulos y pistas ambientales para su inicio, terminación o desarrollo o la duración de las distintas fases de la diapausa. Tampoco se sabe nada de los requerimientos térmicos de esta especie ni de sus umbrales de temperatura adecuados para el desarrollo.

Hospedadores

En la zona de estudio hay un notable número de especies que nidifican en oquedades, algunas de las cuales alcanzan altas densidades, a veces limitadas por la disponibilidad de lugares donde criar (Václav et al. 2011). Del conjunto de especies disponibles hemos trabajado con tres: el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), el estornino negro (*Sturnus unicolor*) y la carraca europea (*Coracias garrulus*). Todas ellas tienen en común ser hospedadores habituales de *Carnus* (ver Dawson & Bortoloti 1997; Grimaldi 1997; Liker et al. 2001; Valera et al. 2003; Lopez Rull et al. 2007; Václav et al. 2008) y nidificar en diversos tipos de cavidades (oquedades naturales hechas por la erosión, cavidades excavadas por otras especies en taludes arenosos, cavidades en construcciones humanas y nidales artificiales).

Realizaremos una breve descripción de las dos primeras especies para dar más detalles de la carraca, la especie hospedadora modelo para la mayor parte de los estudios presentados en esta tesis.

El estornino negro tiene un periodo de cría que se puede extender de marzo a junio. Pone de cuatro a cinco huevos que incuba durante 10-15 días. Los pollos abandonan el nido a los 18-25 días de la eclosión (Cramp & Perrins 1994). A diferencia de cernícalos y carracas (que ponen sus huevos directamente sobre el suelo de la oquedad), los estorninos construyen un nido a base de plantas, hojas, flores y en

ocasiones plumas (Polo et al. 2004). Algunas parejas de estornino hacen en nuestra zona de estudio una primera puesta a principios de marzo y una segunda a finales de mayo o junio. El cernícalo comienza la cría a primeros de abril. Realiza una única puesta de entre tres y siete huevos, que incuba durante 28-30 días. Los pollos están en el nido hasta los 26-30 días de edad (Village 1990). Estas dos especies son residentes en la Península Ibérica.

La carraca (Familia Coraciidae) es un migrante transahariano que selecciona áreas abiertas de clima mediterráneo con temperaturas cálidas durante el periodo de cría (Avilés et al. 1999; Václav et al. 2011). Llega al área de estudio en la provincia de Almería en abril. Su reproducción se extiende desde mayo hasta mediados de julio (Václav et al. 2011). Es un ave con comportamiento territorial, aunque también puede formar colonias laxas, y es filopátrica (Cramp 1985; Valera et al. en prep.). Aunque, como se ha comentado, no aporta material al nido, tiene una interesante conducta de higienización del mismo antes de la puesta (Amat-Valero et al. en prep.). Realiza una sola puesta de entre cuatro a seis huevos generalmente y tiene una marcada asincronía en la eclosión puesto que comienza a incubar a partir del tercer huevo (Cramp 1985). Esto genera gran diferencia de tamaños en los pollos de una misma nidada (Parejo et al. 2007). La incubación dura alrededor de 20 días y los pollos permanecen en el nido hasta los 20-22 días de vida (Cramp 1985; Václav et al. 2011).

Microhábitats

Los hospedadores nombrados anteriormente se caracterizan por criar en diversos tipos de oquedades. Especialmente, la carraca utiliza comúnmente en el área de estudio tres tipos diferentes de cavidades: i) cavidades naturales en los taludes arenosos o rocosos de las ramblas, excavadas por la acción de la erosión o por otras aves, principalmente abejarucos (*Merops apiaster*), ii) oquedades en construcciones humanas, tanto en paredes de cortijos abandonados como en las paredes de los puentes de carretera, y iii) nidales artificiales (cajas nido) instalados en las paredes de los taludes de las ramblas, en paredes de cortijos abandonados o en troncos de árboles (principalmente eucaliptos). Buena parte de nuestro trabajo se basa en las diferencias que existen entre estos tipos de cavidades ya que, a pesar de la variabilidad dentro de cada uno de estos tipos, las tres clases de oquedades mantienen notables diferencias entre sí que pueden proporcionar

condiciones ambientales particulares tanto para las aves como para *Carnus hemapterus* (ver Capítulo I).

JUSTIFICACIÓN DEL SISTEMA DE ESTUDIO

Diversos rasgos de *Carnus hemapterus* y del escenario de trabajo hacen que nuestro sistema de estudio sea particularmente adecuado para analizar la influencia de los factores ambientales, y en particular del microclima, sobre la diapausa y emergencia de este díptero. Revisamos a continuación estos rasgos brevemente.

- Desarrollo de buena parte del ciclo vital del parásito en una localización determinada: Este parásito desarrolla buena parte de su ciclo vital en un mismo hábitat. La dispersión durante la fase alada no es necesaria si la cavidad es ocupada por un hospedador. Esto supone que la mayor parte de su ciclo está expuesta a condiciones ambientales concretas que son fácilmente analizables.
- Rango de hospedadores: Debido a la gran variedad de hospedadores adecuados para *Carnus* (con grandes diferencias en cuanto a características fisiológicas, fenológicas, ecológicas y de comportamiento), las presiones selectivas actuantes sobre este díptero son muy diversas. Esta variedad puede producir variación a nivel intraespecífico en las respuestas fenológicas del parásito en función de la especie hospedadora (Calero-Torralbo 2011). Por lo tanto, se podrían generar diversas estrategias alternativas (ej. variación en la duración de los ciclos de vida dentro de una misma población) con el objetivo de mantener una eficacia biológica adecuada.
- Variedad de microhábitats: Como se ha descrito, tanto los diversos hospedadores de *Carnus* como el parásito ocupan diferentes tipos de cavidades que pueden tener características específicas. La variedad de nidos en los que el parásito habita puede traducirse en un amplio rango de condiciones ambientales a las que *Carnus* ha de adaptarse y que pueden determinar sus estrategias vitales, particularmente la diapausa.
- Variabilidad intraespecífica en ciclos vitales: *Carnus* parece mostrar una diapausa polimórfica. Además de una diapausa invernal de varios meses (Guiguen et al. 1983; Grimaldi 1997), Guiguen et al. (1983) describieron (bajo

condiciones experimentales) una diapausa corta en primavera y Valera et al. (2006) una diapausa prolongada que puede durar varios años.

- Sincronización con el hospedador: Diversos autores han señalado cierto grado de sincronización entre la aparición del hospedador y la emergencia del parásito adulto (Liker et al. 2001; Valera et al. 2003; Calero-Torralbo et al. 2013), por lo que es de suponer la existencia de señales ambientales que regulen tal sincronía.
- Sensibilidad a factores ambientales, fundamentalmente la temperatura: El fotoperiodo es uno de los factores más frecuentemente implicado en la regulación de la diapausa. Sin embargo, para algunas especies (como aquellas que habitan dentro de cuevas o enterradas) y hábitats (ej. tropicales) la intensidad lumínica resulta poco apreciable (Danks 1987, 2006; Kostal 2006). Dadas las bajas condiciones de luminosidad en las que se encuentran las pupas de *Carnus* (Amat-Valero et al. en prep.) en las cavidades que habita durante la diapausa invernal creemos que el fotoperiodo puede ser un factor poco importante en la regulación de la diapausa en este parásito. Sin embargo, sí hay estudios que sugieren que la temperatura puede jugar un papel importante en la regulación de la diapausa de *Carnus* (Calero-Torralbo & Valera 2008; Calero-Torralbo 2011).

Por tanto nuestro sistema de estudio es ideal para investigar la respuesta de parásitos generalistas a variables ambientales en hábitats heterogéneos. Los resultados obtenidos nos dotarían de bases sólidas para posteriores estudios sobre las consecuencias que las diferentes estrategias tendrían en la relación parásito-hospedador y/o las implicaciones de la capacidad del parásito para responder con mayor o menor éxito a la aparición de ambientes novedosos (Cambio Global).

OBJETIVOS-HIPÓTESIS

El objetivo principal de esta tesis es estudiar el efecto de factores abióticos, fundamentalmente la temperatura, en la regulación de la diapausa y emergencia del ectoparásito *Carnus hemapterus*. Este estudio se realiza a pequeña escala, de microhábitat, puesto que, como ya se ha comentado, son las variables abióticas a este nivel (el microclima) las más adecuada según las características de nuestro organismo

modelo. También se pretende esclarecer algunos de los mecanismos y estrategias implicadas en la mencionada regulación.

Con carácter secundario esta tesis pretende aumentar nuestro conocimiento sobre aspectos fundamentales de la historia natural de *Carnus*, como es su ciclo vital, en el entendimiento de que es necesario un conocimiento preciso del organismo modelo para poder abordar con bases sólidas cuestiones más complejas como las relacionadas con el estudio de la interacción parásito-hospedador.

Concretamente los objetivos son:

1. Caracterizar el microhábitat en el que se desarrolla buena parte de la fase de vida libre de *Carnus* (su diapausa) con el fin de conocer cuáles son las principales variables abióticas que conforman el microclima en el que vive y la variabilidad de las mismas. (**Capítulo I**).

2. Determinación del ciclo biológico del parásito y estudio del efecto de las condiciones abióticas en la terminación de la diapausa y emergencia del parásito.

2.1 Duración de la diapausa y regulación y variación del voltinismo (**Capítulo II**).

2.2 Efecto de la temperatura en la terminación de la diapausa y ciclo de vida del parásito (**Capítulo III**).

La principal hipótesis de trabajo es que las condiciones microclimáticas, principalmente la temperatura, tienen un papel fundamental en la regulación del ciclo de vida de *Carnus*, concretamente en la duración de la diapausa, en el desarrollo de la postdiapausa y en el patrón de emergencia del adulto. A partir de esta hipótesis general emitimos hipótesis y predicciones en cada uno de los objetivos. Específicamente:

1. Microhábitats y microclimas (Capítulo I).

La caracterización del microclima de los distintos microhábitats que *Carnus* ocupa es básica para poder profundizar en el estudio de la influencia de los factores abióticos en el ciclo de vida del parásito. Así pues, como primer paso, se han estudiado las condiciones abióticas, en concreto temperatura y humedad relativa, en cada tipo de microhábitat durante un periodo de casi dos años (de agosto a junio de 2009-2010 y 2011-2012).

Por lo tanto, nos planteamos determinar las posibles diferencias microclimáticas durante un ciclo anual, así como la consistencia de las mismas y de esta manera, resaltar las diferentes implicaiones que pueden tener el microlcima en los organismos a dos niveles, por un lado en un insecto (ectotermo) y por otro lado, en un ave (endotermo).

2. Ciclo de vida y efecto de las condiciones abióticas en la duración de la diapausa (Capítulo II y III)

2.1. Duración de la diapausa y regulación y variación del voltinismo (Capítulo II)

Guiguen et al. (1983) describieron la existencia de una diapausa corta en *Carnus* en condiciones de laboratorio, lo que permitiría el acortamiento del ciclo y por lo tanto el bi o multivoltinismo. A pesar de las implicaciones de este hecho en la relación parásito-hospedador y en la supervivencia del parásito, no se han realizado más estudios hasta la fecha. Por otro lado, los estudios sobre variación en voltinismo a escala local son escasos. Por tanto, creemos interesante el estudio de la duración de la diapausa y el voltinismo en *Carnus* ya que puede contribuir al conocimiento de los mecanismos subyacentes a la variación en historias vitales. También puede informar sobre las pistas que usa el parásito para iniciar la diapausa y/o realizar diapausa facultativa. Este capítulo pretende esclarecer la coexistencia de diapausas de distinta duración en una misma población y, por tanto, la coexistencia de estrategias uni y multivoltinas en condiciones naturales.

En nuestra área de estudio *Carnus* parasita diversas especies de aves, que tienen distinta fenología de cría. Por tanto, sus hospedadores están disponibles a lo largo de un prolongado periodo de tiempo durante el cual las condiciones ambientales varían notablemente.

Nuestra *hipótesis de trabajo* es que tanto la disponibilidad prolongada de recursos como la presencia de varias especies de hospedador con diferente fenología de cría favorecerá la coexistencia de diversas estrategias vitales en el parásito (multi vs. univoltinismo) mediante la regulación de la duración de la diapausa.

Predecimos: i) que las pupas de moscas parasitando a aves de fenología temprana realizarán una diapausa corta mientras que las pupas de moscas que parasitan a aves de fenología tardía realizarán una diapausa larga, y ii) la coexistencia de individuos uni y multivoltinos.

2.2. Terminación de la diapausa (Capítulo III)

Todavía no se conoce bien cómo los factores abióticos regulan los mecanismos de sincronización entre los parásitos y hospedadores (Hodek 2002; Thomas & Blanford 2003). Aún más, la identificación de las señales que estimulan la finalización de la diapausa y la sincronización de la emergencia son desconocidas para muchas especies, y en particular para *Carnus*. A nivel general, se conoce que las bajas temperatura, y concretamente los choques de frío (*chilling*), pueden desencadenar la ruptura de la diapausa y el comienzo del desarrollo para algunas especies (Tauber et al. 1986).

En este contexto, nuestra *hipótesis* es que las pupas en diapausa son sensibles a cambios térmicos y que las condiciones térmicas durante el invierno regulan la diapausa y sincronizan la emergencia de *Carnus*. Además, pretendemos determinar si los choques de frío son un estímulo necesario para reanudar el desarrollo en este díptero.

Predecimos que: i) pupas en diapausa invernal emergerán antes cuando las condiciones óptimas (de primavera) se adelantan en el tiempo, y ii) un evento de frío puede promover una mejor sincronización de la población que condiciones de temperatura constantes.

Estos planteamientos nos ayudarán a esclarecer el papel de la temperatura en el ciclo vital y sincronización de este parásito con sus hospedadores.

A continuación se aporta información adicional que complementa los objetivos arriba planteados:

Microhábitat y emergencia del parásito

El estudio del microclima sobre las respuestas fenológicas de insectos ha adquirido recientemente inusitado interés (Kingsolver 1979; Layne 1993; Pincebourde et al. 2007; Pincebourde & Woods 2012), pero es escasa la información del efecto de variables abióticas a microescala sobre la fenología de emergencia de muchas especies (ver, no obstante, Weiss 1995; Ohashi et al. 2005; Vermunt et al. 2012). En localidades donde los microhábitats son muy heterogéneos, la variación intraespecífica en la fenología de emergencia puede estar determinada por respuestas específicas al ambiente más próximo (ver Kingsolver 1979; Weiss et al. 1993). Este hecho tendría importantes implicaciones en la relación parásito-hospedador, ya que puede resultar en variación de la sincronización parásito-hospedador a pequeña escala.

Variabilidad intraespecífica en la emergencia de Carnus hemapterus en relación con el tipo de hábitat (Anexo I)

Recientemente Calero-Torralbo et al. (2013) informaron de diferencias en la emergencia de *Carnus* asociadas al tipo de hábitat aunque no exploraron los factores causantes de tales diferencias.

Nuestra primera presunción es que las condiciones microclimáticas en las que se desarrollan las pupas de *Carnus* determinarán su patrón de emergencia. Por lo tanto, suponemos: i) diferencias en el patrón de emergencia de moscas invernando en cavidades con diferente microclima.

En este contexto pretendemos además esclarecer la importancia relativa de diversas variables microclimáticas sobre el patrón de emergencia del parásito. Puesto que las presiones selectivas varían entre tipos de cavidades, según se muestra en el Capítulo I, nuestra segunda suposición es que las pupas responderán específicamente a las condiciones predominantes en las que viven, de forma que la emergencia de las moscas será modulada por diferentes factores en cada tipo de nido.

Particularmente pensamos que: ii) la emergencia de los individuos que habitan ambientes estables será modulada fundamentalmente por variables asociadas a valores promedio de temperatura mientras que la fluctuación de la temperatura y las condiciones térmicas extremas serán fundamentales en la determinación de la emergencia de individuos habitando en zonas con microclimas fluctuantes.

Si dichas diferencias se perpetúan en el tiempo y el flujo genético se reduce debido a baja dispersión de individuos, podrían promoverse adaptaciones locales y fijación de rasgos fenológicos para cada tipo de microhábitat.

Efecto diferencial de la temperatura según las fases de la diapausa. Consistencia del efecto del microclima (Anexo II).

Diversos autores han señalado diferencias en sensibilidad a estímulos térmicos durante las distintas fases de la diapausa (Tauber et al. 1986; Kostal 2006; Danks 2007) y Calero-Torralbo & Valera (2008) mostraron el efecto de la manipulación de la temperatura al final de la post-diapausa en el patrón de emergencia de *Carnus*.

Sobre la base de esta información nuestra presunción es que cambios térmicos durante la diapausa invernal y cerca del momento de la emergencia promueven diferentes patrones de emergencia en el díptero parásito.

Aprovechando las diferencias en microclima entre los distintos tipos de microhábitat usados por *Carnus* realizamos dos experimentos: (1) homogenización de las condiciones durante la diapausa invernal. En este caso pensamos que: i) la emergencia de *Carnus* será similar en todos los tipos de nidos.

El segundo experimento (2) se basa en el efecto acelerador que las fluctuaciones térmicas tienen sobre la tasa de desarrollo. Consiste en la manipulación de la oscilación térmica en el periodo previo a la emergencia. Suponemos que: ii) un aumento de la fluctuación térmica en pupas de ambientes estables acelerará la tasa de emergencia mientras que la disminución de la fluctuación térmica en pupas provenientes de ambientes inestables con fuerte oscilación térmica disminuirá su tasa de emergencia.

Pretendemos revelar las diferentes sensibilidades de las fases de la diapausa de *Carnus* al ambiente, evaluar la consistencia de los efectos de estímulos producidos en distintas fases de la diapausa y mostrar las diferencias entre microclimas en patrones y respuestas del parásito.

Requerimientos térmicos de *Carnus* para el desarrollo de la post-diapausa en diferentes microhábitats

Una estimación precisa de los requerimientos térmicos (GD) que una especie necesita para completar un cierto estadio requiere someterla a un amplio rango de condiciones térmicas constantes en el laboratorio. Ante la falta de información básica sobre esta especie (umbrales térmicos) y la imposibilidad de realizar esta aproximación en este estudio (Anexo III) hemos realizado una primera aproximación al tema calculando los GD con datos de campo.

Nuestra presunción inicial es que, independientemente del microhábitat ocupado, la población de *Carnus* tiene la misma ventana termal.

Suponemos que debido a las diferencias en microclima entre tipos de cavidades, los GD necesarios para emerger serán diferentes para las moscas de cada microhábitat. La dependencia de la duración del desarrollo a la temperatura variará entre microhabitats y por lo tanto también lo hará la suma de GD. También analizamos la relación entre la tasa de emergencia y la acumulación de calor en cada microhábitat, así como la diferente acumulación a lo largo de la estación y pretende explorar la existencia de diferencias intraespecíficas en los umbrales térmicos de la especie. Finalmente, se exploran posibles sesgos metodológicos en el cálculo de los GD.

REFERENCIAS

- Abouheif E, Wray GA (2002) Evolution of the gene net-work underlying wing polyphenism in ants. *Science* 297: 249–252.
- Abrami G (1972) Optimum mean temperature for plant growth calculated by a new method of summation. *Ecology* 53: 893-900.
- Aliniazee MT (1975) Thermal unit requirements for determining adult emergence of the western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the Willamette Valley of Oregon. *Environmental Entomology* 5: 397-402.
- Allen JC (1976) A modified sine wave method for calculating day degrees. *Environmental Entomology* 5: 388-396
- Allen JC, Jason H (2000) Byrd Computer modeling of insect growth and its application to forensic entomology (Report N°. 181992). National Institute of Justice, U.S. Department of Justice.
- Anderson JF (1970) Induction and termination of embryonic diapause in the salt march mosquitoe, Aedes atropalpus (Diptera: Culicidae). Bulletin Connecticut Agricultural Experiment Station 711: 1-22
- Andrew NR, Hart RA, Jung MP, Hemmings Z, Terblanche JS (2013) Can temperature insects take the heat? A case study of the physiological and behavioural responses in common ant, *Iridomyrmex pupereus* (Formicidae), with potential climate change. *Journal of Insect Physiology* 59: 870-880
- Aoki T (1999) Larval development, emergence and seasonal regulation in *Asiagomphus pryeri* (Selys) (Odonata: Gomphidae). *Hydrobiologia* 394: 179-192
- Araújo MB, Luoto M (2007) The importance of biotic interactions for modeling species distributions under climate change. *Global Ecology and Biogeography* 16: 743-753
- Arnold CY (1960) Maximum-minimum temperatures as a basic for computing heat units. *Proceedings of American Society Horticultural Science* 76: 682-692
- Askew RR (1971) Parasitic insect. Heinemann. London
- Avilés JM, Sánchez JM, Sánchez A, Parejo D (1999) Breeding biology of the Roller *Coracias garrulus* in farming areas of the southwest Iberian Peninsula. *Bird Study* 46: 217-223.
- Avilés JM, Parejo D (2002) Diet and prey type selection by Rollers (*Coracias garrulus*) during the breeding season in southwestern Iberian Peninsula. *Alauda* 70: 227-230.
- Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmack C, Bezemer TM, Brown VK, Butterflield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Harrington R, Hartley S, Jones TH, Lindroth RL, Press M, Symrnioudis I, Watt AD, Whittaker JB (2002) Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biol*ogy 8: 1-16
- Bartholomew GA (1966) Interaction of physiology and behavior under natural conditions. In: *The Galapagos* (ed. Bowman RI). University of California Press, Berkeley, pp. 39-45
- Baskerville GL, Emin P (1969) Rapid estimation of heat accumulation from maximum and minimum temperatures. *Ecology:* 50: 514-517.
- Beck SD (1980) Insect photoperiodism, 2nd ed. Academic Press, New York and London. 387 p.
- Beck SD (1983) Thermal and thermoperiodic effects on larval development and diapause in the European Corn-borer, *Ostrinia nubialis*. *Journal of Insect Physiology* 29: 107-112.
- Behrens W, Hoffmann K, Kempa S, Gabler S, Merkel-Wallner G (1983) Effect of diurnal thermoperiods and quickly oscillating temperatures on the development and reproduction of crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Oecologia* 59: 279-287.

- Bernal J, Gonzalez D (1993) Experimental assessment of a degree-day model for predicting the development of parasites in the field. *Journal of Applied Entomology*. 116: 459–466.
- Bobson A, Lafferty KD, Kuris AM, Hechinger RF, Jetz W (2008) Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11482-11489.
- Bonhomme R (2000) Bases and limits to using `degree.day' unit. *European Journal of* Agronomy 13: 1-10.
- Bradford MJ, Roff DA (1995) Genetic and phenotypic sources of life-history variation along a cline in voltinism in the cricket *Allonemobius socius*. *Oecologia* 103: 319–326.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM (2007) Evolution of animal photoperiodism. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 38: 1–25.
- Brake I (2011) World catalog of Carnidae (Diptera, Schizophora). Myia 12: 113-169
- Briere JF, Pracros P, Le Roux AY, Pierre JS (1999) A novel rate model of temperaturedependent development for arthropods. *Environmental Entomology* 28: 22–29.
- Broitman BR, Szathmary PL, Mislan KAS, Blanchette CA, Helmuth B (2009) Predatorprey interactions under climate change: the importance of habitat vs body temperature. *Oikos*, 118: 219–224.
- Bush AL, Fernandez JC, Esch GW, Seed JR (2001) *Parasitism: The Diversity and Ecology of Animal parasites.* Cambridge University Press, Cambridge (UK).
- Calero-Torralbo M.A, Valera F (2008) Synchronization of host-parasite cycles by means of diapause: host influence and parasite response to involuntary host shifting. *Parasitology* 135: 1343-1352.
- Calero-Torralbo, MA (2011) Factores ecológicos y mecanismos implicados en la variabilidad de la interacción entre un ectoparásito generalista (*Carnus hemapterus*) y sus hospedadores. PhD dissertation, University of Granada, Spain.
- Calero-Torralbo MA, Václav R Valera F (2013) Intra-specific variability in life-cycle synchronization of an ectoparasitic fly to its avian host. *Oikos* 122: 274-284.
- Campbell A, Frazer BD, Gilbert N, Gutierrez AP, Mackauer M (1974) Temperature requirements of some aphids and their parasites. *Journal of Applied Entomology* 11: 431–438.
- Campbell A, Mackauer M (1975) Thermal constants for development of the pea aphid (homoptera: aphididae) and some of its parasites. *The Canadian Entomologist* 107: 419-423.
- Candolle AP (1855) Geographique botanique, raisonée. París
- Cannings RJ (1986) Infestations of *Carnus hemapterus* Nitzsch (Diptera: Carnidae) in Northern Saw-whet Owl nests. *Murrelet* 67: 83-84
- Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Barker CM, Scott TW (2013) Effect of fluctuating daily temperature at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* life-history traits *PLoS One* 8: e58824
- Castner JL (2000) *Photographic Atlas of Entomology and Guide to Insect Identification*. Feline Press; Gainesville, pp. 5-25.
- Chakarov N, Boerner M, Kruger O (2008) Fitness in common buzzards at the cross-point of opposite melanin-parasite interactions. *Functional Ecology* 22: 1062-1069.
- Charnov EL, Gillooly JF (2003) Thermal time: Body size, food quality and the 10° rule. *Evolutionary Ecology Research* 5: 43-51
- Clauss MJ, Venable DL (2000) Seed germination in desert annuals: An empirical test of adaptive bet hedging. *American Naturalist* 155: 168-186.

- Cohen D (1966) Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *Journal of Theoretical Biology* 16: 267-282.
- Cramp S (1985) Handbook of the Birds of Europe, Middle East and North Africa, Vol. IV. Oxford University Press, Oxford, Ontario.
- Cramp S, Perrins CM (1994) Handbook of the birds of Europe the Middle East and North Africa. Vol VIII. Oxford University Press. Oxford.
- Curry GL, Feldman RM, Smith KC (1978) A stochastic model of a temperature-dependent population. *Theoretical Population Biology* 13: 197-213.
- Dambroski HR, Feder JL (2007) Host plant and latitude-related diapause variation in *Rhagoletis pomonella*: a test for multifaceted life history adaptation on different stages of diapause development. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 2101-2112.
- Danforth BN (1999) Emergence dynamics and bet hedging in a desert bee, *Perdita portalis*. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 266: 1985-1994.
- Danks HV (1987) *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological Survey of Canada n° 1, Ottawa, Ontario, (Canada).
- Danks HV (1992) Long life cycles in insects. Canadian Entomologist 124: 167-187.
- Danks HV (2002) The range of insect dormancy responses. *European Journal of Entomology* 99: 127-142.
- Danks HV (2006) Key themes in the study of seasonal adaptations in insects II. Life-cycle patterns. *Applied Entomology and Zoology* 41: 1-13.
- Danks HV (2007) The elements of seasonal adaptations in insects. *Canadian Entomologist* 139: 1-44.
- Danks HV, Foottit RG (1989) Insects of the boreal zone of Canada. *Canadian Entomologist* 121: 625-690.
- David JR, Allemand J, Van Herrewege J, Cohet Y (1983) Ecophysiology: abiotic factors. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson Jr., J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila* Vol. 3d. Academic Press, New York, pp. 105-170.
- Dawson RD, Bortolotti GR (1997) Ecology of parasitism of nestling American Kestrels by *Carnus hemapterus* (Diptera, Carnidae). *Canadian Journal of Zoology* 75: 2021-2026.
- Dawson RD, Hillen KK, Whitworth TL (2005) Effects of experimental variation in temperature on larval densities of parasitic *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae) in nests of tree swallows (Passeriformes: Hirudinidae). *Environmental Entomology* 34: 563-568.
- de Meeûs T, Michalakis Y, Renaud F (1998) Santa Rosalia revisited: or why are there so many kinds of parasites in "the garden of earthly delights? *Parasitology Today* 14: 10-13.
- Dixon AFG, Honek A, Keil P, Kotela MAA, Sizling AL, Jarosik V (2009) Relationship between the minimum and maximum temperature thresholds for development in insects. *Functional Ecology* 23: 257-264
- Dong YC, Wang ZJ, Clarke AR, Pereira R, Desneux N, Niu CY (2013) Pupal diapause development and termination is driven by low temperature chilling in *Bactrocera minax*. *Journal of Pest Science* 86: 429-436.
- DuRant JA (1990) Influence of temperature on spring emergence of European Cron Borer Moths (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural Entomology* 7: 259-264
- Evans JD, Wheeler DE (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee. *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 96: 5575-5580.

