



UNIVERSIDAD
DE CHILE

**Correlato neuroanatómico del Lóbulo Antenal al cambio
de nicho trófico en cucarachas endémicas del género
Moluchia sp. (Blattodea: Ectobiidae)**

Tesis

Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por
Violeta Sotomayor

Octubre, 2024

Director de Tesis Dr: Jorge Mpodozis Marín

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

Violeta Sotomayor Lisboa

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 29 de agosto 2024.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis

Co-Director de Tesis

Dra. Natalia Márquez

Dr. Cristian Villagra

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Pablo Sabat

Dr. Álvaro Glavic

*A mi abuela
María Luz García,*

Biografía



Nacida y criada en la ciudad de Santiago en el año 1997, hermana mayor de tres, mamá de Relmu Salas e hija de Valeria Lisboa y Alonso Sotomayor. Su curiosidad por la naturaleza nace en el jardín de su abuela, pero su amor por ella se asienta y la transforma al entrar a estudiar Biología en la Universidad de Chile donde conoce a las amistades que la acompañarían a conocer los cerros, islas y bosques del territorio. Hoy se dedica a cuidar a su hijo, enseñar e investigar. Éste, es su primer trabajo de investigación.

Agradecimientos

Agradezco al Profesor Jorge Mpodozis por permitirme hacer esta tesis en su laboratorio, por su apoyo, confianza y financiamiento.

Agradezco al Profesor Cristian Villagra por los numerosos terrenos, por sus valiosos consejos, por su confianza y apoyo pleno.

A la Profesora Natalia Márquez, por enseñarme el delicado trabajo en neuroanatomía de insectos, por los terrenos en Valparaíso y el apoyo en el análisis estadístico.

Agradezco también al Profesor Pablo Sabat por su apoyo y financiamiento en el análisis de isotopos estables y a Lucas Navarrete de su laboratorio por su ayuda con el análisis de elipses bayesianas.

Agradezco especialmente a Constanza Schapheer por compartir conmigo sus conocimientos en el holobionte -Molukia-, por enseñarme a explorar los pequeños mundos dentro de los estómagos de las cucarachas y por su amistad.

A mis compañeras de laboratorio, Sofía Fuentes y Valentina Herrera por su ayuda en terreno. A mi amiga Javiera Salas por su ayuda en la construcción del mapa y a todo el equipo del laboratorio El Rayo, por asistir mis dudas y aconsejarme.

Gracias a mi familia, por apoyarme a lo largo de toda mi carrera, particularmente en estos últimos meses. Agradezco especialmente al Tomi por su ayuda y por la vida que compartimos.

Y a Relmu, por su ternura y por quedarse.

Índice de Materias

Lista de tablas.....	I
Lista de figuras.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
Resumen.....	IV
Abstract	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	11
1.2. Objetivo General.....	11
1.3. Objetivos Específicos.....	11
2. METODOLOGÍA	12
2.1. Animales	12
2.2. Análisis de isótopos estables.....	14
2.3. Fijación y disección de cerebros.....	15
2.4. Inmunohistoquímica	16
2.5. Microscopía y análisis de imágenes.....	17
2.6. Estadística.....	18
3. RESULTADOS.....	19
3.1 Morfología Externa.....	19
3.2 Caracterización del nicho trófico.....	20
Posición trófica.....	20
Amplitud nicho isotópico.....	24
Contenido estomacal.....	25
3.3 Neuropilas.....	26
Lóbulo Antenal.....	26
Glomérulos.....	28
Dimorfismo Sexual.....	36
4. DISCUSIÓN.....	37
5. CONCLUSIONES.....	50
7. REFERENCIAS.....	51

Lista de Tablas

Tabla 1 Valores de $\delta^{15}\text{N}$ ‰ y $\delta^{13}\text{C}$ ‰ para plantas del matorral costero y plantaciones de eucalipto.....	22
Tabla 2. Valores de posición trófica cada individuo, calculado con los factores de enriquecimiento 3‰ y 0,6‰.....	23
Tabla 3. Amplitud de nicho isotópico para <i>Moluchia brevipennis</i> y <i>Moluchia sp.</i> a partir de las proporciones de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$).	25
Tabla 4. Cuadro resumen con el número de muestras (n), medidas promedio y desviación estándar (SD) de cada rasgo morfológico, volumen de neuropilas y numero de glomérulos para cada población.....	30

Lista de Figuras

Figura 1. Representación esquemática del cerebro de un insecto del orden Blatodea	6
Figura 2. Puntos de muestreo en las regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana.....	13
Figura 3: Características y mediciones morfológicas de <i>Moluchia spp</i>	20
Figura 4. Marcas isotópicas a partir del experimento de dieta única.	21
Figura 5. Amplitud de nicho isotópico para tres poblaciones de <i>Moluchia spp</i>	24
Figura 6. Inmunohistoquímica de cerebro entero de tres poblaciones de <i>Moluchia spp</i>	27
Figura 7. Reconstrucción de lóbulo antenal y comparación volumétrica entre tres poblaciones de <i>Moluchia spp</i>	28
Figura 8. Inmunohistoquímica del lóbulo antenal de tres poblaciones de <i>Moluchia spp</i>	29
Figura 9. Comparación volumétrica de glomérulos entre individuos de <i>Moluchia spp</i> . de tres poblaciones.	31
Figura 10. Distribución volumétrica de glomérulos en tres poblaciones de <i>Moluchia spp</i>	32
Figura 11. Cantidad de relativa de glomérulos de distintos tamaños para cada individuo.....	33
Figura 12. Cantidad de relativa de glomérulos de distintos tamaños para cada población.....	34
Figura 13. Comparación volumétrica entre glomérulos específicos de dos poblaciones de <i>Moluchia brevipennis</i>	35
Figura 14. Macroglomérulo de <i>Moluchia spp</i>	36

Abreviaturas

$\delta^{13}C$: Abundancia de ($^{13}C/^{12}C$)

$\delta^{15}N$: Abundancia de ($^{15}N/^{14}N$)

Ca: Cáliz de cuerpo fungiforme.

FE: factor de enriquecimiento.

Glo: Glomérulo.

Gs: Gánglio suboesofágico.

HBS: HEPES buffer salino.

LA: Lóbulo Antenal.

MB: Cuerpo Fungiforme.

Mb: *Moluchia brevipennis* perteneciente a matorral costero.

Mbe: *Moluchia brevipennis* perteneciente a plantación de eucalipo.

Moluchias: insectos del género *Moluchia spp.*

OR: Receptor olfatorio.

OSN: neuronas receptoras olfativas.

PBS: Buffer salino.

SEA: Área de elipse estándar.

SEA_B : Área de elipse bayesiana.

SEA_c : Área de elipse corregida por el menor valor.

ZnFA: Zinc formaldehído

Resumen

Los insectos constituyen el grupo animal más abundante y diversificados del planeta. Éstos habitan gran parte de los ecosistemas terrestres, existiendo inclusive linajes que sobreviven en las superficies oceánicas. Entre las características que explicarían su éxito en la Tierra se destaca su gran plasticidad, expresada en una gran diversidad de modos de vida. A pesar de que el sistema nervioso en insectos es altamente conservado, esta enorme diversidad de estilos de vida se ve reflejada en variaciones morfológicas y volumétricas de las distintas neuropilas. En esta investigación se estudió cómo diferencias alimentarias en contextos naturales se asocian con cambios a nivel neuroanatómico en individuos adultos, específicamente en el número y volumen de glomérulos del lóbulo antenal. Para ello, se estudió el nicho trófico y los cerebros de las cucarachas endémicas del género *Moluchia spp.* criadas en ecosistemas con distintos grados de intervención antrópica: matorral costero, plantaciones forestales de eucalipto y sector urbano, en donde los paisajes olfativos y ofertas dietéticas son contrastantes. Se halló que los insectos costeros pertenecen a niveles tróficos más basales y presentan nichos isotópicos más amplios que los insectos de las otras poblaciones, sugiriendo que estas cucarachas se alimentan de una variedad más amplia de recursos tróficos incluido material vegetal fresco, mientras que las cucarachas de plantaciones forestales y de sector urbano se alimentarían principalmente de materia orgánica en descomposición. Por otro lado, no se hallaron diferencias en la cantidad de glomérulos entre las tres poblaciones. Sin embargo, los individuos pertenecientes al matorral costero presentaron una mayor proporción de glomérulos XG en comparación a las cucarachas de ecosistemas intervenidos. Finalmente, se concluye que en estos insectos pareciera haber una correlación entre el tamaño del nicho trófico y la cantidad de glomérulos especializados. Por lo que las interacciones tróficas -ligadas a estímulos sensoriales olfativos- a lo largo de su ontogenia, podrían ser importantes en el desarrollo de estas neuropilas de primer orden.

Palabras clave: *Moluchia sp*, lóbulo antenal, glomérulos, nicho trófico.

Abstract

Insects constitute the most abundant and diversified animal group in the planet. They are present in almost every ecosystem, even over the ocean's surface. Among the traits that would explain their success in Earth, we can highlight their great plasticity, which is expressed in the great diversity of life styles. Although insects' nervous system is highly conserved, differences in their life styles are reflected in morphological and volumetric variations of the different neuropils. In this research we studied how diet differences in natural contexts are associated with changes at the neuroanatomical level in adult individuals, specifically in the number and volume of olfactory glomeruli from the antennal lobe. For this purpose, we studied the brains and the trophic niche of endemic cockroaches of the genus *Moluchia spp.* reared in ecosystems with different degrees of anthropogenic intervention: coastal scrubland, eucalyptus forest plantations and urban outskirts, where olfactory landscapes and dietary supply are contrasting. We found that coastal insects belong to more basal trophic levels and present wider isotopic niches than eucalyptus plantation insects, suggesting that these cockroaches feed on a wide variety of trophic resources including fresh plant material, whereas forest plantation cockroaches feed mainly on decaying organic matter. By the other hand, we found ~96 glomeruli per antennal lobe in all individuals. In addition, we found a larger proportion of extra-large glomeruli in cockroaches from native ecosystems (*Moluchia brevipennis*) compared to other populations. Finally, it is concluded that it seems to be a correlation between the size of the trophic niche of the insects studied and the number of specialized glomeruli, and that trophic interactions -linked to olfactory sensory stimuli- are important in the development of first-order neuropils.

Key words: *Moluchia sp.*, antennal lobe, glomeruli, trophic niche, development.

Introducción

Los insectos corresponden a más de la mitad de las especies animales descritas a la fecha, habitando en la mayoría de los ecosistemas terrestres y superficies acuáticas (Tihelka et al, 2021; Rosenberg et al, 2023). Su abundancia y diversidad sin paralelos va acompañada de un amplio y plástico espectro de modos de vida y roles ecosistémicos, correspondiendo a agentes clave en la estabilidad de los biomas de nuestro planeta (Grimaldi and Engel, 2005; Barnes, 2021). Estas características los hacen un buen modelo de estudio para tratar preguntas comparadas sobre neuroanatomía, en particular las que buscan asociaciones entre estructuras neurales y modos de vida (North and Greenspan 2007; West-Eberhard 2005; Bouchebti and Arganda, 2020). A pesar de que la estructura nerviosa de los insectos es altamente conservada (Galizia and Rössler, 2010, Farris 2003; Polilov and Makarova 2020), es posible encontrar diferencias sustanciales en su fisiología y arquitectura (Murray et al., 1984; Meinertzhagen and Sorra, 2001). Esto se ve reflejado tanto en la ontogenia de un insecto como entre especies filogenéticamente cercanas que difieren en su modo de vida (Westwick and Rittschof, 2021). Este fenómeno ha sido reportado tanto en insectos con planes de desarrollo conservado, *i.e.*, hemimetábolos (exopterigotas), como en insectos con modos de desarrollo derivados, *i.e.*, holometábolos (endopterigotas) (*e.g.*, Ernst et al., 2015; Barchuk, 2017).

Diversidad de modos de vida

Entre los diversos estilos de vida que despliegan los insectos, (como ser diurnos/nocturnos, gregarios/solitarios) destacan sus hábitos alimentarios. Tanto los elementos tróficos que consumen como las estrategias de forrajeo que despliegan, son factores importantes en su desarrollo, ecología y evolución (Cornwallis et al, 2023). Estos animales llevan a cabo un amplio espectro de estrategias de nutrición incluyendo la depredación, la herbivoría, la xilofagia, la hemofagia, la alimentación a partir de

detritos, entre muchas otras. Incluso, muchos insectos son capaces de cambiar de estrategia trófica a lo largo de su ontogenia. Por ejemplo, los odonatos son depredadores acuáticos en las fases inmaduras, pero pasan a ser depredadores terrestres voladores en la fase adulta (Bowman et al. 2018). Por otro lado, en Lepidoptera, durante la etapa larval muchas especies son voraces herbívoros pasando a cumplir roles de polinizadores al completar la metamorfosis (Tobi et al, 1993). Este amplio abanico de posibilidades los sitúa como organismos elementales en muchas redes tróficas y los convierten en agentes ecosistémicos clave ya que, en conjunto con microorganismos endosimbiontes, son capaces de realizar procesos metabólicos que son fundamentales en el ciclo de los principales elementos N, P, C, O, H y S (Schpbeer, 2021) que conforman la vida en la tierra. Una herramienta útil para estudiar los diversos hábitos alimentarios y evaluar sus cambios frente a distintos contextos ambientales, es el análisis de isótopos estables (Hsu et al, 2023; Quinby et al., 2020). Los isótopos son tipos atómicos con distintas cantidades de neutrones en el núcleo. En la naturaleza existen variaciones en las proporciones isotópicas que dependen de procesos tanto fisicoquímicos como biológicos. Estas proporciones se traspan de la dieta al organismo de modo predecible, permitiendo determinar aspectos del origen geográfico y de la dieta (Quinby et al., 2020).

Variaciones en la neuroanatomía

Los insectos utilizan distintas modalidades sensoriales para la orientación espacial y conducta de forrajeo. Entre ellas encontramos la visión, el tacto, el olfato, el gusto e incluso la magnetorrecepción (Borkakati et al, 2019; Clarke et al, 2017; Hansson and Stensmyr, 2011). Curiosamente, es posible hallar una correlación importante entre el estilo de vida, la estructura de ciertos órganos sensoriales y su neuroanatomía. Por ejemplo, tanto abejas (Himenoptera) como en mariposas (Lepidoptera) presentan receptores gustatorios en las patas delanteras, (Agnihotri. et al, 2016) que les permite sentir ciertos componentes químicos al posarse sobre flores y discriminar entre plantas hospederas y no hospederas.

De manera interesante, cambios en el modo de vida de algunas especies se encuentran correlacionadas a modificaciones en su neuroanatomía. Por ejemplo, en langostas (exopterigotas) de los géneros *Locusta* y *Schistocerca* (Orthoptera), se observan dos fases conductuales conspicuas: una gregaria, con un modo de alimentación generalista, y otra solitaria, con modo de alimentación especialista. Ambas fases tienen marcadas diferencias en diversas neuropilas del cerebro (Ott and Rogers, 2010; Ernst et al., 2015). Adicionalmente, se ha documentado que las experiencias olfativas y alimentarias tempranas durante el desarrollo pueden inducir cambios sustanciales en el crecimiento de distintas estructuras cerebrales (Westwick and Rittschof, 2021). Por ejemplo, la cantidad y distribución de sensilas olfativas en la antena y palpos maxilares en *Locusta*, dependen del tipo de dieta recibido en el estado de ninfa (Rogers & Simpson, 1997). En endopterigotas, como la abeja de miel, *Apis mellifera* (Linneaus 1758, Hymenoptera: Apidae), se ha documentado que las obreras desarrollan cuerpos fungiformes de mayor tamaño que las reinas en la etapa adulta (Groh et al, 2012; Barchuk, 2017). Estas diferencias estarían dadas por una nutrición diferencial suministrada durante el estado larval (Groh et al, 2012; Barchuk, 2017). Además, experimentos de privación sensorial en mariposas han demostrado que la experiencia olfativa es fundamental para el desarrollo de centros olfativos de primer orden (lóbulo antenal) (Eriksson, 2019). Estos ejemplos sugieren que las neuropilas sensoriales en insectos, tienen un alto grado de plasticidad experiencia-dependiente durante su desarrollo (West-Everhard, 2003, Westwick and Rittschof, 2021).

Por otro lado, se ha visto que linajes relativamente cercanos entre sí, pero con divergencias en su modo de vida, presentan diferencias en la morfología, fisiología y volumen de sus neuropilas (Koniszewski et al. 2016). Por ejemplo, los coleópteros herbívoros de la familia Scarabeidae presentan una duplicación en los cálices de los cuerpos fungiformes (MB por sus siglas en inglés), mientras que las especies pertenecientes a subfamilias consumidoras de estiércol presentan MB con un único cáliz, como en la mayoría de los neópteros (Farris and Roberts, 2005; Montgomery, 2016). Esta duplicación en los cálices está generalmente acompañada de nuevas subdivisiones funcionales, integrando distintas modalidades sensoriales al incluir

aferencias olfativas y visuales (Farris, 2013). En cuanto al lóbulo antenal (LA) o centros de primer orden asociados al olfato también se han observado variaciones tanto en el número de glomérulos como en la sensibilidad frente a ciertos componentes en organismos con distintos estilos de vida (Immonen et al, 2017; Sheehan et al, 2019). Por ejemplo, la abeja solitaria oligoléctica *Andrena vaga* (Panzer, 1799, Hymenoptera: Andrenidae) presenta menos glomérulos en su LA y una mayor sensibilidad a compuestos volátiles derivados de sus plantas hospederas en comparación a la abeja de miel, que presenta un modo de vida generalista (Burguer, 2013). Es decir, modos de vida ligados a distintas experiencias olfativas y dietarias se correlacionarían con modificaciones en la estructura del MB y LA.

En cuanto al desarrollo de neuropilas olfatorias, encontramos diferencias importantes entre insectos endopterigotas y exopterigotas. Mientras que en la mayoría de los endopterigotas las principales estructuras neurales presentes en adultos se desarrollan durante la metamorfosis, los exopterigotas eclosionan presentando MB y LA minúsculos, que maduran y aumentan en volumen a medida que su ontogenia atraviesa los distintos estadios de ninfa hasta alcanzar la fase de adulto (Farris and Sinakevich, 2003). Por lo tanto, el crecimiento de estos insectos ocurre mientras el organismo está en contacto activo con su ambiente, sugiriendo que estas instancias podrían ser importantes tanto en la conformación de su modo de vida como en el desarrollo de sus estructuras neuronales (Burggren, 2017; Westwick and Rittschof, 2021). Un ejemplo claro de esto está presente en el orden Blattodea, en donde las conductas alimentarias de vida libre comienzan desde la eclosión de la ooteca (Bell et al., 2007; Schal et al., 1984).

Estos ejemplos muestran la plasticidad del sistema nervioso, en particular del sistema olfativo y destacan la importancia de la experiencia temprana en el desarrollo de estas estructuras. Sin embargo, a la fecha no existen estudios que hayan evaluado posibles diferencias en las estructuras sensoriales entre poblaciones que viven en ambientes contrastantes (i.e. ambiente natural versus ambiente intervenido) dentro una misma especie. Un modelo que permite abordar esta pregunta es *Moluchia brevipennis*, una

cucaracha endémica que se encuentra fuertemente asociada a la flora nativa y que además se encuentra en plantaciones forestales (Schapheer et al, 2017).

