

GRAO EN BIOLOXÍA
Curso Académico 2022-2023



Traballo de Fin
de Grao

Respuestas del caracol común
Cornu aspersum (Müller, 1774) a
extractos cuticulares del depredador
de gasterópodos *Lampyris noctiluca*
Linnaeus, 1767 (Coleoptera,
Lampyridae)

Autor/a

Diego González López

Índice

1	Resumen.....	1
2	Introducción	2
3	Objetivos	7
4	Metodología.....	7
4.1	Caracoles.....	7
4.2	Luciérnagas	8
4.3	Dispositivos experimentales empleados.....	9
4.3.1	Primer dispositivo experimental	9
4.3.2	Segundo dispositivo experimental	10
4.4	Experimentos	11
4.4.1	Primer experimento	11
4.4.2	Segundo experimento.....	12
4.5	Análisis de datos.....	13
5	Resultados y Discusión	14
6	Conclusiones.....	17
7	Bibliografía.....	18

1 Resumen

Existen pruebas de que los gasterópodos terrestres son capaces de detectar las señales químicas de sus depredadores (principalmente coleópteros), pudiendo modificar su conducta para evitar el peligro. Sin embargo, los conocimientos existentes sobre la ecología química de los gasterópodos siguen siendo muy limitados. Este estudio examinará en concreto los efectos de un extracto cuticular obtenido en etanol a partir de larvas de *Lampyris noctiluca* (luciérnaga común europea) sobre *Cornu aspersum* (caracol común o de jardín), considerado como una plaga de numerosos tipos de cultivos.

Con los ejemplares de caracol de jardín se realizaron dos experimentos diferentes. El primero cuantificó el tiempo que tardaron los individuos en tomar una salida de dos posibles, en una de las cuales se dispuso una barrera química impregnada con extracto cuticular de luciérnaga y, en la otra, una barrera control impregnada con etanol. En el segundo experimento se cuantificó la ingesta de alimento tratado y no tratado con el extracto cuticular, por parte de los caracoles.

Los resultados del primer experimento evidenciaron la existencia de un cierto efecto, marginalmente significativo, del extracto cuticular de *Lampyris* sobre el comportamiento de los caracoles, en el sentido de que los caracoles prefirieron atravesar la barrera control antes que la barrera con extracto. En el segundo experimento, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entra la ingesta de alimento tratado y no tratado con el extracto de *Lampyris*. Los resultados de ambos experimentos se discuten en el contexto de experiencias similares que refleja la bibliografía y de las circunstancias particulares en las que se realizaron los experimentos aquí descritos.

Palabras clave: extracto cuticular, quimiorrecepción, *Lampyris noctiluca*, *Cornu aspersum*.

2 Introducción

Los gasterópodos terrestres constituyen plagas agrícolas a nivel mundial, pueden causar un gran número de daños en horticultura, agricultura y silvicultura. Especies como la babosa gris *Deroceras reticulatum* o el caracol común *Cornu aspersum* son plagas en una amplia gama de cultivos en toda Europa y son importantes especies invasoras en muchos países del mundo. A diferencia de los coleópteros, existe muy poco trabajo de investigación sobre la ecología química de los gasterópodos terrestres. Sin embargo, los pocos estudios realizados han demostrado claramente que las señales químicas juegan un papel importante en el comportamiento de los gasterópodos, por ejemplo, en la búsqueda de alimento o de pareja y en sus relaciones con depredadores. Este trabajo está enfocado al estudio del comportamiento de los gasterópodos terrestres en presencia de sustancias producidas por insectos que son depredadores naturales de caracoles y babosas, perteneciendo en su gran mayoría al grupo de los coleópteros.

La mayor parte de los Coleópteros identificados como depredadores de Gasterópodos son polívoros (consumidores de diferentes tipos de alimentos), por lo que los caracoles y las babosas no son sus únicas presas. La depredación de estos moluscos se asocia concretamente con cinco familias pertenecientes a dos subórdenes de Coleoptera. Estas son las familias Carabidae (Adephaga, Caraboidea), la Staphylinidae y Silphidae (Polyphaga, Staphylinoidea) y por último Lampyridae y Drilidae (Polyphaga, Elateroidea) (1).

En nuestro estudio nos centraremos en la familia Lampyridae (a la que pertenecen las luciérnagas), concretamente en la especie *Lampyris noctiluca* (luciérnaga común europea). Los miembros de esta familia presentan principalmente una distribución tropical con pequeños grupos de especies en las regiones templadas de ambos hemisferios. La mayoría de ellas son depredadoras de gasterópodos, aunque solo durante su fase larvaria. La especialización llega a ser tal que son capaces de rastrearlos gracias a las sustancias químicas presentes en los rastros de babas que dejan las babosas y los caracoles al desplazarse (2,3).

La morfología de las larvas presenta una combinación de caracteres de escarabajos (puede variar entre las diferentes especies el largo de las patas, la posición relativa de los órganos emisores de luz o la forma de los terguitos). Suelen tener los escleritos endurecidos, lo cual contrasta con los adultos, que tienen una menor esclerotización. Al comparar la morfología de las larvas entre diferentes especies surgen patrones de adaptación en función del hábitat al que hayan amoldado su estilo de vida. Un ejemplo

puede ser las especies acuáticas, las cuales presentan branquias traqueales en lugar de los espiráculos típicos de las terrestres (4).

Como rasgos generales en las fases inmaduras de luciérnagas podemos observar una cabeza retráctil, órganos luminosos en el abdomen, órganos defensivos eversibles a lo largo de su costado (glándulas capaces de producir sustancias químicas y olores repelentes de depredadores) y por último, un par de mandíbulas conectadas a glándulas venenosas (4). Copeland (1981) (5) investigó este veneno con el cual son capaces de someter a sus presas. Utilizó extractos del intestino medio, hemolinfa, la cabeza, el tórax y las mandíbulas de *Photuris lucicrescens* y *Photuris versicolor* para examinar sus efectos inhibidores en los registros electrocardiográficos de los corazones de *Limax maximus*. Los efectos más potentes fueron inducidos por extractos de intestino medio y por la hemolinfa. La inhibición de la función cardíaca mediante la inyección de fluidos del intestino medio se consideró como un método eficaz para someter a la presa, mientras que venenos similares en la hemolinfa podrían actuar como un mecanismo disuasorio para los depredadores.