- Evans JD, Wheeler DE (2001a) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology*. 2, research0001.1-0001.6.
- Evans JD, Wheeler DE (2001b) Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bioessays* 23: 62-68.
- Evans MEK, Ferriere R, Kane MJ, Venable DL (2007) Bet hedging via seed banking in desert evening primroses (Oenothera, Onagraceae): demographic evidence from natural populations. *American Naturalist* 169: 184-194.
- Fan YQ, Groden E, Drummond FA (1992) Temperature-dependent development of Mexican bean beetle (Coleoptera, Coccinellidae) under constand and variable temperatures. *Journal of Economic Entomology* 85: 1762-1770
- Frutiger A, Buergisser G (2002) Life history variability of grazing stream insect (*Liponeura cinerascens minor*; Diptera: Blephariceridae). *Freshwater Biology* 47: 1618-1632
- Gandon S, Van Zandt PA (1998) Local adaptation and host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 214-216.
- Gates DM (1980) Biophysical Ecology. Spinger-Verlag, New York.
- Geiger R, Aron RH, Todhunter P (2009) *The Climate Near the Ground*. Rowman & Littlefield Publishers, Lanham, MD.
- Gilbert N, Raworth DA (1996) Insects and temperature a general theory. *Canadian Entomololy* 128: 1-13.
- Girvan JR, Braithwaite VA (1998) Population differences in spatial learning in three-spined sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B.* 265: 913-918.
- Gonçalves MF, Torres LM (2011) The use of the cumulative degree-days to predict olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi), activity in traditional olive groves from the northeast of Portugal. *Journal of Pest Science* 84: 187-197
- Gray DR, Ravlin FW, Braine JA (2001) Diapause in the gypsy moth: a model of inhibition and development. *Journal of Insect Physiology* 47: 173-184.
- Grimaldi D (1997) The bird flies, Genus *Carnus*: Species revision, generic relationships and a fossil *Meoneura* in amber (Diptera: Carnidae). *American Museum Novitates* 3190: 1-30.
- Guiguen C, Launay H, Beaucournu JC (1983) Ectoparasites des oiseaux en Bretagne. I. Répartition et écologie d'un diptère hematophage nouveau pour la France: Carnus hemapterus Nitzsch. Revue Francaise d'Entomologie 5: 54-62.
- Hakalahti T, Hakkinen H, Tellervo V (2004) Ectoparasitic *Argulus coregoni* (Crustacea: Branchiura) hedge their bets studies on egg hatching dynamics. *Oikos* 107: 295-302.
- Härkönen L, Kaitala A (2013) Months of asynchrony in offspring production but synchronous adult emergence: the role of diapause in an ectoparasite's life cycle. *Environmental Entomology* 42: 1408-1414.
- Hastings A (1983) Can spatial variation alone lead to selection for dispersal? *Theoretical Population Biology*. 24: 244-251.
- Heeb P, Kölliker M, Richner H (2000) Bird-ectoparasite interactions, nest humidity, and ectoparasite community structure. Ecology 81: 958-968.
- Helmuth B, Kingsolver JG, Carrington E (2005) Biophysics, physiological ecology and climate change: does mechanism matter? *Annual Review of Physiology*. 67:177-201.
- Hodek I (2002) Controversial aspects of diapause development. *European Journal of Entomology* 99: 163-173.
- Hoffmann AA, Sgrò CM (2011) Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470: 479-485.

- Holusa J, Kocarek P, Marhoul P, Skokanova H (2012) *Platycleis vittata* (Orthoptera: Tettigoniidae) in the northwestern part of its range is close to estinction: is this tha result of landscape changes? *Journal o Insect Conservation* 16: 295-303
- Honek A (1996) The relationship between thermal constants for insect development: a verification. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 60: 115-152.
- Honek A (1999) Constraints on thermal requirements for insect development. *Entomological Science* 2: 615-621.
- Honek A, Kocourek F (1990) Temperature and development time in insects: a general relationship between thermal constants. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere*. 117: 401-439.
- Hopper KR (1999) Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology. *Annual Review* of Entomology 44: 535-560.
- Inoue T (2012) Effects of temperature on the development of overwintering immature stages of the near-threatened butterfly *Leptelina unicolor* (Bremer & Grey) (Lepidoptera: Hesperiidae). *Entomological Science* 15: 180-188.
- Jacobs W, Renner M (1988) Biologie und Ökologie der Insekten. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer.
- Janz N, Nylin S (2008) The oscillation hypothesis of host-plant range speciation. En: Tilmon KJ, (ed.). Specialization, Speciation and Radiation: The Evolutionary Biology of Herbivorous Insects. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, (USA).
- Jarosík V, Honek A, Dixon AFG (2002) Developmental rate isomorphy in insects and mites. *American Naturalist* 160: 497-510.
- Jarosík V, Kratochvíl L, Honek A, Dixon AFG (2004) A general rule for the dependence of developmental rate on temperature in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society London B (Supplementum)* 271: S219-S221.
- Kato Y, Sakate S (1981) Studies on summer diapause in pupae of Antheraea yamamai (Lepidoptera, saturniidae) .3. influence of photoperiod in the larval stage. Applied Entomology and Zoology 16: 499-500.
- Kennedy JA, Smith JR, Smyth M (1975) Diapause in *Ornithomya biloba* dufour (Diptera: Hippoboscidae) parasitic on fairy martins in South Australia. *Journal of Parasitology* 61: 369-372.
- Kingsolver JG (1979) Thermal and hydric aspects of environmental heterogeneity in the pitcher plant mosquito *Ecological Monograph* 49: 357-376.
- Kingsolver JG, Woods HA, Buckley LB, Potter KA, MacLean HJ, Higgins JK (2011) Complex life cycles and the responses of insects to climate change. *Integrative and Comparative Biology* 51: 719-732.
- Kipyatkov VE, Lopatina EB (2010) Intraspecific Variation of Thermal Reaction Norms for Development in Insects: New Approaches and Prospects. *Entomology Review* 90: 163-184
- Kirkpatrick CE, Colvin BA (1989) Ectoparasitic fly *Carnus hemapterus* (Diptera: Carnidae) in a nesting population of Common Barn-Owls (Strigiformes: Tytonidae). *Journal of Medical Entomology* 26: 109-112.
- Kostal V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52: 113-127.
- Lactin DJ, Holliday NJ, Johnson DL, Craigen R (1995) Improved rate model of temperaturedependent development by arthropods. *Environmental Entomology* 24: 68-75.

- Lajeunesse MJ, Forbes MR (2002) Host range and local parasite adaptation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 269: 703-710.
- Layne JRJ (1993) Winter microclimate of goldenrod spherical galls and its effects on the gall inhabitant *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Thermal Biology* 18: 125-130.
- Lázaro R, Rodrigo FS, Gutiérrez L, Domingo F, Puigdefábregas J (2001) Analysis of a thirtyyear rainfall record (1967-1997) from semi-arid SE Spain: a plant ecological perspective. *Journal of Arid Environments* 48: 373-395.
- Lázaro R, Rodríguez-Tamayo ML, Ordiales R, Puigdefábregas J (2004) El Clima. En: Mota J, Cabello J, Cerrillo MI, Rodríguez-Tamayo ML (eds.) *Subdesiertos de Almería: naturaleza de cine*. Consejería de Medio Ambiente- Junta de Andalucía, Almería, (Spain).
- Leather SR, Walters KFA, Bale JS (1993) *The Ecology of Insect Overwintering*. Cambridge University Press, Cambridge, (UK).
- Liker A, Markus M, Vozár A, Zemankovics E, Rózsa L (2001) Distribution of *Carnus hemapterus* in a starling colony. *Canadian Journal of Zoology* 79: 574-580.
- Lillehammer A (1987) Intraspecific variation in the biology of eggs and nymphs of Norwegian populations of *Leutra hippopus* (Plecoptera). *Journal of Natural History* 21: 29-41
- Liu SS, Meng XD (1999) Modelling development time of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) at constant and natural temperaturas. *Bulletin of Entomological Research* 89: 53-63
- Lloyd S, Soulsby EJL (1988) Immunological responses of the host. Editor: Mehlhorn, H. En: *Parasitology in focus. Facts and trends.* 619-650.
- Lopatina EB, Kipyatkov VE, Balashov SV, Dubovikoff DA, Sokolova LV (2011) Interspecific and intraspecific variation of the duration and thermal requirements for egg development in Carabid Beetles (Coleoptera, Carabidae) in the North-West of Russia. *Entomological Review* 92: 32-45
- López-Rull I, Gil M, Gil D (2007) Spots in starling *Sturnus unicolor* eggs are good indicators of ectoparasite load by *Carnus hemapterus* (Diptera: Carnidae). *Ardeola* 54: 131-134.
- Maa (1968) A new Carnus from Malaya. Pacific Insects 10: 33-36.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) *Brock Biology of Microorganisms*. 10th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, (USA).
- Maiorano A, Bregaglio S, Donatelli M, Furmagalli D, Zucchini A (2012) Comparison of modelling approaches to simulate the phenology of the European Corn Borer under future climate scenarios. *Ecological Modelling* 245: 65-74
- Manel S, Debouzie D (1995) Prediction of egg and larval development times in the field under variable temperatures. *Acta Oecologica* 16: 205-218
- Marshall AG (1981) The Ecology of Ectoparasitic Insects. Academic Press, London, (UK).
- Marshall KE, Sinclair BJ (2012) The impacts of repeated cold exposures of insects. *The Journal* of experimental Biology 215: 1607-1613
- Marco V (2001) Modelización de la tasa de desarrollo de insectos en función de la temperatura. Aplicación al Manejo Integrado de Plagas mediante el método de grados-días. *Boletín SEA* 28: 147-150
- Martin-Vivaldi M, Ruiz-Rodriguez M, Méndez M, Soler JJ (2006) Relative importante of factors affecting nestling immune response differs between junior and senior nestlings within broods of Hoopoes *Upupa epops. Journal of Avian Biology* 37: 467-476.

- Masaki, S (2002) Ecophysiological consequences of variability in diapause intensity. *European* Journal of Entomology 99: 143-154.
- Matyukhim AV, Krivosheina MG (2008) To the knowledge of Diptera (Insecta) Parasites of birds. *Zoologicheskii Zhurnal* 87: 124-125
- Menu F (1993) Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* 96: 383-390.
- Menu F, Debouzie D (1993) Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects: example of the chestnut weevil Curculio elephas (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* 93: 367-373.
- Menu F, Desouhant E (2002) Bet-hedging for variability in life cycle duration: bigger and lateremerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia* 132: 167-174.
- Merino S, Potti J (1996) Weather dependent effects of nest ectoparasites on their brid hosts. *Ecografy* 19: 107-113
- Moczek AP (2010) Phenotypic plasticity and diversity in insects. *Philosofical Transaction of the Royal Society B.* 365: 593-603
- Nitzsch CL (1818) Die Familien und Gattungen der Thierinsekten (Insecta, epizoica) als Prodromus einer Naturgeschichte derselben. *Magazin Entomology (German)* 3: 261-316.
- Ohashi K, Sakuratani Y, Osawa N, Yano S, Takafuji A (2005) Thermal microhabitat use by the Ladrybird beetle, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae), and its life cycle consequences. *Environmental Entomology* 34: 432-439
- Oke TR (1987) Boundary Layer Climates. Methuen, London
- Oldenborgh GJV, Drijfhout S, Ulden AV, Haarsma R, Sterl A, Severijns C, Hazeleger W, Dijkstra H (2009) Western Europe is warming much faster than expected. *Climate of the Past* 5: 1-12.
- Olofsson H, Ripa J, Jonzén N (2009) Bet-hedging as an evolutionary game: the trade-off between egg size and number. *Proceedings of the Royal Society B* 276: 2963-2969.
- Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F (2005) Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends in Ecology & Evolution*. 20: 328-336.
- Papp L (1998) Family Carnidae. Manual of Palaearctic Diptera 3: 211-217.
- Papp L, Darvas B (1998) Contributions to a manual of Palaearctic Diptera, Vol. 3. Science Herald, Budapest, Hungary, 880.
- Parejo D, Silva N, Avilés JM (2007) Within-brood size differences affect innate and acquired immunity in Roller *Coracias garrulus* nestlings. *Journal of Avian Biology* 38: 717-725.
- Pedigo L (1996) *Entomology and pest management*. 2nd Edition. Ed. Prentice-Hall Inc. New Jersey. 679 pp.
- Petavy G, David JR, Gilbert P, Moreteau B (2001) Viability and rate of development at different tempera in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *Journal of Thermal Biology* 26: 29-39.
- Philippi T (1993a) Bet-hedging germination of desert annuals beyond the 1st year. *American Naturalist* 142: 474-487.
- Philippi T (1993b) Bet-hedging germination of desert annuals variation among populations and maternal effects in *Lepidium lasiocarpum*. *American Naturalist* 142: 488-507.
- Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- Pincebourde S, Sinoquet H, Combes D, Casas J (2007) Regional climate modulates the canopy mosaic of favourable and risky microclimates for insects. *Journal of Animal Ecology* 76: 424-438.

- Pincebourde S, Woods HA (2012) Climate uncertainty on leaf surfaces: the biophysics of leaf microclimates and their consequences for leaf-dwelling organisms. *Functional Ecology* 26: 844-853.
- Polo V, Veiga JP, Cordero JP, Viñuela J, Monaghan P (2004) Female starlings adjust primary sex ratio in response to aromatic plants in the nest. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 271: 1929-1933.
- Potter KA, Woods HA, Pincebourde S (2013) Microclimatic challenges in global change biology. *Global Change Biology* 19: 2932-2939.
- Poulin R (1998) Evolutionary Ecology of Parasites. Chapman and Hall, London, (UK).
- Poulin R, Krasnov BR, Shenbrot GI (2008) Interaction frequency across the geographical range as a determinant of host specialisation in generalist fleas. *International Journal of Parasitology* 38: 989-997.
- Price PW (1975). Introduction: the parasitic way of life y its consequences. 1975. En: *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites*. Plenum Press, New York. pp 1-13.
- Pruess KP (1983) Day-degree methods for pest management. *Environmental Entomology* 12: 613-619.
- Radmacher S, Strohm E (2011) Effect of constant and fluctuating temperatures on the development of the solitary bee *Osmia bicornis* (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* 42: 711-720.
- Ratte HT (1984) Temperature and insect development. En: Hoffmann, KH (ed). *Environmental physiology and biochemistry of insects*. Springer, Berlin. pp 33-66
- Réaumur RA (1735) Observation du thérmomètre, faites à Paris pendant l'année 1735, comparées avec celles qui ont été faites sous la ligne, à l'Isle de France, à Alger et en quelquesunes de nos isles de l'Amérique. Mémoires de l'Académie *Royale des Sciences de Paris*, 1735: 545-576.
- Réaumur RA (1736) Mémoires pour server à l'histoire des insects. De l'Imprimerie Royale, Paris.
- Régnière J, Logan JA (2003) Animal life Cycle models. En: Schwartz M (ed) *Phenology: an integrative environmental science*. Kluwer, Dordrecht, pp 237-254
- Reibisch J (1902) Über den Einfluss der temperatur auf die Entwicklung von fischeiern. *Wiss Meeresuntersuch* 2: 213-231.
- Reissig WH, Barnard J, Weires RW, Glass EH, Dean RW (1979) Prediction of apple maggot fly emergence from thermal unit accumulation. *Environmental Entomology* 8: 51-54.
- Roulin A (1998) Cycle de reproduction et abondance du diptère parasite *Carnus hemapterus* dans les nichées de chouettes effraies *Tyto alba*. *Alauda* 66: 265-272.
- Roulin A (1999) Fécondité de la mouche *Carnus hemapterus*, ectoparasite des jeunes chouettes effraies *Tyto alba*. *Alauda* 67: 205-212.
- Roulin A, Brinkhof MWG, Bize P, Richner H, Jungi TW, Bavoux C, Boileau N, Burneleau G (2003) Which chick is tasty to parasites? The importance of host immnunology vs. parasite life history. *Journal of Animal Ecology* 72: 75-81.
- Sabelis MW, Janssen A (1994) Evolution of life-history patterns in the Phytoseiidae. En Mites: Ecological and Evolutionary Analyses of Life- History Patterns (ed. Houck, M. A.). Chapman and Hall; New York, USA and London, UK. pp. 70–98
- Sanderson ED, Peairs LM (1913) The relation of temperature to insect life. *Technical Bulletin New Hampshire Agricultural Experiment Station* 7: 1-125.

- Scharloo W (1991) Canalization: genetic and developmental aspects. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 22: 65-93.
- Scherrer D, Korner C (2010) Infra-red thermometry of alpine landscapes challenges climatic warming projections. *Global Change Biology* 16: 2602-2613.
- Scherrer D, Korner C (2011) Topographically controlled thermal-habitat differentiation buffers alpine plant diversity against climate warming. *Journal of Biogeography* 38: 406-416.
- Schlichting CD, Pigliucci M (1995) Gene regulation, quantitative genetics, and the evolution of reaction norms. *Evolution Ecology* 9: 154-168.
- Schlichting CD, Pigliucci M (1998) *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Schulz TA (1990) New and unusual ectoparasites on raptors. En *Wildlife rehabilitation* (eds. Ludwing DR) vol: 8. Burgess Printing Co., Edina, Minnesota, (USA)
- Sears MW, Raskin E, Angilletta MJ (2011) The world is not flat: defining relevant thermal landscapes in the context of climate change. *Integrative and Comparative Biology* 51: 666-675.
- Seppäla O, Karvonen A, Valtonen ET, Jokela J (2009) Interactions among co-infecting parasite species: a mechanism maintaining genetic variation in parasites? *Proceedings of the Royal Society B* 276: 691-697
- Sevacherian V, Stern VM, Mueller AJ (1977) Heat accumulation for timing *Lygus* control measures on a safflower-cotton complex. *Journal of Economic Entomology* 70: 399-402.
- Sharpe PJH, Demichele DW (1977) Reaction kinetics of poikilotherm development. *Journal of Theoretical Biology* 64: 649-670
- Sinclair BJ, Williams CM, Terblanche JS (2012) Variation in thermal performance among insect population. *Physiological and Biochemical Zoology* 85: 594-606
- Singh N, Mishra G, Omkar (2014) Does temperature modify slow ans fast development in two aphidophagous ladybirds? *Journal of Thermal Biology* 39: 24-31
- Soula B, Menu F (2005) Extended life cycle in the chestnut weevil: prolonged or repeated diapause? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 333-340.
- Stinner RE, Gutierrez AP, Butler GDJ (1974) An algorithm for temperature-dependent growth rate simulation. *Canadian Entomology* 106: 519-524.
- Sun X, Zhou X, Small GE, Sterner R, Kang H Liu C (2013) Energy storage and C:N:P variation in a holometabolous insect (*Curculio davidi Fairmaire*) larva across a climate gradient. *Journal of Insect Physiology* 59: 408-415
- Tauber CA, Tauber MJ (1982) Evolution of seasonal adaptations and life history traits in Chrysopa: Response to diverse selective pressures. En *Evolution and genetics of life histories* (eds. Dingle H, Hegmann JP). Springer-Verlag, New York. pp. 51-72.
- Tauber MJ, Tauber CA (1970) Adult diapause in *Chrysopa carnea*: Stages sensitive to photoperiodic induction. *Journal of Insect Physiology* 16: 2075-2080.
- Tauber MJ, Tauber CA (1975) Natural daylengths regulate insect seasonality by two mechanisms. *Nature* 258: 711-712
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S (1986) *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, Oxford, (UK).
- Teixeira LAF, Polavarapu S (2002) Phenological differences between populations of *Rhagoletix Mendax* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 31: 1103-1109.
- Teixeira LAF, Polavarapu S (2005) Evidence of a heat-induced quiescence during pupal development in *Rhagoletis mendax* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 34: 292-297.

- Thomas MB, Blanford S (2003) Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 344-350.
- Thomson JN (2005) *The Geographic Mosaic of Coevolution*. The University of Chicago Press, Chicago, (USA).
- Tillman PG, Powell JE (1991) Developmental time in relation to temperature for *Microplitis croceipes*, *M. Demolitor*, *Cotesia kazak* (Hymenoptera: Braconidae), and *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), endoparasites of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 20: 61-64.
- Tío R, Cano E, Martínez JL (2006) An approximation to the prediction of the summery emergence of *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae) based on the relationship between degree-days accumulations and adult captures. *Anales de Biologia* 28: 101-108
- Tokeshi M (1985) Life-cycle and production of the burrowing mayfly, *Ephemera danica*: A new Method for estimating Degree.Days required for growth. *Journal of Animal Ecology* 54: 919-930
- Townsend GD, Pritchard G (1998) Larval growth and development of the stonefly *Pteronarcys* californica (Insecta: Plecoptera) in the Crowsnest River, Alberta. Canadian Journal of Zoology 76: 2274-2280.
- Trudgill DL (1994) An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. *Fundamental & Applied Nematology*. 18: 407-417
- Trudgill DL, Honek A, van Straalen NM (2005) Thermal time-concepts and utility. *Annual of Applied Biology* 146: 1-14.
- Trudgill DL, Perry JN (1994) Thermal time and ecological strategies a unifying hypothesis. Annals of Applied Biology. 125: 521-532.
- Václav R, Calero-Torralbo MA, Valera F (2008) Ectoparasite load is linked to ontogeny and cell-mediated immunity in an avian host system with pronounced hatching asynchrony. *Biological Journal of the Linnean Society* 94: 463-473.
- Václav R, Valera F, Martínez T (2011) Social information in nest colonization and occupancy in a long-lived solitary breeding bird. *Oecologia* 165: 617-627.
- Valera F, Casas-Crivillé A, Hoi H (2003) Interspecific parasite exchange in a mixed colony of birds. *Journal of Parasitology* 89: 245-250.
- Valera F, Hoi H, Darolová A, Kristofik J (2004) Size versus health as a cue for host choice: A test of the tasty chick hypothesis. *Parasitology* 129: 59-68.
- Valera F, Martín-Vivaldi M, Carlés-Tolrá M (2006) Life-history variation in three coexisting species of carnid flies (Diptera: Carnidae), *Carnus hemapterus, Hemeromyia anthracina* and *Hemeromyia longirostris. European Journal of Entomology* 103: 347-353.
- van Asch M, Visser ME (2007) Phenolgy of forest Caterpillars and their host trees: the importance of Synchrony. Annual Review of Entomology 52: 37-55
- van der Have, TM (2002) A proximate model for thermal tolerance in ectotherms. *Oikos* 98: 141-155.
- Vermunt B, Cuddington K, Sodek-Swant S, Crosthwaite JC, Lyons DB, Sinclair BJ (2012) Temperatures experienced by wood boring beetles in the under bark microclimate. *Forest Ecology and Management* 269: 149-157.
- Visser ME, Caro SP, van Oers K, Schaper SV, Helm B (2010) Phenology, seasonal timing and circannual rhythms: towards a unified framework. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 3113-3127.

- Via S, Conner J (1995) Evolution in heterogeneous environments: genetic variability within and across different grains in Tribolium castaneum. *Heredity* 74: 80-90
- Village A (1990) The Kestrel T & AD Poyser, Londres.
- Weiss SB, Murphy DD, Ehrlich PR, Metzler CF (1993) Adult emergence phenology on checkerspot butterflies: the effects of macroclimate, topoclimate, and population history. *Oecologia*. 96: 261-270.
- West-Eberhard MJ (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York, (USA).
- Wharton DA (1999) Parasites and low temperatures. Parasitology 119 (Suppl.): S7-S17.
- Wheeler DE, Nijhout HF (1983) Soldier determination in *Pheidole bicarinata*: effect of methophrene on caste and size within castes. *Journal of Insect Physiology* 29: 847-854
- Wheeler DE, Nijhout HF (1984) Soldier determination in the ant *Pheidole bicarinata*: inhibition by adult soldiers. *Journal of Insect Physiology* 30: 127-135.
- Whitworth TL (1976) Host and habitat preferences, life history, pathogenicity and population regulation in species of *Protocallyphora* Hough (Diptera: Calliphoridae). PhD dissertation, Utah State University, Logan, (USA).
- William CM, Adkisson PL (1964) Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiod control of pupal diapause in the Oak silkworm, *Anthieraea pernyi. Biological Bulletin* 127: 511-525
- Willmer PG (1982) Microclimate and the environmental physiology of insects. Advances in Insect Physiology 16: 1-57.
- Wilson EO (1976) Behavioral discretization and the number of castes in an ant species. Behavioral Ecology andSociobiology. 1: 141-154.
- Worner SP (1992) Perfomance of phenological models under variable temperature regimes consequences of the Kaufmann or Rate summation effect. *Environmental Entomology* 21: 689-699.
- Yang AS (2001) Modularity, evolvability, and adaptive radiations: a comparison of the hemiand holometabolous insects. *Evolution & Development*. 2: 59-72.
- Yukawa J, Akimoto K (2006) Influence of synchronization between adult emergence and host plant phenology on the population density of *Pseudasphondylia neolitseae* (Diptera: Cecidomyiidae) inducing leaf galls on *Neolitseae sericea* (Lauraceae). *Population Ecology* 48: 13-21.
- Yukawa J, Nakagawa K, Saigou T, Awa T, Fukuda T, Higashi M (2013) Adult behavior of an ambrosia gall midge *Illiciomyia yukawai* (Diptera: Cecidomyiidae) and synchronization between its emergence and host plant phenology. *Entomological Science* 16: 400-412

CAPÍTULO I

Cavity types and microclimate: implications for ecological, evolutionary and conservation studies

Capítulo publicado en: International Journal of Biometeorology

Referencia: Amat-Valero M, Calero-Torralbo MA, Vaclav R, Valera F (2014) Cavity types and microclimate: implications for ecological, evolutionary, and conservation studies. International Journal of Biometeorology. 58: 1983-1994. DOI: 10.1017/S0031182012000534

Amat-Valero, M.¹, Calero-Torralbo, M. A.¹, Václav, R.², Valera, F.¹

¹ Departamento de Ecología Funcional y Evolutiva, Estación Experimental de Zonas Áridas (EEZA-CSIC), Ctra. Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, Spain.

² Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84506 Bratislava, Slovakia.

Aportación de la doctoranda: Ha participado en el diseño del estudio, en el trabajo de campo (búsqueda y selección de oquedades/nidos, colocación de sensores y descarga de los registros), en la colección de la base de datos, análisis estadístico de los datos, escritura del artículo, envío a la revista y posteriores arreglos en base a las revisiones de los revisores doctores expertos en la materia.

ABSTRACT

The abiotic conditions of the immediate environment of organisms are key factors for a better understanding of ecological and evolutionary processes. Yet information in this regard is biased towards some habitat types, landscapes and organisms. Here we present a two-year comparative study of the microclimatic properties (temperature, relative humidity, and their fluctuation) of three cavity types (nest-boxes, cavities in bridges and burrows in sandy cliffs) in an arid environment. We found marked and consistent months-long differences in microclimate among the three cavity types. Nest boxes were colder than the other cavity types, with temperature oscillations being an order of magnitude higher than in other cavity types. In contrast, microclimate was very stable in burrows and cavities in bridges, the former being generally warmer and drier than the latter. We also discuss the biological implications of microclimatic conditions and its variation in different cavity types by presenting two case studies, namely the temperature-humidity index and water vapor pressure during the hatching period of an endotherm and the chilling period during the diapause of an ectotherm ectoparasite. We stress the need for comparative studies of the same organisms subjected to different microclimates given the important ecological, evolutionary and conservation implications.

CAPÍTULO II

Mixed life-history strategies in a local population of the ectoparasitic fly *Carnus hemapterus*

Capítulo publicado en: Parasitology

Referencia: Amat-Valero M, Vaclav R, Martínez T, Valera F (2012) Mixed life-history strategies in a local population of the ectoparasitic fly *Carnus hemapterus*. Parasitology 139(8):1045-1053. DOI: 10.1017/S0031182013000929

Amat-Valero, M.¹, Václav, R.², Valera, F.¹

¹ Departamento de Ecología Funcional y Evolutiva, Estación Experimental de Zonas Áridas (EEZA-CSIC), Ctra. Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, Spain.