Neuroanatomía en Blattodea

La neuroanatomía y el desarrollo del sistema nervioso en Blattodea ha sido principalmente estudiada en la especie invasora *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758, Blattodea: Blattidae) (Newton, 1879; Farris and Strausfeld, 2001; Paoli, 2020; Fuscá, 2021; Watanabe et al., 2010; Watanabe, 2012). Dentro de los sistemas sensoriales del orden Blattodea, el sistema olfativo es importante en la orientación espacial (Nishino, 2018; Galizia, 2018; Paoli, 2020) y en la conducta de forrajeo (Vergara et al., 2011; Günzel, 2021). El principal órgano olfatorio, de insectos en general y de cucarachas en particular, son las antenas. Estas constan de flagelos anillados, recubiertos por sensilas sensibles a distintos tipos de estímulos (Figura 1). De acuerdo al estímulo al cuál responden, las sensilas se clasifican como sensilas quimiosensoriales de contacto, mecanosensoriales, higrosensoriales, termosensoriales y olfativas (Watanabe, 2012). Las sensilas olfatorias alojan de una a cuatro neuronas receptoras olfativas (*OSN* por sus siglas en inglés) cuyos axones proyectan a glomérulos específicos del lóbulo antenal (LA) dependiente del tipo de receptor olfatorio (OR) que expresen (Watanabe et al., 2010). Estudios realizados en Dípteros y de manera más reciente en Blatodeos, describen que cada glomérulo recibe proyecciones de neuronas sensibles a la misma familia de moléculas odorantes (Paoli, 2020)(Figura 1). En el caso de especies del género *Drosophila* (Diptera), está descrito que cada neurona sensitiva olfativa expresa uno de los 57 genes particulares de ORs, y que las neuronas con el mismo tipo de receptor inervan un único glomérulo del LA (Vosshall, 2000).

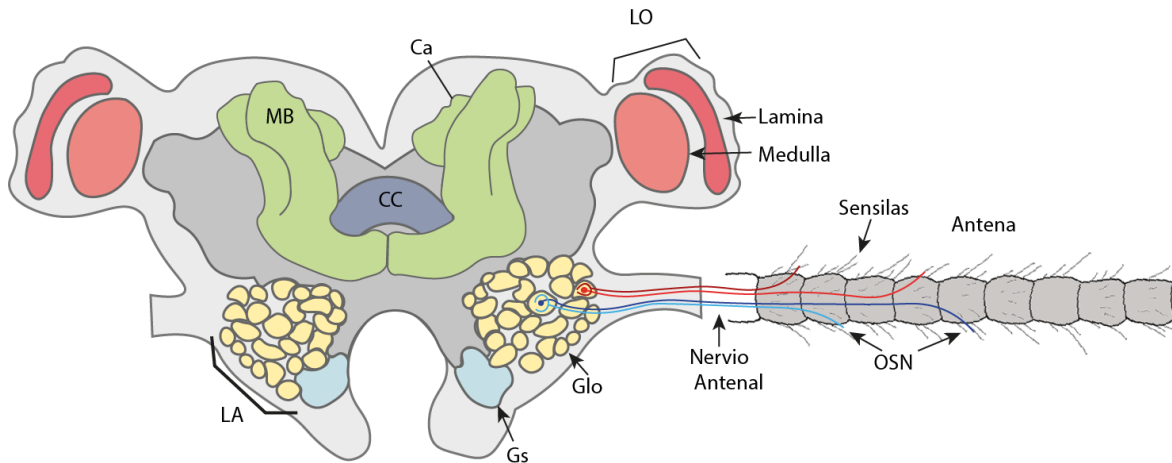


Figura 1. Representación esquemática del cerebro de un insecto del orden Blatodea con sus principales neuropilas y conectividad entre antenas y lóbulo antenal. Abreviaturas: MB: cuerpos fungiformes, Ca: cáliz de cuerpos fungiformes, CC: complejo central, LA: lóbulo antenal, Glo: glomérulo, Gs: ganglio subesofágico, LO: lóbulo óptico, OSN: neuronas receptoras olfativas. OSN con receptores olfativos de la misma familia, inervan el mismo Glo. OSN de segmentos distales inervan la zona central del glomérulo mientras que OSN de segmentos proximales inervan la zona periférica del glomérulo.

Durante el proceso de desarrollo, luego de cada muda, nuevos anillos se agregan a la zona proximal a la cabeza, alargando las antenas (Schafer, 1973), con ellas nuevas OSN inervan los glomérulos existentes en capas que se agregan desde el centro hacia la periferia (Fuscà, 2021) (Figura 1). Por consiguiente, las capas glomerulares son tanto edad-dependientes como segmento-dependientes. En un estudio realizado en la cucaracha de la calavera, *Blaberus craniifer* (Burmeister 1838) (Dictyoptera: Blaberidae), se determinó que la curva de crecimiento de la antena, del lóbulo antenal y de los glomérulos es exponencial a lo largo de las fases de ninfa (Rospars and Chambille, 1986).

Modelo de Estudio: especies del género Moluchia.

La mayoría de las investigaciones en cucarachas, incluyendo las conductuales y neuroanatómicas, se concentran en unas pocas especies, *i.e.*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis* (Linnaeus, 1758, Blattodea: Blattidae) y *Blattella germanica* (Linnaeus, 1758, Blattodea: Ectobiidae) debido a que son un problema de salud pública y plaga urbana. Todas estas presentan un modo de vida similar, íntimamente ligado a ecosistemas modificados por factores antrópicos, particularmente en las ciudades donde se generan artificialmente las condiciones de temperatura y humedad ideales para su sobrevivencia (Schapheer et al, 2018), alimentándose de basura y detritos (Bell, 2007). Sin embargo, existen más de cuatro mil especies de cucarachas descritas, de las cuales más del 99% corresponde a especies silvestres o nativas (Potapov, 2022). Su distribución se concentra en las áreas tropicales, sin embargo, es posible encontrar especies en ecosistemas templados (Schapheer and Villagra, 2017; Villagra and Schapheer, 2016) e incluso desérticos (Hawke and Farley, 1973; Grandcolas, 1996). En cuanto a su dieta, la gran mayoría de las especies descritas son detritívoras, aunque un gran número de especies se alimentan ocasionalmente de tejidos vegetales específicos, como polen, pétalos, frutos y brotes nuevos (Bell, 2007; Potapov, 2022). Debido a que este grupo habita en diversos ecosistemas y despliega una gran variedad de modos de vida, resultan un excelente modelo para estudiar la variabilidad de su sistema nervioso (Olsen et al, 2014; Mcgorry et al, 2014).

En Chile, se han descrito a la fecha 14 especies de cucarachas nativas (Schapheer et al., 2018), dentro de las cuales se encuentra el género *Moluchia* descrito por Rehn en 1890 y estudiadas en mayor profundidad por Schapheer y colaboradores (Schapheer et al., 2017; Villagra and Schapheer, 2016). Dentro de este género encontramos a *Moluchia brevipennis* Saussure, 1864 (Blattodea: Ectobiidae), una especie endémica (no plaga) de hábito crepuscular- nocturno que se encuentra fuertemente asociada a la flora nativa del matorral costero de la zona central de Chile (Schapheer et al, 2017). Esta cucaracha ha sido registrada visitando y alimentándose de recursos florales como polen y néctar de especies de bromeliáceas nativas como *Puya chilensis* y *Puya venusta*, y a otros

representantes de la flora nativa de las terrazas costeras como *Oenothera acaulis* (Onagraceae) y distintas especies de los géneros *Haplopappus* (Asteraceae) y *Nolana* (Solanaceae), entre otros (Schapheer et al, 2017). En un estudio de desacople sensorial realizado por Vergara et al. (2011), se determinó que la visita de *M. brevipennis* a *O. acaulis* es principalmente guiada por el olfato (Vergara et al, 2011) y que la conducta de desplazamientos en el contexto de forrajeo se caracteriza por frecuentes oscilaciones y contactos antenales (Okada 2006; Baba, 2010), sugiriendo que en estas cucarachas nativas el olfato es una de las principales modalidades sensoriales involucradas durante el forrajeo.

La distribución de esta especie disminuye drásticamente en lugares antropizados como ciudades y pueblos aledaños a la costa. Estos sectores poseen altos niveles de contaminación, presencia de basurales y sitios eriazos donde la vegetación nativa se ha eliminado por completo. A pesar de su hábito predominantemente costero, se ha encontrado a *Moluchia brevipennis* en plantaciones forestales poco intensivas de eucalipto en las Regiones de Valparaíso y Metropolitana de Santiago (Observaciones de terreno). De manera que, a pesar de ser una especie nativa del matorral costero, *M. brevipennis* ha sido capaz de sobrevivir a la presión de homogeneización biótica impuestas por la industria forestal. Por otro lado, en diversos puntos de la Región Metropolitana y de Valparaíso se ha registrado otra especie representante del género *Moluchia*. Este espécimen ha sido observado en jardines de sectores urbanos, semi rurales y al interior de viviendas, alimentándose de desechos orgánicos compostados (observaciones de terreno). Si bien esta especie aún no está descrita resulta interesante estudiarla por ser filogenéticamente cercana a *M. brevipennis*, pero presenta un hábito diferente asociado a ambientes más urbanos. A esta especie la llamaremos *Moluchia sp.* a lo largo de esta tesis.

Paisajes olfativos contrastantes.

Las plantas emiten odorantes volátiles desde sus estructuras vegetativas y reproductoras. La composición química y la concentración de volátiles dependen no

sólo de la especie, sino también de sus interacciones bióticas y abióticas. Por ejemplo, frente a la herbivoría por parte de insectos, varias especies de plantas liberan terpenos y sesquiterpenos asociados a la defensa y comunicación entre plantas (Tumlinson, 2014; Verdeguer et al, 2020). Además, se ha documentado que ensamblajes vegetacionales de determinadas composiciones y estructuras generan microclimas que afectan la liberación local de ciertos volátiles y pueden alterar las características de las plumas de olor en cuanto a su forma, tamaño y linealidad de propagación (Randlkofer et al, 2010). Por otra parte, una gran variedad de estudios ha investigado cómo la heterogeneidad vegetal afecta el desempeño y orientación de los insectos (Kagata and Ohgushi, 2006; Amarawardana et al, 2007; van Rensburg et al, 2020;). De modo que a mayor biodiversidad vegetal, mayor es la complejidad estructural de los ecosistemas, lo que a su vez genera un aumento en la complejidad química afectando así la búsqueda de alimentos por parte de insectos (Randlkofer et al, 2010).

En la terraza costera de los Molles (Chile central) se han documentado alrededor de 300 especies de plantas vasculares con un 57% de endemismo (Lund and Letellier, 2012) que presentan una estrecha asociación con insectos tanto en este ecosistema y como en ecosistemas aledaños (Schapheer et al, 2017; Vargas et al, 2018; Guerrero et al, 2019; Villagra et al, 2021). Por otro lado, si bien los eucaliptus liberan una amplia gama de metabolitos volátiles y no volátiles (Sørensen, 2020), las plantaciones forestales presentan una menor biodiversidad de especies formando un ecosistema homogéneo y por ende con una menor complejidad estructural. Esto sugiere que en las plantaciones de eucalipto existe una menor complejidad química y con dinámicas distintas a lo que ocurre en el matorral costero. En el caso de la zona centro de Chile las plantaciones de eucalipto, hasta el año 2016 ocupaban 57.525 hectáreas entre las regiones de Coquimbo y Valparaíso (CONAF, 2023), reemplazando con esta especie exótica grandes parches de bosque y matorral costero. Dado que las cucarachas endémicas *Moluchia brevipennis* se encuentran en ambos tipos de ecosistema, representan un buen caso de estudio para evaluar cambios en el nicho trófico y su posible correlación con cambios a nivel neuroanatómico.

Formulación de la propuesta:

Dado que estudios previos muestran una asociación entre las experiencias olfativas y alimentarias tempranas y el desarrollo de los órganos del sistema olfatorio, se propone que ambientes con paisajes olfativos y ofertas alimentaria distintas podrían incidir sobre el desarrollo y engrosamiento de glomérulos de las cucarachas endémicas del género *Moluchia* (Blattodea: Ectobiidae). Para ello, se estudió la neuroanatomía del lóbulo antenal de estos insectos, con énfasis en la cantidad y volumen de glomérulos, y su posible asociación con la dieta natural, estimada a través del estudio de su nivel trófico, y de la amplitud de nicho isotópico, en poblaciones de *Moluchia sp.* de ecosistemas con distintos grados de intervención antrópica.

Hipótesis

La cantidad y el volumen de los glomérulos en el lóbulo antenal de *Moluchia sp.* están relacionados con la especialización trófica de cada población. *Predicciones:* se espera que las cucarachas de hábitats simplificados (sectores urbanos y plantaciones de eucaliptos) presenten un menor número y volumen de glomérulos debido a una menor diversidad en su dieta, lo que refleja una adaptación a nichos tróficos menos variados y niveles tróficos más altos, en comparación con las cucarachas de ecosistemas nativos.

Objetivo general

Comparar la posición trófica y amplitud del nicho isotópico de cucarachas endémicas del género *Moluchia sp.* pertenecientes a ecosistemas nativos vs ecosistemas intervenidos y correlacionarlo con el volumen y número de glomérulos de sus lóbulos antenales.

Objetivos específicos:

- a) Comparar el nicho trófico de este insecto nativo a través del análisis de isotopos estables, específicamente a través del cambio de nivel trófico y la amplitud de sus nichos isotópicos.
- b) Describir el lóbulo antenal, neuropila de primer orden asociada al olfato en *Moluchia sp.*
- c) Identificar y describir los glomérulos presentes en el lóbulo antenal.
- d) Comparar el número, volumen y estructura de los glomérulos entre distintas poblaciones.
- e) Evaluar la correlación entre el número y tamaño de los glomérulos del lóbulo antenal con el nicho trófico de las cucarachas.

Metodología

Animales

Se colectaron un total de 47 individuos del género *Moluchia spp.* (moluchias) en tres hábitats con distintos grados de intervención antrópica: matorral costero (*M. brevipennis*, n=23, 10 machos, 13 hembras), plantación de eucaliptus (*M. brevipennis*, n=14, 6 machos, 9 hembras) y sector urbano en la precordillera del sur de Santiago (*Moluchia sp.* n=10, 3 machos, 7 hembras) (Figura 2.A.).

En octubre de 2022 y enero de 2023, se realizaron trabajos de terreno en las terrazas costeras de matorral de Pichidangui en la IV Región (32°09'02.9"S 71°31'40.1"W). En este sitio, se obtuvieron individuos de la especie *Moluchia brevipennis* mediante colecta directa al atardecer. Los individuos fueron encontrados bajo troncos, sobre flores nativas (*Nolana crassulifolia*, *Equinopsis chiloensis*, *Carpobrotus chilensis*, *Alstroemeria pelegrina*: Figura 2B) y desplazándose por sectores abiertos. Para la zona de plantación de eucaliptus, se visitaron tres sitios: la Reserva Nacional Lago Peñuelas de la V Región (33°10'53.5"S 71°29'53.9"W), en diciembre de 2022 (n=3, 2 machos, 1 hembra), la zona interior de Pichidangui en un sitio con alta cobertura de eucaliptus (32°08'40.2"S 71°31'18.0"W) en enero de 2023 (n=6, todas hembras) y el sector de Laguna Verde (33°04'57.9"S 71°39'27.7"W) en la comuna de Valparaíso en mayo y septiembre de 2023 (n=5), todos los individuos de esta población fueron hallados entre la hojarasca o bajo troncos (Figura 2C). En diciembre de 2022 y enero de 2023, se colectaron individuos del género *Moluchia sp.* bajo troncos y al interior del compost en un sector semi urbanos de la precordillera de Santiago (33°30'53.6"S 70°32'34.9"W), ésta especie de cucarachas se encuentra en proceso de descripción (n=10, 7 hembras, 3 machos). Los organismos capturados vivos se conservaron en bolsas de plástico *Ziploc* junto con el sustrato correspondiente a cada lugar y luego traspasados a potes de plástico rígido, hasta su procesamiento en el laboratorio. Los individuos capturados fueron identificados según la ficha de categorización realizada por Schapheer & Villagra (2017). Su sexo se determinó en adultos según las diferencias presentadas en la placa subgenital: presencia de estilos y paraproctos asimétricos en machos, ausencia de

estilos y paraterjitos asimétricos en hembras (Bell, 2007). Debido a la baja cantidad de muestras y la falta de evidencia de dimorfismo sexual en el LA (Watanabe et al, 2010), no se hizo una distinción entre machos y hembras en este estudio. Mediante fotografías tomadas con lupa bajo papel milimetrado y el software ImageJ, se midió el ancho de cabeza y largo del cuerpo de cada individuo colectado.

Luego de identificados los especímenes, cuerpo y cabeza fueron separados para distintos procedimientos. Los cuerpos fueron conservados en alcohol 70º y las cabezas se fijaron inmediatamente para la posterior disección.

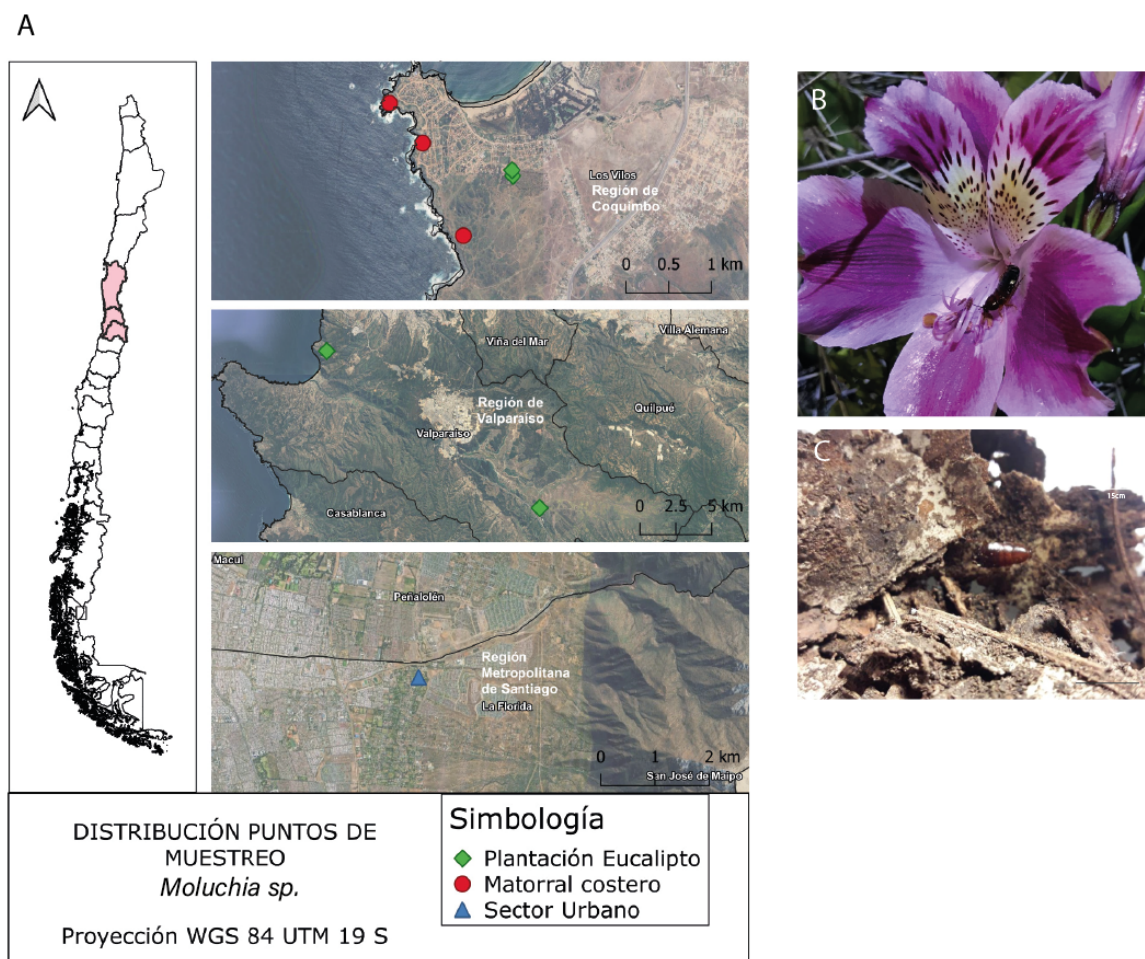


Figura 2. Puntos de muestreo en las regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana **(A)** Mapa de Chile destacando en foto satelital Google Earth® donde se muestran los puntos de muestreo. **(B)** *Moluchia brevipennis* sobre *Alstroemeria pelegrina* de matorral costero. **(C)** *Moluchia brevipennis* sobre hojarasca de plantación de eucaliptus, foto perteneciente a Constanza Schapheer.