Los primeros trabajos que reafirmaron el papel de las luciérnagas como depredadores de caracoles y babosas se realizaron en lampíridos tropicales (6). La luciérnaga india, *Lamprophorus tenebrosus*, se investigó como un posible agente de control biológico de *Achatina fulica*, ya que las larvas de esta especie consumían hasta 60 individuos de estos caracoles durante su desarrollo (7). Otro ejemplo es la luciérnaga japonesa, *Luciola lateralis*, investigada como agente de control de *Pomacea caniculata* (8).

El control biológico de gasterópodos terrestres no sólo tiene interés en el ámbito de la agricultura, sino que también tienen repercusiones sanitarias. Por ejemplo las larvas de lampíridos de los géneros *Aspisoma* y *Cratomorphus* son enemigos naturales de caracoles de agua dulce de los géneros *Biomphalaria* y *Lymnaea*, presentes en zonas pantanosas y vectores de parásitos humanos y del ganado como *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepática*, observándose una depredación activa tanto en ambientes naturales como en experimentos realizados en el laboratorio (9).

En las regiones templadas, las investigaciones se centran en el estudio de *L. notiluca*, siendo un enemigo natural de gasterópodos terrestres y de agua dulce. Wild y Lawson (1937) (10) reportan la depredación de esta especie sobre *Vitrea crystallina*, *Cernuella virgata*, *Monacha cantiana*, *Theba pisana*, *Cepaea nemoralis* y *C. aspersum*, siendo esta última la especie utilizada en el presente trabajo.

Las luciérnagas pasan la mayor parte de su vida en forma larvaria (son especies semélparas), de forma que los adultos no se alimentan, si no que dependen de los recursos consumidos durante la fase anterior (11). La fase adulta solo dura un par de semanas, en la cual se reproducen y se dispersan. Por este motivo es tan importante conocer los rasgos y características de los estadios inmaduros para conocer la biología global de la especie. Normalmente los estudios se basan en su morfología y su comportamiento, descuidando áreas como la fisiología, el hábitat y el ciclo vital. Por este motivo el 94% de las especies de luciérnaga no cuentan con estudios de su fase larvaria (4).

Los moluscos terrestres, al igual que otros muchos grupos de animales, poseen diferentes estrategias para aumentar su supervivencia, siendo una de las más comunes detectar y eludir a los depredadores. En el caso de los gasterópodos terrestres la detección de depredadores por vía visual o por medio del sonido es despreciable, por tener estas vías sensoriales apenas desarrolladas. Por este motivo, la detección de sustancias químicas procedentes de los depredadores es su única forma de prevenir la entrada en zonas (o pasar demasiado tiempo) donde existe un alto riesgo de depredación (12). Este sistema evita exponerse a un contacto directo con el depredador y es una estrategia ampliamente estudiada en otros grupos de animales (13).

Los órganos olfativos (quimiorreceptores) de los caracoles se ubican en cada uno de los cuatro tentáculos cefálicos, los cuales poseen grandes facultades regenerativas, siendo capaces de recuperarse de una lesión en la que el tentáculo se haya escindido por completo. La regeneración no solo engloba a la estructura externa, los gasterópodos terrestres son capaces de reconstruir al completo los órganos olfativos, el ojo y los componentes neuronales asociados (como el ganglio tentacular) (14). Esta gran capacidad de restablecer las funciones reafirma la gran relevancia de estos órganos sensoriales para la supervivencia. Existe otra estructura quimiorreceptora de gran importancia, los labios, capaces de mediar la respuesta a los diferentes químicos por contacto (15).

El órgano olfativo está formado por un epitelio especializado, ubicado debajo del ojo, en la parte terminal del tentáculo. En la parte externa presenta una superficie cubierta por un borde complejo de microvellosidades, encargadas de proteger los quimiorreceptores de la desecación (16). De fuera a dentro se encuentra una capa de células epiteliales, tejido muscular y grupos de neuronas sensoriales bipolares. Estas neuronas sensoriales cuentan con una estructura similar a la presente en los receptores olfativos de vertebrados, siendo ambos capaces de regenerarse constantemente (17).

Otro ámbito donde la quimiorrepción posee una gran relevancia es en la alimentación, la cual está muy condicionada por la lentitud característica con la que estos animales se desplazan. Suelen tener una alimentación generalizada que minimiza la necesidad de locomoción. A su vez esta estrategia requiere un comportamiento de muestreo y mecanismos de aprendizaje sofisticados para evaluar los posibles alimentos que se encuentren a lo largo del camino (18).

Son animales de hábitos nocturnos y su principal forma de detectar el alimento es a través de los órganos olfativos. La orientación de la dirección del individuo dependerá de la intensidad de la señal o de la predisposición a olores pertenecientes a alimentos familiares-favoritos (18).

Una vez que el caracol detecta un alimento potencial debe de decidir si alimentarse o no de él. Para ello realiza un primer análisis gracias a sus tentáculos (donde presentan mecanorreceptores y quimiorreceptores), posteriormente establecen contacto con sus labios, siempre y cuando no se haya producido un rechazo inicial. En el caso de que ambas comprobaciones hayan sido positivas el gasterópodo empezará a comer (19).

La toma de decisiones sobre que alimentos consumir puede ser afectada por numerosos factores. Uno de los más relevantes es el hambre. Aquellos individuos en estado de inanición presentarán comportamientos alimentarios alejados de lo normal, reaccionando con mayor fuerza a los estímulos químicos atractivos (20).

Los repelentes son otro de los factores que condicionaran la alimentación al ser detectados. Producen el rechazo del alimento por parte del animal, pudiendo darse tanto antes como después de su consumo (dejando de comer). Es importante no confundir la capacidad de repeler con la toxicidad, ya que esta se refiere a los efectos negativos causados tras el consumo de una sustancia, de forma que un repelente puede no ser tóxico. Muchas sustancias no producen la reacción de aversión esperada en un principio, pero al resultar tóxicos para el animal este pasa a considerarlos como un repelente gracias al proceso de aprendizaje (18). En contraposición a los repelentes encontramos los fagoestimulantes, que estimulan la ingesta, como pueden ser los azúcares y aminoácidos debido a su gran valor nutricional (18).