² C/ Catavieja, 31. 1°B, 04007 Almería, Spain.

Aportación de la doctoranda: Ha participado en la elaboración del diseño del estudio, trabajo de campo (búsqueda y selección de los nidos ocupados, desinfección de los nidos, seguimiento de la puesta, cría y parasitación de los pollos), trabajo de laboratorio, análisis estadístico de los datos, escritura del artículo, envío a la revista y posteriores arreglos en base a las revisiones de los revisores doctores expertos en la materia.

ABSTRACT

A major issue for the proper understanding of the evolution of life cycle histories is the regulation of voltinism and its variation. Diapause characteristics are known to regulate voltinism, but the underlying mechanisms are poorly understood. This paper studies diapause duration and voltinism variation in a haematophagous diptera parasitizing two sympatric hosts with very different breeding phenologies. We hypothesize that bivoltinism will be more frequent in carnid flies parasitizing an early breeding, multibrooded species than in flies parasitizing a late breeder, single-brooded species. We obtained evidence of the co-occurrence of uni- and bivoltinism in both clutches of the multi-brooded Spotless starling (*Sturnus unicolor*) as well as in clutches of the single-brooded European roller (*Coracias garrulus*). Unexpectedly, the proportion of bivoltine flies was similar in both host species. A remarkable degree of host-parasite synchronization at the population level was found for bivoltine flies. Our findings reveal the facultative nature of diapause in *Carnus*. We discuss the influence of abiotic conditions and host availability on polymorphism in life-history cycles and the consequences both for the parasite and the host.

CAPÍTULO III

Temperature during the free living phase of an ectoparasite influences the emergence pattern of the infective phase.

Capítulo publicado en: Parasitology

Referencia: Amat-Valero M, Calero-Torralbo MA, Valera F (2013) Temperature during the free-living phase of an ectoparasite influences the emergence pattern of the infective phase. Parasitology 140:1357-1367. DOI: 10.1007/S0048401408010

Amat-Valero, M., Calero-Torralbo, M.A., Valera, F.

Departamento de Ecología Funcional y Evolutiva, Estación Experimental de Zonas Áridas (EEZA-CSIC), Ctra. Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, Spain.

Aportación de la doctoranda: Ha participado en el diseño del estudio, trabajo de campo (identificación de los nidos ocupados, recogida de material del nido), programación de las condiciones en las cámaras climáticas y seguimiento de la emergencia del parásito, análisis estadístico de los datos, escritura del artículo, envío a la revista y posteriores arreglos en base a las revisiones de los revisores doctores expertos en la materia.

ABSTRACT

Understanding the population dynamics and co-evolution of host-parasite systems requires detailed knowledge of their phenology which, in turns, requires a deep knowledge on the effect of abiotic factors on the life cycle of organisms. Temperature is known to be a key environmental influence that participates in the regulation of diapause. Yet, not much is known about the effect of temperature on the free-living stages of true parasites and the way it may influence host-parasite interactions. Here we experimentally study the effect of ambient temperature on overwintering pupae of *Carnus hemapterus* (Diptera, Carnidae), an ectoparasitic fly of various bird species. We also test whether chilling is a prerequisite for completion of diapause in this species. In the course of three winter seasons we experimentally exposed carnid pupae from nests of various host species to spring temperature with and without chilling and recorded the emergence pattern in experimental and control groups. Experimental groups showed an advanced emergence date, a lower emergence rate and, consequently, a protracted emergence period. Chilling had no obvious effect on the start of emergence but it did advance the mean emergence date, shortened the length of the emergence period when compared with the control treatment and increased the emergence rate when compared with the spring treatment. This study identifies an environmental cue, namely temperature during the free-living stage, affecting the emergence of a widespread parasite and demonstrates the plasticity of diapause in this parasite. Our findings are of potential significance in understanding host-parasite interactions.

DISCUSIÓN INTEGRADORA

Para entender el efecto de los parásitos sobre sus hospedadores y la evolución de las interacciones parásito-hospedador es necesario comprender primero cómo afectan los factores ambientales a los organismos implicados y a la interacción de ambos (Thomas & Blanford 2003; Poulin 2007). Trabajos previos del grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis se centraron en diversas características del hospedador y su efecto en la variabilidad de la interacción entre Carnus y sus hospedadores (Calero-Torralbo 2011). No obstante, también se prestó atención a la diapausa como mecanismo implicado en la sincronización de los ciclos del parásito y sus hospedadores y se exploró el efecto de la temperatura del hospedador en la fenología de emergencia de aquél (Valera et al. 2006; Calero-Torralbo & Valera 2008). Aparte de estos trabajos el conocimiento de nuestro sistema de estudio es escaso, fundamentalmente en lo concerniente a la interacción factores abióticos-ciclo de vida de *Carnus*. Esta tesis se ha centrado precisamente en esta cuestión, intentando aumentar el entendimiento que tenemos de los factores señalados por diversos autores como imprescindibles para poder abordar con solidez el estudio de la interacción. Y nos hemos centrado precisamente en estos aspectos porque estamos de acuerdo en la necesidad de esta información como paso previo al planteamiento de preguntas de más calado y más atractivas para investigadores y editores. Queremos señalar, además, que estudios como éste se ven a su vez limitados por la escasa información sobre historia natural de esta especie, carencia que afecta a muchos otros organismos.

Los principales resultados de esta tesis son: i) los hábitats en los que *Carnus hemapterus* (y sus hospedadores) desarrolla buena parte de su ciclo de vida son muy variables en cuanto a condiciones microclimáticas. Las diferencias en microclima entre hábitats son consistentes y en buena medida predecibles de un año a otro. Estas condiciones pueden influir en aspectos fundamentales de la biología de esta especie, como su selección de hábitat, sus estrategias vitales, su solapamiento temporal con el hospedador y su eficacia biológica (Capítulo I); ii) hemos comprobado la coexistencia de generaciones uni y bivoltinas en la población y en el mismo nido, como consecuencia del desarrollo por parte de distintos individuos de diapausas cortas y diapausas invernales. Aportamos, por tanto, uno de los pocos ejemplos existentes de plasticidad fenotípica del voltinismo en una población local (Capítulo II); iii)

mostramos experimentalmente la importancia de la temperatura en la regulación de la diapausa y la emergencia de *Carnus*, esclareciendo los diversos efectos que distintas variables térmicas tienen sobre la fenología y el ritmo de emergencia del parásito según cuando se produzcan y cómo interaccionen (Capítulo III y Anexo II); iv) mostramos en condiciones naturales que el microclima del hábitat donde *Carnus* desarrolla su diapausa invernal es una fuente de variabilidad intraespecífica ya que condiciona su patrón de emergencia, y que el efecto de las variables abióticas sobre el parásito varía entre hábitats (Anexo I); y v) estudiamos diversos escenarios que permiten esclarecer los requerimientos térmicos de las pupas de *Carnus* en diapausa para emerger, sugiriendo la existencia de variabilidad intraespecífica a escala local ya sea en tales requerimientos, en los umbrales térmicos de desarrollo o en ambas variables (Anexo II).

En conjunto estos resultados muestran que Carnus es una especie sumamente plástica: hemos comprobado en nuestra área de estudio la existencia de notable variabilidad intraespecífica en diversas estrategias (voltinismo, duración de la diapausa, momento y patrón de emergencia, requerimientos térmicos). Esta plasticidad puede interpretarse en el marco del carácter generalista de la especie, tanto en cuanto a hospedadores pero también en cuanto a hábitats. Este parásito tiene una distribución muy amplia que supone una exposición del mismo a muy distintos climas a nivel de especie. Pero también, y a la vista de nuestros resultados, *Carnus* está expuesto a unas condiciones muy variables según el microhábitat que elija, aun cuando pudiera ser inicialmente clasificada como una especie especialista en un entorno concreto (el hábitat troglodita, no obstante también parasita a especies no trogloditas, ver Grimaldi 1997). Este carácter generalista implica una alta incertidumbre en cuanto a hospedadores, hábitats y clima. Carnus hemapterus hace frente a tal incertidumbre con una enorme capacidad para responder plásticamente a cambios relacionados con los hospedadores (ver Calero-Torralbo 2011) y con las condiciones ambientales locales (esta tesis), capacidad que se expresa en un ciclo de vida y estrategias vitales muy variables. La diapausa es una de estas estrategias, de especial significación para muchos organismos y en particular para *Carnus*, que muestra una diapausa extremadamente plástica: además de variar notablemente en su duración (Guiguen et al. 1983; Valera et al. 2006, Capítulo II), su respuesta a variables abióticas varía entre fases y entre microhábitats (Anexos I y II).

La variabilidad en diversas estrategias (diapausa, voltinismo) aquí mostrada tiene una consecuencia directa en la fenología y patrón de emergencia del parásito, lo que a su vez puede afectar a la sincronización de los ciclos de parásitos y hospedadores. Tal sincronización es fundamental para los primeros y tienen notables consecuencias para los segundos (Tauber et al. 1986; Danks 1987; Leather et al. 1993; van Asch & Visser 2007). Calero-Torralbo et al. (2013) encontraron unos bajos valores de sincronización entre Carnus y la carraca y sugirieron que tal asincronía podría ser una estrategia efectiva en esta especie para parasitar a otros hospedadores más tempranos. Es decir, que como se ha mostrado en otros insectos fitófagos, cierto porcentaje de asincronía fenológica podría ser una estrategia efectiva frente a la impredecibilidad de la aparición de recursos (Wiklund & Friberg 2009; Singer & Parmesan 2010). Aunque se ha sugerido que la asincronía de los ciclos puede beneficiar al hospedador, van Asch & Visser (2007) señalan que las especies parásitas (fitófagas en su caso) pueden reaccionar más fácilmente a posibles cambios fenológicos del hospedador que de manera inversa. Por tanto, lo importante para Carnus sería disponer de unos mecanismos plásticos de ajuste que le permitieran ser eficaces ante una variedad de situaciones.

Nuestros resultados arrojan luz sobre los mecanismos implicados en la regulación de la diapausa. Diversos trabajos han mostrado el papel del fotoperiodo (Tauber et al. 1986; Danks 1987), de la humedad (Hodek 2003), y de la temperatura (Hodek & Hodková 1988; Bosch & Blas 1994; Higaki & Ando 2005). Nosotros no podemos descartar el papel de varios factores y su interacción como, por ejemplo, el efecto modulador de la temperatura frente a la regulación del fotoperiodo (Tauber et al. 1986; (Bradshaw & Holzapfel 2007; Härkönen & Kaitala 2013). No obstante, nuestro estudio muestra sin lugar a dudas que variables térmicas son fundamentales en el control de la emergencia de Carnus. Nuestros resultados son bastante consistentes. Mediante aproximaciones experimentales mostramos que: i) un incremento de la temperatura en invierno produce una emergencia más temprana de las moscas (Capítulo III y Anexo II), una tasa de emergencia más lenta (Capítulo III y Anexo II), y una mayor duración del periodo de emergencia (Capítulo III), lo que indica que actúa como un estímulo temprano para el inicio del desarrollo (ver Tauber et al. 1986; Broufas & Koveos 2000; Kemp & Bosch 2005; Teixeira & Polavarapu 2005); ii) un incremento de la temperatura en primavera produce una tasa de emergencia más rápida (Anexo II), lo que coincide con lo señalado por Calero-Torralbo y Valera (2008); iii) un choque de frío (chilling)

durante la diapausa adelanta la emergencia y acorta la duración del periodo de emergencia (Capítulo III), lo que ha de ser consecuencia de una reducción del periodo de diapausa y una aceleración en el desarrollo (Shimoda & Kiuchi 1997; Milonas & Savopoulou-Soultani 2000; Dong et al. 2013). Nuestras observaciones sobre la fenología de emergencia de Carnus en los distintos hábitats se corresponden con estos efectos generales. En un hábitat como las cajas nido, que reciben tempranos choques de frío (tan pronto como noviembre) y que se caracterizan por una marcada oscilación térmica (Capítulo I), encontramos que las moscas emergen más temprano (Anexos I y II, ver también Calero-Torralbo et al. 2013), tienen una tasa de emergencia más baja (Anexos I y II) y tienen un periodo de emergencia más largo (Anexo I, ver también Calero-Torralbo et al. 2013) que las moscas de puentes y túneles. Esto se puede explicar por: i) una más temprana ruptura de la diapausa por los tempranos choques de frío, de forma que probablemente empiecen a acumular grados-día antes (ver Anexo III); ii) el efecto combinado de las relativamente bajas temperaturas medias, la oscilación térmica y las temperaturas extremas existentes antes de la emergencia. Mientras que las fluctuaciones moderadas dentro de un rango adecuado de temperaturas producen una alta tasa de desarrollo (Worner 1992; Georges et al. 1994; Liu & Meng 2000; Inoue 2012), las temperaturas extremas ocasionan paradas en el desarrollo y, como consecuencia, una disminución en la tasa de desarrollo (Petavy et al. 2011; Carrington et al. 2013), haciendo que el periodo de post-diapausa se alargue, viéndose reflejado en una tasa de emergencia también decelerada. Por el contrario, en hábitats térmicamente estables y que no reciben choques de frío o que los reciben más tarde en la estación (como las oquedades en taludes y en puentes) la diapausa probablemente durará más y, consecuentemente, las moscas tienen una emergencia más retrasada en la estación. Las temperaturas adecuadas y con pequeñas fluctuaciones previas a la emergencia hacen que sus tasas de emergencia sean más altas que las de las moscas de cajas nido, aunque mayores oscilaciones promoverían una emergencia aún más rápida (ver Anexo II). El mantenimiento en el tiempo de unas condiciones determinadas podría resultar en la selección de fenotipos térmicos específicos (Nijhout 1999; Weinig & Schmitt 2004) para cada tipo de hábitat, de forma que, por ejemplo, las moscas de cajas nido tuvieran distintos requerimientos, tasas de desarrollo y/o umbrales térmicos que las moscas de oquedades naturales (ver Anexo III). Otra explicación para los patrones observados podría ser la existencia de una mayor variedad de estrategias alternativas en moscas de
nidos con alta impredecibilidad del ambiente y con condiciones extremas, de forma que una proporción de individuos responda de una manera y otros de otra, dependiendo de su sensibilidad a las condiciones ambientales y su interacción genotipo-ambiente (Via & Conner 1995).

Algunos de estos mecanismos, de base fisiológica, pueden tener importantes implicaciones adaptativas. Así, visto el efecto de las oscilaciones térmicas sobre la tasa de emergencia (Anexo II), la capacidad de una pupa en post-diapausa de detectar fluctuaciones de temperatura y de responder a las mismas puede ser de gran valor si pensamos en los cambios de temperatura que pueden ocurrir en el ambiente de *Carnus* con la ocupación de la cavidad por parte del ave al comienzo de la cría. Esto ayudaría a sincronizar su emergencia con la presencia del hospedador (los pollos) (ver Calero-Torralbo & Valera 2008).

En lo referente a nuestros estudios sobre el efecto de los factores abióticos en el ciclo de *Carnus* conviene resaltar dos cuestiones importantes:

i) El papel regulador de la temperatura se ejerce desde diversas facetas de esta variable. Estas facetas interaccionan y, como hemos dicho, su importancia varía entre hábitats (Anexo I). Así, numerosos estudios en laboratorio han mostrado el efecto regulador de temperaturas fluctuantes frente a su correspondiente temperatura media constante (Radmacher & Strohm 2011; Inoue 2012), así como la importancia e influencia de diversos choques de frío en el desarrollo y supervivencia de insectos (Petavy et al. 2001; Marshall & Sinclair 2012). Sin embargo existe un escaso conocimiento sobre el efecto de diversas variables térmicas en condiciones naturales y aún más en ambientes heterogéneos (pero ver Kingsolver 1979; Vermunt et al. 2012).

ii) La escala de trabajo. Nuestro estudio se desarrolla fundamentalmente a nivel micro. Como se mencionó en la introducción son numerosos los estudios desarrollados sobre el efecto del clima en organismos y ecosistemas pero son menos frecuentes los estudios a la escala adecuada, fundamentalmente en lo que respecta a insectos. La validez de nuestras conclusiones en este sentido está refrendada por la adecuación de la escala de trabajo al organismo en estudio. El estudio a este nivel ha desvelado otros resultados interesantes. Hemos mostrado que ciertos microhábitats pueden moderar los cambios macroclimáticos de una manera muy eficaz (ver también Vermunt et al. 2012; Potter et al. 2013 y referencias aquí dadas). Por tanto, estos microhábitats pueden funcionar como refugios termales que pueden ser muy importantes en ciertos medios, como las zonas áridas, y para ciertos organismos, como las especies ectotermas (Larmuth 1978; Johnston 1996; Walde et al. 2009). Estos refugios térmicos y los organismos que los crean deberían ser objeto de conservación (ver Pike & Mitchell 2013). Uno de los principales desafíos en ecología es predecir el efecto de los cambios climáticos en especies y procesos (Potter et al. 2013). Nuestros resultados muestran que cambios macroclimáticos tendrían consecuencias distintas a escalas menores. En este sentido creemos importante el hecho de que nuestros datos permiten emitir hipótesis comprobables que pueden ayudar a esclarecer mecanismos fisiológicos, adaptativos y consecuencias a distintos niveles (ecofisiológicos, conservacionistas...).

¿Qué consecuencias tiene el efecto de las variables abióticas sobre la diapausa y emergencia de *Carnus* y la plasticidad de ésta ante la variabilidad de los factores abióticos? Aunque son múltiples, aquí nos centraremos en tres. Quizás el aspecto más interesante hace referencia a su interacción con los hospedadores. Nuestro estudio ha desvelado que la fenología de *Carnus* se adelanta en las cajas nido. Del mismo modo, aunque por otras razones, Calero-Torralbo et al. (2013) mostraron que el hospedador adelanta también su fenología en este hábitat, con lo que no se puede deducir un efecto claro del tipo de cavidad en la sincronía entre parásito y hospedador (ver Calero-Torralbo et al. 2013). Sin embargo, este estudio evidencia la posibilidad de que surjan diferencias en la tasa de solapamiento entre parásitos y hospedadores a pequeña escala. Estas diferencias pueden variar en magnitud según la localidad geográfica (Hassel et al. 1991; Singh et al. 2004 y referencias dadas). Tales diferencias se concretarían igualmente en variación en presión de parasitismo, con posibles consecuencias para la eficacia biológica del hospedador.

Otro aspecto importante es el efecto de las variables abióticas de cada tipo de hábitat sobre la eficacia biológica de *Carnus*. Diversos estudios muestran que *Carnus* es más abundante en cajas nido que en otros tipos de hábitat (Møller 1989; Fargallo et al. 2001; Wesolowski & Stanska 2001, Anexos I y II). La mayor abundancia de insectos en un hábitat determinado puede deberse a una variedad de factores como la composición del sustrato del nido, que puede afectar a diferentes estadios del parásito (Krasnov et al. 2002), las dificultades para realizar una limpieza eficaz del nido por parte de los adultos (Amat-Valero et al. in prep.) o el microclima (Dawson et al. 2005; Martínez-de la Puente et al. 2010). Éste último factor es, además, uno de los principales agentes que afectan a la reproducción de los insectos (ver, por ejemplo, Krebs & Loeschcke 1994;

Lourenco & Palmeirim 2008). Específicamente, un estudio experimental sobre la fecundidad de Carnus sugirió que el alto porcentaje de moscas preñadas que no pusieron huevos se pudo deber a una combinación de altas temperaturas (37°C) y baja humedad (Valera & Zidková 2012). Paralelamente, Roulin (1999) encontró un efecto estacional en la fecundidad de Carnus. Si el microclima afecta a la eficacia biológica de Carnus en alguna de sus fases es pertinente asumir que la especie puede desarrollar criterios de selección del hábitat más adecuado (Ruel & Ayres 1999), tal y como se ha mostrado para otros insectos (Heeb et al. 2000; Vickruck & Richards 2012). Esta selección entre hábitats debería hacerse durante la fase de dispersión y supondría que las moscas aladas pueden detectar diferencias en factores abióticos (Lehane 2005; Martínez-de la Puente et al. 2010) y dirigir el vuelo. A pesar de la importancia de estas cuestiones no hay información al respecto. Finalmente el microclima también puede afectar indirectamente a los parásitos vía el efecto del primero sobre los hospedadores. En nuestra área de estudio Václav et al. (in prep) encontró diferencias en éxito reproductor de la carraca entre tipos de nido, lo que puede afectar a su reutilización (Václav et al. 2011) que, además, puede influir en la abundancia de Carnus (Roulin 1998).

El tercer aspecto de interés es la coexistencia de moscas uni y bivoltinas. Calero et al. (2013) especulaban con la coexistencia de varias cohortes de parásitos que originarían, en conjunto, una amplia ventana de emergencia a lo largo de la estación capaz de explotar los diversos hospedadores de la zona. Nuestros resultados amplían las expectativas de estos autores ya que ellos presuponían generaciones bivoltinas al inicio de la temporada y univoltinas al final. Sin embargo, nosotros hemos comprobado la presencia de individuos bivoltinos al final de la temporada también. El hecho de que emerjan moscas muy tarde en la estación incrementa el riesgo de no encontrar hospedador. En el caso de la carraca, algunas de las moscas que realizaron un segundo ciclo (bivoltinas) emergieron cuando aún quedaban pollos no emplumados en el nido. Por lo tanto, aunque el bivoltinismo sea arriesgado, algunos individuos tardíos podrían sacar cierta ventaja de sincronizarse con los últimos hospedadores disponibles, como sería la disminución de la competencia intraespecífica asegurando una supervivencia del mayor número posible de parásitos al acceder a hospedadores tardíos con baja intensidad de infección (ver He et al. 2010). No obstante, algunos de los individuos bivoltinos tuvieron una emergencia extemporánea, lo cual puede interpretarse quizás

como una consecuencia mal adaptativa de una estrategia de *risk-spreading* (ver abajo). De la misma manera que este estudio ha esclarecido algunas de las pistas abióticas que regulan la finalización de la diapausa es importante identificar las variables abióticas que inducen la diapausa, y sobre todo las que inducen una diapausa corta. Nuestro estudio identificó el momento en el que esas pistas están actuando (entre mayo y julio). El conocimiento de tales pistas, de su variabilidad e interacción puede ser muy importante para esclarecer mecanismos subyacentes a la dinámica de poblaciones de parásitos, relaciones parásito-hospedador, variación en voltinismo y evolución de las historias vitales.

El trasfondo evolutivo de la notable variabilidad en caracteres clave de la historia vital de *Carnus* es un tema igualmente interesante. Este parásito ha de hacer frente a una notable impredecibilidad de recursos y hábitats, frente a los cuales se han descrito con frecuencia estrategias de *risk-spreading* (Gerber 1984; Hopper 1999; Olofsson et al. 2009) que, además, son comunes en estadios inactivos de insectos (Menu & Debouzie 1993; Menu 1993; Danforth 1999; Menu & Desouhant 2002). Por lo tanto, algunos rasgos de *Carnus* (como la notable plasticidad en la terminación de la diapausa) sugiere este tipo de estrategias frente a la incertidumbre ambiental. Sin embargo, Hopper (1999) sugirió que la variación genética y las respuestas condicionadas a las pistas ambientales pueden explicar la mayor parte de la variación fenotípica en la diapausa sin necesidad de invocar estrategias *risk-spreading*.

Calero-Torralbo (2011) analizó las posibilidades de que un parásito generalista como *Carnus* experimentara un proceso selectivo de diversificación como consecuencia de diversas presiones selectivas. Señaló que este parásito cumple dos de los requisitos necesarios para tal proceso selectivo:

i) expresión de un rasgo polifénico (en este caso la fenología de emergencia);

ii) respuesta diferencial a recursos que permitan una eficacia biológica máxima: *Carnus* responde diferencialmente a los hospedadores, sincronizando su ciclo de vida con la fenología reproductora de diversas especies (ver también Liker et al. 2001; Valera et al. 2003). A estos resultados, nuestro trabajo puede añadir la mostrada adaptación de los diversos fenotipos a diversos hábitats (Anexo I).

Sin embargo, Calero-Torralbo (2011) apuntó que el tercer requisito (que los recursos se mantengan estables y predecibles a lo largo del tiempo, West-Eberhard 2003) no se cumplía en lo referente a los hospedadores. Concluía, por tanto, que no era

probable un proceso de diversificación ecológica y/o especialización asociado a las fenologías de cría de sus hospedadores. Por el contrario, nuestros resultados sugieren que los distintos tipos de hábitats usados por Carnus y sus diferencias son estables y bastante predecibles a lo largo del tiempo. Incluso en ausencia de que se puedan desarrollar o ejecutar criterios de selección de hábitat (ver arriba) y dado que Carnus no necesita realmente dispersarse si tiene un hospedador presente, podríamos pensar en una especialización de individuos por ciertos tipos de hábitat. Calero-Torralbo (2011) encontró cierta diferenciación genética a nivel local asociada a la fenología de emergencia de Carnus, sugiriendo que en una misma localidad podrían existir ciertas cepas con una duración de la diapausa o una sensibilidad térmica determinada para emerger en distintos periodos de la estación reproductora. Esto coincide con nuestros resultados, que sugieren diferentes requerimientos térmicos y/o tasas de desarrollo según el tipo de hábitat (Bosch & Kemp 2000; Mironidis et al. 2010). Esta fijación de determinados rasgos de la diapausa en distintos hábitats es conocida en especies adaptadas a cambios ambientales asociados a clinas latitudinales o altitudinales (ver Tauber et al. 1986, West-Eberhard 2003) pero también se han citado (aunque menos frecuentemente) en condiciones simpátricas (Coyne & Orr 2004). Nuestros resultados sugieren que el tipo de hábitat puede contribuir a una diferenciación temporal a nivel intraespecífico. Diferencias temporales de la emergencia asociada a los distintos tipos de nido podrían limitar el flujo genético entre linajes: moscas tempranas en cajas nido no se solaparán temporalmente con moscas emergidas más tarde en el mismo nido o en otro tipo de cavidad, lo que podría conducir a un apareamiento concordante (ver Calero-Torralbo 2011), que reforzaría el aislamiento producido por la interrupción del flujo genético.

Aun cuando, a nuestro juicio, nuestros resultados son sólidos, somos conscientes de posibles sesgos motivados por distintos factores: falta de información básica sobre el sistema, simplificación (aunque necesaria) del estudio al no considerar las interacciones entre distintos factores abióticos (ej. temperatura y humedad) y tamaño de muestra. Quizás los resultados más sensibles a tales sesgos son los obtenidos en el Capítulo VI. Como se comenta en el mismo, la falta de información sobre las fases de la diapausa, los estímulos que contribuyen a su finalización, y el inicio de la post-diapausa pueden afectar de manera importante al cálculo de los requerimientos térmicos de *Carnus*. Del mismo modo, algunas asunciones (ej. considerar que la temperatura más baja registrada

en una oquedad natural es suficiente para desencadenar el comienzo de la postdiapausa) pueden introducir sesgos en los resultados. Es posible que interacciones entre factores abióticos como temperatura y humedad puedan modular el efecto de la temperatura sobre la tasa de desarrollo en *Carnus* (particularmente en algunos hábitats). Finalmente, somos conscientes del bajo tamaño de muestra en algunos tipos de nido y trabajos, que es consecuencia de la evolución de las poblaciones de aves en la zona de estudio y de la disponibilidad de cada tipo de nido. No obstante, creemos preferible avanzar sugiriendo posibilidades y mostrando las lagunas de conocimiento que no abordar los problemas. Se hace camino al andar...

A modo de recapitulación señalaremos aquellos aspectos en los que creemos más necesario seguir trabajando: información básica sobre la especie de estudio (duración de las distintas fases del ciclo de vida), bases fisiológicas de los mecanismos de regulación de la diapausa, dispersión y posibles criterios de selección de hábitat por parte de moscas adultas, interacción entre diversas variables abióticas y su efecto en la fisiología y variabilidad fenológica de la especie, estudio en condiciones controladas de la relación entre tasa de desarrollo y temperatura.

