



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Grado en Biología

Departamento de Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la dieta de la avispa asiática (*Vespa velutina* Lepeletier, 1836) mediante isótopos estables

Estudo da dieta da avésa asiática (*Vespa velutina* Lepeletier, 1836) mediante isótopos estables

Study of the yellow-legged hornet (*Vespa velutina* Lepeletier, 1836) diet using stable isotopes



Miguel Codesido Mella

Fecha de defensa: 27 de julio de 2017

Tutoras: Dra. María José Servia García y Dra. Aurora Grandal D'Anglade

Fotografía de la portada extraída de Villemant *et al.* (2006a).

Índice

Resumen/Palabras clave	1
Resumo/Palabras clave	1
Abstract/keywords	2
1. Introducción	3
2. Objetivos	7
3. Material y Métodos	8
3.1. Área de trabajo	8
3.2. Obtención del material	9
3.3. Conservación y preparación de las muestras	10
3.4. Análisis de isótopos estables	12
4. Resultados	13
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones/Conclusións/Conclusions	20
7. Agradecimientos	23
8. Bibliografía	23
Anexo I: Inventario del material recolectado	27
Anexo II: Datos en bruto de los análisis	27

Resumen

Desde su llegada a Europa en 2004, la avispa asiática (*Vespa velutina* Lepeletier 1836) se ha convertido en un problema ecológico, económico y social. Con este trabajo se pretende contribuir a mejorar el conocimiento de la biología de la especie, en concreto de su alimentación, mediante el análisis de isótopos estables de carbono (^{13}C) y nitrógeno (^{15}N). Una vez puesto a punto el protocolo de medida en los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña, se analizaron muestras de larvas (ejemplares completos), pupas (patas y músculo) y adultos (patas, alas y músculo) de nidos secundarios recogidos en el ayuntamiento de Oleiros (A Coruña). A pesar de que se detectaron diferencias substanciales en la huella isotópica de distintos tejidos y fases del ciclo vital, éstas no se ajustan a lo esperado según a la información recogida en la bibliografía sobre la dieta de *V. velutina*, por lo que se discuten posibles hipótesis que permitan explicar estas variaciones. Se proponen además posibles trabajos futuros que complementarían el que aquí se presenta, y que podrían aportar información de interés para el control de la invasión.

Palabras clave: *Vespa velutina*, alimentación, isótopos estables, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$.

Resumo

Desde a súa chegada a Europa en 2004, a vespa asiática (*Vespa velutina* Lepeletier 1836) converteuse nun problema ecolóxico, económico e social. Con este traballo preténdese contribuír a mellorar o coñecemento da bioloxía da especie, en concreto da súa alimentación, mediante a análise de isótopos estables de carbono (^{13}C) e nitróxeno (^{15}N). Unha vez posto a punto o protocolo de medida nos Servizos de Apoio á Investigación (SAI) da Universidade da Coruña, analizáronse mostras de larvas (exemplares completos), pupas (patas e músculo) e adultos (patas, ás e músculo) de niños secundarios recollidos no concello de Oleiros (A Coruña). A pesar de detectárense diferenzas substanciais na pegada isotópica de distintos tecidos e fases do ciclo vital, estas non se axustan ó esperado segundo a información recollida na bibliografía sobre a dieta de *V. velutina*, polo que se discuten posibles hipóteses que permitan explicar estas variacións. Propóñense ademais posibles traballos futuros que complementarían

o que aquí se presente, e que poderían aportar información de interese para o control da invasión.

Palabras clave: *Vespa velutina*, alimentación, isótopos estables, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$.

Abstract

Since its arrival in Europe in 2004, the yellow-legged hornet (*Vespa velutina* Lepeletier 1836) has become an ecological, social and economic problem. This study aims to contribute to improving the knowledge of the species' biology, in particular, its feeding through the analysis of carbon (^{13}C) and nitrogen (^{15}N) stable isotopes. Once started up the measurement protocol in the Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) of the Universidade da Coruña, samples of larvae (whole specimens), pupae (legs and muscle), and adults (legs, wings and muscle) were analysed from secondary nests recollected in Oleiros (A Coruña). Despite finding substantial differences in the isotopic signal of the different development stages, these differences do not adjust to what was expected according to the information gathered in the bibliography about the feeding of the *V. velutina*. For this reason, possible hypotheses are discussed to explain these variations. Besides, possible future studies which would complement this presented here are proposed, and which could provide relevant information for the control of the invasion.

Keywords: *Vespa velutina*, feeding, stable isotopes, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$.

1. Introducción

Tal y como se recoge en el Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras, estas constituyen una de las principales causas de pérdida de biodiversidad en el mundo (RDCEEE 630/2013, 2 de agosto). La capacidad de formar sociedades de los insectos sociales favorece su éxito ecológico en el caso de que se comporten como especies invasoras, y pueden representar una amenaza importante para las especies nativas y el conjunto del ecosistema (Chapman & Bourke, 2001).

Vespa velutina Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Vespidae), llamada vulgarmente avispa asiática, avispa negra o avispón asiático, es el primer y por ahora único insecto representante de la familia Vespidae introducido de Asia a Europa (Rortais *et al.*, 2010). Según Monceau *et al.* (2012), esta especie provoca un gran impacto a través de tres vías: la primera es la ecológica, ya que depreda sobre diversos polinizadores; la segunda es la económica, ya que afecta gravemente a la apicultura (es activa cazadora sobre las colonias de abeja europea *Apis mellifera* Linnaeus; Arca *et al.*, 2014) y la industria frutícola (Consellería do Medio Rural, 2017), y la tercera es la sanitaria, ya que el veneno puede provocar reacciones alérgicas que se traducen a fallos en los órganos e incluso la muerte. En otros países como China, dónde es autóctona, se ha cobrado numerosas víctimas por este motivo (Liu *et al.*, 2015). Sin embargo, esto último solo le sucede a personas alérgicas al veneno de himenópteros, ya que los envenenamientos de esta especie tienen las mismas características que los de especies de avispas autóctonas de Europa, como podría ser *Vespa crabro* Linnaeus (Schwartz *et al.*, 2012).

En su área de origen, *V. velutina* aparece en el norte de la India, Myanmar, la península de Indochina, el sudeste de China, Taiwán y los archipiélagos de Malasia e Indonesia (Villemant *et al.*, 2006a). Su llegada a Europa se constató por primera vez en Lot-et-Garonne (Francia) en el año 2004. La explicación de su llegada no está clara, pero se cree que pudo ser o bien a través del comercio hortícola (Villemant *et al.*, 2006b) o bien gracias al transporte de cerámica china, ya que dentro de una de estas piezas pudo viajar una reina en hibernación (Schwartz *et al.*, 2012). Una vez asentada, se extendió rápidamente a lo largo de distintos países de Europa como España, Portugal, Bélgica,

Italia y Alemania (Rome *et al.*, 2015). Recientemente se ha detectado también en Suiza (European Commission, 2017). En España se registró por primera vez su presencia en 2010 en Navarra (Castro & Pagola-Carte, 2010) y en Galicia se constató su llegada en el año 2014 (Consellería do Medio Rural, 2017).

Las colonias de *Vespa velutina* son fundadas por una única reina. A finales del otoño, en la colonia se producen machos reproductores y reinas vírgenes, que se aparean y, acto seguido, estas últimas buscarán un lugar en el que sufrirán un periodo de hibernación durante el invierno (Monceau *et al.*, 2013). Llegada la primavera, da comienzo su ciclo de vida anual (Fig. 1), cuando las reinas fundadoras emergen de su refugio y fundan un nido primario (Fig. 2), donde pondrán los primeros huevos. Cuando la colonia crece se requiere un nido más grande, por lo que, con frecuencia, abandona el primario y se desplaza para encontrar la localización óptima para fundar un nido secundario (Fig. 3) permanente y de mucho mayor tamaño (Franklin *et al.*, 2017). Es en verano cuando tiene lugar el inicio de la caza para alimentar a sus larvas (Raveret, 2000).