El último gran condicionante que se debe de mencionar es el aprendizaje. Durante la digestión un alimento no tiene por qué presentar afectos negativos-tóxicos, estos pueden aparecer a posteriori. Para evitar estos alimentos los caracoles son capaces de desarrollar preferencias o aversión mediante un proceso de aprendizaje basado en anteriores experiencias (18). Existen diferentes estudios que observaron cómo los caracoles ingerían poca cantidad de un nuevo alimento para ver sus resultados. Si este

era nutricionalmente escaso o tóxico lo rechazarían en el futuro (21,22). Este aprendizaje es revisado constantemente, de forma que un alimento al que antes se encontraban predispuestos puede modificarse su estatus si este pasa a tener consecuencias negativas. Esta adaptación se debe a la existencia de plantas que a lo largo de una temporada pueden presentar diferentes grados de toxicidad o alterar su valor nutritivo (18) (Fig. suplementaria 1).

En un trabajo de Bursztyka del 2017 (23) realizado con gasterópodos terrestres, se observó como estos reaccionaban ante la presencia olfativa de odorantes pertenecientes a escarabajos terrestres de la especie *Carabus morbillosus* (fuerte depredador de caracoles). Esta especie alteró de forma significativa la dirección de movimiento de los caracoles, pero no alteró la elección de refugio de la babosa *D. reticulatum*. Los resultados fueron coherentes con una percepción de la amenaza de depredación específica.

Para los caracoles y las babosas la respuesta de huida conlleva un alto coste energético. Según la investigación de Armsworth en el 2005 acerca de las respuestas conductuales en babosas (*D. reticulatum*) (24), estas se mueven más rápido y pasan menos tiempo estáticas en presencia de señales químicas de escarabajos depredadores (*Pterostichus melanarius*). Esta respuesta implica un aumento de la producción de moco para aumentar la locomoción, de forma que se incrementa la pérdida de agua corporal. En este estudio se postula que el comportamiento anti-depredador no ha evolucionado en respuesta a depredadores generalistas puntuales, si no que está especializado en detectar aquellos cuya dieta esté sustancialmente fundamentada en gasterópodos (sean especialistas o generalistas). Desconocen cuales son los productos químicos que producen los coleópteros empleados en los estudios, pero sugieren que se encuentran en el exterior del cuerpo del escarabajo (en sus cutículas) y no en sus excrementos. Tampoco pudieron afirmar si las babosas reaccionaron a sustancias producidas específicamente por *P. melanarius* o por los miembros de la familia Carabidae por un metabolismo común.

Se realizaron estudios similares usando otras especies de escarabajos carábidos, como es el caso de *Carabus nemoralis*, donde se usaron extractos cuticulares hechos a partir de etanol puro (25). El experimento realizado fue capaz de demostrar el efecto disuasor del extracto sobre *D. reticulatum*, reduciendo su consumo de brotes de colza. Otras investigaciones demostraron que los extractos de *C. nemoralis* y *Carabus coriaceus* alteran significativamente el comportamiento de búsqueda de refugio de la babosa gris, mientras que el uso de extractos de un insecto neutral (*Musca domestica*) no surge

efecto (26). Ambos resultados indican que los gasterópodos terrestres tienen la capacidad de distinguir entre diferentes odorantes y responder en función del grado de amenaza.

A raíz de todos estos estudios en este trabajo se plantea la hipótesis de usar extractos cuticulares obtenidos a partir de larvas de *L. noctiluca* para el control de *C. aspersum*. Para ello se evaluará su efectividad con dos experimentos, en el primero se evaluará el condicionamiento de movimiento por medio de barreras químicas, mientras que el segundo estudiará el efecto inhibitorio de la alimentación de los caracoles usando el mismo extracto.

3 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es estudiar los efectos de la presencia de sustancias químicas obtenidas de la cutícula de larvas de *Lampyrus notiluca* (luciérnaga común europea) en la alimentación o la toma de decisiones del caracol común *Cornu aspersum*, conocido por ser una plaga de múltiples cultivos en Europa.

En concreto se estudió el efecto de extractos cuticulares como barrera física potencial en los movimientos del caracol y el impacto de dichos extractos en la cantidad de alimento ingerido.

4 Metodología

4.1 Caracoles

Los experimentos se realizaron con *Cornu aspersum* (caracol común o de jardín), anteriormente conocido como *Helix aspersa*, *Cantareus aspersus* y *Cryptomphalus aspersus*. Pertenece a la familia Helicidae y cuenta con un carácter cosmopolita, siendo considerado como una plaga. Su concha, globosa, presenta bandas parduzcas en su espiral, la cual puede alcanzar los 3 cm de diámetro y 4 cm de ancho. Los caracoles utilizados se capturaron en dos puntos diferentes del entorno del Río Sarela (Santiago de Compostela, A Coruña) (Fig. suplementaria 2). La identificación de los ejemplares se realizó de manera visual, con la supervisión del tutor del trabajo.

Solo se seleccionaron los individuos adultos y se almacenaron en recipientes acondicionados, consistentes en contenedores plásticos con pequeños orificios de

ventilación y un fondo cubierto con papel de periódico humedecido. Los contenedores se mantuvieron en una cámara climatizada a 15 °C, con un fotoperiodo 12:12 y con el ciclo día-noche invertido con respecto al ciclo natural. Para los experimentos se escogieron ejemplares con un peso comprendido entre 6 y 12 g. Antes de ser utilizados los caracoles se sometían de un período corto de aclimatación, donde adecuaron su actividad a las nuevas condiciones de luz y oscuridad. Se alimentaron *ad libitum* con hojas de repollo frescas y rodajas de zanahoria. Cada 2-3 días se les realizaba un mantenimiento donde se les trasladaba a un nuevo recipiente limpio.

Tras el uso de los caracoles en los experimentos fueron liberados en su medio original.

4.2 Luciérnagas

Como depredadores de gasterópodos para los experimentos se usaron larvas de *Lampyris noctiluca* (luciérnaga común europea), perteneciente a la familia Lampyridae del orden Coleoptera.

En un primer momento se intentó capturar y utilizar ejemplares silvestres vivos. Sin embargo, pese a que en su búsqueda participaron 3 personas, en repetidas ocasiones a lo largo del mes de abril en diferentes localidades de la provincia de A Coruña, no fue posible encontrarlas. Por ello, para los experimentos se utilizaron ejemplares capturados en abril-mayo del 2022 que estaban conservados en etanol absoluto (pureza 99.5%, envasado por Acofarma), mantenidos en un frigorífico a 4°C y sometidos a agitación periódicamente.