REFERENCIAS

- Bosch J, Blas M (1994) Effect of over-wintering and incubation temperatures on adult emergence in *Osmia cornuta* Latr (Hymenoptera, Megachilidae). *Apidologie* 25: 265-277.
- Bosch J, Kemp WP (2000) Development and emergence of the Orchard pollinator *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* 29: 8-13
- Bradshaw WE, Holzapfel CM (2007) Evolution of animal photoperiodism. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 38: 1-25.
- Broufas GD, Koveos DS (2000) Threshold temperature for post-diapause development and degree-days to hatching of winter eggs of the red spider mite *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae) in northern Greece. *Environmental Entomology* 29: 710-713.
- Calero-Torralbo, MA (2011) Factores ecológicos y mecanismos implicados en la variabilidad de la interacción entre un ectoparásito generalista (*Carnus hemapterus*) y sus hospedadores. PhD dissertation, University of Granada, Spain.
- Calero-Torralbo M.A, Valera F (2008) Synchronization of host-parasite cycles by means of diapause: host influence and parasite response to involuntary host shifting. *Parasitology* 135: 1343-1352.
- Calero-Torralbo MA, Václav R Valera F (2013) Intra-specific variability in life-cycle synchronization of an ectoparasitic fly to its avian host. *Oikos* 122: 274-284.
- Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Barker CM, Scott TW (2013) Effect of fluctuating daily temperature at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* life-history traits *PLoS One* 8: e58824
- Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. Sinauer Editors, Sunderland, Massachusets, (USA).
- Danforth BN (1999) Emergence dynamics and bet hedging in a desert bee, *Perdita portalis*. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 266: 1985-1994.
- Danks HV (1987) *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological Survey of Canada n° 1, Ottawa, Ontario, (Canada).
- Dawson RD, Hillen KK, Whitworth TL (2005) Effects of experimental variation in temperature on larval densities of parasitic *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae) in nests of tree swallows (Passeriformes: Hirudinidae). *Environmental Entomology* 34:563-568.
- Dong YC, Wang ZJ, Clarke AR, Pereira R, Desneux N, Niu CY (2013) Pupal diapause development and termination is driven by low temperature chilling in *Bactrocera minax*. *Journal of Pest Science* 86: 429-436.
- Fargallo JA, Blanco G, Potti J, Viñuela J (2001) Nestbox provisioning in a rural population of Eurasian kestrels: breeding performance, nest predation and parasitism. *Bird Study* 48: 236-244.
- Georges A, Limpus C, Stoutjesdijk R (1994) Hatchling sex in the marine turtle *Caretta caretta* is determined by proportion of development at a temperature, not daily duration of exposure. *Journal of Experimental Zoology* 270:432-444.
- Gerber GH (1984) Influence of date of oviposition on egg hatching and embryo survival in the red turnip beetle, *Entomoscelis americana* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Canadian Entomology* 116: 645-652.
- Grimaldi D (1997) The bird flies, Genus *Carnus*: Species revision, generic relationships and a fossil *Meoneura* in amber (Diptera: Carnidae). *American Museum Novitates* 3190: 1-30.

- Guiguen C, Launay H, Beaucournu JC (1983) Ectoparasites des oiseaux en Bretagne. I. Répartition et écologie d'un diptère hematophage nouveau pour la France: *Carnus hemapterus* Nitzsch. *Revue Francaise d'Entomologie* 5: 54-62.
- Härkönen L, Kaitala A (2013) Months of asynchrony in offspring production but synchronous adult emergence: the role of diapause in an ectoparasite's life cycle. *Environmental Entomology* 42: 1408-1414.
- Hassel MP, Pacala S, May RM, Chesson PL (1991) The persistence of host-parasitoid associations in patchy environments. I A general criterion. *American Naturalists* 138: 568-583
- He XZ, Wang Q, Walker JTS, Rogers DJ, Lo PL (2010) A sophisticated life history strategy in a parasitoid wasp: Producing univoltine and multivoltine phenotypes in a local population. *Biological Control* 54: 276-284
- Heeb P, Kölliker M, Richner H (2000) Bird-ectoparasite interactions, nest humidity, and ectoparasite community structure. *Ecology* 81: 958-968.
- Higaki M, Ando Y (2005) Effects of temperature during chilling and pre-chilling periods on diapause and post-diapause development in a katydid, *Eobiana engelhardti subtropica*. *Journal of Insect Physiology* 51: 709-716.
- Hodek I (2003) Role of water and moisture in diapause development (a review). *European Journal of Entomology* 100: 223-232.
- Hodek I, Hodková M (1988) Multiple role of temperature during insect diapause: a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 49: 153-165.
- Hopper KR (1999) Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology. *Annual Review* of Entomology 44: 535-560.
- Inoue T (2012) Effects of temperature on the development of overwintering immature stages of the near-threatened butterfly *Leptelina unicolor* (Bremer & Grey) (Lepidoptera: Hesperiidae). *Entomological Science* 15: 180-188.
- Johnston GR (1996) Thermal ecology of the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) in southcentral Florida. PhD dissertation, University of Miami, Coral Gables.
- Kemp WP, Bosch J (2005) Effect of temperature on Osmia lignaria (Hymenoptera: Megachilidae) prepupa-adult development, survival, and emergence. Journal of Economic Entomology 98: 1917-1923.
- Kingsolver JG (1979) Thermal and hydric aspects of environmental heterogeneity in the pitcher plant mosquito. *Ecological Monographs* 49: 357-376.
- Krasnov BR, Khokhlova IS, Fielden LJ, Burdelova NV (2002) The effect of substrate on survival and development of two species of desert fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*). *Parasite* 9: 135-142
- Krebs RA, Loeschcke V (1994) Effects of exposure to short-term heat stress on fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolution Biology* 7:39-49.
- Larmuth J (1978) Temperatures beneath stones used as daytime retreats by desert animals. Journal of Arid Environment 1:35-40.
- Leather SR, Walters KFA, Bale JS (1993) *The Ecology of Insect Overwintering*. Cambridge University Press, Cambridge, (UK).
- Lehane M (2005) *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. Second ed. Cambridge University Press, Cambridge
- Liker A, Markus M, Vozár A, Zemankovics E, Rózsa L (2001) Distribution of *Carnus hemapterus* in a starling colony. *Canadian Journal of Zoology* 79: 574-580.

- Liu SS, Meng XD (2000) Modeling development time of *Lipaphis erysimi* (Hemiptera: Aphididae) at constant and variable temperatures. *Bulletin of Entomological Research* 90: 337-347.
- Lourenco S, Palmeirim JM (2008) Which factors regulate the reproduction of ectoparasites of temperate-zone cave-dwelling bats? *Parasitology Research* 104:127-134.
- Marshall KE, Sinclair BJ (2012) The impacts of repeated cold exposures of insects. *The Journal* of experimental Biology 215: 1607-1613
- Martínez-de la Puente J, Merino S, Lobato E, Rivero-de Aguilar J, del Cerro S, Ruiz-de-Castañeda R, Moreno J (2010) Nest-climatic factors affect the abundance of biting flies and their effects on nesting conditions. *Acta Oecologia* 36: 543-547.
- Menu F (1993) Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* 96: 383-390.
- Menu F, Debouzie D (1993) Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects: example of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* 93: 367-373.
- Menu F, Desouhant E (2002) Bet-hedging for variability in life cycle duration: bigger and lateremerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia* 132: 167-174.
- Milonas PG, Savopoulou-Soultani M (2000) Diapause induction and termination in the parasitoid *Colpoclypeus florus* (Hymenoptera: Eulophidae): Role of photoperiod and temperature. *Annual Entomological Society of America* 93: 512-518.
- Mironidis GK, Stamopoulos DC, Savopoulou-Soultani M (2010) Overwintering survival and spring emergence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Northen Greece. *Environmental Entomology* 39: 1068-1084.
- Møller AP (1989) Parasites, predators and nest boxes: facts and artefacts in nest box studies of birds? *Oikos* 56: 421-423.
- Nijhout HF (1999) Control mechanisms of polyphenic development in insects. *Bioscience* 49: 181-192.
- Olofsson H, Ripa J, Jonzén N (2009) Bet-hedging as an evolutionary game: the trade-off between egg size and number. *Proceedings of the Royal Society B* 276: 2963-2969.
- Petavy G, David JR, Gilbert P, Moreteau B (2001) Viability and rate of development at different tempera in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *Journal of Thermal Biology* 26: 29-39.
- Pike DA, Mitchell JC (2013) Burrow-dwelling ecosystems engineers provide thermal refugia throughout the landscape. *Animal Conservation* 16: 694-703
- Potter KA, Woods HA, Pincebourde S (2013) Microclimatic challenges in global change biology. *Global Change Biology* 19: 2932-2939.
- Poulin R (2007) *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princenton University Press, New Jersey (USA).
- Radmacher S, Strohm E (2011) Effect of constant and fluctuating temperatures on the development of the solitary bee *Osmia bicornis* (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* 42: 711-720.
- Roulin A (1998) Cycle de reproduction et abondance du diptère parasite *Carnus hemapterus* dans les nichées de chouettes effraies *Tyto alba*. *Alauda* 66: 265-272.
- Roulin A (1999) Fécondité de la mouche *Carnus hemapterus*, ectoparasite des jeunes chouettes effraies *Tyto alba*. *Alauda* 67: 205-212.

- Ruel JJ, Ayres, MP (1999) Jensen's inequality predicts effects of environmental variation. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 361-366.
- Shimoda M, Kiuchi M (1997) Effect of chilling of diapause pupa on adult emergence in the Sweet Potato Hornworm, Agrius convolvuli (Lepidoptera; Sphingidae). Applied Entomological Zoology 32: 617-624.
- Singer MC, Parmesan C (2010) Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: Signal of climate change or pre-existing adaptative strategy? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*: Biological Sciences 365: 3161-3176.
- Singh BK, Rao JS, Ramaswamy R, Sinha S (2004) The role of heterogeneity on the spatiotemporal dynamics of host-parasite metapopulation. *Ecological Modelling* 180: 435-443
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S (1986) *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, Oxford, (UK).
- Teixeira LAF, Polavarapu S (2005) Evidence of a heat-induced quiescence during pupal development in *Rhagoletis mendax* (Diptera : Tephritidae). *Environmental Entomology* 34: 292-297.
- Thomas MB, Blanford S (2003) Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 344-350.
- Václav R, Valera F, Martínez T (2011) Social information in nest colonization and occupancy in a long-lived solitary breeding bird. *Oecologia* 165: 617-627.
- Valera F, Casas-Crivillé A, Hoi H (2003) Interspecific parasite exchange in a mixed colony of birds. *Journal of Parasitology* 89: 245-250.
- Valera F, Martín-Vivaldi M, Carlés-Tolrá M (2006) Life-history variation in three coexisting species of carnid flies (Diptera: Carnidae), *Carnus hemapterus, Hemeromyia anthracina* and *Hemeromyia longirostris. European Journal of Entomology* 103: 347-353.
- Valera F, Zidková L (2012) Reproductive anatomy and fecundity estimation of the haematophagous ectoparasite *Carnus hemapterus*. *Parasitology Research* 110: 1733-1739
- van Asch M, Visser ME (2007) Phenolgy of forest Caterpillars and their host trees: the importance of synchrony. *Annual Review of Entomology* 52: 37-55
- Vermunt B, Cuddington K, Sodek-Swant S, Crosthwaite JC, Lyons DB, Sinclair BJ, (2012) Temperatures experienced by wood boring beetles in the under bark microclimate. *Forest Ecology and Management* 269: 149-157.
- Via S, Conner J (1995) Evolution in heterogeneous environments: genetic variability within and across different grains in *Tribolium castaneum*. *Heredity* 74: 80-90
- Vickruck JL, Richards MH (2012) Niche partitioning based on nest site selection in the small carpenter bees *Ceratina mikmaqi* and *C. calcarata. Animal Behaviour* 83:1083-1089
- Walde AD, Walde AM, Delaney DK, Pater LL (2009) Burrows of desert tortoises (Gopherus agassizii) as thermal refugia for horned larks (Eremophila alpestris) in the Mojave Desert. Southwestern Naturalist 54: 375-381
- Weinig C, Schmitt J (2004) Environmental effects on the expression of quantitative trait loci and implications for phenotypic evolution. *Bioscience* 54: 627-635.
- Wesolowski T, Stanska M (2001) High ectoparasite loads in hole-nesting birds A nestbox bias? *Journal of Avian Biology* 32: 281-285
- West-Eberhard MJ (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York, (USA)

- Wiklund C, Friberg M (2009) The evolutionary ecology of generalization: Among-year variation in host plant use and offspring survival in a butterfly. *Ecology* 90: 3406-3417
- Worner SP (1992) Performance of phenological models under variable temperature regimes: consequences of the Kaufmann or rate summation effect. *Environmental Entomology* 21: 689-699.

CONCLUSIONES

- 1. Este estudio se desarrolla en una localidad árida del sureste de España, donde coexisten entremezclados tres tipos de hábitats (oquedades naturales, cavidades en construcciones humanas y cajas nido) ocupados por una variedad de organismos, entre ellos el díptero ectoparásito *Carnus hemapterus* y sus hospedadores aviares. El estudio a largo plazo de las características microclimáticas de estos hábitats demuestra que se diferencian notablemente en cuanto a humedad y características térmicas. Específicamente las cajas nido son, en general, frías y tienen una oscilación térmica un grado de magnitud mayor que las otras cavidades. Por el contrario, el microclima de las oquedades naturales y de las cavidades en puentes es mucho más estable, siendo las primeras más cálidas y secas que las segundas. Las condiciones microclimáticas de cada tipo de cavidad pueden tener importantes implicaciones tanto para los organismos endotermos que las habitan como para los ectotermos. Esta tesis estudia algunas de estas implicaciones en el ciclo de vida de *Carnus hemapterus*.
- 2. La regulación y variación del voltinismo es un aspecto fundamental en la evolución de las historias vitales. Este estudio demuestra experimentalmente la coexistencia de diapausas largas y cortas y, consecuentemente, de individuos uni y bivoltinos en una población local de *Carnus hemapterus*, siendo uno de los escasos ejemplos en la literatura científica de variación intraespecífica en voltinismo a escala local. La fenología de emergencia de las moscas uni y bivoltinas estuvo notablemente sincronizada con la fenología de los hospedadores. El prolongado periodo de disponibilidad de recursos (hospedadores) para el parásito puede explicar la existencia de bivoltinismo. Este estudio revela la naturaleza facultativa de la diapausa de *Carnus* aunque no los factores abióticos que regulan su inducción y finalización.
- 3. La identificación de los estímulos abióticos que regulan la emergencia de los parásitos es fundamental para la comprensión de las interacciones parásito-hospedador. Este estudio contribuye a desvelar, mediante evidencias experimentales, el papel de la temperatura en la finalización de la diapausa y el

patrón de emergencia de *Carnus hemapterus*. La exposición de pupas en diapausa invernal a temperaturas primaverales adelantó la fecha de emergencia, retardó la tasa de emergencia y aumentó la duración del periodo de emergencia. Aunque los choques de frío no son necesarios para que se termine la diapausa de *Carnus hemapterus*, sí tienen importantes efectos, acelerando el desarrollo de la diapausa, adelantando la emergencia y acelerando su progreso. Estos estudios aportan bases sólidas sobre las que manipular la emergencia de *Carnus* a la vez que muestran la plasticidad de la diapausa de esta especie.

CONSIDERACIONES ADICIONALES

Seguidamente se aporta información adicional que complementan los resultados obtenidos en los capítulos de esta tesis.

Nuestro conocimiento sobre la variación intraespecífica en parámetros fenológicos de parásitos es escaso. El papel del microclima en tal variación ha sido pobremente estudiado. Aprovechando el escenario descrito en la primera conclusión, que se puede considerar como un experimento natural, estudiamos el patrón de emergencia de *Carnus* en distintos tipos de microhábitats y el efecto de diversas variables abióticas en cada uno de ellos. Encontramos marcadas diferencias intraespecíficas en la fenología de emergencia de *Carnus*, de forma que las moscas pupando en cajas nido emergieron mucho más temprano y a menor velocidad que pupas vecinas en otros microhábitats.

De forma paralela, el efecto de las distintas variables abióticas sobre las pupas en diapausa varía entre microhábitats. En ambientes térmicamente inestables (cajas nido) la emergencia de *Carnus* está regulada principalmente por la oscilación térmica y la combinación de eventos de frío, temperaturas altas y temperatura media, mientras que en ambientes con temperatura estable (oquedades de puentes y taludes) son la temperatura media y algunos eventos frío quienes controlan la emergencia. Nuestros resultados muestran que el ciclo de vida de individuos conespecíficos coexistiendo en una misma área pero sujetos a distintas condiciones microclimáticas están influidos por distintas presiones selectivas y responden de distinta manera a las mismas.

La diapausa es una estrategia de resistencia de multitud de organismos en cuya regulación los estímulos ambientales interactúan con el programa genético. Se desconocen numerosos aspectos de tal regulación. Mediante manipulaciones experimentales de variables térmicas estudiamos la rigidez de los patrones de emergencia hallados en condiciones naturales. Nuestros resultados sugieren que tales patrones son bastante sólidos (e.g. las moscas emergen antes en cajas nido) aunque las manipulaciones lograron modificar la magnitud de las diferencias en la tasa de emergencia entre microhábitats. Hallamos diferencias en sensibilidad a variaciones térmicas entre las distintas fases de la diapausa, siendo la respuesta de *Carnus hemapterus* mayor en los últimos momentos del desarrollo de la post-diapausa, lo cual puede otorgarle importantes ventajas adaptativas.

Los modelos de predicción de eventos fenológicos basados en la temperatura son una herramienta de interés en investigación básica y aplicada. Su desarrollo, basado a menudo en datos de laboratorio, requiere de un conocimiento preciso del sistema de estudio y de las condiciones naturales, del que a menudo carecemos. El estudio de los requerimientos térmicos para la emergencia de *Carnus hemapterus* en varios microhábitats asumiendo una ventana térmica común muestra que esta especie necesita menos grados-día para emerger en cajas nido y los acumula de manera más lenta que en otras cavidades. Alternativamente, los umbrales de desarrollo de la especie podrían variar entre microhábitats, lo que es probable dado que los diferentes microclimas pueden determinar respuestas alternativas específicas para cada tipo de microhábitat. Esta primera aproximación a los requerimientos térmicos de *Carnus* revela la complejidad de su cálculo en ambientes heterogéneos y desvela el riesgo de incurrir en algunos sesgos metodológicos derivados del desconocimiento de detalles fundamentales de los organismos objeto de estudio.

ANEXO I

Microclimate and intraspecific differences in emergence

HABITAT TYPE AND MICROCLIMATE GENERATE SMALL-SCALE INTRASPECIFIC DIFFERENCES IN ADULT EMERGENCE OF A HAEMATOPHAGOUS PARASITE Emergence time is a crucial event for parasites since the synchronization with the host and with optimum environmental conditions is necessary to ensure survival and reproduction (Tauber et al. 1986; Danks 1987; Masaki 2002). In insects, diapause termination and metabolic reactivation commonly require an exposure to one or several environmental cues, such as changes in temperature or photoperiod (Tauber et al. 1986; Kostal 2006). Emergence time of many organisms, and in particular of insects, in temperate climates is known to be determined by an endogenous annual timing mechanism that can be modified by temperature with certain limits (Tauber and Tauber 1981; Smith and McIver 1984; Leather et al. 1993). Temperature has been in fact acknowledged as a key environmental factor that influences the life-cycle of parasites and, thus, host-parasite relationships (Tauber et al. 1986; Wharton 1999; Dawson et al. 2005; Mitchell et al. 2005). Temperature can be particularly influential for the life cycle of arthropod ectoparasites which leave the host during the free-living phase of their life cycle and are more exposed to low temperatures than species which remain attached to their host most of their life (Wharton 1999). However, the information about the effect of temperature during the free-living life-cycle stages of parasites and whether this influences host-parasite interactions is scarce (but see Wall et al. 1992; Pitts and Wall 2006; van Dijk and Morgan 2008; Amat-Valero et al. 2013). The mechanisms whereby temperature acts on the host-parasite interaction are not frequently completely understood either (Thomas and Blanford 2003), partly because temperature encompasses multifaceted features involved in insect physiology not always appropriately recognized. Specifically, our knowledge about how ambient temperature can modulate insect life cycles is hindered by three important biases: i) many studies have been performed under laboratory conditions at constant temperatures (i.e. Li 1995; Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Urbaneja et al. 2001), or including one temperature-fluctuating treatment at most (i.e. Kemp and Bosch 2005; Radmacher and Strohm 2010; Amat-Valero et al. 2013), despite it is known that temperature fluctuation and chilling events affect developmental rate and emergence (Beck 1983; Ratte 1984; Inoue 2012; Marshall and Sinclair 2012). Consequently, most of laboratory results using constant temperatures can hardly be extrapolated to natural populations (Beck 1983; Petavy et al. 2001; Marshall and Sinclair 2012); ii) the effect of temperature may differ depending on the moment of the life cycle of the organism (Kostal 2006). Yet, we miss information on key aspects such as the length of successive life cycle stages or the thermal requirements at those stages; and iii) individuals undergo microenvironmental

conditions which may differ markedly from the ambient macroclimate (Weiss et al. 1993; Potter et al. 2013 and references therein). In fact, it has been suggested that microclimatic gradients have larger influence on emergence phenology in insects and arthropods than annual weather fluctuations (e.g. Kingsolver 1979; Baker 1981). However, fine-scale studies considering the effect of the microclimate on insect development rate and their response to thermal conditions are scarce (but see David et al. 1996; Weiss et al. 1993; Vermunt et al. 2012).

The latter point is particularly important since it can explain intraspecific differences in key life-cycle features of insects and variability within interspecific interactions (e.g. host-parasite relationships). Some studies have found intraspecific differences in life-history traits related to diapause in response to latitudinal and altitudinal gradients (Tauber et al. 1986; Masaki 1999; Hodkinson 2005). However, less effort has been addressed to study intraspecific variation of diapause-related variables at a finer scale (e.g. among neighboring or interspersed habitat types; but see Kingsolver 1979; Weiss et al. 1993; Vinogradova 2000; Vermunt et al. 2012) and differential responses of individuals to different, prevailing abiotic conditions (but see Kingsolver 1979; Vermunt et al. 2012).

Carnus hemapterus Nitzsch (1818) (hereafter Carnus) is a haematophagous fly that parasitizes a wide range of bird species, most of them breeding in cavities (Grimaldi, 1997). Very little is known about Carnus' diapause and the environmental conditions eliciting dormancy in this species. Guiguen et al. (1983) suggested that pupae enter diapause after the nestlings leave the nest and undergo a winter diapause lasting several months. Yet, a short diapause (Guiguen et al. 1983; Amat-Valero et al. 2012) and a prolonged diapause (Valera et al. 2006) have also been described. Carnus' emergence and diapause termination are influenced by the temperature experienced during the pupal stage both in winter and spring (when emergence is close to start) (Calero-Torralbo and Valera 2008; Amat-Valero et al. 2013; Calero-Torralbo et al. 2013). Amat-Valero et al. (2013) found that chilling advanced the mean emergence date and shortened the length of the emergence period and suggested that chilling accelerates diapause development and reduces the pupal period. Carnus is a particularly well-suited species for the study of the relationship between microclimate, insect life cycles and host-parasite relationships because: i) it completes its whole life cycle in the nest of its host, and, thus, most of its developmental stages are exposed to the microclimatic conditions of the cavity; ii) host-parasite synchronization both at an intraspecific and interspecific level has been found (Liker et al. 2001; Valera et al. 2003; Calero-Torralbo 2011; Calero-Torralbo et al. 2013); and iii) many bird species parasitized by *Carnus* breed in various cavity types whose microclimate differs widely. Amat-Valero et al. (2014) found that nest boxes are colder, and have much higher temperature oscillations than burrows in sandpits and cavities in bridges, where microclimate is very stable and similar. Thus, this system provides us a sort of natural experiment adequate to study the influence of microclimate on the emergence pattern of carnid flies.

Here we present a fine-scale study on the emergence time of carnid flies raised in different microhabitats (nest boxes, burrows and cavities in bridges) interspersed within a specific geographical area, during one annual cycle. Based on the dissimilarities in the microclimate among cavity types and the effect of temperature on diapausing insects (Tauber et al. 1986; Danks 2007; Amat-Valero et al. 2013; Calero-Torralbo et al. 2013), we predict differences in the emergence pattern of *Carnus* among habitat types. We also explore the influence of various microclimatic variables on the emergence of carnid flies from different habitat types. We hypothesize that carnid pupae will respond specifically to the prevailing conditions they are subjected to, so that insect emergence will be modulated by different factors in each cavity type. Specifically, we predict that variables associated to average temperature will be a major cue for insects inhabiting stable environments whereas thermal extremes will be a major determinant of insect physiology and emergence in fluctuating microclimates.

Procedure

Study area and species

The study area (ca. 50 km²) lies in the Desert of Tabernas (Almería, SE Spain, 37°05'N, 2°21'W). The climate in this area is semiarid with high daily, seasonal and annual variability in temperature and unpredictable rainfall (mean annual rainfall is around 200 mm) usually with heavy rain. Winters are typically mild and summers hot and long (Lázaro et al. 2004).

Carnus hemapterus (Diptera: Carnidae) is a 2 mm long fly whose life cycle takes place entirely in the host' nest except for the presumably short dispersal stage (see below). Pupae are usually buried under the earthy nest material. After emergence, carnid flies are winged and capable of dispersing and colonizing occupied nests (Grimaldi 1997), but they usually lose the wings when a suitable host is located (Roulin

1998). Once emerged, adult flies cannot survive a long time without feeding (around 2-3 days, Calero-Torralbo et al. unpubl.).

The European roller (*Coracias garrulus* L.) is a common host of *Carnus* and it usually breeds in the study area. Its nesting opportunities are restricted to cavities excavated by other birds (European bee-eaters *Merops apiaster* L.) and by erosion in sandstone banks (Casas-Crivillé and Valera 2005). Human constructions (cavities in wall crevices of isolated country houses and in stone bridges) and nest boxes are also used for breeding. Rollers are migrant birds that arrive to the breeding area in south Spain in April. In our population, closely followed since 2005, breeding takes place during May till mid-July, the mean hatching date occurs around 10th of June (data from 2005-2012), incubation taking ca. 21 days and nestling rollers fledging 20-22 days after hatching (Václav et al. 2011).

Experimental design

Diapause and emergence of carnid flies was studied during 2011-2012 in three different habitats with specific thermal conditions: nest boxes, cavities in bridges and burrows in sandy cliffs. Nest boxes have been progressively installed in the study area since 2005 (Václav et al. 2011). Some of them were made of birch wood glued with weather-resistant phenolic resin (see Amat-Valero et al. 2014) whereas others were made of cork oak. The external dimensions of the latter were similar to the wooden ones (27.5-31 cm height, 25 cm width and 26 cm depth, entrance of 6 cm of diameter, thickness of the walls ca. 2 cm.). Nest boxes were installed on sandstone walls, isolated houses and eucalyptus trees, with variable orientation and height. Cavities in bridges and sandy cliffs were also variable in depth, orientation, height and entrance diameter (for more information see Amat-Valero et al. 2014). Importantly, all cavity types were interspersed within the study area so that, for our data set (see below), the mean distance to the nearest different cavity was 7.4 ± 0.7 km. (range: 0.7-18.9 km).

During January 2012, forty eight cavities (15 wooden nest boxes, 13 cork nest boxes, 11 cavities in bridges and 9 in burrows) used by rollers during the previous breeding season were selected. Nest material samples (sand and organic material likely containing *Carnus* pupae) were collected from each nest on 25 January 2012, introduced in an open plastic bag and this one in a gauze bag. In this way, emerging flies could be collected from the gauze bags. Each sample was kept in its respective

cavity type during the whole diapause and emergence period. In this way, pupae were maintained in their original thermal environment.