Sus presas son mayormente insectos, sobre todo abejas (Monceau *et al.*, 2013; Arca *et al.*, 2014), aunque la proporción varía dependiendo de si el nido está situado en una zona urbana o en una agrícola o forestal, siendo esta del 65% o del 33-35% respectivamente (Villemant *et al.*, 2011). Estas les aportan dos de los nutrientes esenciales que necesitan: hidratos de carbono (en forma de néctar y miel), para el consumo de los adultos, y proteínas (tejidos de las propias abejas y sus larvas) para alimentar a las larvas (Matsuura & Yamane, 1990). Según Perrard *et al.* (2009), justo después de cazar a la abeja, la avispa asiática forma un pequeño pellet únicamente con la proteína del tórax y desecha las otras partes como las patas, las alas, el abdomen, la cabeza y, en algunos casos, incluso la cutícula del propio tórax.

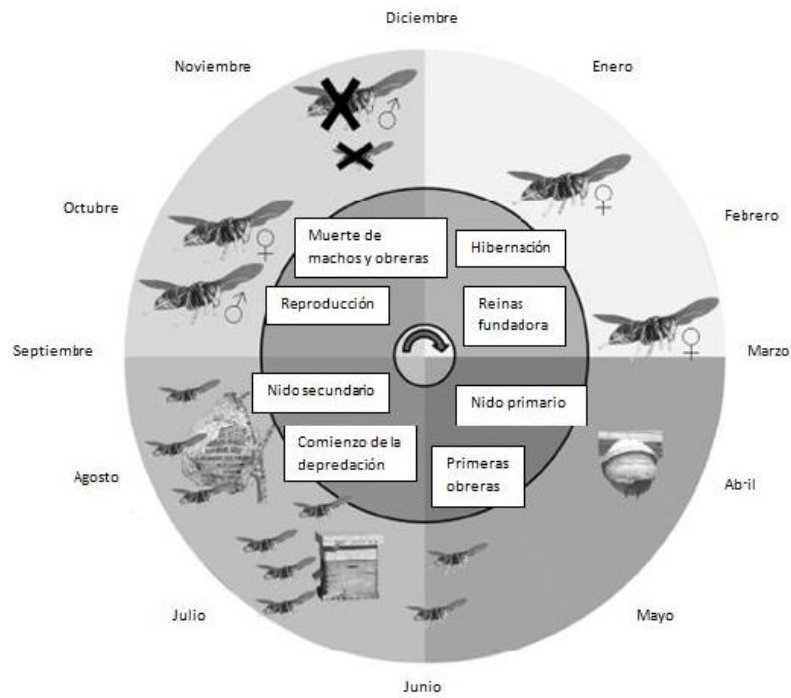


Figura 1: Ciclo de vida de *Vespa velutina*. Fuente: adaptado de Monceau *et al.* (2014).



Figura 2: Nido primario de *Vespa velutina* en un tejado. Fuente: Dra. María J. Servia.



Figura 3: Nido secundario de *Vespa velutina*. Recogido del 13 de noviembre de 2016. Fuente: Fotografía propia.

Sin embargo, a pesar de ser muy conocida su gran capacidad depredadora, sorprende el hecho de que, incluso en trabajos recientes sobre su biología en los que se profundiza sobre la evolución temporal y la diferenciación de castas en las colonias, las referencias que se citan sobre el estado de conocimiento de su alimentación son antiguas (desde 1903 a 1990) y no específicas de *V. velutina* (Rome *et al.*, 2015). Esta falta de documentación acerca de su comportamiento y hábitos tróficos, sobre todo en las áreas en las que es invasora, constituyen un estímulo para el uso de nuevos métodos de estudio que puedan aportar información útil para el control de la invasión.

El uso de métodos basados en isótopos estables ha sido adaptado por ecólogos y fisiólogos animales a partir de su utilización en otros campos recientemente, ya que se ha descubierto su potencial para múltiples estudios como por ejemplo reconstrucciones de dietas de animales (Gannes *et al.*, 1998). En este trabajo se pretende sentar las bases para la aplicación de estos métodos a la biología de *V. velutina*.

Los isótopos son formas del mismo elemento que se diferencian en el número de neutrones en el núcleo (Fry, 2006). Dependiendo de su naturaleza se diferencian en dos tipos: pueden ser radiactivos si se desintegran de forma espontánea emitiendo radiación ionizante (Unkovich, 2001) o por el contrario pueden ser estables cuando no se desintegran espontáneamente si no que permanecen invariables transcurrido un cierto período de tiempo (Redondo, 2008). Los neutrones adicionales en el núcleo de un isótopo estable establecen diferencias químicas sutiles, y son estas diferencias las que hacen que los isótopos se comporten de maneras diferentes en procesos tanto físicos como químicos (Gannes *et al.*, 1998; Fry, 2006). Este hecho da pie a que muchas sustancias naturales tengan una señal o huella isotópica propia (Redondo, 2008).

Ciertos elementos químicos como el hidrógeno, el carbono, el nitrógeno, el oxígeno y el azufre son muy abundantes en la corteza terrestre y participan en numerosos procesos naturales, siendo los más utilizados en los análisis de isótopos estables el carbono y el nitrógeno (Jardine *et al.*, 2003). Es por ello que éstos son los dos elementos en los que se centra este trabajo.

Generalmente, el isótopo ligero (^{12}C y ^{14}N) tiende a formar uniones débiles y a reaccionar más rápido que el pesado (^{13}C y ^{15}N) (Gannes *et al.*, 1998; Unkovich, 2001).

Debido a estas diferencias en los enlaces y en las velocidades de reacción, la abundancia de isótopos estables de un elemento varía entre las distintas especies químicas. El cambio de abundancia isotópica entre dichas especies químicas debido a cambios químicos o físicos se denomina fraccionamiento (Gannes *et al.*, 1998).

La composición isotópica de los tejidos del cuerpo de un animal refleja la composición isotópica de su dieta. El carbono de los animales consumidores (como es el caso) está enriquecido en $\delta^{13}\text{C}$ un 1‰ respecto al carbono que obtiene con la dieta. Los animales de los niveles tróficos más altos presentarán un $\delta^{13}\text{C}$ mayor que el presente en su dieta, cuyo enriquecimiento se verá compensado por la pérdida preferencial de ^{12}C en forma de CO_2 a través de la respiración (Deniro & Epstein, 1978).

El nitrógeno en la proteína de los consumidores está generalmente enriquecido en $\delta^{15}\text{N}$ entre un 3 y un 5 ‰ en relación al nitrógeno obtenido por la alimentación. Esto se debe al fraccionamiento durante procesos como la desaminación, a lo largo de la cual, las enzimas implicadas en el proceso movilizan preferentemente grupos amino con ^{14}N frente a los grupos con ^{15}N , ya que reaccionan a mayor velocidad. En consecuencia, el isótopo ligero es excretado preferentemente mientras que el pesado se mantiene en el organismo (Gannes *et al.*, 1998). A nivel de red trófica, los animales que se encuentren en los niveles tróficos más altos tienen un $\delta^{15}\text{N}$ mayor que los que se encuentran en los niveles más bajos (Gannes *et al.*, 1998). Así, según lo expuesto, esta metodología sería aplicable a este estudio ya que a *V. velutina* se le atribuyen distintos tipos de alimentación según su fase de desarrollo.

2. Objetivos

El análisis de isótopos ha sido utilizado para analizar diversos aspectos de la ecología trófica de himenópteros (Parmentier *et al.*, 2015; Iakovlev *et al.*, 2017), aunque, según la bibliografía consultada, parece que en *V. velutina* es un campo todavía inexplorado.

Por ello, en este trabajo se pretende llevar a cabo una serie de análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno de distintas muestras de *V. velutina* de diferentes localizaciones del ayuntamiento de Oleiros con el fin de:

- Poner a punto los protocolos para el análisis de isótopos estables en larvas, pupas y adultos de *V. velutina*.
- Comprobar si existen diferencias en la huella isotópica de los ejemplares según el tejido o la estructura seleccionados para la medida.
- Comprobar si las señales isotópicas de los individuos a lo largo de su ciclo de vida reflejan diferencias en el tipo de alimentación, como se sugiere en la literatura sobre esta especie.