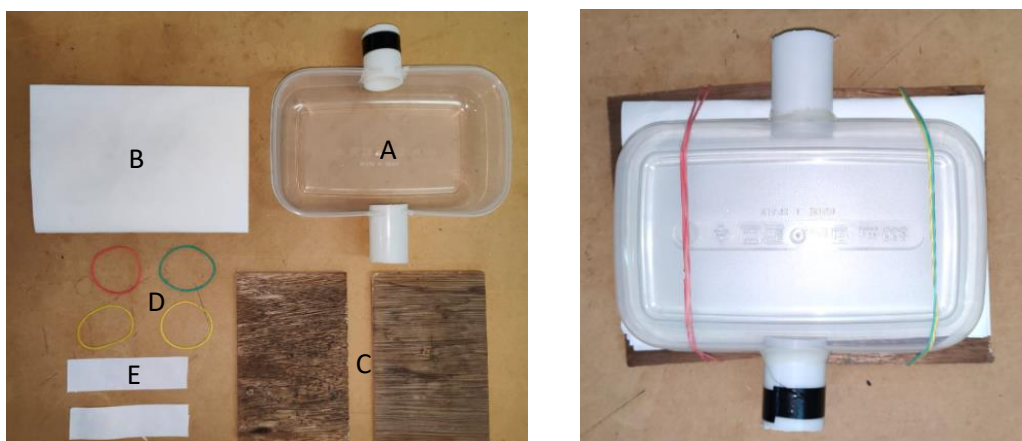
Figura 1. Vial con ejemplar de *L. noctiluca* conservada en etanol absoluto.

4.3 Dispositivos experimentales empleados

Ambos dispositivos fueron diseñados específicamente para los experimentos realizados, buscando que fuesen eficaces y sencillos de montar y limpiar.

4.3.1 Primer dispositivo experimental

Se trataba de un contenedor con 2 salidas. Para su construcción se utilizaron fiambreras de 19 cm de largo, 13 cm de ancho y una profundidad de 5 cm, a las que se adaptaron dos tubos de PVC de 2.9 cm de diámetro y 4.8 cm de largo, insertados en el centro de los costados mayores del recipiente y fijados con cola térmica (Fig. 2 y 3).



Figuras 2 y 3. Vista superior de los elementos que conforman el primer dispositivo experimental y como es el resultado final del mismo. Abreviaturas: A, parte central del primer dispositivo experimental, B, papel de filtro de 42x45cm doblado tres veces sobre sí mismo, C, tablas de madera de 15x10x0.9cm, D, ligas elásticas, E, papel de filtro 3x11cm.

Para configurar la base del contenedor se utilizaron dos tablillas de madera de 15 x 10 x 0.9 cm que se sujetaban al recipiente utilizando 4 gomas elásticas. Sobre esta base se colocaban, en el interior del recipiente, 3 capas de papel de filtro (Filtros Anoa S.A., 73 g / m²) humedecido, con el fin de mantener en el interior una humedad elevada.

En cada contenedor se utilizaron dos tiras de papel de filtro de 3 x 11 cm, colocadas dentro de los tubos de PVC en forma de anillo, de forma que el caracol tenía que pasar obligatoriamente sobre alguna de ellas para salir del recipiente.

A la salida de cada uno de los tubos de PVC se colocó 1 recipiente de plástico con un orificio adaptado para encajar en el extremo del tubo (Fig. 4). En cada uno de estos recipientes se dispuso un trozo de zanahoria para estimular la actividad del caracol liberado en el contenedor central.



Figura 4. Montaje del primer dispositivo experimental.

4.3.2 Segundo dispositivo experimental

El segundo dispositivo consistió en un recipiente plástico con tapadera, con medias de 28 x 18 x 7 cm, en el que la tapadera fue modificada adaptándole una malla plástica de 0.5 cm de luz de malla (Fig. 5), con el objetivo de permitir una buena ventilación del interior. El fondo del recipiente se cubrió, igual que en al caso anterior, 3 capas de papel de filtro humedecido.



Figura 5. Vista superior del segundo dispositivo experimental

4.4 Experimentos

Los experimentos se llevaron a cabo en la misma cámara climatizada en la que se mantenían los caracoles y, siempre, durante la fase oscura del fotoperíodo.

En ambos experimentos se compararon los efectos del extracto cuticular de *Lampyris*, consistente en el etanol 99.5% en el que estaba conservada alguna de las larvas de luciérnaga, con un control consistente en etanol 99.5% puro. Existen evidencias (20) de que los caracoles son incapaces de detectar el etanol por vía olfativa, y Bursztyka et al. (26) observaron experimentalmente que superficies impregnadas con etanol y dejadas secar no afectaba a toma de decisiones de los gasterópodos terrestres.

4.4.1 Primer experimento

Cada vez que se realizó este experimento se hicieron 2 réplicas simultáneamente (Fig. 6). Tapizando el interior de cada uno de los tubos de salida de cada contenedor se colocó una tira de papel de filtro humedecida con agua destilada y a la que se añadieron 100 µl de etanol puro o de extracto cuticular de *Lampyris*. Las tiras de papel se dejaron secar a temperatura ambiente durante 3 min antes de ser colocadas en los tubos. Durante todo el proceso de preparación y montaje de los experimentos se utilizaron guantes de vinilo.

Para este experimento se seleccionaron caracoles que, por su tamaño, no tuviesen dificultades para desplazarse por los tubos. Los caracoles seleccionados se pesaron a la centésima de gramo en una báscula ST-3100 Gram Precision y se colocaron cada uno dentro de uno de los contenedores.

Cada réplica tuvo una duración de 8 horas y se grabó con una cámara de video digital con capacidad de grabar en la oscuridad, gracias a un filtro y un sistema de iluminación infrarroja. Los archivos de vídeo quedaron almacenaron en un disco duro, y a partir de su posterior visualización se determinó el tubo por el cual salió el caracol y el tiempo que tardó en hacerlo. Se consideró que el caracol abandonaba la zona central del dispositivo cuando su región cefálica asomaba por el extremo final de cualquiera de los tubos. Aquellas réplicas en las que el caracol no abandonó la zona central del dispositivo experimental durante las 8 horas de duración del experimento fueron descartadas del análisis de datos. De este modo, obtuvimos finalmente un total de 21 réplicas válidas.