Microclimate in each cavity (except for one nest box) was recorded from August 2011 (October 2011 for cork nest boxes) until July 2012 by means of temperaturehumidity data-loggers (Maxim/Dallas Integrated Products, Inc.) (6 mm of thickness and 17 mm of diameter, temperature range: -20 to 85°C, resolution 0.0625°C; Humidity range: 0 to 100%, resolution 0.04%). They were placed under the nest material as close as possible to the incubation chamber and were programmed to record cavity climatic conditions every three hours. Data loggers were moved into the plastic bags when nest material was collected. After placement of data-loggers in August and October, the entrances were covered with a metal mesh to prevent birds entering the cavities.

Samples were monitored every 2 weeks for parasite emergence, from 15 February 2012 till the end of March 2012 respectively. Then, monitoring was done weekly until the first fly was detected. After emergence of the first fly in a given sample, it was monitored every 3-4 days, until 3 successive negative records occurred. Flies emerging from each sample and date were collected and preserved in ethanol and later identified and counted with a stereoscopic microscope.

Data treatment

Prevalence (percentage of samples in which *Carnus* was detected with respect to the total number of samples) and median abundance (median number of emerged flies per infected sample) was calculated for each habitat type. The emergence pattern was defined by: i) date when 10% of emerged flies was reached, as an indicator of the start of regular emergence; ii) length of emergence period (days between the emergence of the first and the last fly); and iii) mean weekly cumulative percentage of emergence per each cavity type (emergence grouped in weeks starting from the first week in which the earliest emergence was detected for each sample). The slope of the curve within 10 and 90% of mean weekly cumulative emergence was also calculated as an indicator of the emergence rate (see Calero-Torralbo and Valera 2008, Calero-Torralbo et al. 2013; Amat-Valero et al. 2013, for a similar approach). We also calculated the date of first emergence and the date when 50% of flies emerged but here we only report on the results obtained with 10% emergence (see below).

Samples where 5 or more flies emerged during at least 3 different records (in order to allow the study of the emergence pattern) were considered for all variables

except for prevalence (for which we considered all the samples). In some samples the emergence during the first monitoring date was higher than 10%. This was the case for 1 sample from a bridge, 2 samples from nest boxes and 2 samples from burrows. In these cases we estimated the date when 10% emergence was reached (range: 1-4 days earlier, the maximum interval between consecutive monitoring days) on the basis of the shape of the cumulative emergence plotted against date.

Cavities microclimate was defined by: i) mean temperature estimated from the daily average temperature (8 measures per day); ii) mean minimum temperature from the daily minimum temperature recorded in each cavity; iii) mean maximum temperature from the daily maximum temperature recorded in each cavity; iv) mean temperature oscillation from the daily differences between maximum and minimum temperature recorded in each cavity; and v) number of days when daily mean temperature was lower than 10°C (see Marshall and Sinclair, 2012 for this threshold of cold stress and information below).

As said above, there is no information on the environmental stimuli causing diapause termination and post-diapause development in Carnus. Yet, we do know that chilling influences Carnus emergence (Amat-Valero et al. 2013) and that chilling acts in many species as a diapause-termination cue (Bradshaw and Holzapfel 1977; Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Dong et al. 2013). Therefore, we considered the first cold shock in each cavity as such environmental cue (hereafter first chilling date) and studied cavities microclimate from the first chilling date until 10% of emergence was reached in each cavity. As most insects species enter chill-coma at or below 10°C (Marshall and Sinclair 2012) we chose this temperature to define chilling. We considered the first chilling shock to occur when temperature dropped under 10°C for at least one daily record in each of three consecutive days. Chilling was then dated at the third day. First chilling date occurred from the end of November until the beginning of December 2011 for nest boxes and from mid-December 2011 until mid-February 2012 for cavities in bridges. However, only two burrows reached temperatures under 10°C during 3 consecutive days (in February). Therefore, for the rest of the burrows, first chilling date was considered to occur when the lowest temperature (range of 10.4-13.3°C) was achieved (February). Since winter diapauses of insects inhabiting temperate regions usually end when the ambient temperatures attain their seasonal minimum (Hodek 2002) and since the progressive increment of temperature from then onwards usually promotes the start of development (see Tauber et al. 1986; Milonas and

Savopoulou-Soultani 2000) we think it is logical to assume that the coldest temperature in burrows act as a cold shock for *Carnus* even if it does not reach the threshold used for the other cavities.

Microclimatic conditions (mean monthly temperature and mean monthly thermal oscillation) from mid October 2011 until the end of June 2012 did not differ between wooden and cork nest boxes (Amat-Valero et al. in prep.). The pattern of *Carnus* emergence (date of first and last emergence, 10% emergence, mean emergence date and length of the emergence period) did not differ either between both nest boxes types (Mann-Whitney U test, p > 0.10 for all variables, sample size: 12 wooden and 8 cork nest boxes). Therefore, data from both nest boxes types were pooled.

Statistical analyses

Differences among cavity types in prevalence were analyzed by Fisher Exact test and differences in abundance by Negative Binomial Generalized Linear Model (GLM) due to the characteristics of the data (counts of flies and overdispersion). General Linear Models (GLS) were used to study the differences in the date of 10% emergence (response variable) among habitat types (categorical predictor variable). The parameters of the model were calculated by the restricted maximum likelihood method. The fitted model was selected with the likelihood ratio test (Pinheiro and Bates 2000) with the statistical significance of 0.05 for α level. The assumptions of the model were validated (fitted values versus standardized residual and linearity graphs). Adjusted means comparisons among habitat types were made using least significant differences Fisher's multiple comparison tests. Kruskal-Wallis ANOVA test was used for comparing the length of the emergence period among habitat types because the data were non-normal. Conover tests were used for pair comparisons (Conover 1999).

In order to compare the emergence rate among habitat types, the mean weekly cumulative emergence (in percentage) for each habitat type was represented. The slopes of each curve within the range 10%-90% emergence were calculated by means of simple linear regressions ($r^2>0.98$ and p<0.05 in all cases) and were compared by simple linear models in which coefficients and F statistics were obtained and pair comparisons were analyzed by t tests.

Constrained Correspondence Analyses (CCA) was applied to explore the associations among microclimatic thermal variables and the date of 10% emergence, with habitat type as the constraining factor. Since the continuous variables

84

(microclimate variables and emergence date) were measured in different scales, the data were centered, scaled and positivized to meet the requirements of CCA. Finally we explored the relationships between each microclimatic variable and the emergence date in nest boxes and natural cavities (burrows and cavities in bridges pooled) by Pearson correlations.

All analyses were also done for the dates of first emergence and 50% emergence and the results were consistent with the ones obtained for 10% emergence. We therefore only show the latter.

Values reported are means \pm standard errors (SE) (except for median abundance) and p-values. Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel and Rózsa 2005) was used for testing differences in prevalence. InfoStat 12 (Di Rienzo et al. 2012) was used for GLS, Kruskal-Wallis ANOVA and Pearson correlations analyses. GLS was fit through an interface with the R platform using package nlme and function gls. R software (version 3.0.2.Ink) was used to run the Negative Binomial GLM for differences in abundance, the linear models for slopes comparisons and the CCA for associations among microclimatic thermal variables and the 10% emergence date using the package MASS with glm.nb function, package stats with the ml function and package vegan with cca function respectively.

Outcomes

Prevalence and abundance of parasites

Carnus prevalence did not differ among habitat types (Table 1). However, the abundance of flies did differ among cavity types (GLM ANOVA, $F_{2,35}=7.1$, p<0.005), being significantly higher in nest boxes than in burrows and bridges (Table 1). The number of samples where fewer than 5 flies emerged in each habitat type did not differ (4 samples from nest boxes, 1 from a bridge and 1 from a burrow; Fisher's test, p>0.10).

	Prevalence	Test	Median abundance	Test
Bridge	90.9% [11]		23.0 [9]	p<0.005
Burrow	77.8% [9]	p=0.12	(a) 28.0 [6]	
Nest box	96.4% [28]		(a) 62.0 [23] (b)	

Table 1: Prevalence and median abundance (median number of parasites found in infected samples with 5 or more than 5 flies) of *Carnus hemapterus* in samples from different habitat types. Differences in prevalence were tested by Fisher's exact tests and abundance data were tested by Negative Binomial Generalized Linear Model. Sample sizes are shown in square brackets and significant pair-wise differences between cavity types by post-hoc tests are shown by different letters in parentheses (significant level p<0.05).

Emergence pattern

Habitat type had a significant effect on the emergence date of *Carnus* (GLS, Habitat type, $F_{2,32} = 27.0$, p<0.0001). Flies from nest boxes emerged significantly earlier than flies from burrows and cavities in bridges, while no differences were found between flies from the latter nest types (Table 2, Fig. 1). The length of the emergence period also differed among habitat types (Kruskal-Wallis ANOVA test: $H_{(2, n=35)}=10.2$, p=0.006), being significantly longer for nest boxes than for the other habitats and similar for flies from burrows and cavities in bridges (Table 2).

Emergence	Nest box	Bridge	Burrow
	[22]	[8]	[5]
Date of 10% emergence	$22/4/12 \pm 2.1$	$16/5/12 \pm 3.5$	$21/5/12 \pm 4.4$
	(a)	(b)	(b)
Emergence length (days)	51.4±2.3	35.5 ± 3.5	31.4 ± 8.8
	(a)	(b)	(b)

Table 2: Date of 10% emergence and length of the emergence period of carnid flies from different habitat types. Adjusted mean emergence date \pm standard error (n° of days) and mean emergence length (n° of days) \pm standard error are shown. Significant pair-wise differences between habitat types by LSD Fisher tests for emergence date (general linear model) and by Conover scores for emergence length are shown by different letters in round brackets (significant level p<0.05). Sample sizes (number of cavities) are shown in square brackets.



Figure 1: Mean weekly cumulative percentage of emergence \pm standard error (SE) of carnid flies in different habitat types. Week 1=26 March-1 April, week 15=2-8 July. Sample size for each cavity type is shown in brackets.

The slopes of the cumulative emergence curves within 10%-90% emergence differed significantly among habitat types ($F_{5,9}$ =126.0, p<0.0001, Fig. 1), being steepest in bridges (17.1, n=8), intermediate in burrows (16.1, n=5) and mildest in nest boxes (13.6, n=22). Significant differences were found only between the slopes of flies from bridges and nest boxes (t-test, t₇=2.5, p=0.03).

Microclimate, parasite emergence and habitat types

The CCA analysis for date of 10% emergence yielded a significant model (Table 3) with two parameters that explained 70% of the variance and with a significant effect of habitat type. The permutation test showed that the first axis (CCA 1) described significantly the variation in microclimatic variables, separating two groups (Fig. 2): minimum and mean temperature versus variables associated to thermal fluctuation (mean maximum temperature, mean daily temperature oscillation, and number of days when mean temperature was lower than 10°C.). Natural nests (cavities in burrows and in bridges) were associated to the first group whereas nest boxes were related to variation in temperature oscillation (Fig. 2). Emergence date was located close to the first group.

	% Variance explained	df	\mathbf{X}^2	F	p value
Model		2	0.34	36.1	0.005
Habitat type		2	0.34	36.1	0.005
CCA 1	67	1	0.32	69.1	0.005
CCA 2	3	1	0.01	3.2	0.047
Residual		31	0.14		

Table 3: Results of the Constrained Correspondence Analysis (CCA) permutation test for the date of 10% emergence. Values for the model (all terms), for individual axes (CCA 1 and CCA 2) and for the constraining variable (habitat type) are shown. Degrees of freedom (df), Chi square (X^2), F and P values are also offered.

The second axis (CCA 2) was significant but it explained only 3% of the variance (Table 3). It seemingly separated cavities in bridges from cavities in burrows. The first nest type was close to minimum temperature. In contrast, burrows were associated to mean temperature (Fig. 2).



Figure 2: Distribution of the nests (points), of the microclimatic variables (mean temperature=*Mean*, minimum temperature=*Min*, maximum temperature=*Max*, thermal fluctuation=*Fluc* and number of days when temperature was lower than 10°C=*D10*), date of 10% emergence (*E.10*) and habitat types (Nest boxes=NB, n=21; cavities in bridges=Br, n=8; burrows=Bu, n=5). Constrained correspondence axes (CCA 1 and 2) account for 67% and 3% of the variance.

A closer inspection of the relationship between microclimatic variables and emergence date evidenced that, for nest boxes, higher mean temperature (r=-0.56, p<0.01), higher maximum temperature (r=-0.65, p<0.005) and higher thermal

oscillation (r=-0.70, p<0.001) were significantly related with an advance in the date of 10% emergence (n=21 in all cases) (Fig. 3a, b and c). In contrast, the more frequent the chilling events, the later the date of 10% emergence (r=0.77, p<0.0001) (Fig. 3d). Minimum temperature had no significant relationship with the date of 10% emergence (r=0.21, p=0.36).

Given that the emergence date of flies from burrows and cavities in bridges (i.e. natural cavities) did not differ significantly and that these cavities are grouped together by the CCA analysis, we pooled both groups. We did not find any significant relationship between the microclimatic variables and emergence date for natural cavities (p>0.10 in all cases).



Date of 10% emergence

Figure 3: Pearson correlations between date of 10% emergence and microclimatic variables: mean temperature (a), maximum temperature (b), thermal oscillation (c) and number of days with temperature lower than 10°C (chilling frequency) (d), in nest boxes (n=21).

Interpretation

The distribution of *Carnus hemapterus* extends along the Palearctic and North and East of North America (Grimaldi 1997), what means that carnid flies occur across a wide range of thermal environments. Even within a specific area like ours (ca. 50 km²), flies can find and dwell in different habitats, with specific microclimates, that are spatially interleaved with each other: thermally stable and warm burrows in sandpits, thermally stable cavities in bridges but with colder temperatures and some chilling shocks and nest boxes where temperature is highly fluctuating, with chilling and hot extreme events (see Fig. 2 and Amat-Valero et al. 2014). Based on these peculiarities we predicted differences in the emergence pattern of *Carnus* from different cavities. As expected, individuals from nest boxes emerged earlier (up to one month) and during a longer period than flies from neighboring burrows and cavities in bridges whereas there were no differences among flies from the latter habitat types (see also Calero-Torralbo et al. 2013).

Most studies of intraspecific differences in life-history traits related to diapause have focused on geographical variation along latitudinal and altitudinal clines (Tauber et al. 1986; Masaki 1999; Hodkinson 2005). Other works have shown that such traits can vary among populations distributed at similar latitudes (Noriyuki et al. 2011). In contrast, intraspecific differences in diapause development and emergence time of ectotherm organisms at smaller scales are scarce (but see Kingsolver 1979; Weiss et al. 1993; Vinogradova 2000; Vermunt et al. 2012). These cases have been found in heterogeneous habitats where microclimate gradients influence the developmental rates of insects.

Our results add to the latter studies by showing the environmental modulation of intraspecific differences in emergence of carnid flies concurring at short distances. Moreover, we reveal that neighboring flies are influenced by different selective pressures and respond differently to them. In effect, differences in microclimate result in different mechanisms involved in the regulation of emergence. As predicted, maximum temperature and thermal oscillation were associated to an earlier emergence in nest boxes (Fig. 3b, c) what agrees with previous works showing the accelerating effect of fluctuating temperatures on the development rate (Beck 1983; Ratte 1984; Radmacher and Strohm 2011; Marshall and Sinclair 2012; Inoue 2012). The lack of relationship between minimum temperature and emergence can reflect that cold temperatures during

November-April (range: 0.9°C-10.3°C) are under the minimum developmental threshold of Carnus whereas maximum temperatures (range: 15.4-23.5°C) can still be within the thermal window (see Annex III). Mean temperature was also associated to an earlier emergence (Fig. 3a), what suggested that the effect of thermal oscillation was not independent of the average temperature (Petavy et al. 2001; Inoue 2012). Finally, the frequency of chilling was related to a delayed emergence in nest boxes (Fig. 3d). Chilling is known to be a diapause-termination cue, accelerating diapause development and reducing the pupal period (Shimoda and Kiuchi 1997; Dong et al. 2013), and Amat-Valero et al. (2013) found that an episode of chilling advanced the emergence date of *Carnus*. Yet, once diapause has ended, multiple chilling episodes would lower the mean temperature what could explain the positive relationship between chilling and emergence date (Fig. 3d). We also found that flies from nest boxes had the lowest emergence rate. This can be explained by the wide regimen of thermal fluctuations since extreme temperatures are known to result in repeated development arrests and decreased development rate (Petavy et al. 2001; Carrington et al. 2013). Moreover, if cold temperatures are below the minimum threshold for the development (see Marshall and Sinclair 2012) the metabolism decelerates (Petavy et al. 2001). Amat-Valero et al. (2014) reported oscillations above 30°C within one day in nest boxes in our study area. Even though the higher abundance of carnid flies in nest boxes could partly account for the longer emergence period in this microhabitat, the former abiotic variables also contribute to the elongation of such phase (see also Annex II).

Concerning natural cavities (burrows and cavities in bridges), emergence was associated, as predicted, to mean temperature but also to minimum temperature (Fig. 2). Flies from these habitats had a higher emergence rate than nest boxes. The predominantly stable, progressively increasing temperature (forecasting suitable environmental conditions) together with the stimuli produced by sporadic cold periods (Petavy et al. 2001) can explain these patterns. The absence of significant correlations between emergence date and abiotic variables in natural cavities could respond to the small variation of the latter in these habitat types (see Amat-Valero et al. 2014).

The distinctive emergence pattern of carnid flies in the various habitat types poses some interesting questions. First, what are the consequences for hosts and parasites? It is reasonable to examine the fit of the life cycles of the hosts and the parasite in each habitat type. In a study about the synchronization of the life cycle of *Carnus* and rollers Calero-Torralbo et al. (2013) found that host–parasite synchronization at the nest level was highly variable but similar among cavity types (burrows, nest boxes and cavities in bridges). This was the case because (probably for different reasons) nest type had a similar effect on the host and the parasite: both the roller and carnid flies advanced their life cycle (hatching date and emergence, respectively) in nest-boxes. Yet, this study evidences that differences among habitats in microclimate may potentially result in differences in host-parasite synchronization at a very small scale.

A second question refers to the evolutionary background underlying the observed variability in emergence. Schlichting and Pigliucci (1998) pointed out that 3 evolutionary mechanisms can produce phenotypic variation within populations in differing environments: genetic variation (polymorphism with regard to diapause characteristics), risk-spreading strategies and phenotypic plasticity. Genetic polymorphism and/or risk-spreading strategies are considered as main drivers of within populations over-wintering variation in insects (Takafuji and Morimoto 1983; Tyshchenko and Kind 1983; Gerber 1984). These strategies are very common in inactive stages of insects and give them the possibility to survive, diversify and adapt to stochastic conditions (Menu 1993; Menu and Debouzie 1993; Menu and Desouhant 2002). However, Hopper (1999) suggested that genetic variation in diapause, without invoking risk-spreading.

Finally, we did not find differences in prevalence among cavity types but we did find a higher abundance of parasites in nest boxes (see Fargallo et al. 2001; Calero-Torralbo et al. 2013 for similar results), the habitat with the harsher microclimate. Factors like nest substrate quantity and composition (Krasnov et al. 2002) or differences in sanitation behavior of the host (Amat-Valero et al. in prep) could account for such differences. Regardless the cause, it makes sense to wonder whether the fitness of carnid flies varies among habitat types (for instance, as a result of thermal stress on fecundity, see Krebs and Loeschcke 1994) or if the dramatic differences in the abiotic conditions among some habitat types have no costs. If the former, flies should be able to detect and select the most appropriate habitat types (see, for instance, Ruel and Ayres 1999). It could also be that some local adaptation occurs and, then, a freshly-emerged fly could prefer the habitat type. Massive and rapid colonization of isolated new nestboxes by carnid flies (Liker et al. 2001; unpubl. data) suggests that winged adults are equipped with efficient searching skills to detect occupied nests but we ignore whether they can discriminate among different cavity types and whether this 2-mm long insect can control the flight. Natural selection could favor those individuals with better skills to detect and colonize the less strenuous environments. Alternatively, natural selection could favor the ability to respond to novel abiotic conditions by means of diapause traits (Blanckenhorn 1998), particularly for parasites that occupy a wide range of habitats.

This annex has been done by María Teresa Amat-Valero, Miguel Ángel Calero-Torralbo, Teresa Martínez and Francisco Valera.

ANEXO II

Differential effect of temperature during diapause

EXPERIMENTAL MANIPULATION OF TEMPERATURE DURING DIAPAUSE REVEALS RIGID AND VARIABLE EFFECTS OF MICROCLIMATE ON THE EMERGENCE OF AN ECTOPARASITIC FLY

Diapause is a critical stage for many organisms, mainly insects, since it regulates the synchronization of specific life-cycle stages with resource availability and adequate conditions for development, growth and reproduction (Tauber et al. 1986; Danks 1987). It has been well demonstrated that environmental factors strongly influence the course and duration of diapause (Tauber et al. 1986). For instance, diapause termination, postdiapause development and emergence time are considerably affected by temperature (Logan et al. 1979; Taylor 1981; Mironidis et al. 2010; Dong et al. 2013). Moreover, some studies assign the differences in emergence time between and within populations to distinct thermal requirements along post-diapause development (Turnock and Boivin 1997; Biron et al. 1998, 2003). Yet, other aspects of diapause regulation, like the process for the decreasing diapause intensity (Hodek 1996; Kostal 2006), the specific token stimuli required for ending diapause for many species (Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Danks 2007; Dong et al. 2013), the differential effect of temperaturerelated variables on the various stages of the diapause (Kostal 2006) or even the length of successive life cycle stages and the thermal requirements at those stages for many organisms are poorly known (Hodek 1996).

Temperature and photoperiod are environmental cues commonly used by many organisms due to their reliability to time specific life cycle stages (e.g. emergence) with the occurrence of favorable periods. Particularly, temperature is one of the most influential factors in ectotherms life-cycle control (Sharpe and Demichele 1977; Merino and Potti 1996; Thomas and Blanford 2003), since it regulates development time, metabolism, voltinism, diapause termination, emergence period, and mortality (Masaki et al. 1979; Tauber et al. 1986; Vermunt et al. 2012 and references therein). Yet, the general term temperature encompasses multifaceted aspects whose specific role is worth to be studied. For instance, chilling events (Wang and Laing 1989; Marshall and Sinclair 2012), seasonal changes in mean temperature (Tauber et al. 1986; Milonas and Savopoulou-Soultani 2000) or temperature fluctuations (Behrens et al. 1983; Inoue 2012) have been suggested to influence the development program and regulate adult emergence time (Beck 1983; Ratte 1984; Leather et al. 1993; Petavy et al. 2001). Particularly, considering the variance in temperature is critical for an adequate assessment of the effect of thermal conditions on metabolic rates of poikilotherms, since both variables maintain a non-linear relationship and, therefore, are subjected to Jensen's inequality (see Ruel and Ayres 1999). Importantly, microclimatic conditions may have larger influence on various life-cycle stages of insects and arthropods (e.g.
emergence phenology) than annual weather fluctuations (e.g. Kingsolver 1979; Baker 1981). For example, Vermunt et al. (2012) found that spring maxima under-bark temperature was warmer in the south side of the tree than in the north side, what promoted faster development time for beetles on the south side. Yet, fine-scale studies considering the effect of the microclimate on insect development rate and their response to thermal conditions are scarce (but see Kingsolver 1979; Weiss et al. 1993; David et al. 1996; Vermunt et al. 2012; Annex I). Further research is needed on aspects such as the influence of microclimatic conditions and thermal variation on growth rates and adult emergence (but see Weiss et al. 1993; Vermunt et al. 2012), particularly in parasitic species, in order to understand the influence of abiotic factors on the regulation of host-parasite interactions (e.i. Pincebourde and Woods 2012).

Carnus hemapterus Nitzch (1818) (hereafter Carnus) is an ectoparasitic, haematophagous fly of a variety of bird species, most of them usually breeding in cavities (Grimaldi 1997). Carnus is a suitable species for studying the effect of abiotic factors on diapause and adult emergence since: i) its whole life cycle (except for dispersal) occurs in the nest cavities of its hosts, where the effect of photoperiodic cues is unlikely (Danks 1987; Kostal 2006) and, consequently, most of its growth and developmental stages are subjected to the specific microclimate of the cavity, ii) Carnus (and its hosts) inhabits very different cavity types whose microclimate differs widely (Amat-Valero et al. 2014), and marked differences in emergence pattern of flies from different cavity types have been reported (Calero-Torralbo et al. 2013; Annex I); iii) a differential effect of thermal-related variables has been found in different habitat types so that emergence is influenced by thermal fluctuation in nest boxes but by the average temperature in natural cavities (Annex I); and iv) host-parasite synchronization both at an intraspecific and interspecific level has been described (Liker et al. 2001; Valera et al. 2003; Calero-Torralbo 2011; Calero-Torralbo et al. 2013). Recent studies (Calero-Torralbo and Valera 2008; Calero-Torralbo 2011; Amat-Valero et al. 2013; Annex I) have shown that Carnus emergence and diapause termination are influenced by the temperature experienced during the pupal stage both in winter and early spring and that this species shows a remarkable phenotypic plasticity in diapause traits. These works also suggest that sensitivity to temperature varies at different developmental stages, what could explain diverse physiological responses and mechanisms involved in the regulation of host-parasite synchronization (Kostal 2006).

Here we experimentally study the effect of thermal-related variables (thermal oscillation, average temperature) on different times of the diapausal stage of *Carnus* and the resulting emergence pattern. Based on the differential sensitivity of the various phases of diapause to temperature (Tauber et al. 1986; Danks 2007; Kostal 2006) we hypothesize that changing the thermal conditions of carnid pupae during diapause and at the beginning of the emergence period will result in differences in the emergence pattern of flies. Taking advantage of the differences in microclimate among cavities used by Carnus (nest boxes are colder, and have much higher temperature oscillations than burrows in sandpits and cavities in bridges, where microclimate is very stable and similar; Amat-Valero et al. 2014) we performed two experiments: (1) temperature homogenization: we eliminated the thermal differences existing among cavity types during diapause (wintertime) and exposed pupae from different habitats to stable, warm temperature, resembling the conditions found in natural cavities (namely burrows in sandpits, Amat-Valero et al. 2014). We predict (i) similar emergence time among pupae from different cavity types, so that the emergence pattern of flies from nest boxes and cavities in bridges will be analogous to the one of flies from burrows. The second experiment (2) is based on the accelerating effect of fluctuating temperatures on the development rate (Beck 1983; Ratte 1984; Radmacher and Strohm 2011; Marshall and Sinclair 2012; Inoue 2012) and consists on the manipulation of the magnitude of thermal fluctuation: carnid pupae close to emerge and from different cavity types were subjected to a different thermal fluctuation than the one they had under natural conditions. We predict (ii) that flies subjected to higher fluctuation than usual (mainly flies from burrows but also from bridge cavities) will increase their emergence rate whereas the opposite will be the case for flies subjected to narrower fluctuations than usual (flies from nest boxes). Finally, comparing the effect of the manipulations at both stages of the diapause of Carnus will help us to identify differences in sensitivity and responsiveness to ambient conditions between such periods.

Procedures

Study area and species:

The study area (ca. 50 km²) is situated in the Desert of Tabernas (Almería, SE Spain, 37°05'N, 2°21'W). The climate in this area is semiarid with very variable and unpredictable rainfall, usually with heavy rain (mean annual rainfall ca. 218 mm) and

high daily, seasonal and annual variability in temperature. Winters are generally mild and summers hot and long (Lázaro et al. 2004).

Carnus hemapterus (Diptera: Carnidae) is a 2 mm long fly with an adult parasitic stage. Very little is known about *Carnus*' diapause and the environmental conditions eliciting dormancy in this species. Guiguen et al. (1983) suggested that pupae enter diapause after the nestlings leave the nest and undergo a winter diapause lasting several months. Yet, a short diapause (Guiguen et al. 1983; Amat-Valero et al. 2012) and a prolonged diapause (Valera et al. 2006) have also been described. Its emergence and diapause termination are influenced by the temperature experienced during the pupal stage both in winter and spring (when emergence is close to start) (Calero-Torralbo and Valera 2008; Amat-Valero et al. 2013; Calero-Torralbo et al. 2013). Emergence usually occurs with certain synchronization with the presence of the host (Liker et al. 2001; Valera et al. 2003; Calero-Torralbo 2011; Calero-Torralbo et al. 2013) which allows the permanence of the flies in the nest. After emergence, adults are winged and if the nest is not occupied by a potential host, flies can disperse searching for an occupied nest (Grimaldi 1997). Habitually, carnid flies lose the wings once a suitable host is located (Roulin 1998).