3. Material y métodos

3.1. Área de trabajo

El estudio se ha realizado a partir de muestras recogidas exclusivamente en el ayuntamiento de Oleiros, ya que según los datos de la Xunta de Galicia es uno de los ayuntamientos con mayor número de nidos de *V. velutina* detectados a lo largo de los años 2015 y 2016 (más de 100 nidos) y en el primer trimestre del año 2017 (entre 26 y 100 nidos; Consellería do Medio Rural, 2016a, Consellería do Medio Rural, 2016b).

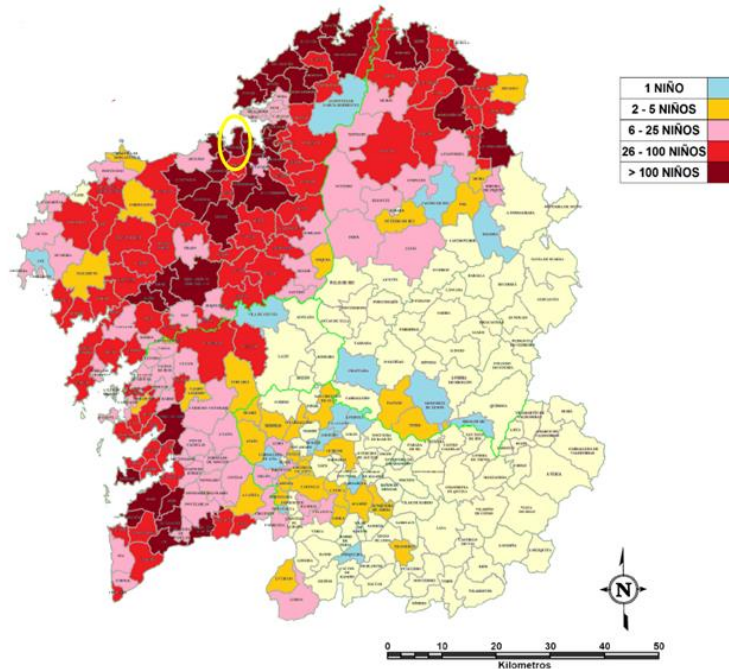


Figura 4: Mapa que muestra el número de nidos extraídos a lo largo de 2016 en todos los ayuntamientos de Galicia. El óvalo amarillo señala el ayuntamiento de Oleiros, que pertenece a la categoría >100 nidos. Fuente: adaptado de Consellería do Medio Rural (2016a).

Oleiros es un ayuntamiento perteneciente a la provincia de A Coruña. Su superficie es de 43,80 km² y tiene 35013 habitantes (Federación Galega de Municipios e Provincias, 2017). Es un ayuntamiento costero con numerosas zonas verdes, las cuales ocupan en total 729000 m² (Concello de Oleiros, 2017). Este hecho podría favorecer la proliferación de *V. velutina*, ya que está demostrado la preferencia de esta especie por establecer sus nidos secundarios (en los cuales se centra este trabajo) en estructuras naturales frente a estructuras urbanas (Franklin *et al.*, 2017).

3.2. Obtención del material

Tanto los nidos como los individuos fueron proporcionados por el equipo de Protección Civil de Oleiros, ya que una de sus funciones es la retirada de los mismos. La recogida de material comenzó el 13 de noviembre de 2016 y terminó el 8 de enero de 2017 y las localizaciones fueron variadas. El resultado fue la obtención de muestras provenientes de 14 localizaciones y de 6 fechas diferentes, aunque no todas pudieron ser utilizadas posteriormente en los análisis. El proceso mediante el cual se retiran los nidos de sus localizaciones es el siguiente: una vez detectado el nido, el personal cualificado para su extracción accede a él siguiendo un protocolo de seguridad, a continuación se rocía su superficie para eliminar posibles ejemplares en vuelo a su alrededor y se inyecta insecticida a través del orificio de entrada del nido. El insecticida (que en este caso es Ikebana[®] Ready to use, Químicas de Murguía, S. A.) se aplica con una sulfatadora en el nido, el cuál será retirado de su lugar de origen, que casi siempre son árboles (Franklin *et al.*, 2017), mediante una pértiga extensible adaptada (Consellería do Medio Rural, 2016b). Una vez retirados los nidos se introducen en bolsas de plástico, donde se llevará a cabo la primera fase de su conservación a temperatura ambiente.

El objetivo era obtener nidos que presentasen individuos en distintas fases de desarrollo (larva, pupa y adulto) para observar las posibles variaciones en la huella isotópica a lo largo de su ciclo de vida teniendo en cuenta el tipo de alimentación, ya que esta varía. Posiblemente debido a la época avanzada del año (Monceau *et al.*, 2013), algunos de los nidos tuvieron que ser descartados por estar vacíos o por tener pocos

representantes de los distintos estados de desarrollo, quedando el número final en 9 nidos de los 14 iniciales.

3.3. Conservación y preparación de las muestras

Este trabajo se centra en el estudio de nidos secundarios exclusivamente, debido a que el volumen de la colonia es mayor (Franklin *et al.*, 2017) y aumenta la posibilidad de obtener un mayor número de muestras de las distintas fases de su ciclo vital.

Debido a las diferencias en cuanto a estructura y composición de distintas estructuras morfológicas, se decidió analizar las patas y las alas de adultos, ya que están mayormente compuestas por quitina y derivan del desarrollo larvario, así como los músculos del tórax, ya que éstos se engrosan y renuevan a medida que el adulto envejece, por lo que serían fruto, al menos en parte, de la alimentación adulta (Rose *et al.*, 2001). De las pupas se analizaron las patas (no se cogieron alas debido a que la mayoría de los ejemplares apenas las tenían desarrolladas) y los músculos del tórax, mientras que las larvas se procesaron enteras.

Una vez recogidas las muestras pasaron a conservarse en un congelador los días previos a su análisis. Antes de llevar a cabo las medidas de isótopos estables, las muestras (larvas, pupas e adultos) deben ser preparadas para poder ser analizadas por el espectrómetro de masas. Para esto, lo primero que se hace es lavar todas las muestras en un baño de ultrasonidos (Fig. 5) de la siguiente manera: se sumerge una gradilla en la cubeta de ultrasonidos durante 15 minutos, a temperatura ambiente y a potencia 2; el proceso se repite tres veces y entre cada una se cambia el agua destilada de los tubos donde se encuentran las muestras. Una vez están lavadas, se procede a su secado: pupas y adultos se dejan secar en una estufa a 35-40° C durante 20 horas (Fig. 6), mientras que las larvas deben ser sometidas a un proceso de liofilización debido a su gran porcentaje de agua (de lo contrario se convertirán en una masa pastosa inservible a la hora de llevar a cabo en el análisis isotópico).

Después de secar las muestras se pasa a su preparación para el análisis (Fig. 7). A los imagos se les extraen dos patas y dos alas, además del músculo torácico, y de las pupas dos patas y músculo. Las larvas, por el contrario, se machacan enteras con la ayuda de un mortero de ágata hasta convertirlas en un polvo fino y homogéneo (Fig. 8).



Figura 5: Baño de ultrasonidos al que fueron sometidas las muestras para eliminar cualquier impureza que pudiera influir en los análisis. Fuente: Fotografía propia.



Figura 6: Estufa de secado de las muestras. Fuente: Fotografía propia.

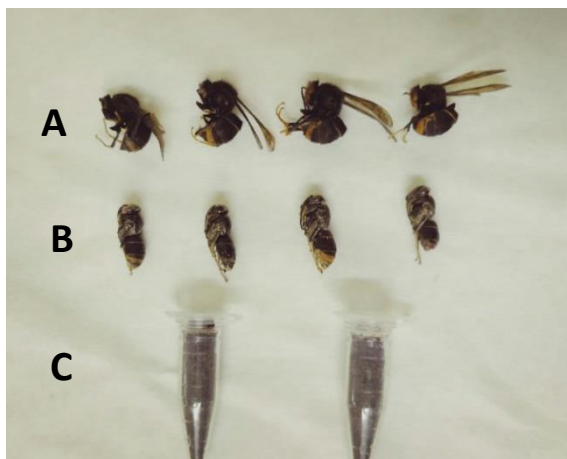


Figura 7: Muestras secas de adultos (A), pupas (B) y larvas liofilizadas y homogeneizadas (C). Fuente: Fotografía propia.