Después de cada réplica los dispositivos utilizados se lavaron a fondo con agua y detergente y se secaron completamente a 50°C antes de la siguiente utilización. Las partes de un único uso, como los papeles de filtro o los recipientes plásticos de los extremos de los tubos, se desecharon al final de cada réplica. En cada réplica se utilizó un caracol diferente, que fue utilizado una única vez. La posición en los tubos de salida del etanol puro y del extracto cuticular de *Lampyris* se intercambió de forma regular.

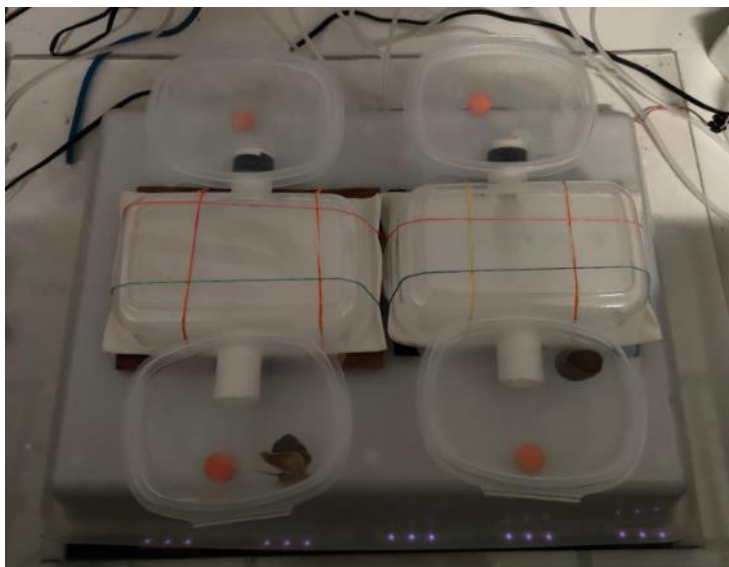


Figura 6. Resultado de la réplica del 15/05/2023. Las rodajas de zanahoria se usaron con el fin de incentivar la toma de decisión entre una de las dos salidas.

4.4.2 Segundo experimento

Cada vez que se realizó este experimento se hicieron 5 réplicas simultáneamente. En lados opuestos del interior de cada contenedor se colocaron 2 discos de 28 mm de diámetro, cortados de hojas de repollo con un sacabocados. Se intentó siempre cortar los discos de la zona más tierna de la hoja y evitando las nerviaciones más gruesas. Antes de su colocación, cada disco fue humedecido con agua destilada, se le aplicaron 100 µl de etanol puro o de extracto cuticular de *Lampyris* y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 3 min. Durante todo el proceso se manipularon los discos con pinzas limpias.

Los caracoles utilizados en este segundo experimento pasaron previamente un período de ayuno de 24-48 horas, y fueron pesados antes de ser introducidos en los dispositivos experimentales. Cada réplica tuvo una duración de 8 horas.

La estimación de la cantidad de cada disco de repollo ingerida por los caracoles se realizó mediante análisis de imágenes. Para ello se fotografiaron los discos al principio y al final de cada réplica y se determinó su superficie en mm² utilizando el programa de libre distribución ImageJ (27) (Figs. 7 y 8).

Al finalizar cada repetición los dispositivos empleados se lavaron con detergente y agua.



Figura 7 y 8. Fotografía de inicio de la réplica 4 del 24/06/2023 y el resultado final. Podemos apreciar como en esta réplica el caracol consumió una mayor superficie del disco de repollo control (C) en comparación con el disco tratado con el extracto cuticular de luciérnaga (L).

4.5 Análisis de datos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa de libre distribución PAST (Paleontological Statistics Software) (28).

Se comprobó la normalidad de los datos correspondientes a las diferentes variables analizadas mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Dado que en la mayoría de los casos no se cumplía el criterio de normalidad, se emplearon siempre análisis no paramétricos. No se intentó ninguna transformación de los datos.

En el primer experimento, para analizar la respuesta de los caracoles (salida por el tubo control o por el tubo tratado con extracto cuticular de *Lampyris*) se utilizó la prueba binomial. El tiempo que tardaron los caracoles en salir por los tubos, así como el peso de los caracoles que tomaron una u otra decisión, se comparó estadísticamente mediante la prueba de Mann-Whitney de igualdad de medianas.

En el segundo experimento, la superficie ingerida por los caracoles a partir de los discos de repollo tratados y no tratados con el extracto cuticular de *Lampyris* se comparó utilizando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para datos emparejados.

5 Resultados y Discusión

En el primer experimento, de los 21 casos disponibles, en 14 de ellos el caracol salió por el tubo control, y 7 por el tubo tratado con extracto cuticular de *Lampyrus*. Según la prueba binomial, la probabilidad de obtener 14 o más casos en 21 intentos es de $p=0.095$, es decir, una probabilidad marginalmente significativa.

La Tabla 1 y la Fig. 9 muestran los pesos de los caracoles y los tiempos que tardaron en salir de la zona central aquellos que salieron por el tubo control y aquellos que salieron por el tubo tratado con extracto cuticular de *Lampyrus*. Los que salieron por el tubo control tardaron en hacerlo 194.6 ± 28.1 min, y los que salieron por el tubo tratado tardaron 102.9 ± 28.2 min (medias \pm error estándar), existiendo diferencias significativas entre ambos tiempos (prueba de Mann-Whitney; $U=21$, $p=0.04$). No existieron diferencias significativas entre el peso de unos y otros caracoles (prueba de Mann-Whitney; $U=41$, $p=0.576$).

CONTROL		LAMPYRIS	
PESO (g)	TIEMPO (min)	PESO (g)	TIEMPO (min)
9,09	210	8,64	198
9,64	226	8,61	28
9,19	238	8,19	49
8,89	332	9,17	77
11,02	214	9,33	219
7,88	273	9,33	68
11,4	123	6,24	81
8,9	115		
9,03	26		
8,53	85		
8,63	97		
8,96	169		
8,66	424		
6,86	192		

Tabla 1. Peso y tiempo de respuesta de los caracoles que salieron por el tubo control y por el tubo tratado con extracto cuticular de *Lampyrus* en el experimento 1.