A very common host of *Carnus* in the study area is the European roller (*Coracias garrulus* L.). It is a migratory bird arriving south of Spain in April. Its breeding season lasts from early May till mid-July. Rollers breed in natural cavities in sandstone cliffs excavated by European bee-eaters (*Merops apiaster* L.) and by erosion (Manrique 1996; Casas-Crivillé and Valera 2005). Human constructions (cavities in wall crevices of stone bridges and isolated country houses) and nest boxes are also used for breeding (Václav et al. 2011).

Experimental design

Diapause and emergence of carnid flies was studied during the season 2008-2009 in three different habitats with specific thermal conditions: nest boxes, cavities in bridges and burrows in sandy cliffs. Nest boxes in the study area have been progressively installed since 2005 (Václav et al. 2011). They were made of birch wood glued with weather-resistant phenolic resin (see Amat-Valero et al. 2014) and were installed on isolated houses, eucalyptus trees and sandstone walls with variable height and orientation. Cavities in sandy cliffs and bridges were also variable in orientation, height, depth and entrance diameter (for more information see Amat-Valero et al. 2014).

Microclimate was recorded in some cavities during November 2008-July 2009 (sample size ranging 6-9 nest boxes, 6-7 cavities in bridges and 5-6 burrows) by means of temperature-humidity data-loggers (Maxim/Dallas Integrated Products, Inc.) (6 mm of thickness and 17 mm of diameter, temperature range: -20 to 85°C, resolution 0.0625°C; Humidity range: 0 to 100%, resolution 0.04%). They were placed under the nest material (sand and organic material) as close as possible to the incubation chamber and were programmed to record cavity climatic conditions every three hours. Cavities microclimate was determined by two main characteristics: i) mean temperature estimated from the daily average temperature (8 measures per day); and ii) mean temperature oscillation estimated from the daily differences between maximum and minimum temperature recorded in each cavity.

After the 2008 breeding season, 21 cavities (8 wooden nest boxes, 7 cavities in bridges and 6 burrows) used by rollers were selected (see Amat-Valero et al. 2013). Nest material samples presumably containing *Carnus* pupae were collected on 12-14 November 2008 and then they were split in two subsamples of the same mass. Each set of subsamples was assigned to one of the following treatments:

1.- Diapause homogenization treatment (hereafter DH treatment)

One set of subsamples was transferred to the Estación Experimental de Zonas Áridas (EEZA, Almería 36°50'N 02°28'W) just after collection. Samples were stored indoors at room temperature and darkness and from mid-December onwards they were subjected to constant, spring conditions (22°C and 60% RH) in darkness in a climatic test chamber (model Ineltec-CCSP©, see Amat-Valero et al. 2013 for specifications) till the end of *Carnus* emergence.

On 11 April 2009 (corresponding with the 13th week of emergence) the chamber worked inadequately. Temperature exceeded 30°C and relative humidity fluctuated widely what promoted the stop of the emergence. On the basis of previous results (Calero-Torralbo and Valera 2008; Calero-Torralbo et al. 2013; Amat-Valero et al. in prep.) we know that the emergence period lasts 13-15 weeks, so that the failure of the chamber affected the emergence of the last flies (those emerging during the last 2-3 weeks) and we lost a small percentage of individuals (see below) since at that time the emergence curve reaches the asymptote (see, for instance, Calero-Torralbo and Valera 2008). The bias can vary among samples from different habitats since the emergence occurs earlier in nest boxes than in burrows and cavities in bridges (Calero-Torralbo et al. 2013; Annex I). Data were treated accordingly (see below).

2.- Post-diapause homogenization treatment (hereafter *PdH treatment*)

The second set of subsamples was kept in their respective cavities till the first emergence was recorded in each sample. At this time, different in each case (range: from mid-April to mid-May), the sample was moved to Almería and kept in darkness and outdoors. A data logger placed close to the samples in Almería shows that mean temperature and thermal fluctuation during May (when most of the emergence occurred) was respectively $24.2^{\circ}C\pm0.35$ and $6.6^{\circ}C\pm0.7$. Thus, samples from nest boxes and burrows in Almería were at a temperature ca. $1.5^{\circ}C$ higher than the one occurring in the original source nests (May mean temperature measured in 2009: nest boxes: $22.7^{\circ}C$ ± 0.53 , n= 9; burrows: $22.7^{\circ}C \pm 0.41$, n= 6). Samples from bridges placed outdoors in Almería were at a temperature ca. $3.6^{\circ}C$ warmer than in their original location (May mean temperature measured in 2009: $20.6^{\circ}C \pm 0.79$, n= 6). Moreover, temperature fluctuation was eightfold higher in Almería than in the nature (burrows: $0.8^{\circ}C \pm 0.13$, n=6; bridges: $0.8^{\circ}C\pm 0.19$, n=6), but half the fluctuation in nest boxes in the nature ($13.6^{\circ}C \pm 0.43$, n=9).

In summary, subsamples subjected to the DH treatment were exposed to the same environmental conditions from November until the end of the emergence period. In contrast, subsamples subjected to the PdH treatment were under natural, heterogeneous conditions during diapause until the start of emergence and then they were kept in the same environment (overall, warm and fluctuating) from the first emergence till the end of emergence.

Samples under natural conditions (*PdH treatment*) were monitored every 2 weeks for parasite emergence from 26 January 2009 till the end of March 2009. After that, monitoring was done weekly until the first fly was detected. Then, samples were monitored every 3-4 days, until 3 successive negative records occurred. Meanwhile, subsamples in the climatic chamber (*DH treatment*), were monitored every 3-4 days starting on 7 January 2009 until 3 successive negative records occurred.

Flies emerging from each sample and date were collected and preserved in ethanol and later identified and counted with a stereoscopic microscope.

Data treatment

Prevalence (percentage of samples in which *Carnus* was detected with respect to the total number of samples) and median abundance (median number of emerged flies per infected sample) was calculated for each habitat type in each subsample. The emergence

pattern was defined by: i) date when 10% of emerged flies was reached, as an indicator of the start of regular emergence; ii) length of the emergence period (days between the emergence of the first and the last fly); and iii) mean weekly cumulative percentage of emergence per each cavity type (emergence grouped in weeks starting from the first week in which the earliest emergence was detected for each sample). The slope of the curve within 10 and 90% of mean weekly cumulative emergence was also calculated as an indicator of the emergence rate (see Calero-Torralbo and Valera 2008, Calero-Torralbo et al. 2013; Amat-Valero et al. 2013, for a similar approach) (but see below for the *DH treatment*). We also calculated the date of first emergence and the date when 50% of flies emerged but here we only report on the results obtained with 10% emergence (see below).

Samples where 5 or more flies emerged during at least 3 different records (allowing the study of the emergence pattern) were considered for all variables except for prevalence (all the samples were considered). In some samples the emergence during the first monitoring date was higher than 10%. This was the case for 2 samples in bridges, 1 in a nest box and 1 in a burrow for the *DH treatment* and for 3 samples in bridges and 1 in a burrow for the *PdH treatment*. In these cases we estimated the date when 10% emergence was reached (range: 1-4 days earlier, the maximum value given by the period between consecutive monitoring days) on the basis of the shape of the cumulative emergence plotted against date.

The failure of the climatic chamber in the *DH treatment* can potentially affect the abundance and, thus, these data should be treated with caution. In contrast, we think that this failure can hardly affect our results on the emergence pattern (10% emergence date and the slope of the curves within 10-90%). Previous studies (Calero-Torralbo and Valera 2008; Calero-Torralbo et al. 2013; Amat-Valero et al. 2013) indicate that the percentage range of emerged flies from the 12th week until the end of the emergence period is around 10-12%. We therefore calculated the date of 10% emergence and the slopes considering the total number of emerged flies as 90%. Consequently, for the slopes we just assume that the fail of the chamber already disregarded the last 10% of flies in each cavity type. Concerning the emergence date, we consider that our results are conservative: emergence date would be somewhat later, mainly in flies from burrows and cavities in bridges (see results).

Statistical analyses

Differences in prevalence among cavity types were analyzed by Fisher Exact test and differences in abundance by Negative Binomial Generalized Linear Model (GLM) due to the features of the data: i) counts of flies; and ii) overdispersion. Mixed-effect models (LME) were used to study the differences among habitat types in the 10% emergence date (response variable) in each treatment. Habitat type, treatment and their interaction were entered as fixed effects and the identity of the nest as the random effect. Heteroscedasticity was detected during standard validation procedures of the model, and therefore, the model was fitted accounting for the features of the data (Pinheiro and Bates 2000). An exponential variance function best addressed differences in variance between cavity types. The parameters of the model were calculated by the restricted maximum likelihood method. The fitted model was selected by means of the likelihood ratio test (Pinheiro and Bates 2000) with the statistical significance of 0.05 for α level. The assumptions of the model were validated (fitted values versus standardized residual and linearity graphs). Adjusted means comparisons were made for each habitat type in each treatment using least significant differences Fisher's multiple comparison tests.

The comparison of the emergence length among habitat types was analyzed only for the *PdH treatment* by nonparametric test since the data were non-normal. Kruskal-Wallis ANOVA test was applied and Conover tests were used for pair comparisons (Conover 1999).

In order to compare the emergence rate among habitat types, the mean weekly cumulative emergence for each habitat type was represented. The slopes of each curve within the range 10%-90% emergence were calculated by means of simple linear regressions ($r^2>0.93$ and p<0.05 in all cases) and were compared by linear models in which coefficients and F statistics were obtained. Finally, pair comparisons were analyzed by t tests.

All analyses were also done for the dates of first emergence and 50% emergence and the results were consistent with the ones obtained for 10% emergence. We therefore only show the latter.

Values reported are means \pm standard errors (SE) (except for median abundance) and p-values. Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel and Rózsa 2005) was used for prevalence. InfoStat 12 (Di Rienzo et al. 2012) was used for LME and Kruskal-Wallis ANOVA analyses. LME was fit through an interface with the R platform using package nlme and function lme and varExp (Pinheiro and Bates 2000). R software (version

3.0.2.Ink) was used to run Negative Binomial GLM for differences in abundance and linear models for slopes comparisons using the package MASS with glm.nb function and package stats with the function ml.

Outcomes

Prevalence and abundance of parasites, habitat types and treatments

Carnus prevalence did not differ among habitat types in any case (Table 1). In contrast, abundance did differ (GLM ANOVA: *PdH treatment:* F=6.1, p<0.005; *DH treatment*: F=4.2, p<0.05) (Table 1). The abundance pattern observed in the *DH treatment* (when some flies could be missed due to the fail of the chamber) was the same to the one found for the other treatment. The number of samples where less than 5 flies emerged in each habitat type did not differ in any of the treatments (*PdH treatment*: 0 cases, *DH treatment*: 2 samples from bridges; Fisher's tests, p>0.10 in all cases).

	Post-diapause homogenization treatment				Diapause homogenization treatment			
	Prevalence	Test	Median	test	Prevalence	Test	Median	Test
			abundance				abundance	
Bridge	85.7%		10.5 [6]		100%		15.0 [5]	
	[7]		(a)	n<0.005	[7]	n - 1.0	(a)	n~0.05
Burrow	100%	n = 0.62	-0.62 45.5 [6]		100%		27.0 [6]	
	[6]	p=0.02	(a, b)	p<0.005	[6]	p=1.0	(a)	p<0.05
Nest	100%		90.0 [8]		100%		101.5 [8]	
box	[8]		(b)		[8]		(b)	

Table 1: Prevalence and median abundance (median number of parasites found in infected samples with 5 or more than 5 flies) of *Carnus hemapterus* in samples from different habitat types under different treatments. Differences in prevalence were tested by Fisher's exact tests and abundance data by Negative Binomial Generalized Linear Model (GLM). Significant pairwise differences by GLM post hoc tests are shown by different letter in parentheses (significant level <0.05). Sample sizes in square brackets.

Effect of habitat type and experimental treatments on the date of emergence and length of the emergence period

Both habitat type and treatment significantly influenced the date when 10% of emergence occurs whereas their interaction was not significant (Table 2). Emergence occurred significantly earlier in nest boxes than in the rest of the cavities (Fisher LSD, p<0.05), whereas no differences were found between flies from cavities in bridges and

burrows (Table 3). Flies subjected to the *DH treatment* emerged significantly earlier (Fisher LSD, p<0.05) than those under the *PdH treatment* (Table 3).

Concerning the length of the emergence period, it did not vary among habitat types for flies under the *PdH treatment* (Kruskal-Wallis test, $H_{(2, n=19)}=1.3$, p=0.51) (Table 3).

	Random				
					effect (SD)
	num df	dem df	F value	p value	Nest
Intercept	1	17	4569.57	< 0.0001	
Habitat type	2	17	11.12	< 0.001	2 20
Treatment	1	14	1116.68	< 0.0001	2.29
Habitat type : Treatment	2	14	0.04	0.96	

Table 2: Mixed-effect model (LME) type III tests on the date of 10% emergence in the three habitat types and in both treatments. Degrees of freedom (df) of the numerator (num) and denominator (dem) for the fixed effects and standard deviation (SD) for the random effect are shown.

Treatment	Variable	Nest box	Bridge	Burrow
Diapause	10%	$9/2/09 \pm 3.8$	$24/2/09\pm4.0$	$20/2/09\pm2.0$
homogenization	emergence	[7] (a)	[5] (b)	[6] (b)
	10%	$29/4/09 \pm 3.3$	$16/5/09 \pm 3.2$	$11/5/09 \pm 1.0$
Post-diapause	emergence	[8] (a)	[5] (b)	[6] (b)
homogenization	Emergence	41.12±5.00	33.60 ± 6.05	35.17±3.85
	length (days)	[8] (a)	[5] (a)	[6] (a)

Table 3: Ten % emergence date of carnid flies from different habitat types under both treatments. The length of the emergence period in each habitat type is also shown for the *Post-diapause homogenization treatment*. Adjusted mean emergence date \pm standard error (n° of days) and mean emergence length (n° of days) \pm standard error are shown. Significant pair-wise differences between habitat types by LSD Fisher tests for emergence date (mixed-effect model) and by Conover scores (Krukal-Wallis ANOVA test) for the length of the emergence period are shown by different letters in round brackets (significant level p<0.05). Sample sizes (number of cavities) are shown in square brackets.

Effect of habitat type and experimental treatments on the emergence rate

The slopes of the emergence curves of flies under the *DH treatment* differed significantly among habitat types (Table 4). Flies reared in nest boxes had a significantly flatter slope than flies from burrows and cavities in bridges (nest boxes vs. burrows t=4.7, p<0.0005; nest boxes vs. cavities in bridges t=4.8, p<0.0005), whose slopes were similar (Table 4, Figure 1).



Figure 1: Weekly cumulative percentage of emergence \pm standard error (SE) of carnid flies from different habitat types under the same temperature during diapause (*Diapause homogenization treatment*). Percentages were calculated up to a maximum of 90% of emergence (see methods). Week 1=19-25 J January, week 12=6-12 April. The sample size for each habitat type is shown in brackets.

Concerning the *PdH treatment*, we also found a significant model when comparing slopes among habitat types, with the one in nest boxes tending to be milder even though pair-wise comparisons did not reach significance (Table 4, Figure 2).

Treatment	Nest box	Bridge	Burrow	F _(df) & p-value
Diapause	9.7 [7]	14.1 [5]	12.7 [6]	$F_{(5,17)}=198.1$
homogenization	(a)	(b)	(b)	p<0.0001
Post-diapause	18.0 [8]	28.8 [5]	30.2 [6]	F _(5,5) =27.3
homogenization	(a)	(a)	(a)	p=0.001

Table 4: Slopes of the 10%-90% weekly mean cumulative emergence of *Carnus* in different habitat types under two experimental treatments. Slope coefficients and F parameters from linear model analyses with degrees of freedom (df) in subscript parentheses are shown. Significant pair-wise differences between habitat types by t-tests are also shown by different letters in round brackets (significant level p<0.05). Sample sizes (number of cavities) are shown in square brackets.



Figure 2: Weekly cumulative percentage of emergence \pm standard error (SE) of carnid flies from different habitat types under the same temperature during post-diapause (*Post-diapause homogenization treatment*). Week 1=6-12 April, week 11=15-21 June. The sample size for each habitat type is shown in brackets.

Comparing the slopes of the emergence curves from both treatments, a much faster emergence rate was evident after manipulation during post-diapause than during diapause for all habitat types (Table 5, Figure 3 a, b, c). The acceleration was more evident for burrows (Table 5, Figure 3b).

Cavity type	Diapause	Post-diapause	t _(df) & p-value
	homogenization	homogenization	
Nest box	9.7	18.0	$t_{(10)} = 4.31$
			p=0.001
Bridge	14.1	28.8	$t_{(6)} = 4.55$
			p=0.004
Burrow	12.7	30.2	$t_{(6)} = 5.19$
			p=0.002

Table 5: Differences in slopes of the mean weekly 10%-90% cumulative emergence among the two treatments (*Diapause homogenization* and *Post-diapause homogenization*) for the three habitat types. Slope coefficients and t statistic (t-test) with degrees of freedom (df) in subscript parentheses are shown.



Figure 3: Linear regressions of the mean \pm standard error (SE) weekly cumulative emergence (within the 10%-90% range) curves of carnid flies in a) nest boxes, b) burrows, c) bridges under the Diapause homogenization (*DH*) and Post-diapause homogenization (*PdH*) treatments. Week 1= the first week when more than 10% mean emergence was reached for each treatment. Sample size is shown in brackets.

Interpretation

In natural environments insects are not necessarily exposed to air temperature and most of them shelter in habitats where microclimate differs from air thermal conditions. Thus, for understanding their responses to temperature it is necessary to take into account the intimate environment they are subjected to. Our experiments showed consistent results: despite the time and length of the period of homogenization of the temperature where pupae occur (either in diapause or at the beginning of the emergence), flies arose significantly earlier in nest boxes than in the other cavity types, where 10% emergence occurred approximately at the same time. Similar findings have been reported by Calero-Torralbo et al. (2013) and in Annex I for flies under natural conditions in different years. We also found a significantly lower emergence rate for flies from nest boxes after both experimental treatments, what parallels the findings of Annex I under natural conditions. Thus, the treatments here performed could just influence the magnitude of the variation in emergence rate among habitats (see below) but not the general emergence pattern found in the field, which is seemingly fairly robust. Therefore, our prediction that homogenization of abiotic conditions during diapause should promote similar emergence pattern among pupae from different cavity types was not met. These results could reflect that the abiotic conditions prior to the start of the homogenization procedure (November) may have had a long-lasting effect on *Carnus* diapause and emergence. Carnid pupae are formed at the end of the breeding season (June-July) and, from that time until November wide microclimate differences can be found among habitat types (Amat-Valero et al. 2014). For instance, chilling is known to act in many species as a diapause-termination cue (Bradshaw and Holzapfel 1977; Tauber et al. 1986; Hodek 1996, 2002; Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Dong et al. 2013) and it has been shown to advance the emergence date of Carnus (Amat-Valero et al. 2013). Since ambient temperature in our study area dropped below 10°C at the beginning of November 2008 and only samples from nest boxes were exposed to such cold shock before collection, pupae collected from nest boxes could have already ended diapause and started post-diapause development. This would not be the case for pupae from burrows and cavities in bridges. Alternatively, specific genotype x environment interactions could occur in nest boxes in response to such cold microclimate, promoting different phenological responses (Via and Conner 1995). The maintenance of such conditions in time could result in the selection of specific thermal phenotypes (Nijhout 1999, Weinig and Schmitt 2004), so that flies from nest boxes would have different thermal requirements for development adapted to the particular microclimate where they have been reared (Kingsolver 1979; Lillehammer 1987; Lopatina et al. 2011). Further experimental studies at different stages of the diapause are needed to identify the precise effect of microclimate on intraspecific variability of emergence date.

The experimental treatments also produced specific, different results. One evident effect of the homogenization of temperature during diapause (DH treatment) was the overall advanced emergence dates for all nest types. This advance in the date of 10% emergence was of about 80 days on average when compared with the data obtained in the PdH experiment (Table 3) and of 74-86 days on average in comparison with the dates reported under natural conditions (Calero-Torralbo et al. 2013, Annex I; Calero-Torralbo, pers. com.). Earlier emergence was most probably due to the warm temperatures flies were subjected to in comparison to the colder ones in their respective habitats, what could promote the resumption of post-diapause development. This agrees with the results obtained by Amat-Valero et al. (2013) and showed that this life cycle stage is sensitive to changes in temperature and that heat accumulation during the pupal stage enables an earlier emergence. The DH treatment also produced lower emergence rates than the ones described in Annex I under natural conditions. The higher rate of flies in natural conditions could be due to the accelerating effect that thermal fluctuations and chilling have on the development rate (Shimoda and Kiuchi 1997; Petavy et al. 2001; Mironidis et al. 2010; Inoue 2012; Dong et al. 2013). In contrast, individuals from all nest types subjected to the DH treatment missed thermal fluctuations and chilling shocks (except for nest boxes in early November) and this could have decelerated their development.

Contrary to these results, the *PdH treatment* produced a much faster emergence rate than the *DH treatment* and that the values obtained under natural conditions (Annex I). Since the experimental temperature was more fluctuating than the usual one in burrows and bridge cavities but less than in nest boxes, we predicted that the emergence rate of carnid flies should be faster mainly for burrows, and to a lesser extent, in bridges. In fact, the effect of the manipulation was stronger for burrows (Table 4 and 5) and also remarkable for flies from bridges. This agrees with previous works showing that moderate fluctuation within an appropriate range of temperature promotes a rapid development (see Worner 1992; Georges et al 1994; Liu and Meng 2000; Petavy et al. 2001). But the emergence rate of flies from nest boxes also increased when compared

with the *DH treatment* and the data from nature (Annex I). It should be noted that the *PdH treatment* modified substantially the magnitude of the fluctuations but also affected the mean temperature, being slightly warmer than in nest boxes in the nature during May. Milder fluctuations and warmer temperature could promote faster emergence in nest boxes. The *PdH treatment* seemingly also influenced the length of the emergence period since in Annex I a longer one was found for nest boxes under natural conditions and here we found not significant differences among cavity types. Furthermore, although in nest boxes more flies emerged in this treatment, the length of the emergence was shorter than under natural conditions (see Table 1 in Annex I).

One clear result of the *PdH treatment* was that the change of the abiotic conditions when emergence is starting promoted a strong response in carnid flies, suggesting that the last part of post-diapause development is a very sensitive stage (Danks 2007; Kostal 2006) and evidencing the ability of flies to face environmental alteration and the plasticity in the termination of diapause. This makes sense since sensitivity to changes in temperature (either mean values and/or fluctuations) could be a way to detect the occupation of the nest by adult birds and the future occurrence of hosts (nestlings) (see Tripet and Richner 1999; Calero-Torralbo and Valera 2008).

Given the heterogeneous and remarkable differences in microclimate among habitats in our study area and the different responses of carnid flies in emergence time, strategies such as risk-spreading could occur in response to unpredictable environments (Gerber 1984; Hopper 1999; Olofsson et al. 2009). Such strategies could be expressed by different phenologies under the same genotype (Menu 1993; Menu et al. 2000). Phenotypic plasticity is crucial when an organism is exposed to a novel environment, where some degree of change is required in order to ensure survival (Via and Conner 1995; Moczek 2010). Our results would agree with this idea, as a prompt emergence occurred when the environmental conditions changed, mainly during the last part of post-diapause development (PdH treatment), and we did not detect signs of increased mortality. Phenotypic plasticity has been shown to influence the post-diapause development process (Scharloo 1991) and the life cycle of many organisms, particularly of generalist insects, as they are subjected to a wide range of different environments. The ability of the organisms to produce the required phenotypic change depends on the genotypic variation and the influence of the genotype x environmental interaction (Via and Conner 1995). Microclimate conditions from each cavity type could favor the expression of certain phenological responses and therefore the selection of the more appropriate phenotypes. This situation could promote local adaptation processes in the population if such conditions are consistent and if the gene flow is limited (Kawecki and Ebert 2004). Calero-Torralbo (2011) showed that carnid flies in Tabernas present a certain level of genetic diversification associated to emergence date suggesting a temporal isolation, what could agree with our results in the consistency of earlier emergence in nest boxes compared to the other cavity types. In this context, increased fidelity to the microhabitat and/or a particular phenotype could be ongoing for each cavity type.

The identification of the stimuli acting on insect diapause and the specific requirements for post-diapause development and emergence time is important since the effect of such signals may synchronize the individuals with the occurrence of the optimal resources, therefore avoiding maladjusted termination of diapause and premature resumption of development (Kostal 2006; Pitts and Wall 2006). Although we lack basic information in some of those aspects for many organisms, like carnid flies, experimental approaches as the ones presented here, and comparisons with patterns in natural conditions are important for predicting the responses of organisms to global and microclimatic changes.

This annex has been done by María Teresa Amat-Valero, Miguel Ángel Calero-Torralbo and Francisco Valera

ANEXO III

Thermal requirements for emergence

ESTIMATING THERMAL REQUIREMENTS FOR ADULT EMERGENCE OF AN ECTOPARASITIC FLY IN A HETEROGENEOUS HABITAT: MICROCLIMATE MATTERS

Insects have evolved various mechanisms to face unpredictability of the surrounding environment, using abiotic seasonal changes as time measure methods giving certain predictability to physiological, behavioral and development changes (Tauber and Tauber 1981; Tauber et al. 1986). Temperature is a seasonally predictable abiotic factor that contributes to regulate life-cycles and control physiological processes and metabolism, mainly in ectotherms (Sharpe and Demichele 1977; Merino and Potti 1996; Thomas and Blanford 2003). Thus, phenology models (i.e. temperature-based functions) have been developed to estimate when an insect will change from one stage of its maturation process to another. One of the most common methods relies on the direct relationship between temperature and developmental rate (Dixon et al. 2009; Lopatina et al. 2011) as the inverse of the time to complete some phase of the life-cycle (growth/time). It is widely assumed that this relationship is curvilinear (i.e. sigmoidal) (see Stinner et al. 1974; Curry et al. 1978; Briere et al. 1999; Allen and Jason 2000), with a lower developmental threshold (usually calculated by extrapolating a linear regression and estimating the so-called basal temperature; see Jarosik et al. 2002; Trudgill et al. 2005) and an optimum temperature for which the development rate reaches its maximum (Trudgill et al. 2005). Beyond this temperature the development rate decreases rapidly and most individuals die (Campbell 1974). Thus, the growth of ectotherms and the development of a certain stage takes place between an appropriate temperature range or thermal tolerance (i.e. thermal window, within a minimum and a maximum temperature thresholds) (van der Have 2002; Jarosik et al. 2002, 2004; Dixon et al. 2009). Within this window the metabolism is active and the development depends on temperature in a linear form (Campbell 1974; Sharpe and DeMichele 1977; Higley et al. 1986). In addition, since insects are adapted to local climatic conditions, it is assumed that extreme temperatures for those organisms are rare in the field (Campbell 1974) and thus, many works use lineal approaches to study the development from one stage to the following (Honek and Kocourek 1990; Trudgill 1994; Trudgill and Perry 1994; Gilbert and Raworth 1996; Honek 1996, 1999; Charnov and Gillooly 2003; Lopatina et al. 2011; Maiorano 2012; but see Lactin et al. 1995; Briére et al. 1999 for non-linear alternatives).