Análisis de Isotopos estables

El sistema digestivo de las cucarachas fue separado del resto del cuerpo. Los intestinos, el buche y el aparato reproductor fueron conservados en alcohol 70° para estudiar su contenido estomacal. Con el resto del cuerpo, principalmente musculatura y exoesqueleto, se obtuvieron las muestras para el análisis de isótopos estables. En primer lugar, se secaron los tejidos en un horno a 60°C por 24 horas para eliminar la humedad, posteriormente fueron molidos y homogenizados con un mortero de cerámica y finalmente se guardaron ~2 mg de muestra en tubos ependorff. Las mediciones de isótopos se realizaron en el *Stable Isotope Facility* de la Universidad de Antofagasta (UASIF), Chile. Aquí se enviaron 10 muestras de cada población, además de pellet de pez y cuatro muestras correspondientes al tejido de cucarachas alimentadas exclusivamente de pellet de pez, para estimar el enriquecimiento a través de los niveles tróficos. Se llegó a la razón isotópica $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$ mediante la siguiente ecuación:

$$\delta X = [R_{muestra} / R_{estandar} - 1] \times 1000 \text{ ‰}$$

Expresada en unidades per mil ‰ donde, R corresponde a las razones isotópicas pesadas vs ligera de cada elemento ($^{13}C/^{12}C$ y $^{15}N/^{14}N$). Los valores estándar fueron los de VPDB para C y nitrógeno atmosférico para N. Con estos valores se estudió el nivel trófico de las poblaciones y la amplitud de sus nichos tróficos.

Se calculó el nivel trófico para cada individuo de las poblaciones de *M. brevipennis* presentes en la costa y en plantaciones de eucaliptus. Para este cálculo se utiliza la ecuación propuesta por Prost (2002).

$$Posición\ trófica = 1 + \frac{\delta^{15}N_{cucaracha} - \delta^{15}N_{base}}{\Delta^{15}N}$$

$\Delta^{15}N$ corresponde al enriquecimiento de ^{15}N a través de los niveles tróficos, o factor de enriquecimiento (FE). Este valor corresponde a la diferencia entre el valor isotópico de los tejidos de un organismo y su dieta. Para esto, se criaron cucarachas desde

estadios ninfales, alimentándolas exclusivamente con pellet de pez, que permitió el crecimiento y muda de las cucarachas, a diferencia de otros alimentos que fueron probados. Luego de 3 mudas se procesaron las muestras y el pellet para obtener $\delta^{15}N$ de cada uno y calcular el enriquecimiento a través de los niveles tróficos $\Delta^{15}N = \delta^{15}N_{tejido} - \delta^{15}N_{dieta}$. Para conocer la marca isotópica de los productores primarios en cada ecosistemas o marca isotópica de la base del nivel trófico, se utilizaron las marcas isotópicas obtenidas el año 2022 de plantas costeras de Pichidangui y de eucaliptus de la Reserva Nacional Lago Peñuelas (Schapheer, resultados no publicados).

Por otro lado, el grado de especialización trófica de las poblaciones (Matorral costero, plantación de eucaliptus y sector urbano), se estimó mediante la amplitud de nicho isotópico utilizando el área de distribución de los valores de $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$. Para esto, se utilizan los valores de la elipse estándar (SEA) y la elipse corregida para tamaños de muestra pequeños (SEA_c) (Jackson et al., 2011). Este último, corresponde a una medida promedio del nicho isotópico de la población. Por otro lado, se calculó la estimación Bayesiana de SEA (SEA_B) para comparar los nichos isotópicos entre poblaciones. Para esto se utilizaron 20.000 iteraciones, las cuales permitieron estimar la probabilidad de que un área de nicho isotópico de una población sea menor que otra. Para la estimación de SEA_c y SEA_B se utilizó SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses) paquete complementario de R (R development Core Team 2023). El contenido estomacal de cada población también fue estudiado con observaciones cualitativas, las muestras disecadas del buche fueron montadas en un portaobjetos y teñidas con azul de metileno o lugol para ser observadas en microscopio óptico.

Fijación y disección de cerebros

Para esta etapa, nos basamos en el protocolo descrito por Ott (2008), en el cual se fijan los tejidos y disecciona el cerebro bajo zinc formaldehído (ZnFA) (1%) y HEPES buffer salino (HBS), en lugar de paraformaldehído (PFA 4%) y buffer fosfato salino (PBS) (0.01M) respectivamente. Luego de ser sacrificados, las cabezas de los individuos fueron sujetos en una placa con cera de abeja y parafina, bajo lupa y con la ayuda de unas pinzas finas, se abrió una ventana del exoesqueleto en la parte frontal de la cabeza,

bajo HBS. El tejido conectivo y la musculatura fueron retirados para exponer el cerebro, luego estas cabezas fueron fijadas en tubos Eppendorf de 2ml con ZnFA 1% durante 20 h para la fijación. Los lavados y la disección de los cerebros se llevaron a cabo bajo HBS y posteriormente las muestras fueron deshidratadas y rehidratadas con concentraciones crecientes (30 min en cada solución) y luego decrecientes (10 minutos en cada solución) de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y 100%). Luego de la rehidratación las muestras se incubaron en suero de caballo al 5% (NHS, por sus siglas en inglés) en PBS tritón (PBSt) al 0,2% por una hora para bloquear sitios no específicos. Al finalizar la incubación se lava tres veces con PBSt por 1 hora y 15 minutos

Inmunohistoquímica

El anticuerpo primario, anti-sinapsina 3C11 (anti-SYNORF1) obtenido de Hibridoma Bank Iowa, se une a la proteína sinapsina propia de vesículas pre sinápticas (Huttner, 1983) por lo que es útil para el marcaje de neuropilas y ha sido utilizada exitosamente en insectos no modelo (Ott, 2008; Groh and Rössler, 2011). Éste, se diluyó en una proporción de 1:50 en NHS al 5% en PBSt y se dejó incubar por seis días. Tras este periodo, la muestra se lavó por una hora y cuarto, tres veces con PBSt (0,2%), y se incubaron durante 3,5 días con el anticuerpo secundario Invitrogen Alexa flúor 488 goat-anti mouse IgG2b diluido en la proporción de 1:100 con 5% NHS en PBSt. Finalmente se realizaron tres lavados en PBSt de 1,25 horas, se incubó en DAPI (1:5k) durante 40 min y luego de tres lavados de una hora en PBSt, el tejido se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol en agua destilada, (30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% \times 2) 30 minutos por cada solución y por último para aclarar el tejido se conservó en metil salicilato. Cada cerebro se montó completo en una placa portadora de objetos metálica con un agujero en el centro, donde se depositó el cerebro embebido en metil salicilato, y se cubrió por ambos lados con cubre objetos cuadrados.

Microscopia y análisis de imágenes

Los cerebros fueron observados con el microscopio confocal Zeiss LSM 710 equipado con láser HeNe de la unidad de microscopía avanzada del Departamento de Biología de la Universidad de Chile. Se obtuvieron pilas de imágenes correspondientes a los cortes ópticos de la totalidad del cerebro, estas pilas o *stack* de imágenes se obtuvieron de ventral a dorsal. Se utilizó un aumento de 1000X para visualizar el cerebro completo con un espaciamiento entre los cortes ópticos de entre 7 – 10 μm y un aumento de 2000X para obtener mas detalle del lóbulo antenal con un espaciamiento de $\sim 2\mu\text{m}$ hasta lograr un escáner completo de la estructura. La excitación del anticuerpo secundario con se realizo con láser HeNe a 543nm y la resolución en el plano XY de 1024x1024 pixeles.

Posteriormente las imágenes fueron analizadas y procesadas con el software de dominio público FIJI. Con el plug-in “Segmentation editor” se delimita manualmente cada estructura y se calcula su área plano a plano, además permite generar una reconstrucción en 3D de cada una de ellas. El cálculo del volumen de las distintas estructuras se llevó a cabo mediante la técnica estereológica (Royet, 1991), con la siguiente fórmula:

$$V = d \sum_{i=1}^n A_i$$

Donde V corresponde al volumen, d corresponde a la distancia entre dos secciones, n al número de apilamientos (*stacks*) o secciones a estudiar y A al área de cada plano. Por lo tanto, el cálculo se llevó a cabo sumando el área de cada imagen multiplicada por los micrones de espaciamiento entre cada una. En el caso de los glomérulos, estos fueron seleccionados y numerados de ventral a dorsal y numerados de manera creciente. Estudios previos demuestran que los glomérulos tienen una identidad morfológica y posicional (Watanabe et al., 2010), por lo que en este trabajo los glomérulos se identificaron por su forma y posición relativa en el espacio y posteriormente clasificados según su tamaño: pequeño (P): glomérulos menores a $1,5 \times 10^4 \mu\text{m}^3$;

mediano (M): glomérulos entre $1,5 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ y menores a $3,0 \times 10^4 \mu\text{m}^3$; grande (G): glomérulos entre $3,0 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ y menores a $6,0 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ y extra grande (XG): glomérulos mayores o iguales a $6,0 \times 10^4 \mu\text{m}^3$.

Estadística

Todos los cálculos estadísticos y gráficas son realizados en el software *R studio* (R development Core Team 2023). Se realizaron pruebas de normalidad con el test Shapiro Wilk. Para comparar los datos con distribuciones normales se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y para los datos sin distribución normal se aplican los test no paramétricos: Kruskar-Wallis, el test Kormogorov-Smirnov para comparar la distribución de los datos y el test Kruskar-Wallis de dos vías para datos no paramétricos: Scheirer Ray Hare, para analizar qué factores inciden en las diferencias volumétricas de los glomérulos. El nivel de significancia se estableció en $\alpha=0,05$ para todas las pruebas estadísticas realizadas.

Resultados

Morfología Externa

Se colectó un total de 47 muestras en los tres ecosistemas descritos (Figura 2). De ellas, se midieron tres parámetros externos para comprobar diferencias anatómicas entre las poblaciones estudiadas, largo del cuerpo, ancho cabeza y peso (Figura 3.D,E,G). Estas cucarachas presentaron un largo de $16,3 \pm 0,3$ mm en promedio, con un valor máximo de 22,6 mm en cucarachas de la costa y un valor mínimo de 12,7 mm para la cucaracha *Moluchia sp.* de sector urbano, pesando en promedio $0,174 \pm 0,008$ mg. Tanto para el largo del cuerpo como para el peso, no se encontraron diferencias entre las poblaciones (ANOVA: largo $F_{(2,44)}=2,158$, p: 0,128 y peso $F_{(2,34)}=1,565$, p=0,224). Sin embargo, se encontró que el ancho de la cabeza difiere entre los tres grupos de *Moluchia sp.* estudiados, (ANOVA $F_{(2,43)}= 6,251$, p =0,004) en particular el grupo de *Moluchia brevipennis* del matorral costero tiene un ancho de cabeza significativamente mayor que el de las otras poblaciones (test tukey HSD: costa vs eucalipto p=0,03; costa vs urbano:p<0,01) con un promedio de $2,93 \pm 0,04$ mm (Tabla 4)(Figura 3.E). Curiosamente, al comparar el ancho de la cabeza estandarizado por largo del cuerpo, no encontramos diferencias significativas entre las poblaciones (Kruskal Wallis: $H(2)=0,12$; p=0,9)(Figura 3.F).

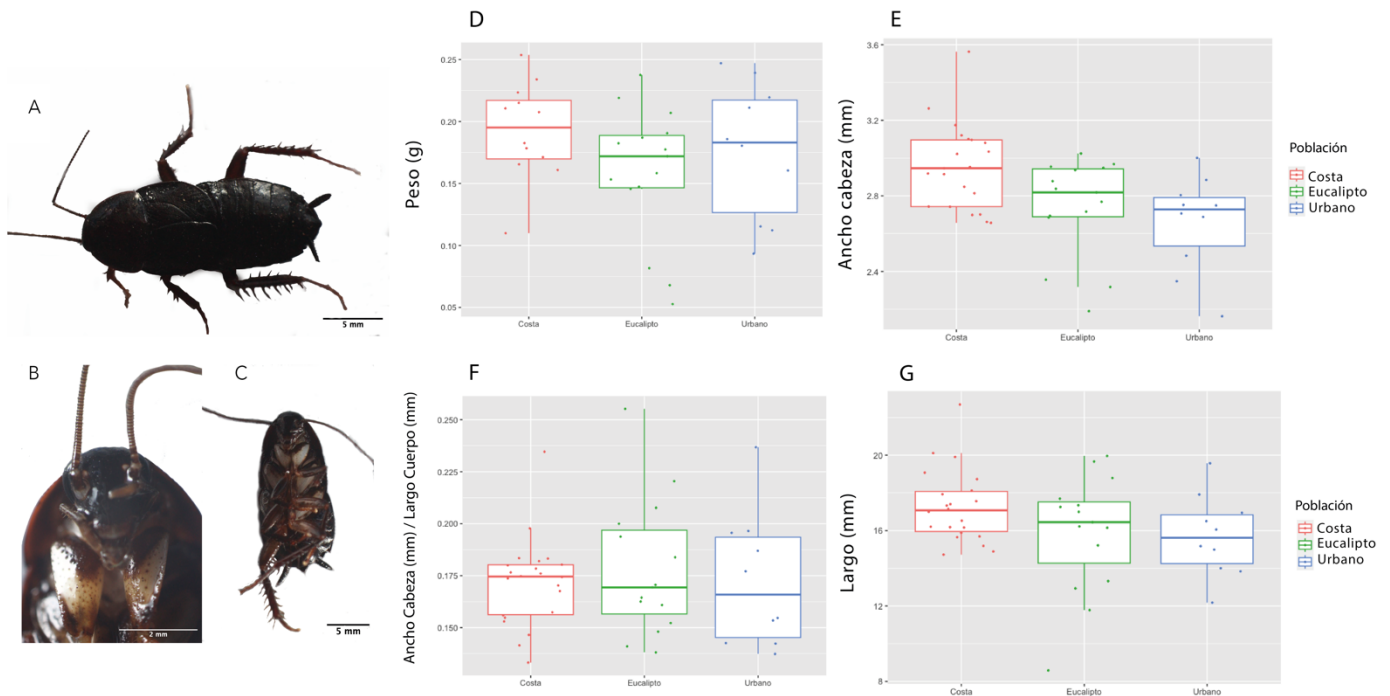


Figura 3: Características y mediciones morfológicas de *Moluchia spp.* **(A)** Vista dorsal de *Moluchia brevipennis* hembra, **(C)** vista ventral de *Moluchia brevipennis*. Las barras indican 5 mm. **(B)** Vista ventral anterior de *M. brevipennis*, con énfasis en su cabeza y apéndices cefálicos, la barra blanca indica 2 mm. **(D)** Gráfico de cajas del peso de los individuos para las tres poblaciones **(E)** Gráfico de cajas del ancho de cabeza para las tres poblaciones, con diferencias significativas para las cucarachas de la costa (ANOVA $F_{(2,43)} = 6,251$, $p = 0,004$). **(F)** Gráfico de cajas del ancho de la cabeza normalizado por el largo del cuerpo, no hay diferencias significativas entre las poblaciones (Kruskal Wallis $H(2) = 0,11$; $p > 0,05$). **(G)** Gráfico de cajas del largo de los individuos para las tres poblaciones en mm. n para cada medición está especificado en la tabla 3.

Caracterización del nicho trófico

Para caracterizar el nicho trófico de las poblaciones estudiadas, se estimó su nivel trófico, la amplitud del nicho isotópico y su contenido estomacal.

Posición trófica

Para estudiar el nivel trófico es importante considerar el factor de enriquecimiento (FE), es decir el aumento del valor de $\delta^{15}\text{N} \text{‰}$ entre la dieta y los tejidos. Para ello

analizamos la marca isotópica de distintos tejidos de cucarachas alimentadas exclusivamente con pellet de pez a lo largo de tres mudas hasta llegar al estadio adulto. Estos tejidos fueron, exoesqueleto, musculatura y una mezcla de tejidos (cuerpo entero eliminando la cabeza y el intestino). Obtuvimos un valor de $\delta^{15}\text{N}$ de 6,77 ‰ para la dieta (pellet de pez). Mientras que el exoesqueleto presentó una disminución en $\delta^{15}\text{N}$ ‰ con un valor de 5,61‰, tanto la musculatura como la mezcla de tejidos presentaron un enriquecimiento en $\delta^{15}\text{N}$ con valores de 7,09 ‰ y 7,37‰ respectivamente (Figura 4). Sin embargo, sólo la mezcla de tejidos presentó además un enriquecimiento en $\delta^{13}\text{C}$ ‰ de modo que se consideró la marca isotópica de este tejido para calcular el FE de $\delta^{15}\text{N}$ resultando en 0,6‰ y de $\delta^{13}\text{C}$ resultando en 1,31‰.

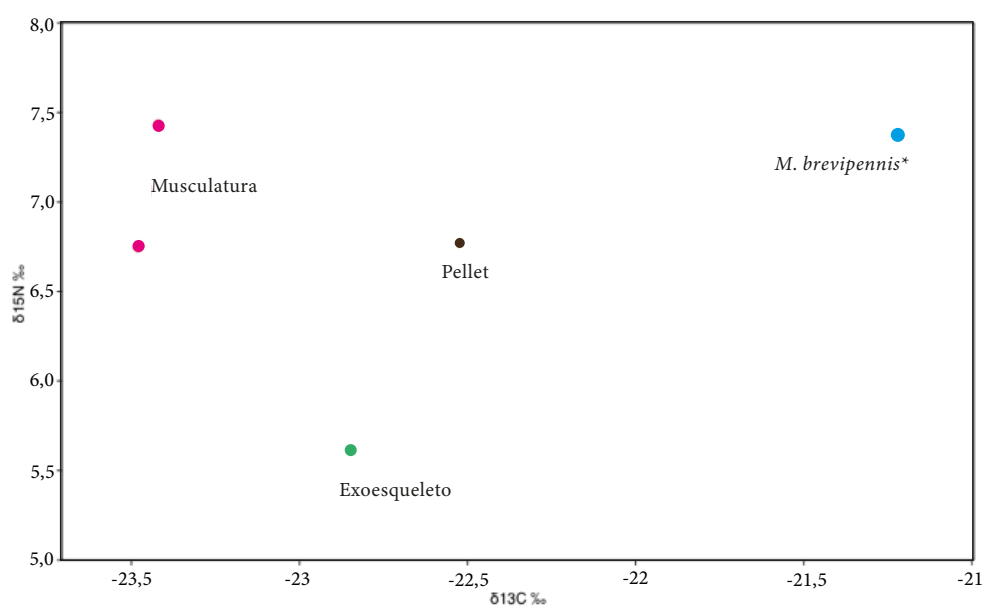


Figura 4. Marcas isotópicas a partir del experimento de dieta única. Puntos obtenidos del análisis de isótopos estables de distintos tejidos de cucarachas adultas alimentadas exclusivamente con pellet de pez a lo largo de 2 o más mudas. *M. brevipennis** corresponde al cuerpo del individuo con sistema digestivo, reproductivo y cabeza disecados.