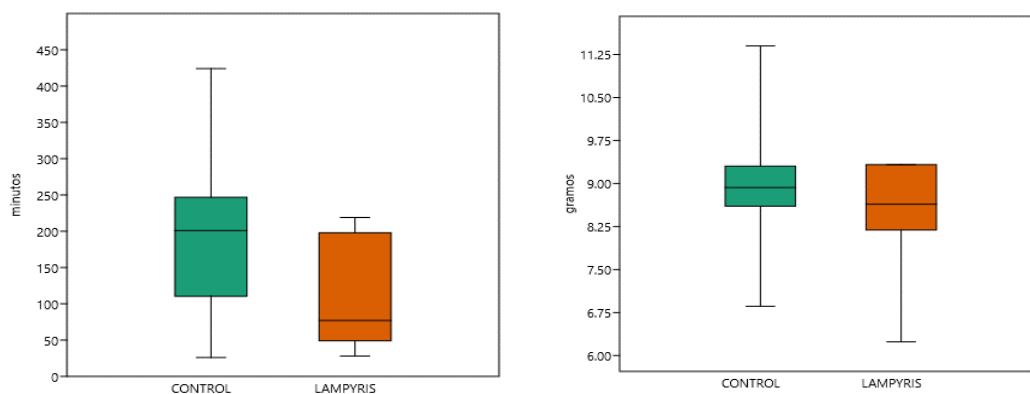


Figura 9. Diagramas de caja que representan A) los minutos que tardaron los caracoles en salir por el tubo control o el tubo tratado con extracto cuticular y B) el peso de los individuos que manifestaron una u otra decisión. Se representan las medianas, los rangos intercuartílicos y los valores máximos y mínimos registrados.

La Tabla 2 y la Fig. 10 muestra la cantidad ingerida por los caracoles de los discos de repollo tratados y no tratados con el extracto cuticular de *Lampyrus*, expresada en mm². Aunque los caracoles ingirieron mayor cantidad de los discos no tratados (296.5±60.4 mm²) frente a los tratados con el extracto (236.4±53.4 mm²), las diferencias no son significativas (prueba de Wilcoxon; W=127, p= 0,411).

SUPERFICIE INGERIDA (mm ²)	
CONTROL	LAMPYRIS
460,957	27,319
5,696	17,846
650,057	453,178
612,962	0
55,206	423,038
0	38,924
602,31	559,869
562,564	618,641
73,362	0
218,489	0
0	619,604
656,2	335,764
2,309	124,959
228,529	620,174
657,028	271,882
269,232	1,409
184,661	55,995
19,951	348,323
57,618	131,772
612,011	78,396

Tabla 2. Superficie ingerida (mm²) por los caracoles de los discos de repollo tratados y no tratados con extracto cuticular de *Lampyrus* en el experimento 2.

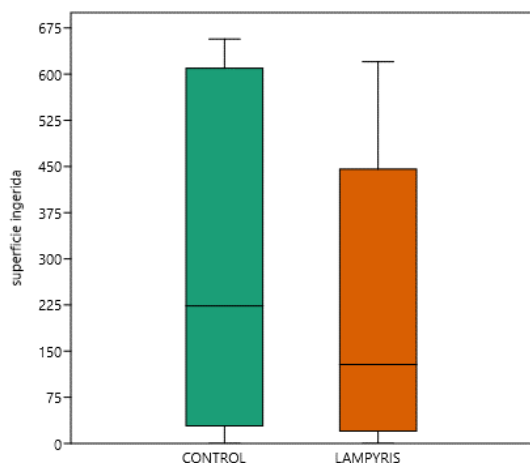


Figura 10. Diagrama de caja donde se representa la superficie de los discos de repollo consumida por los caracoles. Se representan las medianas, los rangos intercuartílicos y los valores máximos y mínimos registrados

Los resultados obtenidos están en consonancia con los obtenidos en experimentos previos similares (24,25), que obtuvieron evidencias de la eficacia de extractos cuticulares de escarabajos depredadores de gasterópodos para actuar como barrera física para los moluscos.

Sin embargo, no encontramos ninguna evidencia de que el extracto utilizado tenga ningún efecto inhibitor del consumo de alimento por parte de los caracoles, en contra de lo esperado. A este respecto, hay que considerar que para la realización del segundo experimento los caracoles se mantuvieron en ayunas durante un período de 24-48 horas. Este protocolo se instauró tras observar, en experimentos preliminares con caracoles no sometidos a ayuno, que los animales no comían de ninguno de los discos de repollo, y se interpretó que el motivo era que los animales se encontraban saciados dado que durante su almacenamiento se les proporcionaba alimento *ad libitum*. Sin embargo, al estar en ayuno es posible que reaccionen más intensamente a los estímulos químicos atractivos del alimento (20), a pesar del riesgo potencial que eso representa. El condicionamiento del hambre en el comportamiento alimenticio de los gasterópodos es un factor poco estudiado (18), por lo que no podemos descartar ni confirmar esta hipótesis.

Otra consideración que es necesario tener en cuenta es el aprendizaje de los caracoles. Como ya se ha mencionado anteriormente, el aprendizaje es un factor fundamental, capaz de alterar las respuestas de huida o el comportamiento alimentario (18). Los intentos que realizamos para capturar luciérnagas vivas nos llevan a concluir que, al menos el presente año, hay muy poca presencia de *L. noctiluca* en la zona en la fueron capturados los caracoles. Si esto es así, no habría habido interacción entre las dos especies y los caracoles carecerían de experiencia que les permitiese identificar a *L. noctiluca* como una amenaza. La bibliografía pone en evidencia que la respuesta de aversión de los caracoles y babosas a las sustancias químicas producidas por sus

depredador (generalista o especialista) sólo se manifiesta ante aquellos que ejercen una gran presión sobre las poblaciones de gasterópodos (23–26), lo que implica que debe existir un aprendizaje o experiencia previa de la interacción entre las especies. Los resultados, relativamente positivos de un efecto de los extractos cuticulares de *L. noctiluca* sobre el comportamiento de los caracoles, podrían explicarse por la presencia en la cutícula de metabolitos comunes a diferentes familias de coleópteros depredadores. Es necesario realizar nuevas experiencias con caracoles sometidos en sus poblaciones naturales a una mayor interacción con *L. noctiluca*.