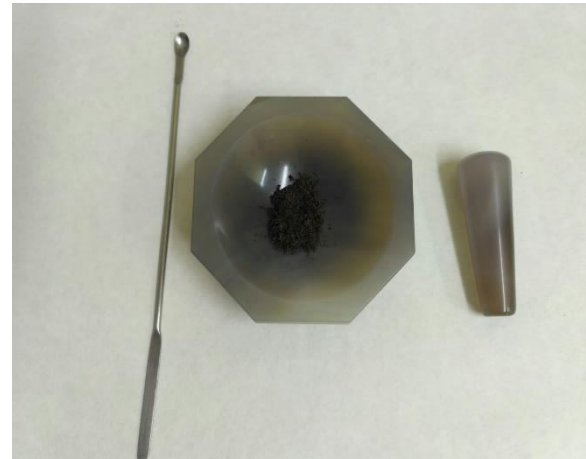


Figura 8: Detalle de una muestra de larvas liofilizadas y homogeneizadas en un mortero de ágata. Fuente: Fotografía propia.

3.4. Análisis de isótopos estables

Una vez listas las muestras para realizar el análisis de isótopos estables se trasladaron al departamento de Unidad de Técnicas Instrumentales de Análisis (UTIA) situado en los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) del Campus de Elviña, en la Universidade da Coruña. Aquí se lleva a cabo la determinación de los valores de ^{15}N y ^{13}C mediante la combustión de una mínima proporción del material (1 miligramo aproximadamente) en un analizador elemental FlashEA1112 (ThermoFinnigan) acoplado mediante una interfase Conflon (ThermoFinnigan) a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas Deltaplus (ThermoFinnigan). El proceso consiste en someter las muestras a una combustión instantánea a 1020°C . El resultado de esto es la formación de CO_2 , N_2 y H_2O . El agua es retenida en un filtro y el CO_2 y N_2 son separados por cromatografía en el analizador elemental e introducidos a través de la interfase en el espectrómetro de masas, en el cual se ionizan por impacto electrónico y se separan bajo la acción de un campo magnético en función de las masas de los isótopos. La reproducibilidad analítica del equipo es superior al 0,15 ‰ tanto en los isótopos de carbono como en los de nitrógeno.

Los resultados de la medición de las proporciones de los isótopos de C y N se expresan en ‰ relativos a un estándar de uso internacional. De esta forma, el estándar utilizado para el carbono es VPDB (Vienna Pee Dee Belemmite) y Aire atmosférico para el nitrógeno. Esto se representa mediante el cálculo de la siguiente ecuación:

$$\delta^{\text{H}}(\text{‰}) = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1] \times 1000$$

En ella, δ hace referencia a la abundancia isotópica relativa de la muestra, H a la masa del isótopo más pesado y R la relación del isótopo más pesado con respecto al ligero, es decir, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el caso del carbono y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en el caso del nitrógeno (Gannes *et al.*, 1998).

Una vez se tienen todos los resultados se clasifican según fase del ciclo de vida (larva, pupa y adulto) y en el caso de las pupas y adultos también según la estructura analizada (patas y músculo en pupas y patas, alas y músculo en adultos). Una vez se hace esto se calculan las medias y las desviaciones típicas.

4. Resultados

En total se analizaron 35 muestras, de las cuales 4 eran de larvas, 15 eran tejido de pupas (7 de músculo y 8 de patas) y 15 de adultos (5 de músculo, 5 de patas y 5 de alas). Se realizaron dos medidas de cada una de las muestras (salvo de las alas de dos ejemplares adultos de los nidos 13 y 14, de los que solo se realizó una), de las cuales se tomó un valor medio con el que trabajar. Cabe mencionar que en ningún caso la diferencia entre las dos medidas supera el margen de error del aparato ($\pm 0,15$), lo que indica que están bien homogeneizadas.

A continuación aparecen representados en tablas los resultados de los análisis. En la Tabla 1 se muestran los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$, así como sus valores medios y desviaciones típicas, de las larvas; en las Tablas 2 y 3 los de las pupas (músculo y patas respectivamente) y en las Tablas 4, 5 y 6 los de los adultos (músculo, patas y alas respectivamente).

Tabla 1. Valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) (con media y desviación típica) de las larvas de 4 nidos distintos.

Muestra	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
N.3 6 LARVAS	6,39	6,14	45,35	-28,16
N.9 6 LARVAS	8,79	5,74	44,69	-27,14
N.13 7 LARVAS	7,58	7,73	47,94	-27,60
N.14 7 LARVAS	7,31	4,77	47,91	-27,04
Media		6,10		-27,49
Desviación típica		1,23		0,51

Tabla 2. Valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) (con media y desviación típica) del músculo de las pupas de 7 nidos distintos.

Muestra	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
N.1 MUS. P	11,66	6,35	44,42	-26,66
N.3 MUS. P	8,11	6,18	32,30	-27,03
N.4 MUS P	12,87	6,69	43,45	-25,87
N.6 MUS. P	12,79	6,84	47,70	-27,25
N.7 MUS P	9,62	8,94	43,31	-27,98
N.10 MUS. P	11,64	6,38	47,96	-27,330
N.14 MUS. P	9,00	6,15	42,78	-27,57
Media		6,79		-27,10
Desviación típica		0,98		0,68

Tabla 3. Valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) (con media y desviación típica) de las patas de las pupas de 8 nidos distintos.

Muestra	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
N.1 PATAS P	7,60	6,56	27,99	-26,50
N.3 PATAS P	10,77	7,21	38,65	-26,34
N.4 PATAS P	13,08	7,07	44,19	-25,94
N.5 PATAS P	13,01	7,83	46,48	-26,96
N.7 PATAS P	12,21	10,14	41,88	-26,56
N.9 PATAS P	12,73	8,38	44,02	-26,70
N.10 PATAS P	11,46	7,40	42,35	-26,53
N.14 PATAS P	11,45	6,52	43,53	-26,33
Media		7,64		-26,48
Desviación típica		1,18		0,30

Tabla 4. Valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) (con media y desviación típica) del músculo de los adultos de 5 nidos distintos.

Muestra	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
N.6 MUS. A	11,6	7,0	46,6	-27,0
N.9 MUS. A	9,7	7,2	42,7	-26,8
N.10 MUS. A	11,0	7,4	45,1	-25,5
N.13 MUS. A	11,0	7,8	45,3	-26,9
N.14 MUS. A	7,1	7,0	44,1	-27,1
Media		7,27		-26,64
Desviación típica		0,34		0,65

Tabla 5. Valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) (con media y desviación típica) de las patas de los adultos de 5 nidos distintos.

Muestra	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
N.6 PATAS A	10,79	7,43	45,59	-27,25
N.9 PATAS A	11,05	8,13	41,30	-26,54
N.10 PATAS A	12,26	6,82	47,07	-27,07
N.13 PATAS A	10,61	8,14	44,55	-26,97
N.14 PATAS A	9,84	7,26	43,89	-26,52
Media		7,56		-26,87
Desviación típica		0,57		0,33

Tabla 6. Valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) (con media y desviación típica) de las alas de los adultos de 5 nidos distintos.

Muestra	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
N.6 ALAS A	11,13	7,41	47,51	-27,39
N.9 ALAS A	11,66	8,00	45,41	-26,49
N.10 ALAS A	12,48	6,65	46,62	-27,11
N.13 ALAS A	12,13	7,86	48,13	-27,41
N.14 ALAS A	11,82	7,02	47,86	-26,85
Media		7,39		-27,05
Desviación típica		0,56		0,39

Se calcularon las diferencias de las medias, para comprobar si existe una tendencia clara a la hora de almacenar los isótopos pesados de C y N en cada estructura corporal a medida que los ejemplares avanzan a lo largo de los distintos estados en su ciclo de vida. Los resultados se agrupan en la Tabla 7.