Desafortunadamente, sólo pudimos obtener la marca isotópica de los productores primarios de la costa y de la plantación forestal (Tabla 1, obtenidos por Schapheer, 2022), de modo que sólo se estudió la posición trófica en cucarachas de la costa y eucalipto.

Tabla 1 Valores de $\delta^{15}\text{N}$ ‰ y $\delta^{13}\text{C}$ ‰ con su desviación estándar (SD) para la base de la red trófica de dos poblaciones de *Moluchia brevipennis*.

	$\delta^{15}\text{N}$ ‰	SD	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	SD
PLANTAS COSTA (n=4)	5,84	1,38	-28,10	1,18
EUCALIPTU (n=1)	-1,80	-	-27,94	-

Utilizando el valor de FE de $\delta^{15}\text{N}$ de 0,6‰ se obtuvo que las cucarachas costeras presentan un nivel trófico promedio de $3,9 \pm 1,9$, mientras que las cucarachas de plantaciones de eucaliptus obtuvieron un nivel promedio mucho mayor de $12,9 \pm 0,6$. Dado que los valores obtenidos se aleja de los reportados clásicamente, también se consideró el factor promedio de 3‰ a modo de comparación (DeNiro & Epstein, 1978, 1981). Con este valor de FE en $\delta^{15}\text{N}$ se obtiene que las cucarachas costeras presentan una posición de $1,6 \pm 0,4$ en la cadena trófica, es decir se estarían a la base de la cadena, mientras que las colectadas en plantaciones de eucalipto presentan un nivel trófico relativo de $3,4 \pm 0,1$ (ANOVA: $F_{(1,18)} = 18,86$, $p < 0,001$) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de posición trófica calculado para cada individuo de cada población, con el factor de enriquecimiento de $\delta^{15}\text{N}$ (FE) igual a 0,6‰ y 3‰. Para ambos casos se obtuvieron diferencias significativas entre ambas poblaciones (ANOVA: $F_{(1,18)} = 18,86$, $p < 0,001$).

Nivel Trófico

FE: 0,6 ‰		FE: 3 ‰	
<i>M. brevipennis</i> costa	<i>M. brevipennis</i> eucalipto	<i>M. brevipennis</i> costa	<i>M. brevipennis</i> eucalipto
-2,23	7,88	0,35	2,38
2,55	14,10	1,31	3,62
-1,50	13,21	0,50	3,44
2,11	13,66	1,22	3,53
1,65	13,57	1,13	3,51
-2,03	16,13	0,39	4,03
3,18	14,05	1,44	3,61
11,74	11,53	3,15	3,11
8,10	12,75	2,42	3,35
16,23	12,72	4,05	3,34

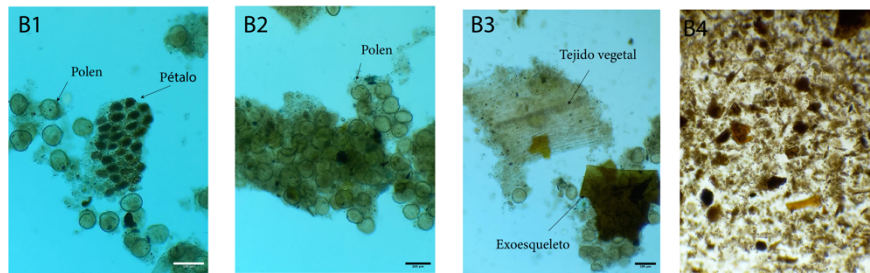
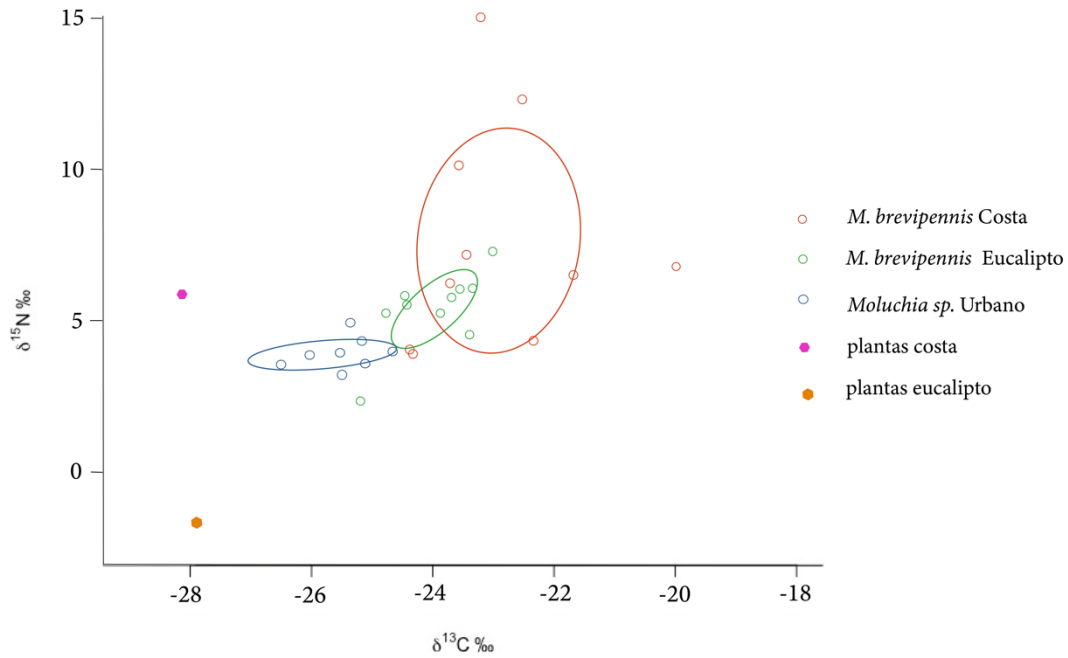


Figura 5. Amplitud de nicho isotópico para tres poblaciones de *Moluchia spp* y su contenido estomacal (A) Elipses estándar (SEAc) obtenido del análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno de tres poblaciones de cucarachas nativas (*M. brevipennis* y *Moluchia sp*). Los tejidos analizados fueron el cuerpo entero de los insectos con los sistemas digestivo, reproductivo y cabezas disecados. Además, se muestra la marca isotópica de hojas de eucalipto (naranja) y plantas costeras (rosado) B) Contenido estomacal de cucarachas obtenidas del matorral costero, teñidas con azul de metileno (B1, B2, B3), las barras corresponden a 100 μ m, y contenido estomacal de cucaracha obtenida en plantación forestal de eucaliptus teñido con lugol (B4).

Amplitud nicho isotópico

Para estimar el grado de especialización trófica a nivel de población, se estudió la amplitud del nicho isotópico a través del área estándar de las elipses (SEA y SEAc), estos resultados se presentan en la tabla 3 y muestran que las moluchias del matorral costero presentan áreas de mayor tamaño. Los análisis estadísticos de las elipses bayesianas (SEA_B) revelaron que existe una diferencia significativa en la amplitud de nicho

isotópico entre las cucarachas del matorral costero en relación a las otras dos poblaciones ($p=0$) y que hay un 32% de probabilidad de que las moluchias de sector urbano sean menores a aquellas provenientes de plantaciones forestales ($p=32,37$) por lo que no se puede asumir diferencia entre ellas. Para este estudio no se determinó el porcentaje de superposición entre elipses ya que las muestras pertenecen a ecosistemas distintos.

Tabla 3. Comparación entre poblaciones de las diferentes métricas de la amplitud de nicho isotópico para *Moluchia brevipennis* y *Moluchia sp.* a partir de las proporciones de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$). Se muestra el promedio \pm desviación estándar (SD). Área de elipse estándar (SEA), área de elipse estándar corregida por la muestra más pequeña (SEA_c) y área Bayesiana de elipse estándar (SEA_B).

	<i>M. brevipennis</i> Costa	<i>M. brevipennis</i> Eucaliptu	<i>Moluchia sp.</i> Urbano	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>P</i>
ANOVA						
$\delta^{15}\text{N} \text{‰} \pm \text{SD}$	7,63 \pm 3,7	5,37 \pm 1,2	3,86 \pm 0,5	6,35	2, 26	0,005
$\delta^{13}\text{C} \text{‰} \pm \text{SD}$	-22,92 \pm 1,3	-23,97 \pm 0,7	-25,85 \pm 1,2	16,75	2, 26	<0,001
SEA ‰^2	15,55	2,07	1,78			
$SEA_c \text{‰}^2$	17,50	2,33	2,03			
SEA_B	17,25	2,48	2,03			

Contenido estomacal

Obtuvimos una enorme abundancia de polen en casi todas las muestras de cucarachas pertenecientes al matorral costero, el que se destaca por ser trilobulado de 10 μm de diámetro. Además, se encontraron restos vegetales que se identificaron como pétalos debido a la coloración y densidad celular (Cavallini-Speisser, 2021), tejido vegetal que podría pertenecer a tallos o raíces debido a la organización de sus células y restos de exoesqueleto. Por otro lado, en el sistema digestivo de cucarachas de plantaciones de eucalipto encontramos una enorme abundancia de pequeños elementos minerales y probables restos de exoesqueleto (Figura 5.B).

Neuropilas

Las cucarachas presentan un cerebro bilobulado compuesto de tres divisiones principales, protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (Figura 6.E). El protocerebro se caracteriza por presentar dos hemisferios, aquí se encuentran varias neuropilas entre ellas los cuerpos fungiformes (MB). Las moluchias presentan MB de dos cálices con sus lóbulos medial y ventral prominentes y laminados (Figura 6.A-C), similar a lo descrito para *P. americana* (Strausfeld, 2009; Farris and Strausfeld, 2001; Farris, 2003). El volumen del protocerebro en todas las poblaciones muestra una distribución normal (Shapiro-Wilk: $W=0,9$; $p = 0,07$) sin diferencias significativas entre ellas (ANOVA $F_{(2,10)} = 1,807$, $p: 0,21$, Figura 6.D), con un promedio de $1,16 \times 10^8 \mu m^3$. Sin embargo, no se encontraron diferencias estructurales importantes entre los cerebros de las distintas especies.

Lóbulo Antenal

En la zona postero ventral del cerebro se ubica el deutocerebro donde se encuentra el lóbulo antenal en ambos hemisferios (Figura 6). Esta neuropila se compone de glomérulos agrupados en racimos, formando en su conjunto una neuropila de forma ovalada, como se muestra en las imágenes de microscopía confocal (Figura 6.A1, A4) y en la reconstrucción de esta estructura (Figura 7.A). En cuanto al volumen de esta neuropila se encontró que las poblaciones no mostraron una distribución normal (Shapiro Wilk: $W=0,87$; $p = 0,04$) y no presentaron diferencias significativas entre sí (Kruskal Wallis $H(2)=1,6$; $p=0,45$) con un volumen promedio de $5,8 \times 10^6 \mu m^3$ (Figura 7.B). Al analizar el volumen del LA normalizado por el volumen del protocerebro tampoco se obtienen diferencias significativas entre las poblaciones (Kruskal Wallis $H(2)=2,2$; $p=0,33$), por lo tanto, no hay una sobrerrepresentación particular de esta neuropila con respecto al resto del cerebro en ninguna de las cucarachas estudiadas, aunque sí vemos que las cucarachas de la costa tienden a tener un mayor volumen que el resto de las poblaciones (Figura 7.C).

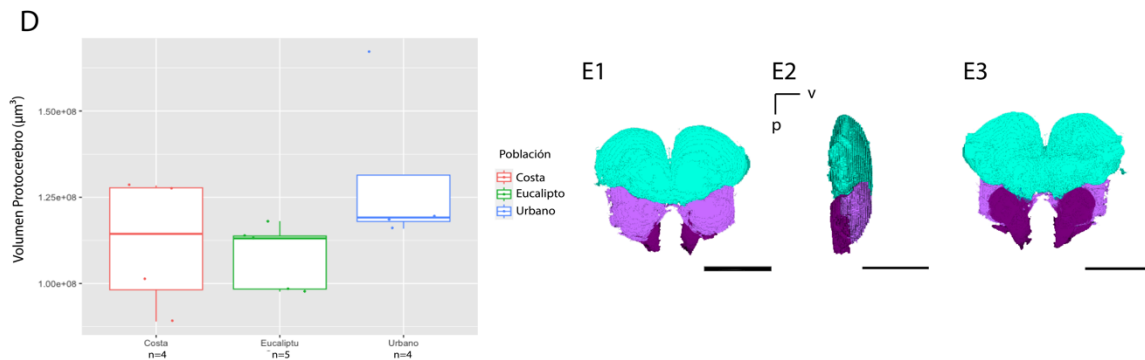
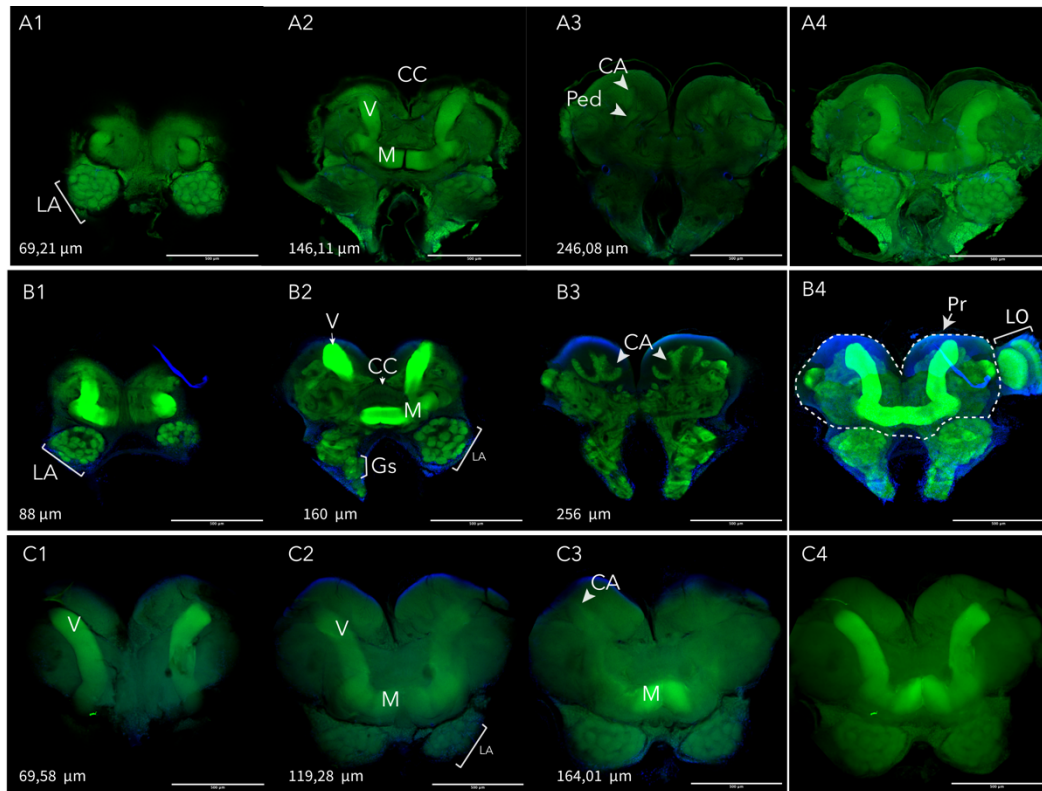


Figura 6. Inmunohistoquímica de cerebro entero de tres poblaciones de *Moluchia spp.* Serie de cortes ópticos de ventral a dorsal del cerebro de **(A)** *M. brevipennis* capturada en matorral costero, **(B)** *Moluchia brevipennis* capturada en plantación de eucaliptus, **(C)** *Moluchia sp.* colectada en sector urbano. A4, B4 y C4 muestran la proyección Z de la máxima intensidad, permitiendo visualizar el cerebro en su totalidad. Abreviaturas: LA: lóbulo antenal, CA: cálices del cuerpo fungiforme, M y V: Lóbulo medial y ventral del cuerpo fungiforme, Ped: pedúnculo del cuerpo fungiforme, CC: complejo central, Gs: Ganglio subesofágico, LO: lóbulo óptico, Pr: protocerebro (sin LO). **(D)** Comparación del volumen del protocerebro entre las distintas poblaciones, sin diferencias significativas entre ellas (ANOVA $F_{(2,10)} = 1,807$, $p = 0,21$) **(E)** Reconstrucción en 3D del cerebro de *M. brevipennis* dividido en tres macro regiones, protocerebro (celeste), deutocerebro (lila), tritocerebro (morado), en una vista ventral **(E1)**, lateral **(E2)** y dorsal **(E3)**.

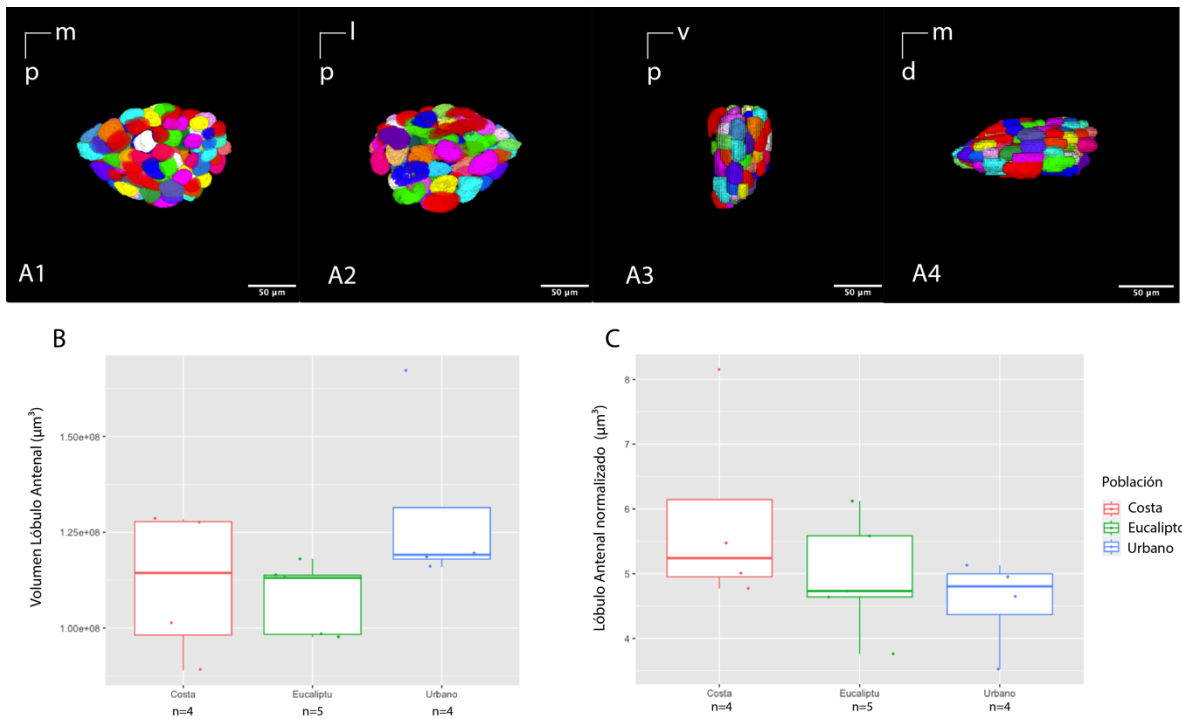


Figura 7. Reconstrucción de lóbulo antenal y comparación volumétrica entre tres poblaciones de *Moluchia spp* (A) Reconstrucción en 3D del lóbulo antenal, en vista ventral (A1), dorsal (A2), lateral (A3) y anterior (A4). Cada color corresponde al volumen de un glomérulo y la barra a 50 µm. (B) Comparación volumétrica del lóbulo antenal entre poblaciones sin diferencias entre ellas (Kruskal Wallis $H(2)=1,6$; $p=0,45$). y (C) comparación volumétrica del lóbulo antenal normalizado por el volumen del protocerebro entre poblaciones, sin diferencias significativas (Kruskal Wallis $H(2)=2,2$; $p=0,33$).

