

UC17-FC
MAB-EBE
T431
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE POSTGRADO



**ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE INTERCAMBIO GASEOSO Y DE PÉRDIDA DE
AGUA EVAPORATIVA A TRAVÉS DE UN GRADIENTE TÉRMICO EN EL FÁSMIDO
ALTOANDINO *Agathemera crassa* (PHASMATODEA)**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al grado de:

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Por

MARIANA BEATRIZ THIENEL DE LA FUENTE

Director de Tesis: Dr. Claudio Veloso Iriarte

Diciembre de 2012

Santiago de Chile



INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

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

MARIANA BEATRIZ THIENEL DE LA FUENTE

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de noviembre de 2012.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Veloso Iriarte

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mauricio Canals Lambarri

Dr. Francisco Bozinovic Kuscevic



*"Para un gran número de problemas habrá algún animal a elección
o unos pocos en los cuales pueden ser más convenientemente estudiados"*

August Krogh, 1929

*Dedicada
al chinchemolle y a su maravillosa fisiología...*

AGRADECIMIENTOS



Agradezco infinitamente a Claudio, mi tutor, por ser un constante apoyo en mi desarrollo profesional, laboral y personal, y más importante aún, por creer en mí y en mis capacidades, otorgándome su confianza y el incentivo (y financiamiento) para lograr el cumplimiento de mis metas, en especial, el de esta tesis. Sus enseñanzas permanentes y expertas, que en ocasiones van más allá del ámbito académico, hacen de éste, el mejor Profesor Guía que un alumno quisiera tener.

Quisiera agradecer también los valiosos aportes y sugerencias para el perfeccionamiento de este trabajo de la Comisión Evaluadora, compuesta por los doctores Mauricio Canals y Francisco Bozinovic, quienes además colaboraron en la consolidación de su publicación.

Les agradezco además, a todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Ecofisiología Animal: Pablo Sabat, Hugo Torres, Andrés Sazo, Grisel Cavieres, Natalia Ramírez, Carmen Alfaro, Gonzalo Barceló, María José Pérez, Karin Maldonado, Felipe Fuentes, Cristóbal Narváez, Mónica Núñez, Daniela Figueroa, Fanny Venegas y Claudio Reyes; a mis fieles amigas: Misque Hoare, Laura Catalán, Milén Duarte y María del Sol, como también así aquellas incondicionales: Magdalena Huerta y Natalia Cuadrado. A todos estos seres humanos les doy gracias, en primer lugar, por tolerar el singular aroma que expele el chinchemolle cuando se enoja y porque de una u otra manera demostraron interés en mi trabajo y en su proceso de desarrollo, entregándome su apoyo y alentándome en momentos complicados.

Por último, le agradezco a mi familia, quienes con esfuerzo y paciencia están logrando comprender al, muchas veces no bien ponderado, mundo científico, y las implicancias que posee el hecho de pertenecer a él.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Fondecyt 1080072.