Tabla 7. Diferencias de las medias de los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ y $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ a lo largo de los distintos estados del ciclo de vida.

	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$
Δ Larvas-Pupas músc.	0,69	0,39
Δ Larvas-Pupas patas	1,54	1,00
Δ Pupas patas-Adultos patas	-0,08	-0,39
Δ Pupas patas-Adultos alas	-0,25	-0,57
Δ Pupas músc.-Adultos músc.	0,48	0,46

Atendiendo a la Tabla 7, se puede observar como la mayor parte de las muestras presentan un enriquecimiento del isótopo pesado de C y N a medida que pasan a la siguiente fase del ciclo de vida (positivos) con excepciones: los adultos presentan un empobrecimiento del isótopo pesado de ambos elementos tanto en las alas como en las patas (negativos). En este caso también cabe mencionar que las diferencias llegan a ser apenas imperceptibles, como es el caso de la transición de patas de pupa a patas de adulto.

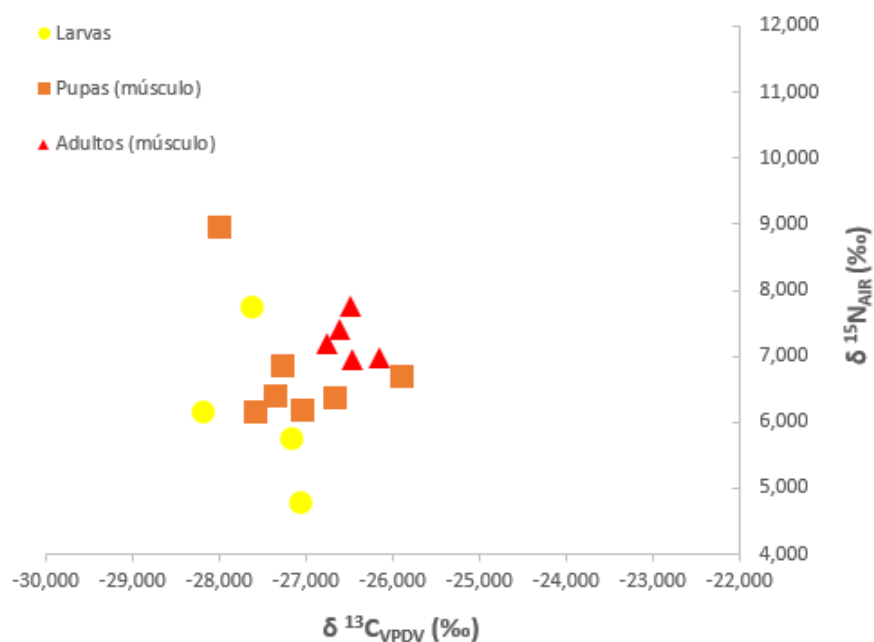


Figura 9: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ frente a los de $\delta^{13}\text{C}$ de las distintas muestras de larvas y músculo de pupas y adultos.

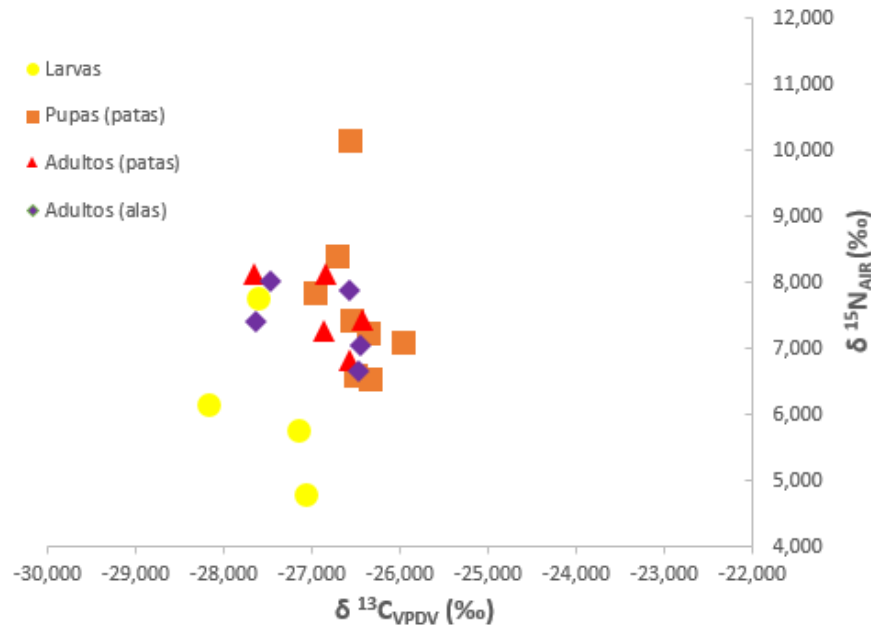


Figura 10. Valores de $\delta^{15}\text{N}$ frente a los de $\delta^{13}\text{C}$ de las distintas muestras de larvas, patas de pupas y adultos y alas de adultos.

En la Figura 9 podemos observar como los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del tejido blando analizado de los adultos se encuentran muy agrupados, mientras que en pupas y larvas esto no sucede, estando mucho más dispersos. Los valores de la desviación típica calculados apoyan esta afirmación. En larvas y pupas los valores de desviación típica son 1,23 (Tabla 1) y 0,98 (Tabla 2) respectivamente, mientras que en adultos es 0,34 (Tabla 4), valor mucho menor. En la Figura 10 se observa cómo los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del tejido esclerotizado de los adultos (tanto patas como alas) de nuevo se encuentran muy agrupados, con valores de desviación típica de 0,57 (Tabla 5) y 0,56 (Tabla 6), frente al 1,18 de las patas de las pupas (Tabla 3), mucho más dispersos. Destaca en ambas figuras el hecho de que uno de los valores de las patas de las pupas (Fig. 10) y del músculo de las pupas (Fig. 9) una aparezca disparado frente al resto; si nos fijamos en la Tabla 2 y 3 esos datos disparados pertenecen al mismo individuo, extraído del nido 7.

En cuanto a los valores de $\delta^{13}\text{C}$, en el caso de las partes blandas o viscerales (Fig. 9) se puede apreciar que existe una mayor dispersión de los datos (especialmente en el músculo de las pupas, con una desviación típica de 0,68; Tabla 2) que en el caso de las partes duras o esclerotizadas (Fig. 10), las cuales se encuentran más agrupadas (las

desviaciones típicas oscilan entre 0,30 de las patas de las pupas y 0,39 de las alas de los adultos; Tabla 3 y Tabla 6 respectivamente).

5. Discusión

Si el análisis de isótopos estables reflejase fielmente las afirmaciones recogidas en la bibliografía consultada sobre la alimentación de *V. velutina* (Matsuura & Yamane, 1990; Arca *et al.*, 2013; Monceau *et al.*, 2014), esperaríamos que las larvas mostrasen valores elevados en ambos isótopos (^{15}N y ^{13}C) como correspondería a su alimentación mayormente carnívora, aunque en menor medida también reciben azúcares por parte de los adultos (Rome *et al.*, 2015). En el caso de las pupas se esperarían valores de composición isotópica similares a los de la larva porque a lo largo de esta fase no se alimentan. Por el contrario, en los adultos debería verse reflejado el cambio en la alimentación hacia valores más bajos de ^{15}N y ^{13}C , que se corresponden más a una dieta basada en fruta, néctar u otros productos vegetales, que funcionan como su mayor fuente de energía (Raveret, 2000).

Lo esperable sería que los tejidos blandos como el músculo, a causa de su capacidad para regenerarse (Rose *et al.*, 2001), se empobreciesen en los isótopos pesados de C y N en el paso de la fase larvaria a la fase adulta debido a los cambios en la alimentación. Por otro lado, también se esperaría que los tejidos duros como los que forman el exoesqueleto, que no sufren transformaciones importantes a lo largo de las distintas fases del ciclo de vida, se mantuvieran con valores más o menos similares desde su formación durante la metamorfosis.