Glomérulos

Los glomérulos fueron identificados y nombrados con un número de menor a mayor según su orden de aparición de ventral a dorsal (Figura 8). Además fueron clasificados según su tamaño, $0 \leq$ pequeño (P) $< 1,5 \times 10^4 \mu m^3 \leq$ mediano (M) $< 3,0 \times 10^4 \mu m^3 \leq$ grande (G) $< 6,0 \times 10^4 \mu m^3 \leq$ extra grande (XG).

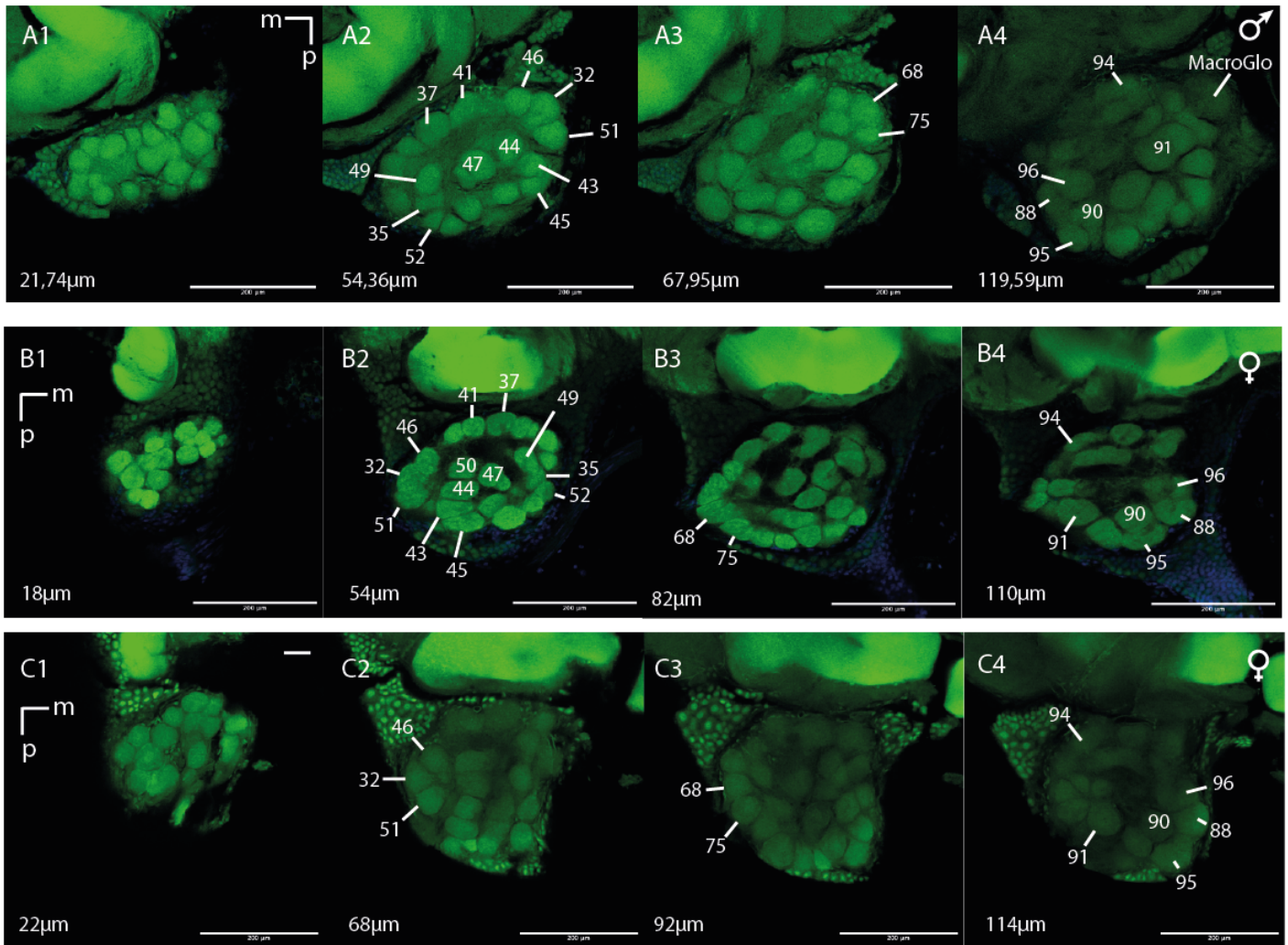


Figura 8. Inmunohistoquímica del lóbulo antenal de tres poblaciones de *Moluchia* spp. Cortes ópticos del lóbulo antenal presentados de ventral a dorsal (profundidad de corte óptico indicado en esquina izquierda de cada fotografía) de (A) *M. brevipennis* capturada en matorral costero, (B) *M. brevipennis* capturada en plantación de eucaliptus, (C) *Moluchia* sp. colectada en sector urbano. Los glomérulos fueron identificados con números crecientes de ventral a dorsal. La barra indica 200µm.

En la zona ventral los glomérulos se encuentran más apilados, son de forma esférica y tamaño P y M en más de un 80%, mientras que en la zona dorsal los glomérulos son de tamaño L y XL, presentan formas diversas y se ubican ordenadamente al borde de la neuropila dejando algunos glomérulos en el centro con espacio entre ellos (Figura 8. A2 y B2). En la zona dorso-posterior al deutocerebro, se ubica el tritocerebro donde hayamos de manera muy conspicua el ganglio sub-oesofágico (Gs de la Figura 6.B2).

Éste está compuesto de cuatro glomérulos de tamaños pequeños ubicados hacia medial con un diámetro de entre 28 y 41 μm y con un cúmulo de glomérulos muy pequeños de máximo 9 μm de diámetro agrupados en racimos muy condensados ubicados en la parte lateral del ganglio.

Para los análisis y comparaciones volumétricas de los glomérulos, contamos y medimos los glomérulos de tres individuos por población. En las tres poblaciones estudiadas, no se hallaron diferencias significativas en el número de glomérulos (ANOVA: $F_{(2,6)} = 0,47$ $p = 0,64$) con un promedio de $96 \pm 0,7$ (mínimo de 93 y un máximo de 101). Para los especímenes del matorral costero hallamos un volumen promedio de $4,4 \times 10^4 \mu\text{m}^3$. Para las cucarachas de plantación de eucalipto un volumen promedio de $3,4 \times 10^4 \mu\text{m}^3$. Finalmente, para las cucarachas de *Moluchia sp.* del sector urbano su volumen promedio fue de $3,6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ (Tabla 4).

Tabla 4. Cuadro resumen con el número de muestras (n), medidas promedio y desviación estándar (SD) de cada rasgo morfológico, volumen de neuropilas y numero de glomérulos para cada población.

	<i>Moluchia brevipennis</i> costa			<i>Moluchia brevipennis</i> eucaliptu			<i>Moluchia sp.</i>		
	n	Promedio	SD	n	Promedio	SD	n	Promedio	SD
Ancho cabeza (mm)	22	2,936	0,24	15	2,739	0,26	10	2,658	0,25
Largo cuerpo (mm)	22	17,276	1,94	15	15,889	3,10	10	15,717	2,15
Peso (g)	12	0,193	0,04	10	0,155	0,06	10	0,176	0,05
Vol protocerebro (μm^3)	4	$1,115 \times 10^8$	$1,96 \times 10^7$	5	$1,082 \times 10^8$	$9,487 \times 10^6$	4	$1,303 \times 10^8$	$2,452 \times 10^7$
Vol LA (μm^3)	4	$6,328 \times 10^6$	$7,12 \times 10^5$	5	$5,430 \times 10^6$	$1,373 \times 10^6$	4	$5,818 \times 10^6$	$1,738 \times 10^5$
LA/Proto *100	4	5,852	1,56	5	4,968	0,91	4	4,565	0,72
Nº glomérulos	3	95,6	1,25	3	96,6	1,53	3	96,3	4,16

Para realizar las comparaciones de volumen glomerular entre las poblaciones, consideramos siempre el volumen de los glomérulos normalizado por el volumen de su protocerebro (sin considerar el lóbulo óptico)(Figura 6.B4). Ningún individuo presentó una distribución normal en el volumen de sus glomérulos (Shapiro Wilk $<0,05$) por lo tanto, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis de dos vías: test de Scheirer Ray Hare para comparar diferencias de tamaño glomerular entre individuos y entre poblaciones. Posteriormente, se utilizó el test Kolmogorov-smirnov para comparar la distribución de volumen glomerular entre las poblaciones y por otro lado, utilizamos el test Chi cuadrado para comparar la cantidad de glomérulos de distintos tamaños entre las poblaciones.

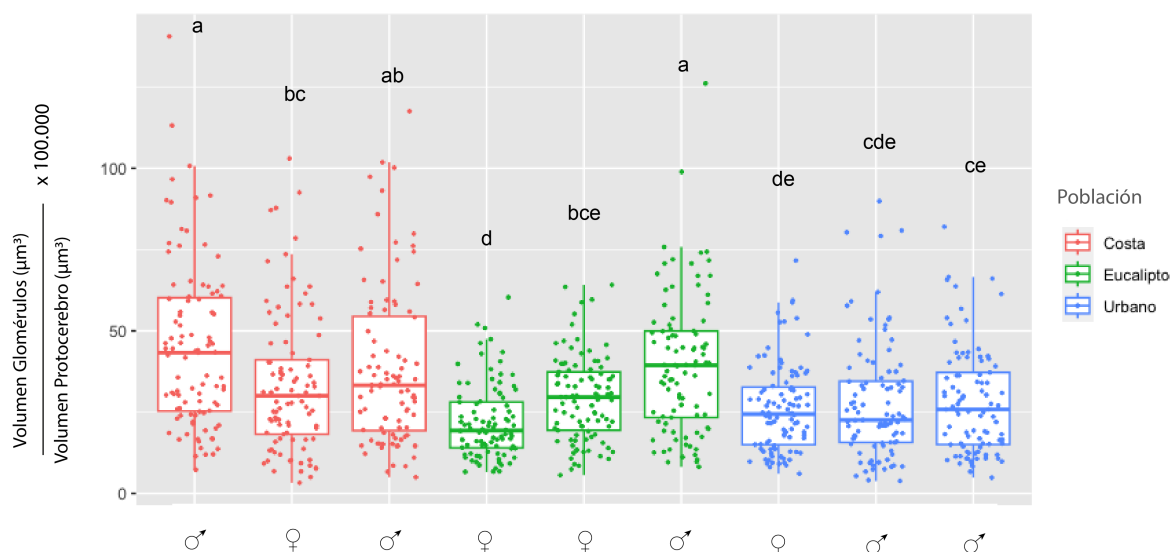


Figura 9. Comparación volumétrica de glomérulos entre individuos de *Moluchia spp.* de tres poblaciones Gráfico de cajas del volumen glomerular normalizado para cada individuo. Cada caja en el gráfico corresponde a los glomérulos de un individuo cuyo sexo está indicado en el eje x. Los colores representan la población a la que pertenece cada *Moluchia sp.* Las letras en la parte superior de cada caja corresponden a los resultados del test de Dunn, (test post hoc de Kruskal-Wallis) grupos con letras distintas indican diferencias significativas entre si ($p<0,05$).

Con los datos disponibles (3 individuos por población) hallamos que, a pesar de que existen diferencias entre los individuos, no podemos asumir diferencias en el volumen glomerular entre las tres poblaciones. (Scheirer Ray Hare: Individuos $H(6)=55$, $p<0,001$; Población $H(845)= 759$, $p=0,98$; Interacción $H(845)= 759$, $p=0,98$). De manera

interesante, las cucarachas del sector urbano son las que presentaron menor variabilidad (Figura 9).

Por otro lado, al graficar la distribución volumétrica de los glomérulos en histogramas de frecuencias, se observa una mayor heterogeneidad para los glomérulos de *M. brevipennis* de la costa, en relación a las cucarachas de plantaciones de eucalipto y de sector urbano, que presentan una mayor homogeneidad en los volúmenes (Figura 10). Se encontraron diferencias significativas en la distribución de los volúmenes entre la población del matorral costero y plantación de eucalipto (Kolmogorov-Smirnov: $D=0,17$, $p<0,001$) y entre matorral costero y sector urbano (Kolmogorov-Smirnov: $D=0,22$, $p<0,001$). Pero las poblaciones de plantación de eucalipto y sector urbano no presentaron diferencias entre sí (Kolmogorov-Smirnov: $D=0,1$, $p=0,09$) (Figura 10).

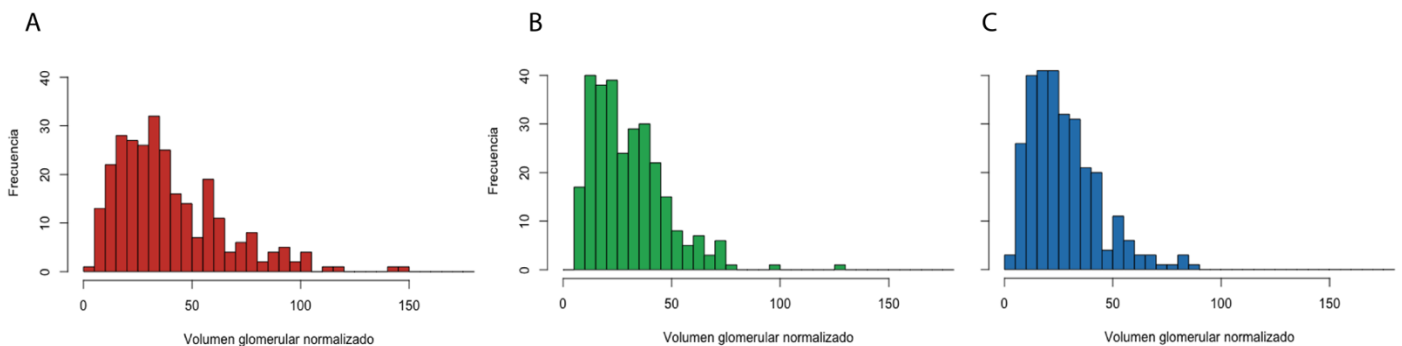


Figura 10. Distribución volumétrica de glomérulos en tres poblaciones de *Moluchia spp.* En cada histograma se grafican los volúmenes de glomérulos de tres cucarachas. El eje x indica el volumen normalizado por el protocerebro en intervalos de 5 unidades y el eje y indica la frecuencia o cantidad de glomérulos de cada intervalo. **(A)** Matorral costero en rojo, **(B)** Plantación forestal de eucalipto en verde y **(C)** *Moluchia sp.* de sector urbano en azul. Se hallan diferencias significativas entre la población costera y las otras poblaciones (Kolmogorov Smirnov: costa-eucalipto $D=0,17$ $p=0,0004$, costa-urbano $D=0,22$ $p=2,3e-6$, urbano-eucalipto $D=0,1$ $p=0,09$).

Como fue mencionado más arriba, los glomérulos se clasificaron en cuatro tamaños, pequeño (P), mediano (M), grande (G) y extra grande (XG). Al graficar el porcentaje de glomérulos de cada tamaño por individuo (Figura 11), se observa que los individuos del sector urbano son los que presentan una mayor homogeneidad entre sí, es decir no hay diferencias en la cantidad de glomérulos de cada tamaño entre los individuos (prueba de Chi-cuadrado: $X^2_{(6, N=289)}=4,8$; $p=0,5$). Lo contrario se encuentra en las poblaciones de plantación de eucalipto y costa donde se encontraron diferencias en la cantidad de glomérulos de cada tamaño entre los individuos (prueba de Chi cuadrado costa: $X^2_{(6, N=283)}=15,98$ $p=0,01$; prueba de Chi cuadrado eucalipto: $X^2_{(6, N=290)}=49,1$ $p<0,01$). Para estas dos poblaciones, los machos parecen tender a presentar una mayor proporción de glomérulos XG en relación a las hembras.

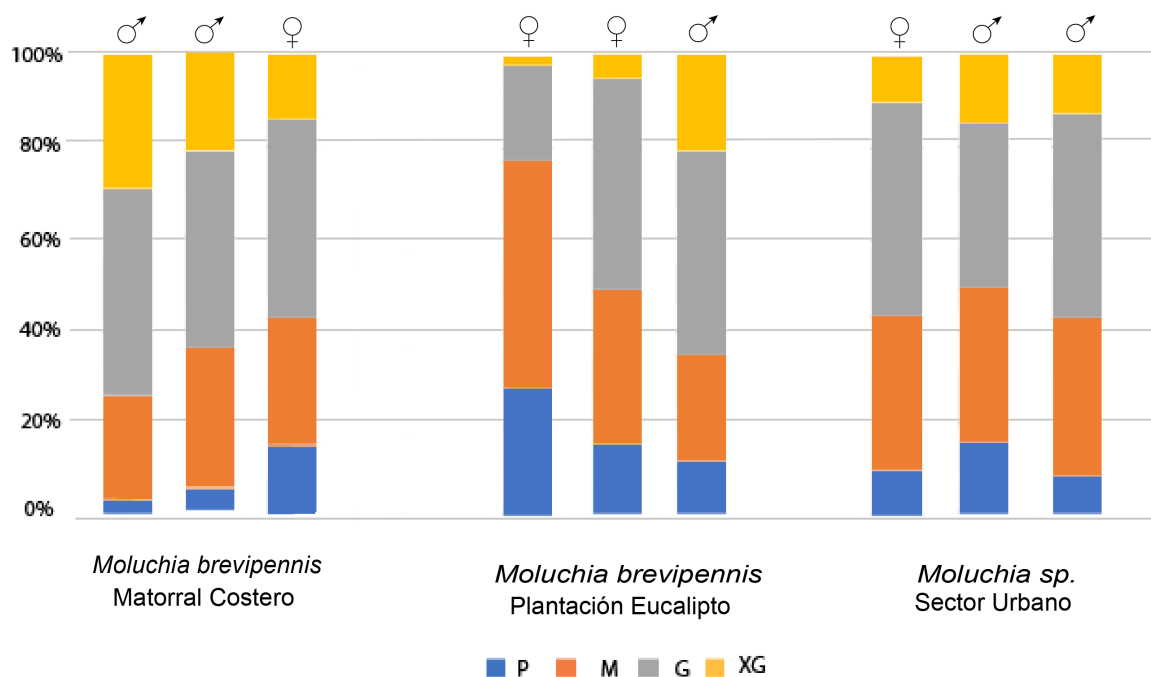


Figura 11. Cantidad de relativa de glomérulos de distintos tamaños (P, M, G y XG) expresada como porcentaje, para cada individuo de cada población. El sexo de cada individuo se indica en la parte superior de cada barra.

Ahora al comparar la proporción de glomérulos de los distintos tamaños entre las poblaciones, (Figura 12) se observa que el 21% de los glomérulos de las cucarachas costeras son de tamaño XG mientras que las otras poblaciones menos de un 13% de los glomérulos son de este tamaño. Por otro lado, el 7,8% de los glomérulos de cucarachas costeras son de tamaño P, mientras que en plantaciones de eucalipto un 18% son P y en sectores urbanos un 11%. Observamos que hay diferencias significativas en la proporción de glomérulos entre las tres poblaciones (Prueba de Chi-cuadrado $X^2_{(6, N=862)}=34,24$, $p<0,01$), con una mayor proporción de glomérulos XG en las cucarachas de matorral costero y una menor proporción de glomérulos pequeños.