ÍNDICE DE MATERIAS



LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	8
1.2. Objetivos	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. Modelo de estudio	10
2.2. Captura y mantención	11
2.3. Respirometría	11
2.4. Determinación de patrones de intercambio gaseoso	13
2.5. Componentes evaluados	15
2.6. Análisis estadístico	16
3. RESULTADOS	18
3.1. Producción de CO ₂	18
3.2. Pérdida de agua evaporativa	34
3.3. Correlaciones entre la pérdida de agua y la producción de CO ₂ en cada patrón de intercambio gaseoso	45
4. DISCUSIÓN	47
4.1. Patrones de intercambio gaseoso y de pérdida de agua	47
4.2. Período de actividad	53
4.3. Correlación entre producción de CO ₂ y pérdida de agua	54
5. CONCLUSIONES	56
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Masa corporal promedio entre tratamientos de individuos adultos de <i>A. crassa</i> .	13
Tabla 2. Valores de Q_{10} de machos y hembras en estadio adulto de <i>A. crassa</i> .	19
Tabla 3. Porcentaje de presencia de los tres patrones respiratorios identificados en hembras y machos en estadio adulto de <i>A. crassa</i> en las temperaturas medidas.	20
Tabla 4. Chi-cuadrado para la proporción de patrones respiratorios presentados en las temperaturas medidas.	21
Tabla 5. Resultados descriptivos del intercambio gaseoso discontinuo (IGD) exhibido por individuos adultos de <i>A. crassa</i> a 10 y 20 °C.	23
Tabla 6. Resultados descriptivos del intercambio gaseoso cíclico (IGC) exhibido por individuos adultos de <i>A. crassa</i> a 10 y 20 °C durante el período de reposo.	26
Tabla 7. Resultados descriptivos del intercambio gaseoso continuo (IGCO) exhibido por individuos adultos de <i>A. crassa</i> a 20 y 30 °C durante el período de reposo.	28
Tabla 8. Resultados descriptivos de la pérdida de agua evaporativa de <i>A. crassa</i> durante el intercambio gaseoso discontinuo (IGD) a 10 y 20 °C.	35
Tabla 9. Resultados descriptivos de la pérdida de agua evaporativa de <i>A. crassa</i> durante el intercambio gaseoso cíclico (IGC) a 10 y 20 °C.	38
Tabla 10. Resultados descriptivos de la pérdida de agua evaporativa de <i>A. crassa</i> durante el intercambio gaseoso continuo (IGCO) a 20 y 30 °C.	40
Tabla 11. Contribución relativa de la pérdida de agua cuticular y respiratoria a la pérdida de agua total en individuos adultos de <i>A. crassa</i> durante el IGD e IGC.	43
Tabla 12. ANOVA de medidas repetidas para el efecto de la temperatura y el sexo sobre la pérdida de agua cuticular y respiratoria.	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Intercambio gaseoso continuo (IGCO) en *Aphodius fossor* (Scarabaeidae), medido a 15 °C. Chown & Holter 2000..... 3
- Figura 2.** Intercambio gaseoso cíclico (IGC) en *Drosophila melanogaster* (Diptera), medido a 25 °C. Redibujado de Williams et al. 1997..... 3
- Figura 3.** Intercambio gaseoso discontinuo (IGD) en *Omorgus radula* (Coleoptera), medido a 24 °C (Bosch et al. 2000). 4
- Figura 4.** Fases del intercambio gaseoso discontinuo. Medición obtenida desde una pupa de *Attacus atlas* (Lepidoptera) (Hetz & Bradley 2005)..... 5
- Figura 5.** Filogenia de insectos que indica el(los) patrón(es) de intercambio gaseoso exhibido(s) por distintas especies dentro de cada orden. Nótese que el patrón respiratorio discontinuo se presenta en sólo 5 de 30 órdenes de insectos, ausentándose en Phasmatodea, mientras que el cíclico y el continuo han sido observados en todos los taxa estudiados, siendo el primero la condición ancestral del resto (modificado de Marais et al 2005) 6
- Figura 6.** Método de identificación de patrones respiratorios según Marais et al. (2005). El patrón respiratorio continuo (A; desde *Perisphaeria* sp., Blattodea) posee >30% de los datos sobre la línea central (línea roja), presentando fluctuaciones irregulares entre los puntos máximos y mínimos. El patrón respiratorio cíclico (B; *Cormocephalus elegans*, Chilopoda) posee <30% de los datos sobre la línea central, presentando períodos regulares entre picos. Modificado de Marais et al. 2005. 14
- Figura 7.** Efecto de la temperatura sobre la tasa de producción de CO₂ en adultos de *A. crassa*. Se indican valores promedio \pm DE. Letras distintas indican diferencias significativas. 18