Otro aspecto a tener en cuenta con respecto a los resultados obtenidos es la concentración de extracto utilizada, que fue escogida sobre la base de la bibliografía existente. Si la concentración resultase ser demasiado baja, los caracoles podrían interpretar que su escasez era señal de que el depredador hacía tiempo que había pasado por ese punto y estaba lejos, por lo que el riesgo sería bajo. Siendo el riesgo bajo, el beneficio obtenido al alimentarse sería preferible al elevado gasto energético necesario para la respuesta anti-depredador.

Una última consideración que es necesario hacer es la antigüedad del extracto cuticular utilizado, de aproximadamente un año. Se ha demostrado que extractos etanólicos de cutícula de cucarachas mantenían sus propiedades durante al menos un mes (29), pero no se conoce cuál puede ser su estado tras períodos de tiempo superiores.

La búsqueda de métodos efectivos de control de plagas de gasterópodos terrestres ecológicos y específicos es un activo campo de investigación, dado que los principales molusquicidas químicos existentes en el mercado presentan problemas de toxicidad ambiental y falta de especificidad (30). Para avanzar en este campo una alternativa prometedora es identificar sustancias químicas naturales capaces de repeler y causar aversión a los gasterópodos.

6 Conclusiones

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el extracto cuticular etanólico de *L. noctiluca* tiene sobre *C. aspersum* un cierto efecto como barrera física, capaz de influir sobre su comportamiento a la hora de desplazarse.

Por otro lado, no podemos afirmar que el mismo extracto tenga la capacidad reducir el consumo de alimento de *C. aspersum*, aunque existen diversas consideraciones que inducen a cuestionarse el significado de los resultados obtenidos a este respecto.

7 Bibliografía

1. Symondson WOC. Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae, Lampyridae, Drilidae and Silphidae) as Predators of Terrestrial Gastropods. En: Natural Enemies of Terrestrial Molluscs. G.M. Barker. UK: CABI Publishing; 2004. p. 37-84.
2. Fu X, Meyer-Rochow V. Larvae of the firefly *Pyrocoelia pectoralis* (Coleoptera: Lampyridae) as possible biological agents to control the land snail *Bradybaena ravidia*. Biol Control. 2013;65:176-83.
3. Sato N. Prey-tracking behavior and prey preferences in a tree-climbing firefly. PeerJ. 2019;7:e8080.
4. Riley WB, Rosa SP, Lima da Silveira LF. A comprehensive review and call for studies on firefly larvae. PeerJ. 2021;9:e12121.
5. Copeland J. Effects of larval firefly extracts on molluscan cardiac activity. Experientia. 1981;37(12):1271-2.
6. Mead AR. The Giant African Snail: A Problem in Economic Malacology. Chicago: University of Chicago Press; 1961. 257 p.
7. Hutson JC, Austin GD. Notes on the habits and life history of the Indian glow-worm (an enemy of the African or Kalutara snail). Ceylon Dep Agric Bull. 1924;(69):1-16.
8. Kondo A, Tanaka F. An experimental study of predation by the larvae of the firefly, *Luciola lateralis* Motschulsky (Coleoptera: Lampyridae) on the apple snail, *Pomacea caniculata* Lamark (Mesogastropoda: Pilidae). Jpn J Appl Entomol Zool. 1989;(33):211-6.
9. Viviani V. Fireflies (Coleoptera: Lampyridae) from Southeastern Brazil: Habitats, Life History, and Bioluminescence. Ann Entomol Soc Am. 2001;94:129-45.
10. Wild SV, Lawson AK. Enemies of the land and freshwater Mollusca of the British Isles. J Conchol. 1937;(20):351-61.
11. McLean M, Buck J, Hanson FE. Culture and Larval Behavior of Photurid Fireflies. Am Midl Nat. 1972;87(1):133-45.
12. Dicke M, Grostal P. Chemical Detection of Natural Enemies by Arthropods: An Ecological Perspective. Annu Rev Ecol Evol Syst. 2001;32:1-23.

13. Brown GE, Ferrari MCO, Malka PH, Russo S, Tressider M, Chivers DP. Generalization of predators and nonpredators by juvenile rainbow trout: learning what is and is not a threat. *Anim Behav.* 2011;81(6):1249-56.
14. Kiss T. Do terrestrial gastropods use olfactory cues to locate and select food actively? *Invertebr Neurosci IN.* 2017;17(3):9.
15. Salánki L, van Bay T. Peripheral and central discrimination of chemoreceptor stimulation in the snail, *Helix pomatia*. En: *Neurobiology of Invertebrates Gastropoda Brain*. Budapest: Akadémiai Kiadó; 1976. p. 497-510.
16. Emery DG. Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs. *Microsc Res Tech.* 1992;22(4):307-24.
17. Chase R, Rieling J. Autoradiographic evidence for receptor cell renewal in the olfactory epithelium of a snail. *Brain Res.* 1986;384(2):232-9.
18. Speiser B. Food and Feeding Behaviour. En: *The Biology of Terrestrial Molluscs*. G.M. Barker. UK: CABI Publishing; 2001. p. 259-88.
19. Gelperin A. Rapid Food-Aversion Learning by a Terrestrial Mollusk. *Science.* 1975;189(4202):567-70.
20. Chase R. The olfactory sensitivity of snails, *Achatina fulica*. *J Comp Physiol.* 1982;148(2):225-35.
21. Whelan RJ. Response of Slugs to Unacceptable Food Items. *J Appl Ecol.* 1982;19(1):79-87.
22. Linhart YB, Thompson JD. Terpene-based selective herbivory by *Helix aspersa* (Mollusca) on *Thymus vulgaris* (Labiatae). *Oecologia.* abril de 1995;102(1):126-32.
23. Bursztyka P, Lafont-Lecuelle C, Teruel E, Leclercq J, Brin A, Pageat P. Behavioural response of xerophilous land snail and slug species to chemical cues from ground-beetle predators: the role of ecological relevance. *J Molluscan Stud.* 2018;84(2):141-7.
24. Armsworth CG, Bohan DA, Powers SJ, Glen DM, Symondson WOC. Behavioural responses by slugs to chemicals from a generalist predator. *Anim Behav.* 2005;69(4):805-11.