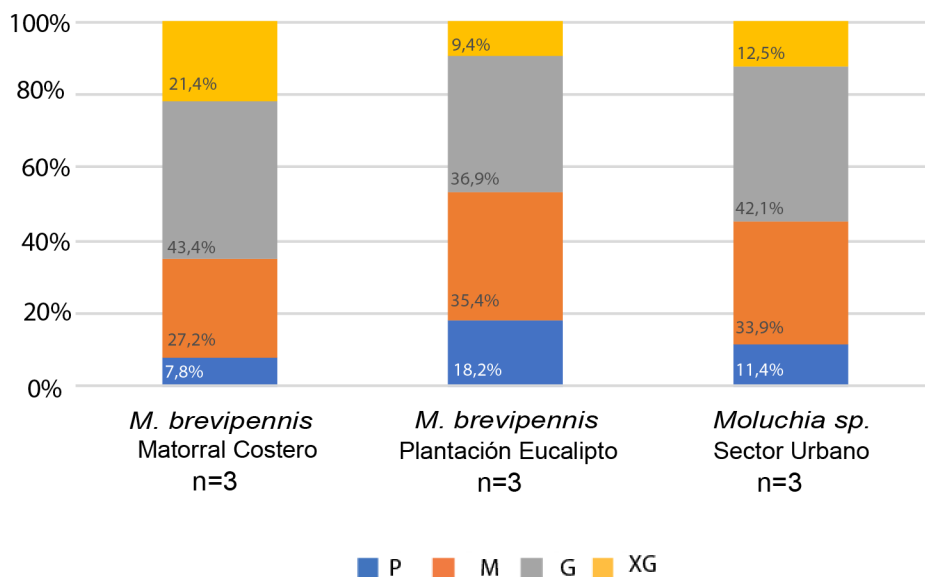


Figura 12. Cantidad de relativa de glomérulos de distintos tamaños (P, M, G y XG) expresada como porcentaje, para cada población. Prueba de Chi-cuadrado ($X^2_{(6, N=862)}=34,24$, $p<0,01$) indica diferencias significativas entre las poblaciones.

Por otro lado, fue posible identificar por su forma y posición a 13 glomérulos del LA en todas las cucarachas del matorral costero y de plantaciones de eucalipto. En *Moluchia sp.* (sector urbano) no fue posible identificar estos glomérulos en todos los individuos, por lo tanto, no fueron considerados en esta comparación. Estos glomérulos se encuentran en la zona más dorsal del LA y se caracterizan por ser de gran tamaño (M, G y XG), por su posición relativa y por sus formas conspicuas. Comparamos el volumen de estos glomérulos entre ambas poblaciones, para ello promediamos el volumen de cada glomérulo con los de su misma población (Figura 13) y realizamos la prueba de dos vías no paramétrica Scheirer Ray Hare para evaluar diferencias entre poblaciones y entre glomérulos de distintas identidades. Hallamos que hay diferencias entre los glomérulos estudiados y que para esta muestra existe una diferencia significativa entre ambas poblaciones (Scheirer Ray Hare: id Glomerular $H(12)=44$, $p<0,001$; Población $H(1)=3,7$, $p=0,05$; Interacción $H(12)=2,8$, $p=0,99$). Además, para esta muestra, se hallaron diferencias en la cantidad de glomerulos M y XG entre ambas poblaciones (Pueba de Chi-cuadrado: $X^2_{(2,N=76)}=9,27$, $p=0,009$), siendo la población costera la que presentó menos glomérulos M y más glomérulos XG.

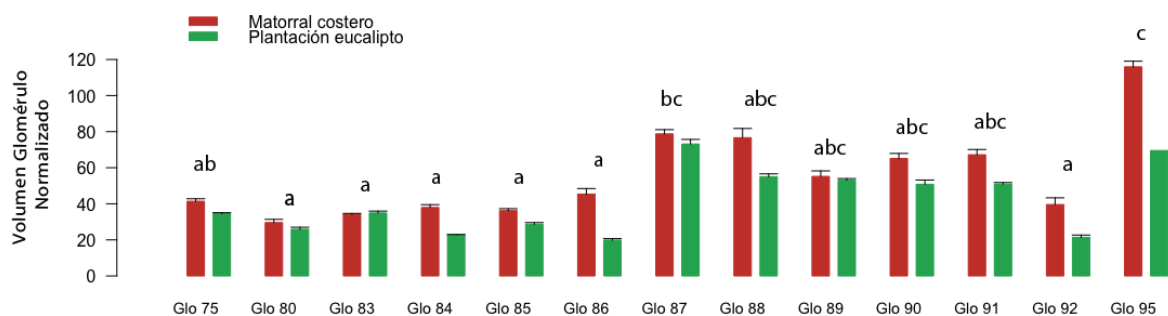


Figura 13. Comparación volumétrica entre glomérulos específicos de dos poblaciones. Matorral costero y plantación de eucaliptos. Cada barra representa el promedio de 3 glomérulos. Las letras en la parte superior de cada par de barra corresponden a los resultados del test de Dunn, (test post hoc de Kruskal-Wallis) glomérulos con letras distintas indican diferencias significativas entre sí ($p<0,05$). Se indica el error estándar en la parte superior de cada barra.

Dimorfismo sexual.

En las cucarachas macho fue posible identificar un glomérulo notablemente más engrosado que en hembras, este dimorfismo entre machos y hembras sugieren una relación de esta estructura con la percepción de feromonas. Este macroglomérulo se ubica en la zona dorso-lateral del LA (Figura 8. A4) cerca de la zona por donde ingresa el nervio antenal a la neuropila (Figura 1). En machos este glomérulo alcanza un volumen promedio de $1,97 \times 10^5 \mu m^3$, mientras que en hembras alcanza un promedio de $3,63 \times 10^4 \mu m^3$, es decir, el macho desarrolla un glomérulo cinco veces mayor que el de las hembras (Figura 14).

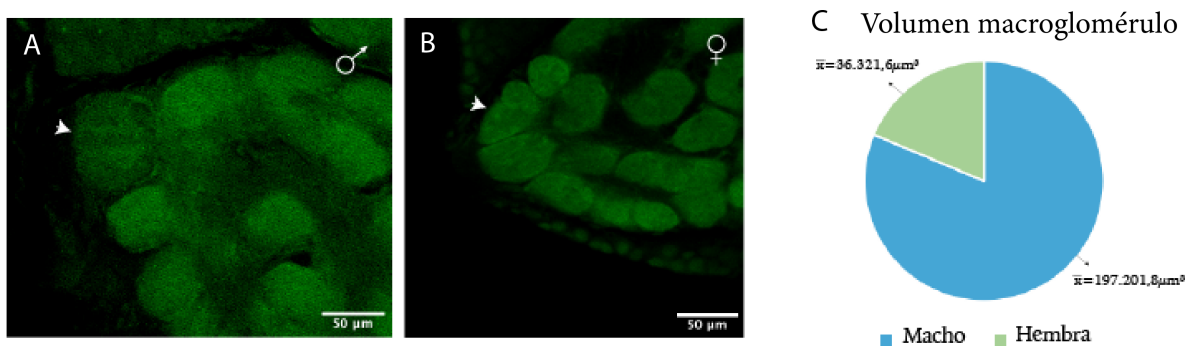


Figura 14. Macroglomérulo de *Moluchia spp.* se muestra la diferencia en forma y tamaño del macroglomérulo hallado en macho (A) y hembra (B) la barra corresponde a 50µm en ambos casos. Siendo el del macho significativamente mayor a de las hembras (C).

Discusión

En este trabajo se investigaron los efectos de distintos grados de intervención antrópica sobre la ecología trófica de *Moluchia spp.* y la neuroanatomía de los centros olfativos de primer orden de estas cucarachas. Los datos obtenidos del análisis de isótopos estables y de contenido estomacal fueron correlacionados con el número y volumen de glomérulos del lóbulo antenal (LA). Se encontró que las cucarachas costeras presentan el nicho isotópico más amplio de las poblaciones estudiadas lo cual se correlaciona con una mayor proporción de glomérulos XL en su LA.

Nicho trófico

El nicho trófico se estimó mediante el análisis de isótopos estables y la descripción de su contenido estomacal. El análisis de los isótopos estables $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ permitió estudiar y comparar los niveles tróficos de *M. brevipennis* de la costa y de plantaciones de eucalipto y la amplitud de nicho isotópico de las tres poblaciones. Además, describimos algunos elementos del contenido estomacal de las cucarachas de costa y eucalipto.

Análisis de isótopos estables

Las marcas isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ del tejido de las cucarachas, son un reflejo de las marcas isotópicas de los nutrientes que consumen (Hobson, 1992). Por lo tanto, su análisis nos permitió estudiar la variabilidad de elementos consumidos dentro de una población y entre poblaciones. Por un lado, el análisis de las marcas de $\delta^{13}\text{C}$ nos permite diferenciar entre uso de recursos terrestres y marinos (Sabat & Martínez del Río, 2002). Mientras que los recursos terrestres generalmente están empobrecidos en ^{13}C (i.e., valores más negativos) con valores promedios de -25‰ , el uso de recursos marinos presenta valores promedios de $\delta^{13}\text{C}$ de -17‰ (Chisholm and Nelson, 1982). En este caso, todos los individuos estudiados presentaron marcas isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$

con valores entre $-28,7\text{‰}$ y $-21,7\text{‰}$, indicando que su alimentación se basa en recursos terrestres. En otros estudios se ha descrito que la actividad de los invertebrados omnívoros en sectores costeros es fundamental para el ciclaje de elementos orgánicos de origen acuático y su incorporación al suelo (Korobushkin, 2016), este no sería el caso de *Moluchia brevipennis*, que a pesar de su hábito costero basa su dieta exclusivamente en recursos terrestres. Por otro lado, la marca de $\delta^{13}\text{C}$ nos permite hacer inferencias sobre el metabolismo de las plantas que conforman la base de su red trófica, C_3 , C_4 o CAM. Mientras que los individuos de plantaciones de eucaliptus y sector urbano presentan marcas que sugieren una base conformada únicamente por plantas de metabolismo C_3 (valores entre -34‰ y $-22,5\text{‰}$ (Mateo et al, 2004)), las marcas isotópicas de las cucarachas costeras sugieren que la base de su red trófica está conformada por plantas con metabolismo C_3 y CAM (valores entre -21‰ y $-18,5\text{‰}$), es decir la mayoría de los pastos y angiospermas, como las Bromeliáceas (Rundel, 1998; Chikaraishi et al, 2004), donde se ha registrado la visita de *Moluchia brevipennis* (Schapheer et al., 2017).

Paralelamente, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ nos informan sobre la posición trófica de los insectos dentro de una red. Se utilizaron dos valores de enriquecimiento trófico en $\delta^{15}\text{N}$: 3‰ utilizado como promedio en la literatura (DeNiro & Epstein, 1978, 1981) y $0,6\text{‰}$ obtenido a partir del experimento de dieta única en base a pellet de pez. Es importante destacar que para calcular el FE= $0,6\text{‰}$ se consideró la mezcla de tejidos por ser la única que mostró un enriquecimiento tanto en $\delta^{15}\text{N}$ como en $\delta^{13}\text{C}$ (Figura 4). Esto se podría deber a que la mezcla de tejidos además de contener exoesqueleto y musculatura, cuenta con tejido graso, tejido conectivo y parte del sistema nervioso. Resulta interesante, que uno de los simbiontes intracelulares de *M. brevipennis*: *Blattabacterium* (Schapheer, resultados no publicados), se aloja en los cuerpos grasos de estas cucarachas y permite la asimilación y reciclaje de nitrógeno (Sabree, 2009), sugiriendo que este tejido es un buen indicador del enriquecimiento en $\delta^{15}\text{N}$.

Para ambos análisis (con FE: 3‰ y $0,6\text{‰}$) se obtuvo que las cucarachas del matorral costero presentan posiciones tróficas más variadas y en promedio más bajas que las

cucarachas de plantaciones forestales de eucalipto (Tabla 2). Por un lado, con el factor de enriquecimiento promedio usado en literatura: 3‰, obtuvimos que las cucarachas costeras presentan una posición trófica promedio de 1,6 que se relaciona al consumo de material vegetal (Potapov et al, 2019) con una desviación estándar de 1,2 y que las cucarachas de plantaciones de eucalipto se encuentran en posiciones tróficas de 3,4, asociado al consumo de materia orgánica en descomposición o consumo de microorganismos (Potapov et al, 2019), con una desviación estándar de 0,4 (Tabla 2). Por otro lado, con el factor de enriquecimiento 0,6‰ obtuvimos que las cucarachas costeras presentan posiciones tróficas variadas que van de -2,2 al 16,2. En cambio, las cucarachas de plantaciones forestales mostraron posiciones por sobre el décimo eslabón de la red trófica para la mayoría de los individuos (Tabla 2). Estos valores se encuentran muy por sobre lo esperado, ya que se han reportado posiciones tróficas de máximo 2,7 para Blatodeos (Schmidt, 2020) y de 2,5 para anélidos endogéicos que se alimentan principalmente de microorganismos y materia orgánica en descomposición del suelo (Potopov, et al. 2019). A pesar de la enorme desviación en los datos, estos resultados sugieren que las cucarachas pertenecientes al matorral costero estarían consumiendo elementos tanto cercanos a la base de la red trófica (*e.g* material vegetal fresco), como elementos orgánicos en descomposición, mientras que las cucarachas de plantaciones forestales con posiciones tróficas más altas y menos variadas, estarían consumiendo principalmente elementos orgánicos en descomposición. Éstos resultados son congruentes con el contenido estomacal encontrado y descrito en las distintas poblaciones, mientras en las cucarachas costeras hallamos material vegetal como polen y pétalos, en las poblaciones de plantaciones forestales encontramos una elevada cantidad de material mineral y desechos orgánicos como restos de exoesqueleto (Figura 5.B).

Por lo tanto, el cambio de uso de suelo de ecosistemas nativos a plantaciones forestales, estaría modificando tanto las interacciones tróficas como los recursos basales utilizados por estos insectos. Se han descrito resultados similares en cucarachas nativas de las selvas tropicales de indonesia. Cuando su ecosistema es intervenido con plantaciones forestales de palma, pasan de pertenecer a posiciones tróficas bajas

asociadas al consumo de plantas, a posiciones más elevadas asociadas al consumo de microorganismos (Schmidt, 2020).

Amplitud nicho isotópico

Mediante el área estándar de las elipses (SEAc y SEA) y el análisis de elipses bayesianas (SEA_B), obtuvimos información sobre la amplitud del nicho isotópico de cada población y la comparación estadística entre ellas. Encontramos que el nicho isotópico de las cucarachas costeras resultó ser mayor que el de las otras poblaciones (Figura 11A, Tabla 3). Además el nicho isotópico de la poblaciones de la plantación de eucalipto y la población del sector urbano presentaron un tamaño de nicho isotópico similar entre sí.

Resulta interesante que todas las cucarachas colectadas en plantaciones forestales presentaron marcas isotópicas muy cercanas a pesar de ser obtenidas de sectores alejados geográficamente entre sí (Figura 2). Ésto nos permite asumir que los ambientes estudiados presentarían una oferta isotópica similar, y por lo tanto podemos compararlos e inferir que las variaciones en la realización isotópica de cada población, son un reflejo del grado de especialización trófica. Estos resultados sugieren que, a nivel poblacional, las cucarachas de plantaciones de eucalipto y sector urbano presentan un mayor grado de especialización trófica que los individuos de la población costera. De manera que, en ecosistemas con una alta riqueza y diversidad de especies nativas, las cucarachas son capaces de consumir elementos variados mientras que en ecosistemas degradados con mayor intervención antrópica, las cucarachas reducen la diversidad de elementos que consumen. Por lo tanto, las cucarachas del género *Moluchia spp.* pueden ajustar sus estrategias de forrajeo en función del grado de intervención en los ecosistemas en los que se encuentran.

En síntesis, de los resultados se puede inferir que las cucarachas presentes en plantaciones de eucalipto tienen una dieta que consistiría en detritos, diversos tipos de tejidos orgánicos en descomposición y microorganismos, mientras que las cucarachas costeras se alimentarían de una diversidad más grande de elementos incluyendo material vegetal fresco.

Neuroanatomía

Este estudio se comparó por primera vez las características estructurales del lóbulo antenal en insectos del mismo género pero que habitan en nichos tróficos contrastantes.

Comparación de morfología externa y neuropilas

No se observaron diferencias en la morfología externa de las cucarachas de las distintas poblaciones (Figura 3), ni se encontraron diferencias significativas en el volumen del protocerebro entre las poblaciones (Figura 6, Tabla 4). En ese sentido, pareciera que la oferta dietaria y los paisajes olfativos de los distintos ecosistemas no tendrían una incidencia significativa sobre el tamaño de estas estructuras. En particular, no se encontró una sobrerrepresentación del LA en el protocerebro en ninguna de las poblaciones estudiadas. No obstante, sí se hallaron diferencias en el volumen glomérular entre poblaciones.

Identificación de glomérulos

En base a su morfología, posición y tamaño la identificación los glomérulos de la zona dorsal 94 y 91 (Figura 6) sirvió como guía para la identificación del resto de los glomérulos. Utilizando estos marcadores anatómicos fue posible identificar 13 glomérulos en individuos de las poblaciones costeras y de plantación forestal. Es decir, la forma y posición de los estos glomérulos es conservada entre los distintos individuos estudiados. Esto sugiere un arreglo posicional que podría tener relevancia tanto en la transducción sensorial del estímulo olfativo, como en la representación odotópica del lóbulo antenal en los cuerpos fungiformes y el cuerno lateral, tal como ocurre en otros insectos (López-Riquelme, 2014; Paoli, 2020; Nishino, 2023). También sugiere un modo de desarrollo conservado, donde la conexión entre neuronas olfativas y neuronas de proyección ocurre en posiciones neuroanatómicas específicas a pesar del medio en el cual estas cucarachas nacieron y se criaron.

De manera interesante, al comparar la forma y posición de los glomérulos con los reportados para *Periplaneta americana* (Blattidae), encontramos coincidencias en al menos cinco glomérulos ubicados en la zona ventral, que por su tamaño, forma y posición resultan fáciles de identificar. Estos glomérulos corresponden a: 94= J11 en *P. americana* (XL), 90= I10(L), 95=I09(L), 96=I14 (L) y 88=I15 (XL) (Watanabe et al., 2010). De estas estructuras, el J11 (94 en nuestro estudio) es el único caracterizado como termo e hidrosensible en la cucaracha cosmopolita *P. americana*, los demás glomérulos son inervados por Neuronas Sensoriales Olfatorias (OSN). Además, en *P. americana* se ha descrito que las neuronas mecano y quimiosensoriales de contacto inervan el ganglio suboesofágico (Gs) ubicado en la parte dorso posterior del LA (Nishino et al. 2005), estructura que también está presente en *Moluchia brevipennis* (Figura 6.B2). Por lo que a pesar de que la cantidad total de glomérulos no sea la misma (96 en promedio para *Moluchia* sp., 205 para *P. americana* (Watanabe et al, 2010)), todas estas coincidencias sugieren que *M. brevipennis* podrían tener glomérulos homólogos a los de *P. americana* y que presentarían similitudes anatómicas en su agrupamiento (clustering) y en la ramificación del nervio antenal.

Número de glomérulos

El número de los glomérulos no fue significativamente diferente entre las tres poblaciones, en promedio contamos $94,6 \pm 0,6$ unidades en las cucarachas costeras, $96,6 \pm 0,8$ en las cucarachas de plantaciones forestales y $96,3 \pm 2,4$ en las de sector urbano. Este resultado se podría deber a un error de conteo asociado al grosor de los cortes ópticos, entre mayor sea éste, resulta más difícil discriminar el límite entre un glomérulo y otro. En relación a esto, se ha reportado que la técnica de trazado neuronal en la antena puede resultar más eficientes y precisas para el conteo de los glomérulos (Watanabe, 2010;). A pesar de las consideraciones técnicas, los resultados obtenidos muestran número de glomérulos similares entre cucarachas criadas en distintos ecosistemas, sugiriendo que todas cuentan con la misma cantidad de familias receptoras de odorantes.