Figura 8. Q_{10} calculado a partir de la producción de CO_2 en los tratamientos térmicos y entre machos y hembras. Se indican valores promedio \pm DE. Letras distintas indican diferencias significativas.	19
Figura 9. Porcentaje de presencia de patrones respiratorios en el total de individuos de <i>A. crassa</i> medidos a tres temperaturas.	21
Figura 10. Tasa metabólica de <i>A. crassa</i> utilizando diferentes patrones de intercambio gaseoso a 10 (A) y 20 °C (B). Se indica promedio \pm DE.	22
Figura 11. Cuatro registros representativos del patrón de intercambio gaseoso discontinuo presentados en machos (A y C) y hembras (B y D) a 10 (A y B) y 20 °C (C y D) durante el período de reposo.	24
Figura 12. Efecto de la temperatura ambiental sobre componentes del IGD en <i>A. crassa</i> durante el período de reposo (promedio \pm DE). Todas las diferencias son significativas ($p < 0,05$).	25
Figura 13. Cuatro registros representativos del patrón de intercambio gaseoso cíclico presentados en machos (A y C) y hembras (B y D) a 10 (A y B) y 20 °C (C y D) durante el período de reposo.	27
Figura 14. Efecto de la temperatura ambiental sobre componentes del IGC en <i>A. crassa</i> durante el período de reposo (promedio \pm DE). Todas las diferencias son significativas, excepto para la amplitud.	27
Figura 15. Cuatro registros representativos del patrón respiratorio continuo exhibidos por machos (A y C) y hembras (B y D) de <i>A. crassa</i> a 20 (A y B) y 30 °C (C y D) durante el período de reposo.	28
Figura 16. Registros representativos de la modificación del IGD (A) e IGC (B) a IGCO desde el período de reposo al de actividad durante el tratamiento a 10 °C. Nótese la pérdida de ciclicidad durante el período de actividad.	29

Figura 17. Trazas de producción de CO ₂ durante los períodos de actividad y reposo (IGD) a 10 °C.....	30
Figura 18. Registros representativos de la modificación del IGD (A) y del IGC (B) a IGCO desde el período de reposo al de actividad durante el tratamiento a 20 °C, y de la exacerbación de este último patrón en el período de actividad (C). Nótese la pérdida de ciclicidad del IGD e IGC durante el período de actividad.....	31
Figura 19. Trazas de producción de CO ₂ durante los períodos de actividad y reposo (IGD) a 20 °C.....	32
Figura 20. Registro representativo de la exacerbación del IGCO desde el período de reposo al de actividad en el tratamiento de 30 °C.....	33
Figura 21. Efecto de la temperatura sobre la tasa de pérdida de agua en adultos de <i>A. crassa</i> . Se indican valores promedio ± DE. Letras distintas corresponden a diferencias significativas.	34
Figura 22. Efecto de las fases del IGD sobre la tasa de pérdida de agua de individuos adultos de <i>A. crassa</i> durante los tratamientos a 10 y 20 °C. Se muestran valores promedio ± EE y letras distintas indican diferencias significativas.....	36
Figura 23. Registros representativos de tres patrones distintos de pérdida de agua evaporativa exhibidos por un mismo individuo ($\bar{m}_b = 4,94$ g) durante los tratamientos térmicos. En A, B y C se muestra el registro de TEWL a 10, 20 y 30 °C, correspondientes a un patrón respiratorio de IGD, IGC e IGCO, respectivamente.	37
Figura 24. Efecto de las fases del IGC sobre la tasa de pérdida de agua de individuos adultos de <i>A. crassa</i> durante los tratamientos a 10 y 20 °C. Se muestran valores promedio ± DE y letras distintas indican diferencias significativas.	39

Figura 25. Efecto del tipo de patrón respiratorio sobre la TEWL masa específica durante los tratamientos térmicos a 10 (A) y 20 °C (B). Se indican promedios \pm DE.....	41
Figura 26. Tasa de pérdida de agua durante los períodos de reposo (barras negras) y de actividad (barras blancas). Se indican valores promedio \pm EE y diferencias significativas entre ambos períodos en cada tratamiento térmico dadas por la Prueba de t ($p < 0,05$).....	42
Figura 27. Vías de pérdida de agua evaporativa de individuos adultos de <i>A. crassa</i> en las temperaturas donde se presentaron patrones con ciclo (IGD e IGC). Se indican valores de promedio \pm DE y diferencias significativas dadas por la prueba Unequal HSD ($p < 0,05$).....	44
Figura 28. Mediciones simultáneas (izquierda) y correlaciones (derecha) de las tasas de pérdida de agua y de producción de CO ₂ correspondientes a ejemplos representativos del IGD, IGC e IGCO.	46

RESUMEN

En insectos se han descrito tres patrones de intercambio gaseoso: continuo (IGCO), cíclico (IGC) y discontinuo (IGD), siendo los dos primeros de carácter ancestral y el tercero una novedad que habría aparecido en forma convergente e independiente en al menos cinco taxa, y del cual no hay registro en Phasmatodea. Se han propuesto seis hipótesis sobre el origen del IGD, siendo las más estudiadas la Hídrica y la Ctónica (hipoxia/hipercapnia), y dados los antecedentes evolutivos que explican la aparición del IGD, no es posible descartar que este patrón se encuentre en este orden de insectos.