Degree days accumulation (hereafter DD) is a common simulation tool, widely used in agriculture or crop management (Aliniazee 1975; Reissig et al. 1979; Yang et al. 1995; Régnière and Logan 2003; Maiorano et al. 2012). It is calculated on a daily basis and represents the heat units required for an organism to complete the development from one stage to the following above a minimum temperature threshold (Honek 1996; Trudgill et al. 2005). DD models are usually tested under laboratory conditions to predict diapause phases and phenological emergence in the field (Tauber et al. 1986; Blanckenhorn 1997; Kim et al. 2001). Whereas DD models have been proved good enough to estimate emergence of various pests, it is admitted that mismatches between predicted and observed phenological stages in nature frequently occur (see Kingsolver 1979; Bonhomme 2000) and that important information on key factors (e.g. temperature oscillation, the quantity and quality of food stored, the influence of specific microclimate conditions and local adaptations) would improve the accuracy of predictions (Pruess 1983; Lillehammer 1987; Charnov and Gillooly 2003; Lopatina et al. 2011; Inoue 2012; Sun et al. 2013). Particularly important is the fact that poikilotherms development rate is a nonlinear function of temperature and, thus, it is affected by Jensen's inequality, what means that thermal variance has important implications that cannot be inferred from average environmental conditions. The effects of temperature variance are a recognized source of error in DD models of insect development (the Kaufmann effect, Worner 1992). Moreover, since microclimate may differ markedly from ambient macroclimate (Weiss et al. 1993; Potter et al. 2013), a proper estimation of DD would require using realistic temperature data, being important the site at which thermal measurements are done (Bonhomme 2000). Yet, such information is usually scarce (Pruess 1983). Frequently, we also miss essential information on key features of the focal species, such as the length of successive life cycle stages, the thermal requirements at those stages and the thermal window within which a certain insect stage is capable of accumulating the required number of DD. Specifically, determination of the end of some stages (i.e. diapause) is difficult in nature, and, thus, it is common to use estimates based on arbitrary dates (i.e. Tokeshi 1985; DuRant 1990; Tío et al. 2006; Gonçalves and Torres 2011) instead of biologically meaningful periods (see Pruess 1983; Manel and Debouzie 1995).

Several criteria can be adopted when calculating the DD for a given stage of a focal species. Since DD models have been used in general as a predictor tool, it is commonly assumed that a given species would need a constant amount of DD for completing its development (see Wigglesworth 1972; Gullan and Cranston 1994). Therefore, some studies assume a unique and common thermal window (upper and lower temperature thresholds) for the species (see Dixon et al. 2009 and references therein). Yet, factors adding variation within the population and/or its distribution (e.g.

microclimatic and altitudinal differences) would produce differences in the amount of DD required to develop from one stage to another (see Despins and Roberts 1984; Lillehammer 1987; Frutiger and Buergisser 2002). Therefore, specific thermal thresholds that fit best the population under study are calculated (Manel and Debouzie 1995; DuRant 1990; Masanori and Higashi 2008). Furthermore, it has been found that not only differences in thermal thresholds but also different DD can be required for populations that are widely distributed along latitudinal gradients (see Lopatina et al. 2011).

Carnus hemapterus Nitzsch (1818) is a haematophagous fly parasitizing a wide range of bird species, with some preference for troglodytic ones (Grimaldi 1997). It offers an interesting opportunity to explore intraspecific variation in thermal requirement for development and emergence since: i) it is distributed throughout the Palearctic region and so, throughout a wide variety of latitudinal environments; ii) most of its life cycle (including a diapausal stage) occurs in the nest of its host, subjected to specific microclimatic conditions of the cavity; iii) some host species breed in different cavity types (nest boxes, burrows in sandpits and cavities in human constructions) whose microclimate differs widely (Amat-Valero et al. 2014). For example, temperature in nest boxes is highly fluctuating and colder during winter than in burrows, that are warmer and thermally stable; iv) temperature during diapause is known to influence the diapausal stage and adult emergence (Calero-Torralbo et al. 2008; Amat-Valero et al. 2013; Annex I and II); and v) different thermal-related factors govern the emergence time of flies in each microhabitat and, thus, different emergence patterns have been found in flies inhabiting different microhabitats (Annex I). Specifically, carnid flies from nest boxes emerged earlier than flies from neighboring burrows and cavities in bridges.

Here we perform a fine-scale study on the thermal requirements of carnid flies in three different microhabitats within the same geographical range during one annual cycle. Since such microhabitats are interspersed across a moderate area with similar macroclimatological parameters and given the lack of information about thermal thresholds applicable to this species we assume a unique and common upper and lower temperature threshold for the whole population. We calculate the DD required for emergence and we explore the relationship between emergence rate and heat accumulation along the season in each microhabitat.

116

Since the metabolic rates of poikilotherms tend to increase exponentially with temperature, Jensen's inequality states that thermal variance will produce faster metabolic rates than constant thermal regimes with the same average temperature (see Beck 1983; Ruel and Ayres 1999; Inoue 2012; Annex I and II). Such statement can be extrapolated to various sources of variability of environmental temperatures. For instance, differences among microhabitats in temperature variability will produce differences in metabolic rates of the insects they host. It is predictable that changes in developmental response of poikilotherms to temperature will be selected to minimize variance in their operative body temperatures (Ruel and Ayres 1999). In other words, the dependence of duration of development on temperature will vary among habitats and so will do the sum of degree days. We therefore predict that: i) differences among microhabitats in variance of temperature will result in differences in the amount of DD required to emerge. Moreover, since cold shocks promote development reactivation and decrease the development period (Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Marshall and Sinclair 2012) we predict that: ii) flies in highly-thermal fluctuating environments (nest boxes) will require a lower amount of DD to emerge than flies in more stable environments (burrows and cavities in bridges) and that flies from cavities in bridges, where cold shocks occur (Amat-Valero et al. 2014), will require less DD than flies from burrows, where cold shocks seldom happen. Comparing our results with previous information on intraspecific differences in emergence of carnid flies (Annex I) will clarify likely intraspecific differences in thermal thresholds. Also, we estimate DD from a standard, arbitrary date and from a biologically meaningful event and discuss the likely biases of each procedure.

Procedures

Study area and species

The study area (ca. 50 km²) lies in the Desert of Tabernas (Almería, SE Spain, 37°05'N, 2°21'W). The climate is semiarid with winters typically mild and hot and long summers. It is characterized by high daily, seasonal and annual variability in temperature, and unpredictable rainfall (Lázaro et al. 2004) usually with heavy rain.

Carnus hemapterus (Diptera: Carnidae) (hereafter *Carnus*) is a 2 mm long, blood sucking fly whose life cycle occurs entirely in the nest of the host except for a presumably short dispersal stage (see below). It usually overwinters as pupae in the nest material in a diapause stage that is sensitive to temperature (Calero Torralbo and Valera

2008; Amat-Valero et al. 2013). Diapause usually lasts several months (Guiguen et al. 1983) even though a short diapause (Guiguen et al. 1983; Amat-Valero et al. 2012) and also a prolonged diapause (Valera et al. 2006) have been described. Emergence of imagines occurs with certain synchronization with the presence of host (Liker et al. 2001; Calero-Torralbo and Valera 2008; Calero-Torralbo et al. 2013). Once emerged, carnid flies cannot survive a long time without feeding (around 2-3 days, Calero-Torralbo unpubl.). After emergence adult flies are winged and capable of dispersing and colonizing occupied nests (Grimaldi 1997), and then they normally lose the wings when a suitable host is located (Roulin 1998).

In our study area, carnid flies can be found in the three main cavity types used by their hosts: burrows in sandstone banks excavated by the European bee-eater (*Merops apiaster* L.) and by erosion (Manrique 1996; Casas-Crivillé and Valera 2005), cavities in human constructions (isolated country houses and stone bridges) and nest boxes. One main host in our study area is the European roller (*Coracias garrulus* L.), a migrant, single-brooded bird species (Václav et al. 2011).

Experimental design

Thirty two cavities (12 wooden nest boxes, 8 cork nest boxes, 7 cavities in bridges and 5 in burrows) used by rollers during the 2011 breeding season were selected for this study. Nest boxes were installed on sandstone walls, isolated houses and eucalyptus trees, with variable orientation and height (see Václav et al. 2011). Cavities in bridges and sandy cliffs were also variable in depth, orientation, height and entrance diameter.

Cavities microclimate was studied with temperature-humidity data-loggers (Maxim/Dallas Integrated Products, Inc.) (6 mm of thickness and 17 mm of diameter, temperature range: -20 to 85°C, resolution 0.0625°C; Humidity range: 0 to 100%, resolution 0.04%), that had been located in each of the selected cavities since 21-28 July 2011 (for wooden nest boxes, cavities in bridges and burrows) and since 15 October 2011 for cork nest boxes. Data-loggers were placed under the nest material (organic material and sand) as close as possible to the incubation chamber. They were programmed to record nest climatic conditions every three hours from the dates mentioned above and were maintained in the samples (see below) until the end of fly emergence in each sample. After placement of data-loggers the cavities entrances were covered with a metal mesh to prevent birds entering.

Adult emergence was monitored from nest material samples (sand and organic material likely containing *Carnus* pupae) collected from each cavity on 25 January 2012 and introduced with the data-logger in an open plastic bag and this one in a gauze bag. Each sample was kept in its respective cavity type during the whole study period. Thus, pupae were subjected to their original thermal environment and emerging flies could be collected in the gauze bags. Bags were monitored every 2 weeks from 15 February 2012 till 30 March 2012, and then monitoring was done weekly until the first fly was recorded. After emergence of the first fly in a given sample, it was monitored every 3-4 days until at least 3 successive negative records occurred.

Data treatment

Carnus emergence was studied in samples where 5 or more flies emerged and at least in 3 different records in order to allow the study of the emergence pattern. Emergence was defined by the following variables: i) date when 10% of flies emerged as an estimator of the start of regular emergence; and ii) date when 50% of flies emerged as an indicator of seasonal emergence progress since most flies emerge around this date.

Cork and wooden nest boxes did not differ either in the emergence pattern (date of first and last emergence, 10% emergence, mean emergence date and length of the emergence period) (Mann-Whitney U test, p > 0.10 for all variables, sample size: 12 wooden nest boxes and 8 cork nest boxes), or in the microclimatic conditions (mean monthly temperature and mean monthly thermal oscillation) from mid October 2011 until the end of June 2012 (Amat-Valero et al. in prep.). Therefore, data from both nest types were pooled.

Following Manel and Debouzie (1995), we calculated the DD required until 10% and 50% emergence and within the range of 10-90% emergence for flies from all cavities. In 7 out of 32 cavities (3 nest boxes, 2 burrows and 2 cavities in bridge) emergence during the first monitoring date was higher than 10%. In these cases we estimated the date when 10% emergence was reached (range: 1-4 days earlier, the maximum value given by the period between consecutive monitoring days) on the basis of the shape of the cumulative emergence plotted against date.

The amount of DD accumulated was obtained following the linear model described by Mariorano et al. (2012) that calculates DD hourly by subtracting a base temperature from the air temperature data. In our case we calculated DD in each cavity at a three-hours basis (see also Manel and Debouzie 1995) using the formula:

$$DD_d = \Sigma_{h=1}^d (T_h - T_{min}) / 8$$

where DD_d is the DD accumulated until day d (when a given % of emergence is obtained in each cavity), T_h is the temperature in the cavity (°C) at hour h, and T_{min} is the lower threshold for insect development.

Since high temperatures (ca. 32°C, see Maiorano et al. 2012) also stunt insect development and are common in our study area, an upper temperature threshold (T_{max}) was needed for a proper calculation of DD accumulation. Thus, when $T_h < T_{min}$ or when $T_h > T_{max}$ the value obtained for that moment was zero in the summation.

Maximum and minimum temperature thresholds are unknown for *Carnus*. Thus, we calculated DD required until 10% and 50% of emergence assuming a unique and common thermal window for all carnid flies regardless their microhabitat of origin. Following the values reported in the literature for other dipteran species we set the lower and upper thresholds at 8.8°C and 30°C respectively (Nakamori et al. 1978; Byrd and Butler 1997; Lauziere et al. 2002; Dixon et al. 2009; Gonçalves and Torres 2011).

DD accumulation until 10% and 50% of emergence was calculated from two different starting dates: i) following a common method (DuRant 1990; Gonçalves and Torres 2011) we fixed an arbitrary date (1st January 2012) for the whole population; and ii) from the first chilling date. We lack information on the specific cues that promote diapause termination and post-diapause development in Carnus but we do know that chilling acts in many species as a diapause-termination cue (Bradshaw and Holzapfel 1977; Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Dong et al. 2013) and that it specifically influences Carnus emergence (Amat-Valero et al. 2013). Therefore, in order to adjust the start of DD accumulation to a biological meaningful event, we considered the first cold shock in each cavity (hereafter first chilling date) as an environmental cue breaking diapause. We estimated it to occur when temperature dropped under 10°C for at least one daily record in each of three consecutive days. First chilling date was then dated at the third day. Cold shocks (temperature lower than 10°C) occurred from the end of November until the beginning of December 2011 for nest boxes and from mid-December 2011 until mid-February 2012 for cavities in bridges. However, only two burrows reached temperatures under 10°C during 3 consecutive days (in February). Therefore, for the rest of the burrows (three), first chilling date was considered to occur when the lowest temperature (range: 10.4-13.3°C) was achieved (February). We assume

that the coldest temperature in these burrows act as a cold shock even if it does not reach the threshold used for the other cavities because the progressive increment of temperature from then onwards could be the seasonal change which carnid pupae would need to start the development (see Tauber et al. 1986; Milonas and Savopoulou-Soultani 2000).

We explored the relationship between the emergence pattern within the range 10-90% emergence and: i) DD accumulation during that period of emergence. We therefore calculated the DD accumulated in intervals of 50 DD from the first chilling date in each cavity and we averaged the cumulative emergence percentage reached for each DD value in each cavity type; and ii) the time elapsed (in weeks) from the first chilling date (i.e. when DD accumulation presumably starts). We also investigated the differences among cavity types in the time elapsed from the first chilling date till 10% emergence. Hence, the first chilling date in each nest was averaged for each cavity type and the week 1 was assigned to such date (i.e. 1st week for nest boxes was 28 November-4 December 2011).

We also studied the seasonal pattern of DD accumulation. For this, the amount of DD accrued weekly was calculated for the period when 10-90% occurs in each cavity and averaged for each cavity type.

Statistical analyses

General linear models (GLS) were used to study the variation in DD accumulation (response variable) among cavity types (categorical predictor variable). The parameters of the models were calculated by the restricted maximum likelihood method. The fitted model was selected with the likelihood ratio test (Pinheiro and Bates 2000) with the statistical significance of 0.05 for α level. The assumptions of the model were validated (fitted values versus standard residual and linearity graphs). Heteroscedasticity was detected during standard model validation procedures and, therefore, models were fitted accounting for these features of the data (Pinheiro and Bates 2000). Models incorporating a constant variance structure best addressed different variances among cavity types. Adjusted means comparisons among habitat types were made using least significant differences Fisher's multiple comparison tests. The same model (GLS) and process was followed to study differences among cavity types in the time elapsed from

the first chilling date till 10% emergence occurred. Constant variance structure best addressed different variances among cavity types.

Within cavity-type comparisons of DD accumulated from both starting dates were made by means of Mann-Whitney U tests.

The relationship between the emergence pattern and: i) DD accumulation, and ii) the time elapsed from the first chilling date, and the seasonal progress of DD accumulated weekly were studied by simple linear regressions ($r^2>0.97$ and p<0.005 in all cases). The slopes of each regression line were compared by simple linear models in which coefficients and F statistics were obtained and pair comparisons were analyzed by t tests.

General linear models and Mann-Whitney tests were done with Infostat 12 (di Rienzo et al. 2012). GLS were fit through an interface with the R platform using package nlme and function gls. R software (version 2.15.3.Ink) was used to run simple linear models and slopes comparisons using the package stats and the function ml.

Outcomes

Degree days calculation

The amount of DD accumulated by carnid flies varied significantly among cavity types both when using an arbitrary starting date (1st January) and when calculating them from the first chilling date (Table 1, Figure 1). In both cases, and for both 10% and 50% emergence, flies from nest boxes accumulated significantly less DDs than flies from the other cavities, and flies from burrows accumulated significantly more DD than flies from cavities in bridges (Table 2, Figure 1).

	Ja	nuary	Chilling		
	10%	50%	10%	50%	
Intercept	F=1352.1	F=1350.4	F=1342.6	F=1298.5	
df(num)=1 df(den)=29	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	
Cavity type	F=126.5	F=81.3	F=24.0	F=18.9	
df(num)=2 df(den)=29	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	

Table 1: Type III tests of linear models (GLS) on degree days accumulated from first of January and from the first chilling date until 10% and 50% of emergence of carnid flies. Degrees of freedom of the numerator (df(num)) and denominator (df(den)), F statistics and p values for each model are shown.

	Emergence	Nest boxes	Bridges	Burrows
		[20]	[7]	[5]
January	10%	403.4 ± 11.9	622.3 ± 33.5	1131.9 ± 46.7
		(333.5-538.4)	(481.9-718.2)	(998.3-1285.0)
		а	b	с
	50%	580.1 ± 15.0	821.1 ± 25.1	1316.48 ± 67.93
		(455.9-708.8)	(695.3-884.7)	(1172.6-1533.0)
		а	b	с
Chilling	10%	507.5 ± 18.3	565.9 ± 14.7	857.03 ±47.17
		(384.9-639.9)	(497.9-601.5)	(745.4-1005.0)
		а	b	с
	50%	674.5 ± 16.9	764.7 ± 18.6	1041.43 ± 64.1
		(541.3-804.2)	(705.4-863.0)	(895.3-1252.0)
		а	b	с

Table 2: Adjusted mean number of degree days accumulated \pm standard errors (SE), in each cavity type from first of January and from the first chilling date until 10% and 50% of emergence of carnid flies (range of degree days in brackets). Significant pair-wise differences between habitat types by LSD Fisher tests are shown by different letters (significant level p<0.05). Sample size is shown in square brackets.

Results obtained for both periods were consistent (i.e. did not differ significantly) for cavities in bridges in both emergence dates (Mann Whitney test, n=7, p>0.10 in all cases). Meanwhile the DD accumulated in burrows from first chilling date till 10% and 50% emergence were significantly less than the ones accumulated from 1st January (n=5, till 10%: z=2.4, p=0.02; till 50%: z=2.2, p=0.03). In contrast, the amount of DD accumulated in nest boxes was significantly lower from 1st January than from the first chilling date for both emergence dates (n=20, p<0.0005 in both cases, Figure 1).



Figure 1: Mean (and SE) amount of degree days accumulated in each cavity type from: i) 1st January; and ii) first chilling date (see methods) until 10% emergence was obtained in each sample. Sample sizes are shown brackets.

Relationship between the pattern of emergence and DD accumulation

The amount of carnid flies emerging (within the range 10-90%) per DD unit varied significantly among cavity types ($F_{5,19}$ = 415.1, p<0.0001). Flies from nest boxes had a significantly steeper slope (slope: 0.23, n=20) than flies from bridges (slope: 0.20, n=7, t_{12} =2.2, p=0.04) and from burrows (slope: 0.18, n=5, t_{13} =4.7, p<0.0005), which had the mildest slope. The differences between flies from burrows and cavities in bridges were also significant (t_{13} =2.2, p=0.04; Figure 2).



Figure 2: Linear regressions between the mean \pm standard error (SE) cumulative emergence within the range 10-90% and the amount of degree days (DD) accumulated (in 50 units intervals) in each cavity type from the first chilling date. Sample size for each cavity type is shown in brackets.

Relationship between the pattern of emergence and time of DD accumulation

The time elapsed from the first chilling date until 10% emergence occurred differed significantly among cavity types (GLS type III tests; Intercept: $F_{1,29}$ =832.3, p<0.0001; Cavity type: $F_{2,29}$ =34.3, p<0.0001). Flies from nest boxes needed significantly more time to start regular emergence than flies from the other cavity types (time elapse 147.1±2.2 days, mean 10% emergence in the 21st week; nest boxes vs burrows $F_{1,29}$ =62.8, p<0.0001; nest boxes vs bridges $F_{1,29}$ =8.7, p<0.01, Figure 3), while no significant differences were found between the time needed by flies from burrows and cavities in bridges (time elapsed in burrows: 98.6±5.7 days, mean 10% emergence in the 14th week; time elapsed in bridges: 114.3±10.9 days, mean 10% emergence in the 16th week; burrows vs bridges $F_{1,29}$ =1.63, p=0.2, Figure 3).

Figure 3, a modification of Figure 1 in Annex I, shows that the slopes of the cumulative emergence curves within 10%-90% emergence differed significantly among habitat types ($F_{5,9}$ =126.0, p<0.0001), being steepest in bridges (17.1, n=8), intermediate in burrows (16.1, n=5) and mildest in nest boxes (13.6, n=22) (Figure 3, see also Annex I). Significant differences were found only between the slopes of flies from bridges and nest boxes (t-test, t₇=2.5, p=0.03).



Figure 3: Linear regressions between the mean \pm standard error (SE) cumulative emergence within the range 10-90% emergence and the time elapsed from the first chilling date for each cavity type. Week 1: mean week when first chilling occurred for each cavity type. Sample size for each cavity type is shown in brackets.

Seasonal progression of DD accumulation

The speed of DD accumulation within 10-90% differs among cavity types ($F_{5,9}$ = 241.8, p<0.0001, Figure 4) so that flies from burrows and cavities in bridges accrued heat significantly faster (slopes: 104.3 and 96.2 respectively) than flies from nest boxes (slope: 61.1; burrows vs nest boxes: t₆=9.9, p=0.002; bridges vs nest boxes: t₇=4.5, p=0.001). The slopes of the accumulation rate of DD by flies from burrows and bridges was similar (t₅=0.8, p=0.5).



Figure 4: Linear regressions between the mean \pm standard error (SE) amount of degree days accumulated in each cavity type for the interval 10-90% emergence and the emergence period (in weeks). Week 1: date when the emergence of the first fly occurs. Week 5=23-29 April, week 11=4-10 June. Sample size for each cavity type is shown in brackets.

Interpretation

In our study area carnid flies dwell in interspersed, different microhabitats with specific microclimates. Assuming a common upper and lower temperature threshold for the whole population we found that flies from nest boxes required less DD to start regular emergence (10%) and to reach 50% emergence than flies from other cavities. Flies from burrows required the highest amount of DD to reach 10% and 50% emergence, while flies from bridges needed an intermediate amount of DD. Such results were consistent when the DD accumulation started from an arbitrary date and also from first chilling date. This finding suggests that *Carnus* can have different thermal requirements for post-diapause development and thus, different DD depending on the microclimate it lives. This would agree with results by Lillehammer (1987) who found that the development in the egg and nymphal stages of *Leuctra hippopus* differed due to the local environment, what promoted a different accumulation of DD. A similar pattern was found for carabid beetles (Lopatina et al. 2011), since the duration of egg development and the thermal requirements varied across species and individuals living in different locations.

Flies from nest boxes also differ from the ones from other cavity types in other aspects: i) they emerged earlier in the season (Calero-Torralbo et al. 2013; Annex I) even though they needed more time to emerge from chilling (the assumed date when

DD accumulation starts) (Figure 3); ii) they needed less DD but they accumulated them slower (Figure 4) and, therefore, emergence was slower (Figure 3 and Annex I); and iii) more flies from nest boxes emerged per DD than from bridges and burrows (Figure 2), what suggests a higher uniformity in the thermal requirements among neighboring individuals.

These facts can explain some of our observations: i) earlier seasonal emergence in nest boxes could be explained by the lower amount of DD required to emerge and by an early start of heat accumulation; and ii) the emergence pattern observed for flies from nest boxes would be the result of the interplay between the moderate amount of DD required, the time needed to get these DD and the rate of DD accumulation. Microclimate in nest boxes is characterized by considerable thermal fluctuation, what could promote acceleration in the development rate (see Beck 1983; Behrens et al. 1983; Marshall and Sinclair 2012; Inoue 2012) and consequently changes in thermal requirements (lower DD requirements). From a mechanistic point of view, the formula used to calculate DD will produce higher values with higher temperatures and lower values with increasing number of cold days. The temperature in nest boxes in our study area closely reflects ambient temperature, being the coldest microhabitat in winter with temperatures under 10°C during most days from December to February (Amat-Valero et al. 2014). Therefore, it is not surprising that both the amount of DD accumulated from chilling to the 10% emergence and the accumulation rate is lower for flies from nest boxes than for flies from the other cavities. As the season progresses the mean temperature and thermal fluctuation increases in nest boxes, with daily temperature oscillations above 30°C occurring frequently. In Annex I it was suggested that the early seasonal emergence of flies in nest boxes was governed by thermal oscillation (which is known to accelerate the development rate) and by the balance among chilling shocks, high and average temperatures. Thermal oscillation will increase DD if it happens within the fixed thermal window (8.8°C-30°C). Thus, many values will not add DD with the formula used here and, moreover, extreme values may also decrease the emergence rate since they are known to produce repeated development arrests and so, decreased developmental rate (Petavy et al. 2001; Carrington et al. 2013).

Concerning flies from burrows and bridges, they are similar in that they emerged at the same time in the season (see also Calero-Torralbo et al. 2013; Annex I), and required the same time to emerge from chilling. They also had a similar emergence rate (Figure 3 and Annex I) and both accumulated DD at the same rate (Figure 4). These similitudes make sense since microclimate in these two cavity types is similar, the main difference being the number of cold days (higher for cavities in bridges). The higher frequency of cold days could explain that flies from bridges need less DD than flies from burrows (Table 2, Figure 2) if they act as a stimulus for development (see Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Marshall and Sinclair 2012).

Even though the different amount of DD required for flies from different habitat types could be explained by the different development rate, other alternatives are feasible. We could assume a similar development rate for flies from all microhabitats (but see Kingsolver 1979; Weiss et al. 1993; Lopatina et al. 2011). Then, in order to get a similar DD accumulation rate for flies from all cavity types we should modify the slopes of some of the curves depicted in Figure 4. This exercise would prove informative. For instance, decreasing the rate of DD accumulation in burrows would require narrowing the thermal window, mainly by decreasing the upper threshold to get less DD as the season progresses. Burrows are highly stable environments and we should probably modify unrealistically the thermal window to get substantial changes in DD. Alternatively, increasing the slope of flies from nest boxes to make it similar to the one of burrows and bridges would require rising the maximum temperature threshold and consequently increasing the accumulation of DD mainly in the second half of the season. Widening the thermal window for flies in nest boxes makes sense since thermal thresholds considered here were frequently surpassed, both lower temperatures than 8.8°C in winter and higher temperatures than 30°C later on in the season are common in nest boxes. Moreover, two thermal variables typical of nest boxes, namely daily thermal amplitude and heat shocks, have been reported to lower the minimum threshold (Bonhomme 2000; Inoue 2012) and increase the upper threshold respectively (see Terblanche et al. 2006; Nyamukondiwa et al. 2013 and references therein).

Are specific microhabitat thresholds likely to occur? Via and Conner (1995) stated that the specific environment of each microhabitat could stimulate certain genes due to the process of genotype x environment interactions, promoting different responses in order to face such particular microclimate. Variation in genotype x environment interactions between individuals could occur more frequently in very variable and unpredictable microclimate, what could favor genetic variation and consequently longer emergence periods due to different phenological responses (as it is the case for flies from nest boxes, see Figure 3, Annex I). If the microclimatic conditions for a given habitat are consistent and remain in time, selection for various

thermal phenotypes could occur (Nijhout 1999; Weinig and Schmitt 2004). This could be particularly important for novel or challenging habitats like nest boxes (where temperature regimes are likely to cross frequently physiological thresholds), since adaptation to the specific microclimatic conditions where flies have been reared (see Kingsolver 1979; Lillehammer 1987; Lopatina et al. 2011) would decrease the impact of potential deleterious effects.

DD are usually used as a simulation tool (Pruess 1983; Bernal and Gonzalez 1993; Maiorano et al. 2012). If we were to use DD for predictive purposes, i.e. looking for a fixed amount of DD to predict emergence in our study area, we should increase the thermal window in nest boxes so that flies from this microhabitat accumulate more DD and equal those found for flies from other microhabitats. Alternatively, specific thresholds for flies from each microhabitat should be calculated, what would require the study of the development rate in a wide range of temperatures in absence of confounding variables. The temperature profile acting on the life cycle of *Carnus* is much more complex than an average temperature and thus, it can be hardly captured by simple models. Weiss et al. (1993) stressed that, in heterogeneous habitats, the interactions among development rates and emergence time make the prediction of insect phenology a complex problem. Our results support this conclusion and suggest that considering unique thresholds for very different (micro) habitats would not be appropriate (see also Bonhomme 2000; Bosch and Kemp 2000; Kemp and Bosch 2005; Radmacher and Strohm 2011).