Como se ha podido comprobar con los resultados de este trabajo, detectamos contradicciones a esta hipótesis de partida. En la Tabla 7 y en la Figura 9 vemos que en el paso de larva a pupa, el músculo se enriquece en ^{15}N y ^{13}C , lo cual se acentúa todavía más en el paso de pupa a adulto. En el caso de las partes esclerotizadas (Fig. 10), vemos que en el paso de larva a pupa tiene lugar un enriquecimiento en ambos isótopos pesados (sobre todo en el de nitrógeno, 1,54 ‰; Tabla 7), mientras que de pupa a adulto

apenas hay cambio. De hecho, se da un ligero empobrecimiento que, en el caso de las patas de pupas y de adultos, es prácticamente anecdótico (0,08 ‰; Tabla 7).

Para explicar estas aparentes contradicciones con la hipótesis de partida no se barajan problemas en los análisis (el SAI tiene una amplia experiencia en este tipo de trabajos) ni en la recogida y conservación de las muestras. De hecho, elementos externos como el insecticida podrían provocar variaciones en los datos, pero tras el procesamiento y lavado exhaustivo de los ejemplares esto es improbable, por lo que las contradicciones encontradas deberían explicarse de otro modo.

Por ejemplo, el enriquecimiento en isótopos pesados en ciertos tejidos de la pupa podría deberse a que, justo antes de pupar, la larva expulsa un meconio, esto es, el contenido intestinal acumulado a lo largo de su fase larvaria (Rome *et al.*, 2015). Está comprobado que los meconios de los insectos están empobrecidos en el isótopo pesado frente al propio individuo (Tibbets *et al.*, 2008) debido a que se excreta preferentemente el isótopo ligero, ya que se moviliza con mayor velocidad que el pesado (Gannes *et al.*, 1998). Esto podría explicar el motivo del enriquecimiento en ^{15}N en el paso de larva a pupa (Fig. 9 y Fig. 10) en nuestras muestras. Este enriquecimiento también ocurre en menor medida para el ^{13}C . Sin embargo, solo la expulsión del meconio rico en isótopos ligeros no basta para explicar la variación observada, ya que si fuese solo así, los valores de enriquecimiento en isótopos pesados de la pupa deberían ser similares para todos los tejidos, y esto no ocurre. Fijándonos en las Figuras 9 y 10 y en la Tabla 7, se ve como las patas de las pupas se enriquecen mucho más que las partes blandas (músculo). Esto indica que la redistribución de isótopos a lo largo de la metamorfosis con la síntesis de nuevos tejidos juega un papel relevante en la señal isotópica final de cada una de las partes (esclerotizadas y blandas).

En el paso de pupa a adulto esperábamos observar una señal isotópica igual o muy similar en las partes esclerotizadas (Fig. 10) de ambos estados de desarrollo, ya que éstas no sufren remodelación de tejidos, así como una diferencia en los tejidos blandos (Fig. 9) hacia valores más bajos en ambos isótopos pesados debido al cambio en la alimentación del adulto. Sin embargo, los resultados no se ajustan a esta hipótesis, ya que en las partes duras se observa un ligero empobrecimiento en ambos elementos mientras que en el músculo se produce un enriquecimiento. Esto puede tener varias

interpretaciones. La primera podría ser el hecho de que la regeneración de algunos tejidos como el músculo sea lenta (Rose *et al.*, 2001) y, como el ciclo de vida de estos animales es corto, podría no dar tiempo a que se detecten cambios apreciables en sus proporciones de isótopos. Además, es posible que las larvas y adultos de *V. velutina* no lleven una alimentación exclusivamente basada en proteínas e hidratos de carbono respectivamente como se piensa.

Según Edwards (1980) o Monceau *et al.* (2014), está comprobado que las obreras no sólo obtienen el alimento para sus larvas a partir de insectos, sino que también lo hacen a partir de carroña u otros restos. Sin embargo, otros textos recogen que los adultos son incapaces de consumir carne (Janet, 1903; Spradbery, 1973; Matsuura & Yamane, 1990; cit. En Rome *et al.*, 2015). Expertos en el tema no ponen en duda esta afirmación, pero los textos originales son antiguos y a falta de estudios de campo detallados sobre la alimentación de *V. velutina*, una posibilidad podría ser que esto no fuera del todo cierto, es decir, que los adultos pudieran consumir carroña o presas de forma esporádica. Esto podría explicar el comportamiento isotópico más propio de un animal carnívoro que presentan en comparación con las larvas.

Por otra parte, los adultos proporcionan a las larvas también un líquido rico en azúcares, mientras que éstos reciben proteína en forma de una regurgitación de la saliva de las larvas (Rome *et al.*, 2015). Este fenómeno de intercambio de sustancias recibe el nombre de trofolaxis, y podría ser el responsable o influir en estos valores isotópicos de los adultos en el caso de que dicho proceso tenga una gran importancia.

Con los datos recogidos en este trabajo no es posible asumir o rechazar con total seguridad ninguna de las explicaciones propuestas. Para ello habría que llevar a cabo una toma de muestras mucho mayor y más organizada y realizar análisis complementarios. Por ejemplo obteniendo más muestras de todos los estados de desarrollo y conociendo la edad de cada individuo en el momento de hacer los análisis. También sería interesante analizar los meconios. Este estudio podría incluir nuevas áreas geográficas, lo que permitiría comparar el comportamiento de esta especie en las mismas.

Sin embargo, esta metodología de análisis podría abrir las puertas a nuevas investigaciones, que podrían ser además de gran interés para todos aquellos agentes que hoy en día trabajan en el diseño de métodos de control de la invasión de *V. velutina*.

6.a Conclusiones

- Se han puesto a punto los protocolos de trabajo necesarios para el uso de isótopos estables en los estudios de alimentación de la especie *Vespa velutina*.
- Se ha comprobado la idoneidad para el análisis de distintos tejidos y estructuras dependiendo de la fase vital estudiada: cuerpo entero para las larvas; patas y músculo del tórax para las pupas; y patas, alas y músculo del tórax para los adultos.
- Se han detectado diferencias sustanciales en la huella isotópica de las distintas estructuras corporales seleccionadas de larvas, pupas y adultos.
- Se ha detectado en general un enriquecimiento en isótopos pesados de nitrógeno y carbono en el paso de larva a pupa, el cual es más notable en el caso de las patas.
- Se ha observado un enriquecimiento en isótopos pesados en el músculo del tórax en ambos isótopos en el paso de pupa a adulto, mientras que las partes esclerotizadas sufren un empobrecimiento, aunque en algunos casos es anecdótico.
- A pesar de detectarse diferencias en la huella isotópica de los distintos estados de desarrollo, estas no se ajustan a lo esperado según la información recogida en la bibliografía sobre la alimentación de la especie.
- Posibles trabajos futuros podrían ayudar a confirmar o rechazar algunas de las hipótesis aquí propuestas.

6.b Conclusións

- Puxéronse a punto os protocolos de traballo necesarios para o uso de isótopos estables nos estudos de alimentación da especie *Vespa velutina*.
- Comprobose a idoneidade para a análise de distintos tecidos e estruturas dependendo da fase vital estudada: corpo enteiro para as larvas; patas e músculo do tórax para as pupas; e patas, ás e músculo do tórax para os adultos.
- Detectáronse diferencias substanciais na pegada isotópica das distintas estruturas corporais seleccionadas de larvas, pupas e adultos.
- Detectouse en xeral un enriquecemento en isótopos pesados de nitróxeno e carbono no paso de larva a pupa, o cal é máis notable no caso das patas.
- Observouse un enriquecemento en isótopos pesados no músculo do tórax en ambos isótopos no paso de pupa a adulto, mentres que as partes esclerotizadas sofren un empobrecemento, aínda que nalgúns casos é anecdóticos.
- A pesar de detectárense diferencias na pegada isotópica dos distintos estados de desenvolvemento, estas non se axustan ó esperado segundo a información recollida na bibliografía sobre a alimentación da especie.
- Posibles traballos futuros poderían axudar a confirmar ou rexeitar algunhas das hipóteses aquí propostas.