Contrariamente a lo reportado en mamíferos donde cada receptor es sensible a un grupo más amplio de volátiles, experimentos de registro en sensila única en distintos órdenes de insectos, sugieren un alto grado de especificidad de los receptores a moléculas volátiles específicas, es decir, cada OSN responde a unas pocas moléculas estructuralmente similares entre sí (Wibe et al., 1997; Kristoffersen et al., 2008; Ghaninia et al., 2008). Y de manera interesante, aquellos volátiles asociados a estímulos ecológicos importantes para el insecto presentan las mayores afinidades de unión a su receptor. Por ejemplo, los mosquitos africanos de la malaria *Anopheles gambiae* (Diptera: culicidae) presenta un receptor: “AgOr2” que desencadena un potencial de acción únicamente al unir indol, un componente importante del sudor humano (Carey et al, 2010). Por lo tanto estos estudios sugieren que en insectos la cantidad de glomérulos guarda una correlación con la cantidad de moléculas volátiles a las cuales son sensibles.

En insectos el número de glomérulos es muy variable (Galizia, 1999; Kollman, 2016). Por un lado tenemos grupos con un número reducido de glomérulos, como las moscas del género *Drosophila sp.* (Díptera: Tephritidae) que cuentan con un total de 52 (Grabe, 2016), mientras que en himenópteros existen hormigas (Hymenoptera: Formicidae) con grandes cantidades de glomérulos como *Camponotus ocreatus* con 380 (Lopez-Riquelme, 2014) o incluso 630 en la especie *Apterostigma cf. mayri* (Kelber, 2009). Curiosamente, dentro de una misma especie también se han encontrado diferencias asociadas a distintos modos de vida. Las hormigas trabajadoras de la tribu Attini son de distintos tamaños, las hormigas pequeñas presentan 50 glomérulos menos que las hormigas trabajadoras de tamaño grande, esta diferencia se asocia a especificidad de tareas dentro de la colonia (Kelber, 2009). De manera interesante, dentro del orden Blattodea también se han encontrado grandes diferencias, por un lado, cucarachas de hábitos silvestres como *Blaberus craniifer* cuenta con 106 glomérulos (Rospars and Chambille, 1986) y *Diploptera punctata*, con 99 (Chiang, 2001). Mientras que la cucaracha caracterizada por ser plaga mundial: *Periplaneta americana* cuenta con 205 glomérulos (Watanabe, 2010), más del doble de lo hallado para *Moluchia spp.* Esta marcada diferencia entre *Moluchia spp.* y *P. americana*, sugiere que las cucarachas

endémicas presentan una menor cantidad de tipos de receptores olfativos en sus antenas y, por lo tanto, una sensibilidad a una menor gama de estímulos olfativos.

Volumen glomerular

En cuanto al volumen de los glomérulos, se hallaron diferencias intrapoblacionales significativas, sobre todo al interior de las poblaciones de la costa y de plantaciones de eucalipto (Figura 9 y 11). Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticas entre las poblaciones.

No obstante, al estudiar la distribución de tamaños glomerulares a nivel poblacional, sí se hallaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 10). Por un lado, las cucarachas de plantaciones forestales y sectores urbanos mostraron una distribución acumulada hacia la izquierda con valores que corresponderían principalmente a glomérulos de tamaño P, M y G. Las cucarachas costeras, en cambio mostraron una distribución más heterogénea, presentando glomérulos de mayor volumen. Esto se ve con mayor claridad en la Figura 12 donde se aprecia que las cucarachas costeras tienen con un porcentaje significativamente mayor de glomérulos XG en comparación a las otras poblaciones. Adicionalmente se compararon los volúmenes de los trece glomérulos identificados en las poblaciones costeras y forestales. Para estos glomérulos, se hallaron diferencias significativas entre las poblaciones (Figura 13) siendo la población costera la que presentó glomérulos de mayor tamaño y con una mayor proporción de glomérulos XG.

El volumen de los glomérulos está principalmente determinado por la cantidad de OSN que los inervan (Nishino et al, 2011; Nishino et al, 2018; Nishino, 2023). Por lo tanto, glomérulos de mayor tamaño, son inervados por una mayor cantidad de OSN, sugiriendo una mayor sensibilidad a determinados volátiles (Paoli, et al. 2020). El mayor volumen en los glomérulos de las cucarachas de la costa podría estar correlacionado a su estilo de vida. Las cucarachas costeras visitan diversas plantas nativas tanto para su alimentación como para su refugio, el engrosamiento particular en una proporción de glomérulos podría asociarse a la detección de volátiles emitidos

por sus plantas hospederas como ocurre en otros casos (Burguer, 2013). En ese sentido, una menor proporción de glomérulos XG en las cucarachas de ecosistemas intervenidos, sugiere especificidad hacia una menor cantidad de familias odorantes, lo que se podría asociar con el empobrecimiento de biodiversidad presente en estos ecosistemas. Sin embargo, se requeriría al menos de experimentos de registro la antena (electroantenograma) presentando los volátiles de los diferentes ambientes a las tres poblaciones de cucarachas para determinar la relación entre tamaño glomerular y sensibilidad a odorantes.

Por otro lado, es interesante destacar que las cucarachas del sector urbano son las que presentan una menor variabilidad en la distribución de tamaños (Figura 9 y 11), sin diferencias aparentes entre machos y hembras. En cambio, las cucarachas de la especie *Moluchia brevipennis* pertenecientes a los ecosistemas de matorral costero y plantación forestal presentan una gran variabilidad intrapoblacional (Figura 9 y 11) sugiriendo una mayor plasticidad durante su desarrollo (Westwick y Rittchhof, 2012), resultando en individuos adultos con neuropilas sensoriales más variadas.

Macroglomérulo

En las cucarachas macho del género *Moluchia* se identificó un glomérulo ubicado en la zona dorso lateral cercano a la entrada del nervio antenal que tiene cinco veces el volumen de su homólogo en hembras. Estas características lo hacen un buen candidato como macroglomérulo sexual sensible a feromonas. Sin embargo, se requerirían tanto experimentos conductuales como de registro electrofisiológicos para demostrarlo.

En otras cucarachas macho de hábito silvestre como, *Blaberus craniifer* (Blaberidae)(Chambille y Rospans, 1985), también se identificó un único glomérulo engrosado y el dimorfismo sexual entre ambos sexos aparece sólo luego de la última muda. Por otro lado, en *P. americana* y *Blatta lateralis* (ambas Blattidae) a pesar de que no existe dimorfismo sexual entre machos y hembras para la mayoría de los glomérulos, existe un engrosamiento en un conjunto de glomérulos (D07 y D06), sensibles a las feromonas liberadas por las hembras: periplanonas A y B (Domae, 2019). Estos macro glomérulos son hasta 30 veces más grandes en machos que hembras (Nishino, 2009),

reciben el nombre de complejo macroglomerular y están ubicados en la zona lateral del LA cerca de la entrada del nervio antenal. Para otros grupos de insectos se han hallado hasta 4 macro glomérulos en machos, que llegan a ser entre 20 y 30 veces más grandes que el resto de los glomérulos (Streinzer, 2013). Sin embargo, el dimorfismo sexual del LA no está presente en todos los insectos, algunas polillas como *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) presentan glomérulos engrosados tanto en machos como en hembras (Berg, 2002) y en otros insectos a pesar de presentar glomérulos notoriamente engrosados, el estímulo de estos no gatilla conductas de cortejo (Domae, 2019). Tal es la variedad de formas que pueden presentar los glomérulos sexuales, que es muy importante contrastar este resultado con otros estudios.

Correlato neuroanatómico al cambio de nicho trófico

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una correlación entre la distribución de los glomérulos del LA y el nicho trófico observado en las cucarachas del género *Moluchia spp.*

Dietas distintas pueden inducir grandes cambios en la neuroanatomía de los insectos, tanto por los aportes nutricionales que estas ofrecen como por el despliegue conductual que realizan los organismos para adquirirlas (Montgomery, 2016; Farris and Roberts, 2005, Petit et al., 2015). En este caso, es conocido que las conductas de búsqueda de alimento en cucarachas del género *Moluchia spp.* depende fuertemente de estímulos olfativos y movimientos antenales (Vergara, 2011) y que los ecosistemas estudiados ofrecen dietas ligadas a estímulos sensoriales distintos. El hábitat costero por ejemplo, es más biodiverso en plantas hospederas (Lund and Letellier, 2012), por lo tanto presenta una mayor complejidad estructural y química (Randlkofer et al, 2010). Nuestras observaciones en terreno y los resultados de este estudio, particularmente el de amplitud de nicho isotópico, sugieren que los individuos del matorral costero estarían expuestas a diversas plumas de olor a lo largo de su ontogenia, lo que podría determinar el engrosamiento de ciertos glomérulos. Los insectos de plantaciones forestales y de sector urbano, por otra parte, se encuentran recluidas a espacios más

cerrados y sometidas a estímulos olfativos de una menor complejidad, lo que se relacionaría con nichos isotópicos reducidos y a la presencia de menos glomérulos particularmente engrosados.

Las condiciones ambientales con las cuales se encuentre un organismo a lo largo de su ontogenia pueden gatillar cambios morfológicos importantes en el desarrollo de su fenotipo (Mpodozis, 2022; Vargas et. al, 2020; West-Eberhard, 2005). En el caso de los insectos está bien documentado y discutido cómo ciertas interacciones ecológicas durante las primeras etapas de la ontogenia, generan efectos importantes en la morfogénesis de neuropilas tanto de primer como de segundo orden, con consecuencias conductuales y sensoriales en el adulto (West-Eberhard, 2003; Westwick and Rittschof, 2021; Barnes, 2021). Considerando que las cucarachas son exopterigotas y por lo tanto el desarrollo post embrionario del lóbulo antenal (neuropilas de primer orden) ocurre mientras los insectos despliegan conductas activas de forrajeo, podemos pensar que estas interacciones tróficas, ligadas a estímulos sensoriales olfativos, son importantes en el desarrollo de los glomérulos del lóbulo antenal (Westwick and Rittschoff, 2021). Y por lo tanto, el reemplazo de ecosistemas nativos por plantaciones forestales, podría estar alterando asociaciones ecológicas importantes para el desarrollo de los organismos de esta especie.

Finalmente, es importante destacar que cucarachas de distintas especies, pero con nichos isotópicos similares (*M. brevipennis* de plantación de eucalipto y *Moluchia sp.* de sector urbano) no presentan diferencias en la distribución de sus glomérulos. Esto sugiere que el modo de vida ligado a la alimentación puede constituir un factor importante en el proceso de especiación de estas cucarachas, llevándolas a convertirse en organismos cada vez más especializados en sistemas con altos grados de intervención antrópica.

Limitaciones del estudio

Los resultados aquí discutidos cuentan con algunas limitaciones asociados a distintos factores. Uno de ellos es la baja cantidad de muestras para las comparaciones neuroanatómicas. Las cucarachas *Moluchia brevipennis* corresponde a una especie endémica (Schapheer, 2017) de distribución acotada y sólo es posible hallar individuos adultos entre octubre y diciembre. La abundancia de éstos disminuye considerablemente en periodos de sequía, siendo especialmente difícil capturarlas en plantaciones forestales de eucalipto, terreno que tuvimos que repetir en varias localidades (Figura 2). Por otro lado, el desarrollo de los experimentos de inmunohistoquímica en los cerebros de las cucarachas endémicas significó probar diferentes protocolos disponibles para otras especies de insectos hasta encontrar el que mejor marcara las estructuras de interés (i.e. glomérulos, cuerpos fungiformes), por lo que se perdió material biológico en el proceso. Finalmente, el análisis de las imágenes utilizando FIJI resultó mucho más largo de lo esperado, tomando más de un año.

A pesar de que el factor de enriquecimiento 0,6‰, se encuentra dentro de lo esperado para invertebrados *e.g.* de -4,9 a 0,8 ‰ en *Hemideina thoracica* (Orthoptera) según el tejido analizado (Wehi and Hicks, 2010) o de -0,2 a 6,59 ‰ en artrópodos herbívoros (Spence and Rosenheim, 2005), las posiciones tróficas obtenidas tanto en las cucarachas costeras como en las cucarachas de plantaciones de eucalipto, se encuentran muy por sobre los valores ecológicamente esperados (Tabla 2). Esta enorme desviación, podría estar explicada por la baja cantidad de muestras pertenecientes a la base de la red trófica (Tabla 1), que en el caso de la plantaciones forestales sólo se contó con una réplica. Por otro lado, experiencias anteriores habían demostrado que el pellet de pez funciona como alimento para las cucarachas en condiciones de laboratorio permitiendo mudas exitosas y sobrevivida, en relación a otros alimentos probados (cómo hojarasca sola o comida de perro peletizada). Si bien este alimento permitió mantener a las cucarachas hasta la adultez, su contenido proteico es muy alto y no se encuentra de manera natural en los ecosistemas estudiados. Por lo tanto, su grado de absorción y asimilación en los tejidos podría no reflejar el enriquecimiento en ^{15}N y ^{13}C que ocurre

bajo condiciones naturales (como es reportado en otros estudios, *e.g* Spence and Rosenhim, 2005), induciendo a sesgos en el cálculo de posición trófica. De hecho, distintos estudios han reportado que la mayoría de las cucarachas cuentan con una dieta empobrecida en nitrógeno (Cochran, 1985; Molleman, 2009), lo que implica un mayor reciclaje de este elemento, aumentando su fraccionamiento y por lo tanto generando un enriquecimiento en ^{15}N (Spence and Rosenhim, 2005). Así, en condiciones naturales esperaríamos obtener un valor de enriquecimiento trófico más elevado.

En relación al volumen de glomérulos (Figura 9), el bajo número de muestras y la gran variabilidad intrapoblacional, no nos permite asumir diferencias entre las poblaciones. Por otro lado, en estudios anteriores en cucarachas no se encontraron diferencias entre machos y hembras (Watanabe et al, 2010). Aquí pareciera ser que los machos de la especie *Moluchia brevipennis* (matorral costero y plantación de eucalipto), tienden a presentar tamaños glomerulares mayores que las hembras (Figura 9 y 11). Diferencia que no se observa en los individuos de *Moluchia sp.* del sector urbano (Figura 11). Esta observación es sólo una tendencia ya que no hay datos suficientes como para realizar un análisis estadístico. Para corroborar esta tendencia, sugerimos al menos duplicar la cantidad de muestras por población con una proporción de machos y hembras balanceada.

Finalmente, para evaluar una correlación entre cantidad de estímulos olfativos ligados a la dieta y variaciones neuroanatómicas en el LA de estas cucarachas, propusimos un experimento de jardín común. Para ello, ninfas en sus primeros estadios fueron capturadas en octubre del año 2022 con la intención de criarlas bajo condiciones de dieta controlada, sin embargo no fueron capaces de sobrevivir hasta alcanzar la fase de adulto debido a la falta de equipamiento necesario para mantener una temperatura adecuada. Las cucarachas utilizadas para el experimento de dieta única en base a pellet de pez fueron criadas en el laboratorio bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, por la estudiante Sofía Fuentes. Sin embargo, se descartó la posibilidad de

utilizar estas muestras para el experimento de inmunohistoquímica por el estado de los tejidos y por falta de tiempo.

Conclusiones

En este estudio comparamos la neuroanatomía del lóbulo antenal y la ecología alimentaria de cucarachas endémicas del género *Moluchia spp.* pertenecientes a ecosistemas contrastantes. Las cucarachas de matorral costero presentan una mayor proporción de glomérulos engrosados (tamaño XG) que las cucarachas de plantaciones de eucalipto y sector urbano lo que podría estar asociado a una mayor sensibilidad olfativa. Sin embargo, no se hallaron diferencias en el número de glomérulos entre las distintas poblaciones, curiosamente su promedio de 96 glomérulos, es mucho menor que lo reportado para cucarachas cosmopolitas (Watanabe et al., 2010). Las cucarachas costeras ocupan niveles tróficos más basales y presentan un nicho isotópico más amplio que las cucarachas de plantaciones de eucalipto. Además, las cucarachas de la costa se alimentan de una mayor variedad de recursos, incluidos materiales vegetales frescos, mientras que las cucarachas de ecosistemas simplificados, se alimentan principalmente de desechos orgánicos en descomposición y no muestran diferencias en la amplitud del nicho isotópico. Esto sugiere que el nicho trófico de las cucarachas está correlacionado con el engrosamiento de glomérulos particulares del lóbulo antenal, sugiriendo que las experiencias olfativas ligadas a la alimentación podría incidir sobre el desarrollo de neuropilas sensoriales de primer orden. Además, el reemplazo de ecosistemas nativos por plantaciones forestales y sistemas urbanos altera aspectos importantes de la ecología y desarrollo neuroanatómico de estos insectos.

Referencias

Agnihotri, A. R., Roy, A. A., y Joshi, R. S. 2016. Gustatory receptors in Lepidoptera: chemosensation and beyond. *Insect Molecular Biology*. 25: 519-529.

Amarawardana, L., Bandara, P., Kumar, V., Pettersson, J., Ninkovic, V., y Glinwood, R. 2007. Olfactory response of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) to volatiles from leek and chive: Potential for intercropping with sweet pepper. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B – Soil and Plant Science*. 57: 87–91.

Baba Y., Tsukada A. y Comer C.M. 2010. Collision avoidance by running insects: antennal guidance in cockroaches. *Journal of Experimental Biology*. 213: 2294–2302.

Barchuk, A. R., dos Santos, G. D., Dias Caneschi, R., de Paula Junior, D. E., y Moda, L. M. R. 2018. The ontogenetic saga of a social brain. *Apidologie*. 49: 32-48.

Bell, W.J., Roth, L.M., Nalepa, C.A., 2007. *Cockroaches, Ecology, Behavior, and Natural History*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

Berg, B. G., Galizia, C. G., Brandt, R., y Mustaparta, H. 2002. Digital atlases of the antennal lobe in two species of tobacco budworm moths, the oriental *Helicoverpa assulta* (male) and the American *Heliothis virescens* (male and female). *Journal of Comparative Neurology*. 446: 123-134.

Borkakati, R. N., Venkatesh, M. R., Saikia, D. K., y Sasanka, S. B. 2019. A brief review on food recognition by insects: Use of sensory and behavioural mechanisms. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 7: 574-579.

Bouchebti S. y Arganda S. 2020. Insect lifestyle and evolution of brain morphology. *Current Opinion in Insect Science*. 42: 90-96.

Bowman, R. M., Schmidt, S., Weeks, C., Clark, H., Brown, C., Latta IV, L. C., y Edgehouse, M. 2018. Phenotypic plasticity in a population of odonates. *Nature Scientific Reports*. 8: 8442.

Burggren, W. W. 2017. Epigenetics in insects: mechanisms, phenotypes and ecological and evolutionary implications. In *Advances in insect physiology*. 53: 1-30.

Caniani, D., Labella, A., Lioi, D. S., Mancini, I. M., and Masi, S. (2016). Habitat ecological integrity and environmental impact assessment of anthropic activities: a GIS-based fuzzy logic model for sites of high biodiversity conservation interest. *Ecological Indicators* 67, 238–249.

Carey, A.F., Wang, G., Su, C.-Y., Zwiebel, L.J., and Carlson, J.R. 2010. Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*. 464: 66–71.

Cavallini-Speisser, Q., Morel, P., & Monniaux, M. 2021. Petal cellular identities. *Frontiers in plant science*. 12: 745507.

Chiang, A. S., Liu, Y. C., Chiu, S. L., Hu, S. H., Huang, C. Y., & Hsieh, C. H. 2001. Three-dimensional mapping of brain neuropils in the cockroach, *Diploptera punctata*. *Journal of Comparative Neurology*. 440: 1-11.

Chikaraishi, Y., Naraoka, H., and Poulson, S. R. 2004. Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry*. 65: 1369-1381.