How useful are our estimations of DD? They confirm previous results and suggest mechanistic processes involved in the emergence of this parasite. In Annex I was found that flies emergence occurred more slowly in nest boxes than in burrows and bridges. Using DD as a surrogate of emergence we found a similar pattern: weekly DD accumulation along the emergence period occurred more slowly in nest boxes than in burrows and cavities in bridges (Figure 4) and, in fact, a longer emergence period has been reported for flies from nest boxes in comparison to the one of flies from bridges and burrows (Calero-Torralbo et al. 2013; Annex I). Yet we are aware that our estimations of the DD required for emergence can be biased by three factors: i) some errors could be associated with the model chosen (i.e. linear instead of sigmoidal), since deceleration of the development rate occurs near the lower and upper temperature thresholds (see also Bernal and González 1993; Maiorano et al 2012). This is more likely to affect nest boxes than the two other cavity types; ii) the low sample size of

some cavity types (namely burrows), whose effect (together with the variability in key features such as sandbank orientation or tunnel length) can be seen in the variability of the mean values (Table 2); and iii) incorrect timing of the date for starting DD accumulation (see, for instance, Pruess 1983; Bohomme 2000). We used a biologically meaningful event to date the start of DD accumulation (first chilling date). Our data support that DD accumulation in nest boxes starts earlier than in the other cavity types because flies from nest boxes accumulated more DD from the first chilling date (end of November) than from an arbitrary date (Table 2), suggesting that chilling could stimulate development resumption (William 1956; Tauber et al. 1986; Milonas and Savopoulou-Soultani 2000; Higaki 2005; Dong et al. 2013), what agrees with the results shown by Amat-Valero et al. (2013) for Carnus. Interestingly, flies from bridges accumulated the same amount of DD from both dates (Figure 1) what suggests that the first chilling dates in bridges (from December to mid-February) encompass the arbitrary date. Finally, flies from burrows accumulated less DD from the first chilling date than from 1st January what suggests that development resumption should occur after the arbitrary date (in fact chilling in burrows occurs in February). Yet, as said before, it could be that chilling is not equally reliable for all microhabitats (e.g. burrows). Our study also shows that using arbitrary dates for the calculation of DD can render larger intraspecific differences than the ones found using the first chilling date. Therefore, we suggest the convenience of identifying biologically meaningful events under natural conditions for a reliable estimation of the thermal requirements of organisms in heterogeneous habitats.

This annex has been done by María Teresa Amat-Valero, Miguel Ángel Calero-Torralbo, Radovan Václav and Francisco Valera
REFERENCIAS DE LOS ANEXOS

- Aliniazee MT (1975) Thermal unit requirements for determining adult emergence of the western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the Willamette Valley of Oregon. *Environmental Entomology* 5: 397-402.
- Allen JC, Jason H (2000) Byrd Computer modeling of insect growth and its application to forensic entomology (Report N°. 181992). National Institute of Justice, U.S. Department of Justice.
- Amat-Valero M, Vaclav R, Martínez T, Valera F (2012) Mixed life-history strategies in a local population of the ectoparasitic fly *Carnus hemapterus*. *Parasitology* 139:1045-1053
- Amat-Valero M, Calero-Torralbo MA, Valera F (2013) Temperature during the free-living phase of an ectoparasite influences the emergence pattern of the infective phase. *Parasitology* 140:1357-1367
- Amat-Valero M, Calero-Torralbo MA, Vaclav R, Valera F (2014) Cavity types and microclimate: implications for ecological, evolutionary, and conservation studies. *International Journal of Biometeorology*. 58: 1983-1994.
- Baker CRB (1981) Accumulated temperatures in some pest habitats in 1976-78. Agricultural Meteorology 23:245-253.
- Beck SD (1983) Thermal and thermoperiodic effects on larval development and diapause in the European Corn-borer, Ostrinia nubialis. *Journal of Insect Physiology* 29: 107-112.
- Behrens W, Hoffmann K, Kempa S, Gabler S, Merkel-Wallner G (1983) Effect of diurnal thermoperiods and quickly oscillating temperatures on the development and reproduction of crickets, Gryllus bimaculatus. *Oecologia* 59: 279-287.
- Bernal J, Gonzalez D (1993) Experimental assessment of a degree-day model for predicting the development of parasites in the field. *Journal of Applied Entomology*. 116: 459-466.
- Biron D, Langlet X, Boivin G, Brunel E (1998) Expression of early and late emerging phenotypes in both diapausing and non-diapausing *Delia radicum* L. pupae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 87: 119-124.
- Biron D, Brunel E, Tiilikkala K, Hellquist S, Dixon PL (2003) Expression of a bimodal emergence pattern in diapausing and non-diapausing *Delia floralis*: a phenological survival strategy. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 107: 163–166.
- Blanckenhorn WU (1997) Effect of temperature in growth, development and diapause in the yellow dung fly against all the rules? *Oecologia* 111: 318-324
- Blanckenhorn WU (1998) Altitudinal differentiation in the diapause response of two species of dung flies. *Ecological Entomology* 23: 1-8.
- Bonhomme R (2000) Bases and limits to using `degree.day' unit. European Journal of Agronomy 13: 1-10.
- Bosch J, Kemp WP (2000) Development and emergence of the Orchard Pollinator Osmia lignaria (Hymenoptera: Megachilidae). Environmental Entomology 29: 8-13.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM (1977) Interaction between photoperiod, temperature, and chilling in dormant larvae of the tree-hole mosquito, *Toxophynchites rutilus* COQ. *The Biological Bulletin* 152: 147-158
- Briere JF, Pracros P, Le Roux AY, Pierre JS (1999) A novel rate model of temperaturedependent development for arthropods. *Environmental Entomology* 28: 22-29.
- Byrd JH, Butler JF (1997) Effects of temperature on *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) development. *Journal of medical Entomology* 34: 353-358

- Calero-Torralbo MA (2011) Factores ecológicos y mecanismos implicados en la variabilidad de la interacción entre un ectoparásito generalista (*Carnus hemapterus*) y sus hospedadores. PhD dissertation, University of Granada, Spain.
- Calero-Torralbo MA, Valera, F (2008) Synchronization of host-parasite cycles by means of diapause: host influence and parasite response to involuntary host shifting. *Parasitology* 135: 1343-1352.
- Calero-Torralbo MA, Václav R Valera F (2013) Intra-specific variability in life-cycle synchronization of an ectoparasitic fly to its avian host. *Oikos* 122: 274-284.
- Campbell A, Frazer BD, Gilbert N, Gutierrez AP, Mackauer M (1974) Temperature requirements of some aphids and their parasites. *Journal of Applied Entomology* 11: 431-438.
- Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Barker CM, Scott TW (2013) Effect of fluctuating daily temperature at critical thermal extremes on Aedes aegypti life-history traits *PLoS One* 8: e58824
- Casas-Crivillé A, Valera F (2005) The European Bee-eater (*Merops apiaster*) as an ecosystem engineer in arid environments. *Journal of Arid Environment* 60: 227-238
- Charnov EL, Gillooly JF (2003) Thermal time: Body size, food quality and the 10° rule. *Evolutionary Ecology Research* 5: 43-51
- Conover WJ (1999) Practical nonparametric statistics, 3rd edn. Wiley, New York
- Curry GL, Feldman RM, Smith KC (1978) A stochastic model of a temperature-dependent population. *Theoretical Population Biology* 13: 197-213.
- Danks HV (1987) Insect Dormancy: an ecological perspective. *Biological Survey of Canada* No. 1, Ottawa, Ontario, Canada.
- Danks HV (2007) The elements of seasonal adaptations in insects. *Canadian Entomology* 139: 1-44
- David JF, Celerier ML, Vannier G (1996) Overwintering with a low level of cold-hardiness in the temperate millipede *Polydesmus angustus*. *International Journal of Ecology* 17: 393-404.
- Dawson RD, Hillen KK, Whitworth TL (2005) Effects of experimental variation in temperature on larval densities of parasitic *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae) in nests of tree swallows (Passeriformes: Hirundinidae). *Environmental Entomology* 34: 563-568.
- Despins JL, Roberts JE (1984) Phenology of adult European Corn-Borer (Lepidoptera, Pyralidae) in Virgina. *Journal of conomic Entomology* 77: 588-590
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW InfoStat versión (2012). InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar
- Dixon AFG, Honek A, Keil P, Kotela MAA, Sizling AL, Jarosik V (2009) Relationship between the minimum and maximum temperature thresholds for development in insects. *Functional Ecology* 23: 257-264
- Dong YC, Wang ZJ, Clarke AR, Pereira R, Desneux N, Niu CY (2013) Pupal diapause development and termination is driven by low temperature chilling in *Bactrocera minax*. *Journal of Pest Science* 86: 429-436.
- DuRant JA (1990) Influence of temperature on spring emergence of European Cron Borer Moths (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural Entomology* 7: 259-264
- Fargallo JA, Blanco G, Potti J, Viñuela J (2001) Nestbox provisioning in a rural population of Eurasian Kestrels: Breeding performance, nest predation and parasitism. *Bird Study* 48: 236-244.

- Frutiger A, Buergisser G (2002) Life history variability of grazing stream insect (*Liponeura cinerascens minor*; Diptera: Blephariceridae) *Freshwater Biology* 47: 1618-1632
- Georges A, Limpus C, Stoutjesdijk R (1994) Hatchling sex in the marine turtle *Caretta caretta* is determined by proportion of development at a temperature, not daily duration of exposure. *Journal of Experimental Zoology* 270:432–444.
- Gerber GH (1984) Influence of date of oviposition on egg hatching and embryo survival in the red turnip beetle, *Entomoscelis americana* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Canadian Entomology* 116: 645–652.
- Gilbert N, Raworth DA (1996) Insects and temperature a general theory. *Canadian Entomololy* 128: 1-13.
- Gonçalves MF, Torres LM (2011) The use of the cumulative degree-days to predict olive fly, Bactrocera oleae (Rossi), activity in traditional olive groves from the northeast of Portugal. Journal of Pest Science 84: 187-197
- Grimaldi D (1997) The birds flies, Genus *Carnus*: species revision, generic relationships and a fossil Meoneura in amber (Diptera: Carnidae). *American Museum Novitates* 3190: 1-30.
- Guiguen C, Launay H, Beaucournu JC (1983) Ectoparasites des oiseaux en Bretagne. I. Rèpartition et écologie d'un diptère hematophage nouveau pour la France: Carnus hemapterus Nitzsch. Revue Francaise d'Entomologie 5:54-62
- Gullan PJ, Cranston PS (1994) The Insects: An Outline of Entomology. Chapman and Hall, London.
- Higaki M (2005) Effect of temperature on the termination of prolonged larval diapause in the chestnut weevil *Curculio skkimensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Physiology* 51: 1352-1358
- Higley LG, Pedigo LP, Ostle KR (1986) DEGDAY: a program for calculating degree-days, and assumptions behind the degree-day approach. *Environmental Entomology* 15: 999-1016.
- Hodek I (1996) Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *European Journal of Entomology* 93: 475-487.
- Hodek I (2002) Controversial aspects of diapause development. *European Journal of Entomology* 99: 163-173.
- Hodkinson ID (2005) Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Review* 80: 489-513.
- Honek A (1996) The relationship between thermal constants for insect development: a verification. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 60: 115–152.
- Honek A (1999) Constraints on thermal requirements for insect development. *Entomological Science* 2: 615-621.
- Honek A, Kocourek F (1990) Temperature and development time in insects: a general relationship between thermal constants. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere* 117: 401-439.
- Hopper KR (1999) Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology. *Annual Review* of Entomology 44: 535–560.
- Inoue T (2012) Effects of temperature on the development of overwintering immature stages of the near-threatened butterfly *Leptelina unicolor* (Bremer & Grey) (Lepidoptera: Hesperiidae). *Entomological Science* 15: 180-188.
- Jarosík V, Honek A, Dixon AFG (2002) Developmental rate isomorphy in insects and mites. *American Naturalist* 160: 497–510.
- Jarosík V, Kratochvíl L, Honek A, Dixon AFG (2004) A general rule for the dependence of developmental rate on temperature in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society London B (Supplementum)* 271: S219–S221.

- Kawecki TJ, Ebert D (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letter* 7: 1225-1241.
- Kemp WP, Bosch J (2005) Effect of temperature on Osmia lignaria (Hymenoptera: Megachilidae) prepupa-adult development, survival, and emergence. Journal of Economic Entomology 98: 1917-1923.
- Kim DS, Lee JH, Yiem MS (2001) Temperature-Dependent development of *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae) and its stage emergence models. *Environmental Entomology* 30: 298-305
- Kingsolver JG (1979) Thermal and hydric aspects of environmental heterogeneity in the pitcher plant mosquito. *Ecological Monographs* 49: 357-376.
- Kostal V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52: 113-127.
- Krasnov BR, Khokhlova IS, Fielden LJ, Burdelova NV (2002) The effect of substrate on survival and development of two species of desert fleas (Siphonaptera: Pulicidae). *Parasite* 9: 135-142.
- Krebs RA, Loeschcke V (1994) Effects of exposure to short-term heat stress on fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 7: 39–49.
- Lactin DJ, Holliday NJ, Johnson DL, Craigen R (1995) Improved rate model of temperaturedependent development by arthropods. *Environmental Entomology* 24: 68-75.
- Lauziere I, Setamou M, Legaspi J, Jones W (2002) Effect of temperature on the Life Cycle of Lydella Jalisco (Diptera: Tachinidae), a Parasitoid of Eoreuma loftini (Lepidoptera: Pyralidae) Environmental Entomology 31: 432-437
- Lázaro R, Rodríguez-Tamayo M., Ordiales R, Puigdefábregas J (2004) El Clima. In: Mota J, Cabello J, Cerrillo MI, Rodríguez-Tamayo ML (eds.) *Subdesiertos de Almería: naturaleza de cine*. Consejería de Medio Ambiente- Junta de Andalucía, Almería, (Spain).
- Leather SR, Walters KFA, Bale JS (1993) *The ecology of insect overwintering*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Liker A, Markus M, Vozar A, Zemankovics E, Rozsa L (2001) Distribution of *Carnus hemapterus* in a starling colony. *Canadian Juornal of Zoology* 79: 574-580
- Lillehammer A (1987) Intraspecific variation in the biology of eggs and nymphs of Norwegian populations of *Leutra hippopus* (Plecoptera). *Journal of Natural History* 21: 29-41
- Li D (1995) Development and survival of *Eriginidium graminicolum* (Sundevall) (Aranea: Lyniphiidae: Erigoninae) at constant temperature. *Bulletin of Entomological Research* 85: 79-91.
- Liu SS, Meng XD (2000) Modeling development time of *Lipaphis erysimi* (Hemiptera: Aphididae) at constant and variable temperatures. *Bulletin of Entomological Research* 90: 337-347.
- Logan JA, Stinner RE, Rabb RL, Bacheler JS (1979) A descriptive model for predicting spring emergence of *Heliothis zea* populations in North Carolina. *Environmental Entomology* 8: 141-146.
- Lopatina EB, Kipyatkov VE, Balashov SV, Dubovikoff DA, Sokolova LV (2011) Interspecific and intraspecific variation of the duration and thermal requirements for egg development in Carabid Beetles (Coleoptera, Carabidae) in the North-West of Russia. *Entomological Review* 92: 32-45
- Maiorano A (2012) A physiological based approach for degree-day calculation in pest phenology models: the case of the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) in Northern Italy. *Interantional Journal of Biometeorology* 56: 653-659

- Maiorano A, Bregaglio S, Donatelli M, Furmagalli D, Zucchini A (2012) Comparison of modelling approaches to simulate the phenology of the European Corn Borer under future climate scenarios. *Ecological Modelling* 245: 65-74
- Manel S, Debouzie D (1995) Prediction of egg and larval development times in the field under variable temperatures. *Acta Oecologica* 16: 205-218
- Manrique J (1996) Corología y ecogeografía de las aves nidificantes en la provincia de Almería (SE ibeírico). PhD dissertation, Universidad de Granada, Granada
- Marshall KE, Sinclair BJ (2012) The impacts of repeated cold exposures of insects. *The Journal* of experimental Biology 215: 1607-1613
- Masaki S (1999) Seasonal adaptations of insects as revealed by latitudinal diapause clines. Entomological Science 2: 539-549.
- Masaki S (2002) Ecophysiological consequences of variability in diapause intensity. *European Journal of Entomology* 99: 143-154.
- Masaki S, Ando Y, Watanabe A (1979) High temperature and diapause termination in the eggs of Teleogryllus *commodus* (Orthoptera: Gryllidae). *Kontyu* 47: 493-504.
- Masanori H, Higashi S (2008) Degree-day accumulation controlling allopatric and sympatric variations in the sociality of sweat bees, *Lasioglossum (Evylaeus) baleicum* (Hymenoptera: Halictidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 1239-1247
- Merino S, Potti J (1996) Weather dependent effects of nest ectoparasites on their brid hosts. *Ecografy* 19: 107-113
- Menu F (1993) Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephans* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* 96: 383–390.
- Menu F, Debouzie D (1993) Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects: example of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia*, Berlin 93: 367-373.
- Menu F, Desouhant E (2002) Bet-hedging for variability in life cycle duration: Bigger and lateremerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia*, Berlin 132: 167-174.
- Menu F, Roebuck JP, Viala M (2000) Bet-hedging diapause strategies in stochastic environments. *American Naturalist* 155: 724–734
- Milonas PG, Savopoulou-Soultani M (2000) Diapause induction and termination in the parasitoid *Colpoclypeus florus* (Hymenoptera: Eulophidae): Role of photoperiod and temperature. *Annals of the Entomological Society of America* 93: 512-518.
- Mironidis GK, Stamopoulos DC, Savopoulou-Soultani M (2010) Overwintering survival and spring emergence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Northen Greece. *Environmental Entomology* 39: 1068-1084.
- Mitchell SE, Rogers ES, Little TJ, Read AF (2005) Host-parasite and genotype-by-environment interactions: Temperature modifies potential for selection by a sterilizing pathogen. *Evolution* 59: 70-80.
- Moczek AP (2010) Phenotypic plasticity and diversity in insects. *Philosophical Transactions of Royal Society B.* 365: 593-603
- Nakamori H, Soemori H, Kakinohana H (1978) Effect of temperature on pupal development of melon fly, *Dacus-cucurbitae*-COQ and method to control timing of adult emergence. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 22: 56-59
- Nijhout HF (1999) Control mechanism of polyphonic development in insects. *BioScience* 49: 181-192.

- Noriyuki S, Akiyama K, Nishida T (2011) Life-history traits related to diapause in inuvoltine and bivoltine populations of *Ypthima multistriata* (Lepidoptera: Satyridae) inhabiting similar latitudes. *Entomological Science* 14: 254-261.
- Nyamukondiwa C, Weldon CW, Chown SL, Roux PC Terblanche JS (2013) Thermal biology, pupolations and implications of temperature extreme for the management of two globally significant insect pests. *Journal of Insect Phisiology* 59: 1199-1211
- Olofsson H, Ripa J, Jonzén N (2009) Bet-hedging as an evolutionary game: the trade-off between egg size and number. *Proceedings of the Royal Society B* 276: 2963-2969.
- Petavy G, David JR, Gilbert P, Moreteau B (2001) Viability and rate of development at different tempera in Drosophila: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *Journal of Thermal Biology* 26: 29-39.
- Pincebourde A, Woods HA (2012) Climate uncertainty on leaf surfaces: the biophysics of leaf microclimates and their consequences for leaf-dwelling organisms. *Functional Ecology* 26: 844-853.
- Pinheiro JC, Bates DM (2000) Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer, New York
- Pitts KM, Wall R (2006) Cold shock and cold tolerance in larvae and pupae of the blow fly, *Lucilia sericata*. *Physiological Entomology* 31: 57-62.
- Potter KA, Woods HA, Pincebourde S (2013) Microclimatic challenges in global change biology. *Global Change Biology* 19: 2932-2939.
- Pruess KP (1983) Day-degree methods for pest management. *Environmental Entomology* 12: 613-619.
- Radmacher S, Strohm E (2010) Factors affecting offspring body size in the solitary bee *Osmia bicornis* (Hymenoptera, Megachilidae). *Apidologie* 41: 169-177.
- Radmacher S, Strohm E (2011) Effect of constant and fluctuating temperatures on the development of the solitary bee *Osmia bicornis* (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* 42: 711-720.
- Ratte HT (1984) Temperature and insect development. In: Hoffmann, K. H. (ed). *Environmental physiology and biochemistry of insects*, pp 33-66. Springer, Berlin.
- Régnière J, Logan JA (2003) Animal life Cycle models. In: Schwartz M (ed) *Phenology: an integrative environmental science*. Kluwer, Dordrecht, pp 237-254
- Reiczigel J, Rozsa L (2005) Quantitative Parasitology 3.0. Budapest.
- Reissig WH, Barnard J, Weires RW, Glass EH, Dean RW (1979) Prediction of apple maggot fly emergence from thermal unit accumulation. *Environmental Entomology* 8: 51-54.
- Roulin A (1998) Cycle de reproduction et abundance du diptére parasite *Carnus hemapterus* dans le niches de chouettes effraies *Tyto alba*. *Alauda* 66: 265-272
- Ruel JJ, Ayres MP (1999) Jensen's inequality predicts effects of environmental variation. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 361-365.
- Scharloo W (1991) Canalization: genetic and developmental aspects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 65–93.
- Schlichting CD, Pigliucci M (1998) *Phenotypic Evolution: a Reaction Norm Perspective*. Sinauer Asociates, Sinauer, MA, (USA).
- Sharpe PJH, Demichele DW (1977) Reaction kinetics of poikilotherm development. *Journal of Theoretical Biology* 64: 649-670.
- Shimoda M, Kiuchi M (1997) Effect of chilling of diapause pupa on adult emergence in the Sweet Potato Hornworm, *Agrius convolvuli* (Lepidoptera; Sphingidae). *Applied Entomology and Zoology* 32: 617-624.

- Smith BP, McIver S (1984) The patterns of mosquito emergence (Diptera: Culicidae; *Aedes spp.*): their influence on host selection by parasitic mites (Acari: Arrenuridae; *Arrenurus spp.*). *Canadian Journal of Zoology* 62: 1106-1113.
- Stinner RE, Gutierrez AP, Butler GDJ (1974) An algorithm for temperature-dependent growth rate simulation. *Canadian Entomology* 106: 519-524.
- Sun X, Zhou X, Small GE, Sterner R, Kang H Liu C (2013) Energy storage and C:N:P variation in a holometabolous insect (*Curculio davidi Fairmaire*) larva across a climate gradient. *Journal of Insect Physiology* 59: 408-415
- Takafuji A, Morimoto N (1983) Diapause attributes and seasonal occurrences of 2 populations of the citrus red mite, *Panonychus-citri* (Mcgregor) on pear (Acarina, Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology* 18: 525-532.
- Tauber CA, Tauber MJ (1981) Insect seasonal cycles: genetics and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 281-308.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S (1986) Seasonal Adaptation of Insects. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Terblanche JS, Klok CJ, Krafsur ES, Chown SL (2006) Phenotypic plasticity and geographic variation in thermal tolerance and water loss of the tsetse *Glossina pallidipes* (Diptera : Glossinidae): implications for distribution modelling. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 786–794.
- Taylor F (1981) Ecology and evolution of physiological time in insect. *The American Naturalist* 117: 1-23.
- Thomas MB, Blanford S (2003) Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends of Ecology & Evolution* 18: 344-350.
- Tío R, Cano E, Martínez JL (2006) An approximation to the prediction of the summery emergence of *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae) based on the relationship between degree-days accumulations and adult captures. *Anales de Biologia* 28: 101-108
- Tokeshi M (1985) Life-cycle and production of the burrowing mayfly, *Ephemera danica*: A new Method for estimating Degree.Days required for growth. *Journal of Animal Ecology* 54: 919-930
- Tripet F, Richner H (1999) Dynamics of hen flea *Ceratophyllus gallinae* subpopulations in blue tit nests. *Journal of Insect Behavior* 12: 159–174
- Trudgill DL (1994) An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. *Fundamental and Applied Nematology* 18: 407–417
- Trudgill DL, Honek A, vanStraalen NM (2005) Thermal time-concepts and utility. *Annual of Applied Biology* 146: 1–14.
- Trudgill DL, Perry JN (1994) Thermal time and ecological strategies a unifying hypothesis. *Annual of Applied Biology* 125: 521–532.
- Turnock WJ, Boivin G (1997) Inter- and intra-population differences in the effects of temperature on post-diapause development of *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 4: 55–265.
- Tyshchenko VP, Kind TV (1983) Neuroendocrine mechanisms regulating the seasonal cycles. *Trudy Vsesoyuznogo Entomologicheskogo Obshchestva* 64, 82-117.
- Urbaneja A, Llácer E, Garrido A, Jacas JA (2001). Effect of temperature on the life history of Cirrospilus sp. near lyncus (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Phyllocnistic citrella* (Lpidoptera: Gracillariidae). *Biological Control* 21: 293-299.
- Václav R, Valera F, Martínez T (2011) Social information in nest colonisation and occupancy in a long-lived, solitary breeding bird. *Oecologia* 165:617-627.

- Valera F, Casas-Crivillé A, Hoi H (2003) Interspecific parasite exchange in a mixed colony of birds. *Journal of Parasitology* 89: 245-250.
- Valera F, Casas-Crivillé A, Calero-Torralbo MA (2006) Prolonged diapause in the ectoparasite *Carnus hemapterus* (Diptera: Cyclorrapha, Acalyptratae) – how frequent is it in parasites? *Parasitology* 133:179–186
- van der Have, TM (2002) A proximate model for thermal tolerance in ectotherms. *Oikos* 98: 141-155.
- van Dijk J, Morgan ER (2008) The influence of temperature on the development, hatching and survival of Nematodirus battus larvae. *Parasitology* 135: 269-283.
- Vermunt B, Cuddington K, Sobek-Swant S, Crosthwaite JC, Lyons DB, Sinclair BJ, (2012) Temperatures experienced by wood boring beetles in the under bark microclimate. *Forest Ecology and Management* 269: 149-157.
- Via S, Conner J (1995) Evolution in heterogeneous environments: genetic variability within and across different grains in *Tribolium castaneum*. *Heredity* 74: 80-90
- Vinogradova EB (2000) Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Series Parasitologica No 2. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow. 250 pp.
- Wall R, French N, Morgan KL (1992) Effects of temperature on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomology Research* 82: 125-131.
- Wang T, Laing JE (1989) Diapause termination and morphogenesis of *Holcothorax-testaceipes ratzeburg* (hymenoptera, encyrtidae), an introduced parasitoid of the spotted tentiform leafminer, *Phyllonorycter-blancardella* (f) (lepidoptera, gracillariidae). *Canadian Entomology* 121: 65-74
- Weinig C, Schmitt J (2004) Environmental effects on the expression of quantitative trait loci and implications for phenotypic evolution. *Bioscience* 54: 627 635.
- Weiss SB, Murphy DD, Ehrlich PR, Metzler CF (1993) Adult emergence phenology on checkerspot butterflies: the effects of macroclimate, topoclimate, and population history. *Oecologia*. 96: 261-270.
- Wharton DA (1999) Parasites and low temperatures. Parasitology 119 (Suppl.), S7-S17.
- Wigglesworth VB (1972) The principles of insect physiology (7th ed.) Methuen, London
- William CM (1956) Physiology of insect diapause. X. An endocrine mechanism for the influence of temperature on the diapausing pupa of the *Cecropia silkworm*. *Biological Bulletin* 110: 201-218
- Worner SP (1992) Performance of phenological models under variable temperature regimes: consequences of the Kaufmann or rate summation effect. *Environmental Entomology* 21: 689-699.
- Yang S, Logan J, Coffey DL (1995) Mathematical formulae for calculating the base temperature for growing degree days. *Agriculture and Forest Meteorology* 74: 61–74.