6.c Conclusions

- Protocols needed have been started up for the use of stable isotopes in the feeding studies on *Vespa velutina*.
- The adequacy of the analysing procedures for the analysis of different tissues and structures has been proven depending on the considered vital stage: whole body for larvae; legs and thorax muscle for pupae; and legs, wings and thorax muscle for adults.
- Substantial differences have been shown in the isotopic signal of the various body structures selected from larvae, pupae and adults.

- A general enrichment in heavy isotopes of nitrogen and carbono has been detected during the passing of larvae-to-pupae stages, which is acuter in the case of legs.
- Enrichment has been revealed in the thorax muscle in both isotopes during the passing of pupae-to-adult stage, whereas the sclerotised parts suffer an impoverishment, which is anecdotic in some cases.
- Despite having found differences in the isotopic signal of the different development stages, these differences do not adjust to what was expected according to the information gathered in the bibliography about the feeding of the species.
- Possible future studies could help to acknowledge or reject several of the hypotheses proposed here.

7. Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a las Dras. María José Servia García y Aurora Grandal D'Anglade por brindarme conocimientos, buenos consejos, motivación y sobre todo mucha paciencia a lo largo de lo que ha sido esta aventura, sin ellas no hubiese sido posible.

Dar las gracias también a María Lema Grille y al resto del departamento de la Unidad de Técnicas Instrumentales de Análisis (UTIA) de los Servicios y Apoyo para la Investigación (SAI) de la UDC por permitirnos realizar los análisis en sus instalaciones.

Por último pero no por ello menos importante, agradecer al equipo de Protección Civil de Oleiros, los cuales sin tener ningún tipo de obligación me facilitaron todo el material requerido, sin su ayuda este proyecto no podría ni haber despegado.

8. Bibliografía

- Arca, M.; Papachristoforou, A.; Mougel, F.; Rortais, A.; Monceau, K.; Bonnard, O.; Tardy, P.; Thiéry, D.; Silvain, J. F.; Arnold, G. (2014). Defensive behaviour of *Apis mellifera* against *Vespa velutina* in France: Testing whether European honeybees can develop an effective collective defence against a new predator. *Behavioural Processes*, 106, 122-129.
- Castro, L.; Pagola-Carte, S. (2010). *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. *Heteropterus Revista de Entomología*, 10, 193-196.
- Chapman, R. & Bourke, A. (2001). The influence of sociality on the conservation biology of social insects. *Ecology Letters*, 4 (6), 650-662.
- Concello de Oleiros. (2017). Parques. URL: http://www.oleiros.org/web/concello-oleiros/localiza/paraxes-turisticos/parques?p_p_id=EXT_PUBLICADOR_INSTANCE_3lvM&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&EXT_PUBLICADOR_INSTANCE_3lvM_struts_action=%2Fext%2Fpublicador%2Fview_content&EXT_PUBLICADOR_INSTANCE_3lvM_assetId=418443&EXT_PUBLICADOR_INSTANCE_3lvM_urlTitle=introduccion&EXT_PUBLICADOR_INSTANCE_3lvM_type=content&redirect=%2Fweb%2Fconcello-oleiros%2Flocaliza%2Fparaxes-turisticos%2Fparques. Fecha de consulta: 3 de julio de 2017.

- Consellería do Medio Rural. (2016a). Concellos con detección de niños de *Vespa velutina* – Ano 2016. Xunta de Galicia.
- Consellería do Medio Rural (2016b). Protocolo de vixilancia e control fronte á avespa asiática (*Vespa velutina*). Xunta de Galicia.
- Deniro, M. J. & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 495-506.
- Edwards, R. (1980). *Social wasps. Their behaviour and control*. Sussex, Reino Unido: Rentokil Limited.
- European Comission (2017). Asian hornet (*Vespa velutina*) detected in Switzerland. URL: [https://easin.jrc.ec.europa.eu/\(X\(1\)S\(h5u0b21b3k53g5zwtji5ubuq\)\)/NewsAndEvents/DetailNews/0551ce06-b503-4b19-a7bf-77ec3553e259?AspxAutoDetectCookieSupport=1](https://easin.jrc.ec.europa.eu/(X(1)S(h5u0b21b3k53g5zwtji5ubuq))/NewsAndEvents/DetailNews/0551ce06-b503-4b19-a7bf-77ec3553e259?AspxAutoDetectCookieSupport=1). Fecha de consulta: 24 de mayo de 2017.
- Federación Galega de Municipios e Provincias. (2017). Oleiros. URL: <http://www.fegamp.gal/concello/oleiros>. Fecha de consulta: 3 de julio de 2017.
- Franklin, D. N.; Brown, M. A.; Datta, S.; Cuthbertson, A. G. S.; Budge, G. E.; Keeling, M. J. (2017). Invasion dynamics of Asian hornet, *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae): a case study of a commune in south-west France. *Applied Entomology and Zoology*, 52 (2), 221-229.
- Fry, B. (2006). *Stable isotope ecology*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Gannes, L.; Martínez, C.; Koch, P. (1998). Natural Abundance Variations in Stable Isotopes and their Potential Uses in Animal Physiological Ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3, 725-737.
- Iakovlev, I. K.; Novgorodova, T. A.; Tiunov, A. V.; Reznikova, Z. I. (2017). Trophic position and seasonal changes in the diet of the red wood ant *Formica aquilonia* as indicated by stable isotope analysis. *Ecological Entomology*, 42 (3), 263-272.
- Janet, C. (1903). *Observations sur les guêpes*. París, Francia: C. Naud.
- Jardine, T. D.; McGeachy, S. A.; Paton, C. M.; Savoie, M.; Cunjak, R. A. (2003). Stable isotopes in aquatic systems: sample preparation, analysis and interpretation. *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2656, 1-39.
- Matsuura, M. & Yamane, S. (1990). *Biology of the Vespine Wasps*. Berlín, Alemania: Springer.
- Monceau, K.; Bonnard, O.; Thiéry, D. (2012). Chasing the Queens of the alien predator of honeybees: A water drop in the invasiveness ocean. *Open Journal of Ecology*, 2 (4), 183-191.
- Monceau, K.; Maher, N.; Bonnard, O.; Thiéry, D. (2013). Predation dynamics study of the recently introduced honeybee killer *Vespa velutina*: learning from the enemy. *Apidologie*, 44, 209–221.