25. Bursztyka P, Lafont-Lecuelle C, Teruel E, Leclercq J, Brin A, Pageat P. The foraging behaviour of the slug *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) is modified in the presence of cuticular scents from a carabid beetle. *J Molluscan Stud.* 2016;82(2):314-9.
26. Bursztyka P, Saffray D, Lafont-Lecuelle C, Brin A, Pageat P. Chemical Compounds Related to the Predation Risk Posed by Malacophagous Ground Beetles Alter Self-Maintenance Behavior of Naive Slugs (*Deroceras reticulatum*). *PLOS ONE.* 2013;8(11):e79361.
27. ImagenJ [Internet]. [citado 5 de julio de 2023]. Disponible en: <https://imagej.net/ij/index.html>
28. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. Natural History Museum. 2001 [citado 5 de julio de 2023]. PAST: Paleontological Statistics Software. Disponible en: <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/index.html>
29. Rollo CD, Czvzewska E, Borden JH. Fatty acid necromones for cockroaches. *Naturwissenschaften.* 1994;81(9):409-10.
30. Birkett MA, Dodds CJ, Henderson IF, Leake LD, Pickett JA, Selby MJ, et al. Antifeedant Compounds from Three Species of Apiaceae Active Against the Field Slug, *Deroceras reticulatum* (Muller). *J Chem Ecol.* 2004;30(3):563-76.

Material Suplementario

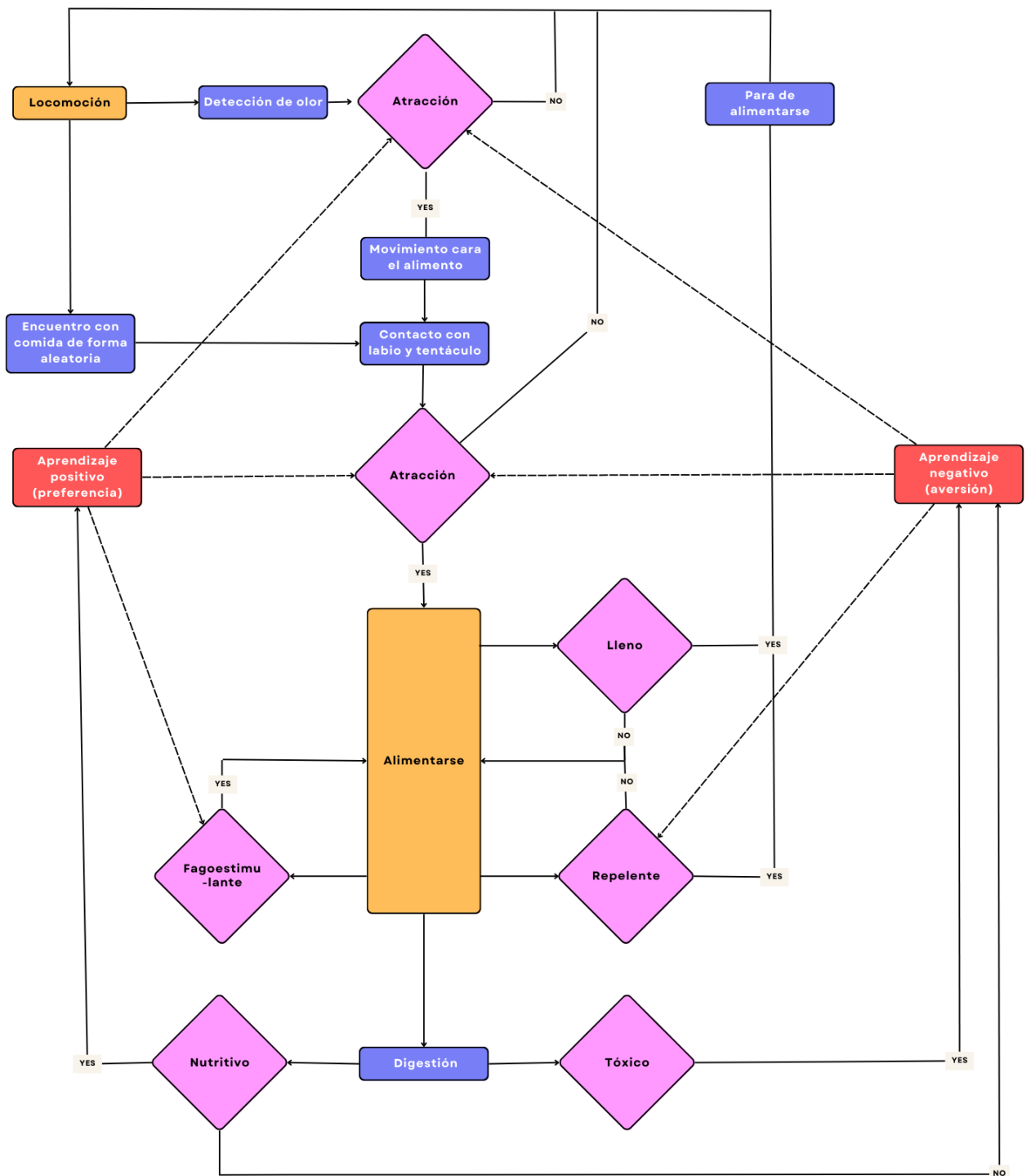


Figura suplementaria 1. Secuencia de eventos regulatorios de importancia general (18). La fase post-digestiva influirá en el comportamiento alimentario futuro hacia un determinado alimento. De esta forma la modificación la ingestión de alimentos a través del aprendizaje se muestra con flechas discontinuas. El hambre también influye en este proceso, pero no se incluye en el diagrama debido a que su influencia sobre la secuencia de ingestión no es del todo conocida.

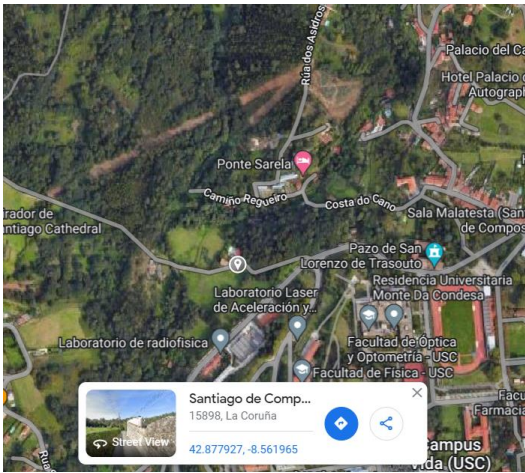


Figura suplementaria 2. Localización del primer y segundo punto de recolección de ejemplares de *C. aspersum*.