Clarke, D., Morley, E., and Robert, D. 2017. The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology*. 203: 737-748.

Cochran DG (1985) Nitrogen-excretion in cockroaches. *Annual Review of Entomology* 30:29–49

CONAF. 2023. Catastro Vegetacional. On line, visitando en octubre 2023: <https://www.conaf.cl/regulacion/informacion-geografica-o-territorial/catastro-vegetacional/>

Domae M. Et. Al. 2019. Functional unification of sex pheromone-receptive glomeruli in the invasive T Turkestan cockroach derived from the genus *Periplaneta*. *Neuroscience Letters* 708: 134320.

Eriksson, M., Nylin, S., & Carlsson, M. 2019. Insect brain plasticity: effects of olfactory input on neuropil size. *Royal Society Open Science*. 6: 190875.

Ernst, U. R., Van Hiel, M. B., Depuydt, G., Boerjan, B., De Loof, A., & Schoofs, L. 2015. Epigenetics and locust life phase transitions. *Journal of Experimental Biology*. 21: 88-99.

Ernst, K. D. and Boeckh, J. 1983. A neuroanatomical study on the organization of the central antennal pathways in insects. III. Neuroanatomical characterization of physiologically defined response types of deutocerebral neurons in *Periplaneta americana*. *Cell and Tissue Research*. 229: 1–22.

Farris, S. M. 2013. Evolution of complex higher brain centers and behaviors: behavioral correlates of mushroom body elaboration in insects. *Brain Behavior and Evolution*, 82: 9-18.

Farris, S. M., & Roberts, N. S. 2005. Coevolution of generalist feeding ecologies and gyrencephalic mushroom bodies in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 17394-17399.

Farris, Sarah M. and Strausfeld, Nicholas J. 2001. Development of Laminar Organization in the Mushroom Bodies of the Cockroach: Kenyon Cell Proliferation, Outgrowth, and Maturation. *The Journal of Comparative Neurology*. 439:331-351.

Farris, S.M. 2003. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. *Arthropod Structure & Development*. 32: 79– 101.

Fuscà D, Kloppenburg, P. 2021. Odor processing in the cockroach antennal lobe—the network components. *Cell and Tissue Research*. 383: 59-73.

Galizia C and Rössler W. 2010. Parallel olfactory systems in insects: Anatomy and function. *Annual Review of Entomology*. 55:399-420.

Galizia, C. G. 2018. Neuroscience: An olfactory homunculus in the insect brain. *Current Biology*. 28: R227-R229.

Ghaninia, M., Larsson, M.C., Hansson, B.S., and Ignell, R. 2008. Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. *Journal of Experimental Biology*. 211: 3020–3027.

Grabe, V., Baschwitz, A., Dweck, H. K., Lavista-Llanos, S., Hansson, B. S., & Sachse, S. 2016. Elucidating the neuronal architecture of olfactory glomeruli in the *Drosophila* antennal lobe. *Cell reports*, 16: 3401-3413.

Grimaldi, D & Engel, M. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University press.

Groh, C., & Rössler, W. 2011. Comparison of microglomerular structures in the mushroom body calyx of neopteran insects. *Arthropod structure & development*. 40: 358-367.

Groh, C., Lu, Z., Meinertzhagen, I. A., & Rössler, W. 2012. Age-related plasticity in the synaptic ultrastructure of neurons in the mushroom body calyx of the adult honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Neurology*. 520: 3509-3527.

Guerrero, P. C., Antinao, C. A., Vergara-Meriño, B., Villagra, C. A., & Carvallo, G. O. 2019. Bees may drive the reproduction of four sympatric cacti in a vanishing coastal mediterranean-type ecosystem. *PeerJ*. 7: e7865.

- Günzel, Y., McCollum, J., Paoli, M., Galizia, C. G., Petelski, I., & Couzin-Fuchs, E. 2021. Social modulation of individual preferences in cockroaches. *Iscience*. 24: 101964.
- Hansson B. S. 1999. *Insect Olfaction*. Springer-Verlag Heidelberg. Lund University.
- Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. 2011. Evolution of insect olfaction. *Neuron*. 72: 698-711.
- Hawke, S. D., & Farley, R. D. 1973. Ecology and behavior of the desert burrowing cockroach, *Arenivaga* sp.(Dictyoptera, Polyphagidae). *Oecologia*, 11: 263-279.
- Hobson K.A. and R.G. Clark. 1992. Assessing avian diets using stable isotopes: I. Turnover of ¹³C in tissues. *Condor* 94: 181–188.
- Hsu, G. C., Szlavecz, K., Csuzdi, C., Bernard, M., & Chang, C. H. 2023. Ecological groups and isotopic niches of earthworms. *Applied Soil Ecology*. 181: 104655.
- Immonen E.-V., Dacke M, Heinze S, el Jundi B. 2017. Anatomical organization of the brain of a diurnal and a nocturnal dung beetle. *Journal of Comparative Neurology*. 525: 1879–1908.
- Jackson, A. L., Inger, R., Parnell, A. C., & Bearhop, S. 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER–Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*. 80: 595-602.
- Kareiva, P. 1983. Influence of vegetation texture on herbivore populations: Resource concentration and herbivore movement. In R. F. Denno, & M. S. McClure (Eds.), *Variable plants and herbivores in natural and managed systems* (pp. 259–289). New York: Academic Press.
- Keeley, J. E., & Rundel, P. W. 2003. Evolution of CAM and C4 carbon-concentrating mechanisms. *International journal of plant sciences*. 164: S55-S77.
- Kelber C, Rössler W, Roces F, Kleineidam CJ. 2009. The antennal lobes of fungus-growing ants (*Attini*): neuroanatomical traits and evolutionary trends. *Brain, Behavior and Evolution* 73:273–284.
- Kelber, C., Rössler, W., & Kleineidam, C. J. 2010. Phenotypic plasticity in number of glomeruli and sensory innervation of the antennal lobe in leaf-cutting ant workers (*A. vollenweideri*). *Developmental Neurobiology*. 70: 222-234.
- Kelly, J. F. 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian journal of zoology*. 78: 1-27.

Kleineidam. 2005. A Macroglomerulus in the Antennal Lobe of Leaf-cutting Ant Workers and its Possible Functional Significance. *Chemical Senses* 30: 383–392.

Kollmann, M., Schmidt, R., Heuer, C. M., & Schachtner, J. 2016. Variations on a theme: antennal lobe architecture across Coleoptera. *PLoS One*. 11: e0166253.

Koniszewski, N. D. B., Kollmann, M., Bigham, M., Farnworth, M., He, B., Büscher, M., ... & Bucher, G. 2016. The insect central complex as model for heterochronic brain development—background, concepts, and tools. *Development genes and evolution*. 226: 209-219.

Korobushkin, D. I., Korotkevich, A. Y., Kolesnikova, A. A., Goncharov, A. A., Panchenkov, A. A., & Tiunov, A. V. 2016. Consumption of aquatic subsidies by soil invertebrates in coastal ecosystems. *Contemporary Problems of Ecology*. 9: 396-406.

Kristoffersen, L., Larsson, M.C., and Anderbrant, O. 2008. Functional characteristics of a tiny but specialized olfactory system: olfactory receptor neurons of carrot psyllids (Homoptera: Triozidae). *Chemical Senses*. 33: 759–769.

Lesser, J. S., James, W. R., Stallings, C. D., Wilson, R. M., & Nelson, J. A. 2020. Trophic niche size and overlap decreases with increasing ecosystem productivity. *Oikos*. 129: 1303-1313.

López-Riquelme, G. O. 2014. Representación odotópica de la organización glomerular del lóbulo antenal en los cuerpos fungiformes de las hormigas (Hymenoptera: Formicidae): Comparaciones entre dos especies. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 17: 15-31.

Lund, R., & Teillier, S. 2012. Flora vascular de Los Molles, Región de Valparaíso, Chile. *Chloris chilensis*. 2(2).

MacArthur, R. H. and Pianka, E. R. 1966. On optimal use of a patchy environment. *The American Naturalist*. 100: 603–609

McGorry, C. A., Newman, C. N., & Triplehorn, J. D. 2014. Neural responses from the wind-sensitive interneuron population in four cockroach species. *Journal of insect physiology*. 66: 59-70.

Maldonado, K., Bozinovic, F., Newsome, S. D., & Sabat, P. 2017. Testing the niche variation hypothesis in a community of passerine birds. *Ecology*. 98: 903-908.

Malun, D. 1993. Connections between the deutocerebrum and the protocerebrum, and neuroanatomy of several classes of deutocerebral projection neurons in the brain of male *Periplaneta americana*. *Journal of Comparative Neurology*. 329: 143–162.

Meinertzhagen, I. A., & Sorra, K. E. 2001. Synaptic organization in the fly's optic lamina: few cells, many synapses and divergent microcircuits. *Progress in brain research*. 131: 53-69.

Molleman, F. 2010. Puddling: from natural history to understanding how it affects fitness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 134: 107-113.

Montgomery H. S. 2016 Brain Composition in Heliconius Butterflies, Posteclosion Growth and Experience- Dependent Neuropil Plasticity. *The Journal of Comparative Neurology*. 524:1747-1769.

Mpodozis, J. 2022. Natural drift: a minimal theory with maximal consequences. *Constructivist Foundations*. 18: 094-101.

Murray, M. A., Schubiger, M., & Palka, J. 1984. Neuron differentiation and axon growth in the developing wing of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 104: 259-273.

Newsome, S. D., Martinez del Rio, C., Bearhop, S., & Phillips, D. L. 2007. A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 5: 429-436.

Newton, E. T. 1879. *Memoris: On the Brain of the Cockroach, Blatta Orientalis*. *Journal of Cell Science*. 2: 340-356.

Nishikawa, M., Yokohari, F., & Ishibashi, T. 1995. Central projections of the antennal cold receptor neurons and hygrosensory neurons of the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Comparative Neurology*, 361(1), 165-176.

Nishino, H., Iwasaki, M., Paoli, M., Kamimura, I., Yoritsune, A., & Mizunami, M. 2018. Spatial receptive fields for odor localization. *Current biology*. 28: 600-608.

Nishino, H., Nishikawa, M., Yokohari, F., & Mizunami, M. 2005. Dual, multilayered somatosensory maps formed by antennal tactile and contact chemosensory afferents in an insect brain. *Journal of Comparative Neurology*. 493: 291-308.

Nishino, H., Yamashita, S., Yamazaki, Y., Nishikawa, M., Yokohari, F., & Mizunami, M. 2003. Projection neurons originating from thermo-and hygrosensory glomeruli in the antennal lobe of the cockroach. *Journal of Comparative Neurology*. 455: 40-55.

Nishino, H., Yoritsune, A., & Mizunami, M. 2010. Postembryonic development of sexually dimorphic glomeruli and related interneurons in the cockroach *Periplaneta americana*. *Neuroscience letters*. 469: 60-64.

North, G., & Greenspan, R. J. 2007. Invertebrate neurobiology. Cold Spring Harbor Monograph Series 49.

Okada J, Toh Y. 2006. Active tactile sensing for localization of objects by the cockroach antenna. *Journal of Comparative Physiology. A* 192: 715–726.

Olsen, A. C., & Triplehorn, J. D. 2014. Neural responses from the filiform receptor neuron afferents of the wind-sensitive cercal system in three cockroach species. *Journal of insect physiology*. 68: 76-86.

Ott, S. R., & Rogers, S. M. 2010. Gregarious desert locusts have substantially larger brains with altered proportions compared with the solitary phase. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277: 3087-3096.

Ott S. 2008. Confocal microscopy in large insect brains: Zinc-formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *Journal of Neuroscience Methods*. 172: 220-230.

Paoli, M., Nishino, H., Couzin-Fuchs, E., & Galizia, C. G. 2020. Coding of odour and space in the hemimetabolous insect *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology*. 223: jeb218032.

Petit C, Le Ru B, Dupas S, Frérot B, Ahuya P, et al. 2015. Influence of Dietary Experience on the Induction of Preference of Adult Moths and Larvae for a New Olfactory Cue. *PLOS ONE* 10: e0136169.

Polilov, A. A., & Makarova, A. A. 2020. Constant neuropilar ratio in the insect brain. *Scientific Reports*. 10: 21426.

Post, D. M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*. 83: 703-718.

Potapov, A. M., Beaulieu, F., Birkhofer, K., Bluhm, S. L., Degtyarev, M. I., Devetter, M., ... & Scheu, S. 2022. Feeding habits and multifunctional classification of soil-associated consumers from protists to vertebrates. *Biological Reviews*. 97: 1057-1117.

Potapov, A. M., Tiunov, A. V., Scheu, S., Larsen, T., & Pollierer, M. M. 2019. Combining bulk and amino acid stable isotope analyses to quantify trophic level and basal resources of detritivores: a case study on earthworms. *Oecologia*. 189: 447-460.

Quinby, B. M., Creighton, J. C., & Flaherty, E. A. 2020. Stable isotope ecology in insects: a review. *Ecological Entomology*. 45: 1231-1246.

Randlkofer, B., Obermaier, E., Hilker, M., & Meiners, T. 2010. Vegetation complexity—the influence of plant species diversity and plant structures on plant chemical complexity and arthropods. *Basic and Applied Ecology*, 11(5), 383-395.

Rogers SM, Simpson SJ. 1997. Experience-dependent changes in the number of chemosensory sensilla on the mouthparts and antennae of *Locusta migratoria*. *Journal of Experimental Biology*. 200:2313- 2321.

Rosenberg, Y., Bar-On, Y. M., Fromm, A., Ostikar, M., Shoshany, A., Giz, O., & Milo, R. 2023. The global biomass and number of terrestrial arthropods. *Science advances*. 9: eabq4049.

Rospars and Chambille (1986) Postembryonic growth of the antennal lobes and their identified glomeruli in the cockroach *blaberus craniifer burm.* (dictyoptera: blaberidae): a morphometric study. *International Journal of Insect Morphometry*. 15: 39310415.

Royet. J. P. 1991. Stereology: A Method for Analyzing Images. *Progress in Neurobiology* 37: 433-474.

Rundel, P. W., & Dillon, M. O. 1998. Ecological patterns in the Bromeliaceae of the lomas formations of Coastal Chile and Peru. *Plant Systematics and Evolution*. 212: 261-278.

Sabat, P., & del Rio, C. M. 2002. Inter-and intraspecific variation in the use of marine food resources by three *Cinclodes* (Furnariidae, Aves) species: carbon isotopes and osmoregulatory physiology. *Zoology*. 105: 247-256.

Sabree, Z. L., Kambhampati, S., & Moran, N. A. 2009. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106: 19521-19526.

Schafer, R., & Sanchez, T. V. 1973. Antennal sensory system of the cockroach, *Periplaneta americana*: postembryonic development and morphology of the sense organs. *Journal of Comparative Neurology*. 149: 335-353.

Schal, C., Gautier, J. Y., & Bell, W. J. 1984. Behavioural ecology of cockroaches. *Biological Reviews*. 59: 209-254.

Schapheer, C., Lopez-Uribe, M. M., Vera, A., & Villagra, C. A. 2017. Distribution, habitat use and plant associations of *Moluchia brevipennis* (Saussure, 1864)(Blattodea: Ectobiidae): an endemic cockroach from Chilean Mediterranean Matorral biome. *Revista Brasileira de Entomologia*, 61:114-122.

Schapheer, C., Sandoval, G., & Villagra, C. A. 2018. Pest cockroaches may overcome environmental restriction due to anthropization. *Journal of Medical Entomology*, 55: 1357-1364.

Schapheer, C., Villagra, C. 2017. *Moluchia brevipennis* species categorization process (Ministry of the Environment of Chile) pag. 1-6.

Sheehan ZBV, Kamhi JF, Seid MA, Narendra A. (2019) Differential investment in brain regions for a diurnal and nocturnal lifestyle in Australian *Myrmecia* ants. *Journal of Comparative Neurology*. 2019;1-17

Spence, K. O., & Rosenheim, J. A. 2005. Isotopic enrichment in herbivorous insects: a comparative field-based study of variation. *Oecologia*. 146. 89-97.

Streinzer, M., Kelber, C., Pfabigan, S., Kleineidam, C. J., & Spaethe, J. 2013. Sexual dimorphism in the olfactory system of a solitary and a eusocial bee species. *Journal of Comparative Neurology*, 521: 2742-2755.

Tihelka, E., Cai, C., Giacomelli, M., Lozano-Fernandez, J., Rota-Stabelli, O., Huang, et al. 2021. The evolution of insect biodiversity. *Current Biology*. 31: R1299-R1311.

Tobi, D. R., Grehan, J. R., & Parker, B. L. 1993. Review of the ecological and economic significance of forest Hepialidae (Insecta: Lepidoptera). *Forest ecology and management*. 56: 1-12.

Tumlinson, J. H. 2014. The importance of volatile organic compounds in ecosystem functioning. *Journal of chemical ecology*. 40: 212-213.

Randlkofer, B., Obermaier, E., Hilker, M., & Meiners, T. 2010. Vegetation complexity—the influence of plant species diversity and plant structures on plant chemical complexity and arthropods. *Basic and Applied Ecology*. 11: 383-395.

van Rensburg, P. D. J., Siebert, S. J., Masehela, T., Ellis, S., & Van den Berg, J. 2020. Diversity patterns of plants and arthropods in soybean agro-ecosystems in the Grassland Biome of South Africa. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 21.

Vargas, A. O., Botelho, J. F., & Mpodozis, J. 2023. The evolutionary consequences of epigenesis and neutral change: A conceptual approach at the organismal level. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 340: 531-540.

Vargas, H. A., Rasmann, S., Ramirez-Verdugo, P., & Villagra, C. A. 2018. *Lioptilodes friasi* (Lepidoptera: Pterophoridae) niche breadth in the Chilean Mediterranean matorral biome: trophic and altitudinal dimensions. *Neotropical entomology*. 47: 62-68.

Verdeguer, M., Sánchez-Moreiras, A. M., & Araniti, F. 2020. Phytotoxic effects and mechanism of action of essential oils and terpenoids. *Plants*. 9: 1571.

Vergara et al. 2011. Are eavesdroppers multimodal? Sensory exploitation of floral signals by a non-native cockroach *Blatta orientalis*. *Current Zoology* 57: 162–174.

Villagra, C. A., & Schapheer, C. 2016. New records of *Moluchia strigata* (Blanchard, 1851)(Blattodea: Ectobiidae) in Mediterranean Matorral, Central Chile. *Gayana*. 80: 137-140.

Villagra, C., Vera, W., Lenitz, S., & Bergmann, J. 2021. Differences in volatile emissions between healthy and gall-induced branches of *Haplopappus foliosus* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 98: 104309.

Vosshall, L. B., Wong, A. M., & Axel, R. 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*. 102: 147-159.

Watanabe H. 2012. Sensillum-specific, topographic projection patterns of olfactory receptor neurons in the antennal lobe of the cockroach *Periplaneta Americana*. *Journal of Comparative Neurology*. 520: 1687-1701.

Watanabe, H., Nishino, H., Nishikawa, M., Mizunami, M., & Yokohari, F. 2010. Complete mapping of glomeruli based on sensory nerve branching pattern in the primary olfactory center of the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Comparative Neurology*. 518: 3907-3930.

West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.

West-Eberhard, M. J. 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 6543-6549

Westwick, R. R., & Rittschof, C. C. 2021. Insects provide unique systems to investigate how early-life experience alters the brain and behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 15: 660464.

Wibe, A., Borg-Karlson, A.K., Norin, T., and Mustaparta, H. 1997. Identification of plant volatiles activating single receptor neurons in the pine weevil (*Hylobius abietis*). *Journal of Comparative Physiology*. 180: 585–595.

Winnington, A. P., Napper, R. M., & Mercer, A. R. 1996. Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. *Journal of Comparative Neurology*. 365: 479-490.