- Monceau, K.; Bonnard, O.; Thiery, D. (2014). *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of Pest Science*, 87 (1), 1-16.
- Liu, Z.; Chen, S.; Zhou, Y.; Xie, C.; Zhu, B.; Zhu, H.; Liu, S.; Wang, W.; Chen, H.; Ji, Y. (2015). Deciphering the Venomic Transcriptome of Killer-Wasp *Vespa velutina*. *Scientific Reports*, 5, 9454.
- Parmentier, T.; Bouillon, S.; Dekoninck, W.; Wenseleers, T. (2015). Trophic interactions in an ant nest microcosm: a combined experimental and stable isotope ($\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$) approach. *OIKOS*, 125 (8), 1182-1192.
- Perrard, A.; Haxaire, J.; Rortais, A.; Villemant, C. (2009). Observations on the colony activity of Asian hornet *Vespa velutina* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae) in France. *International Journal of Entomology*, 45 (1), 119-127.
- Raveret, M. (2000). Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behaviour. *Annual Review of Entomology*, 45, 121–150.
- Redondo, R. (2008). Fundamentos teóricos y técnicos de los isótopos estables. En Alcorlo, P.; Redondo, R.; Toledo, J. (Eds.), *Técnicas y aplicaciones multidisciplinarias de los isótopos ambientales* (pp 9-24). Madrid, España: UAM ediciones.
- Rome, Q.; Muller, F. J.; Touret-Alby, A.; Darrouzet, E.; Perrard, A.; Villemant, C. (2015). Caste differentiation and seasonal changes in *Vespa velutina* (Hym.: Vespidae) colonies in its introduces range. *Journal of Applied Entomology*, 139, 771-782.
- Rortais, A.; Villemant, C.; Gargomin, O.; Rome, Q.; Haxaire, J.; Papachristoforou, A.; Arnold, G. (2010). A new enemy of honeybees in Europe: the Asian hornet *Vespa velutina*. En Settele, J.; Penney, L. D.; Georgiey, T. A.; Grabaum, R.; Grobelnik, V.; Hammen, V.; Klotz S.; Kotarac, M.; Kühn, I. (Eds.), *Atlas of Biodiversity Risks* (p. 181). Sofía, Bulgaria: Pensoft Publishers.
- Rose, U.; Ferber, M.; Hustert, R. (2001). Maturation of muscle properties and its hormonal control in an adult insect. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 3531-3545.
- Schwartz, C.; Villemant, C.; Rome, Q.; Muller, F. (2012). *Vespa velutina* (frelon asiatique): un nouvel hyménoptère en France. *Revue Française d'Allergologie*, 52, 397-401.
- Spradbery, J. P. (1973). *Wasps: an account of the biology and natural history of solitary and social wasps with particular reference to those of the British Isles*. Londres, Reino Unido: Sidgwick & Jackson.
- Tibbets, T. M.; Wheelless, L. A.; Martínez, C. (2008). Isotopic enrichment without change in diet: an ontogenic shift in $\delta^{15}\text{N}$ during insect metamorphosis. *Functional Ecology*, 22, 000-000.
- Unkovich, M. (2001). *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems*. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic.

Villemant, C.; Haxaire, J. & Streito, J.C. (2006a). La découverte du Frelon asiatique *Vespa velutina*, en France. *Insectes*, 143 (4), 3-7.

Villemant, C.; Haxaire, J. & Streito, J.C. (2006b) Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 111 (4), 535.

Villemant, C.; Barbet-Massin, M.; Perrard, A.; Muller, F.; Gargominy, O.; Jiguet, F.; Rome, Q. (2011). Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. *Biological Conservation*, 144, 2150–2152.

Anexo I: Inventario del material recolectado

Nido	Fecha	Dirección	Altura (m)	Larvas	Pupas	Adultos
1	28/11/2016	Rúa Néboa nº 1, Parroquia Liáns	4	18	12	0
2	22/11/2016	Rúa Lavandeiras nº 5, Nós	10	0	0	0
3	25/11/2016	Rúa Che Guevara, Perillo	12	11	6	10
4	02/01/2017	Rúa Cobo, nº 26	12	0	8	0
5	02/01/2017	Rúa Cobo, nº 5	5	0	0	0
6	25/11/2016	Rúa Anido, nº 76, Mesón da Auga	16	0	3	8
7	22/11/2016	Av. Frco. Giner dos Ríos nº 22	14	0	11	0
8	28/11/2016	Rúa Obelisco (detrás de Radio Oleiros)	18	1	2	1
9	25/11/2016	Av. Che Guevara, Perillo	14	15	3	5
10	25/11/2016	Av. Che Guevara, Perillo	8	2	20	6
11	02/01/2017	Rúa Cobo nº 8	16	0	0	1
12	08/01/2017	Rúa Mazarico, Liáns	10	0	0	0
13	13/11/2016	Rúa Calixa nº17	13	11	21	6
14	13/11/2016	Rúa Mosqueiro nº14	12	7	8	3

Anexo II: Datos en bruto de los análisis de isótopos

Muestra	Peso (mg)	% N	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	% C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)
N.3 6 LARVAS	1,067	6,4	6,1	45,8	-28,2
	1,050	6,4	6,1	44,9	-28,1
N.9 6 LARVAS	1,016	8,9	5,8	45,2	-27,2
	0,991	8,7	5,7	44,2	-27,1
N.13 7 LARVAS	0,955	7,6	7,6	48,4	-27,7
	1,017	7,6	7,9	47,4	-27,5
N.14 7 LARVAS	0,994	7,4	4,7	48,4	-27,0
	0,974	7,2	4,8	47,4	-27,1
N.1 MUS. P	1,112	11,7	6,3	44,5	-26,6
	0,937	11,6	6,4	44,4	-26,7
N.3 MUS. P	1,021	7,9	6,2	32,0	-27,1
	0,924	8,3	6,2	32,6	-26,9
N.4 MUS P	1,074	12,9	6,7	43,0	-25,8
	0,968	12,9	6,6	43,9	-26,0
N.6 MUS. P	0,928	12,8	6,9	47,6	-27,3
	1,160	12,8	6,8	47,8	-27,3
N.7 MUS P	1,101	9,5	8,9	43,4	-28,0
	0,980	9,8	8,9	43,2	-28,0
N.10 MUS. P	0,924	11,6	6,4	47,2	-27,3
	0,914	11,6	6,3	48,7	-27,3
N.14 MUS. P	1,062	8,9	6,1	42,2	-27,6
	0,945	9,1	6,2	43,4	-27,6
N.1 PATAS P	1,032	7,0	6,6	25,8	-26,4
	1,059	8,2	6,5	30,2	-26,6
N.3 PATAS P	1,073	10,5	7,2	37,7	-26,3
	1,071	11,1	7,2	39,6	-26,4
N.4 PATAS P	0,907	12,8	7,2	43,4	-25,9
	0,935	13,3	6,9	45,0	-26,0
N.5 PATAS P	0,994	12,5	7,8	45,5	-27,1

	0,995	13,5	7,9	47,4	-26,9
N.7 PATAS P	0,997	12,3	9,9	42,4	-26,6
	1,099	12,1	10,4	41,4	-26,5
N.9 PATAS P	1,035	12,6	8,4	43,3	-26,7
	0,958	12,9	8,4	44,7	-26,7
N.10 PATAS P	1,102	11,0	7,4	42,0	-26,5
	0,900	11,9	7,4	42,7	-26,5
N.14 PATAS P	0,948	11,8	6,6	44,7	-26,3
	1,140	11,1	6,5	42,3	-26,4
N.6 MUS. A	1,153	11,6	6,9	46,3	-27,0
	0,904	11,6	7,0	46,9	-27,0
N.9 MUS. A	0,963	9,8	7,2	42,9	-26,8
	1,102	9,7	7,3	42,5	-26,7
N.10 MUS. A	1,028	11,1	7,4	45,2	-25,4
	0,938	10,8	7,5	45,0	-25,6
N.13 MUS A	1,114	11,1	7,7	45,0	-26,8
	0,982	11,0	7,8	45,5	-26,9
N.14 MUS. A	1,098	7,8	6,9	46,2	-27,0
	0,903	6,4	7,0	42,1	-27,2
N.6 PATAS A	1,021	11,1	7,5	45,6	-27,2
	1,088	10,5	7,4	45,6	-27,3
N.9 PATAS A	1,026	10,9	8,1	40,5	-26,5
	0,990	11,2	8,2	42,1	-26,5
N.10 PATAS A	1,134	12,1	6,8	47,1	-27,1
	1,018	12,4	6,8	47,0	-27,1
N.13 PATAS A	0,974	10,5	8,1	44,3	-27,0
	0,980	10,8	8,2	44,8	-27,0
N.14 PATAS A	0,986	10,3	7,3	44,6	-26,5
	1,047	9,4	7,2	43,2	-26,5
N.6 ALAS A	0,904	11,4	7,3	48,1	-27,4
	0,353	10,8	7,5	47,0	-27,4
N.9 ALAS A	0,910	11,4	8,1	45,1	-26,4
	0,807	12,0	7,9	45,8	-26,6
N.10 ALAS A	0,918	12,3	6,8	46,5	-27,1
	0,888	12,7	6,5	46,8	-27,1
N.13 ALAS A	0,955	12,1	7,9	48,1	-27,4
N.14 ALAS A	1,088	11,8	7,0	47,9	-26,9