Con el sentido de apoyar o descartar a la Hipótesis Hídrica, en este trabajo se analizó la tasa de producción de CO₂ asociada a la pérdida de agua evaporativa total a través de un gradiente térmico (10, 20 y 30 °C) en adultos de *Agathemera crassa*, un fásmidio altoandino de Chile central, cuya condición ambiental durante invierno es subnival (hipoxia/hipercapnia) y la de verano es xérica. Las mediciones se efectuaron utilizando un sistema de flujo continuo de aire seco pasando a 200 ml min⁻¹, por un período de 24 h y ciclo L:O de 12:12 h, con el fin de registrar tanto el período de reposo como el de actividad.

Durante el período de reposo, *A. crassa* exhibió los tres patrones de intercambio gaseoso, destacando la utilización del IGD preferentemente a 10 °C (85% de los individuos). A medida que la temperatura aumentó, el IGCO fue el patrón más frecuente, siendo utilizado por el 100% de los individuos a 30 °C. Los componentes del ciclo (amplitud, período y frecuencia) estuvieron fuertemente influenciados por el incremento de la temperatura ambiental, observándose un aumento sustancial de los picos de producción de CO₂ y su frecuencia, y una concomitante disminución de la duración del ciclo, la que estuvo determinada principalmente por las fases C y F. Durante el período de actividad de los individuos, los patrones con ciclo se modificaron a continuos, con un

aumento significativo de la tasa metabólica. No se observó efecto de la temperatura sobre la tasa de pérdida de agua, a excepción de las hembras a 30 °C, cuyo valor fue aproximadamente el doble respecto de 10 y 20 °C. Al separar la pérdida de agua evaporativa total en sus componentes cuticular y respiratoria en aquellos patrones con ciclo, se observó una contribución del 80 y 20%, respectivamente, cuya proporción no difirió entre 10 y 20 °C. En los tres patrones de intercambio gaseoso existió una asociación directa y significativa entre la tasa de producción de CO₂ y la de pérdida de agua.

Los resultados sugieren que la Hipótesis Hídrica, debe rechazarse, pues no sería una explicación para el surgimiento del IGD en *A. crassa*, dado que a mayores temperaturas, donde se perdió más agua, este patrón desapareció. Por otra parte, la baja contribución del agua perdida por respiración respecto a la vía cuticular, sugiere un bajo aporte de este componente al ahorro y balance hídrico de los individuos. No obstante, el hábitat subterráneo de esta especie y su historia de vida sugieren que la aparición de IGD podría explicarse por un conjunto de factores, entre ellos la condición ambiental de hipercapnia (H. Ctónica) y la baja demanda metabólica asociada al sistema de retroalimentación regulatoria de PO₂ y PCO₂ (H. Neuronal). Se concluye que la presencia del IGD podría estar subestimada en otros taxa de insectos y artrópodos, al ser medidos bajo condiciones en donde este patrón no necesariamente puede expresarse.



ABSTRACT

In insects have been described three gas exchange patterns: continuous (IGCO), cyclic (IGC) and discontinuous (IGD), being the first two an ancestral character and the third a novelty that would have appeared convergent and independently in at least five taxa, and of which no record in Phasmatodea. Six hypotheses have been proposed about the origin of the IGD, being the most studied the Higric and Chthonic (hypoxic/hypercapnic), and given the evolutionary background to explain the appearance of the IGD, we cannot rule out that this pattern is present in this order of insect.

With regard to support or disprove the Higric Hypothesis, this study examined the rate of CO₂ production associated with the total evaporative water loss through a thermal gradient (10, 20 and 30 °C) in adults of *Agathemera crassa*, a high-Andean phasmid of central Chile, whose environmental condition during winter is sub-nival (hypoxic/hypercapnic) and summer is xeric. The measurements were conducted using a continuous flow system with dry air passing 200 ml min⁻¹, for a period of 24 h and cycle L: D of 12:12 h, in order to record both rest and activity periods.

At rest, *A. crassa* showed three patterns of gas exchange, highlighting the use of IGD preferably at 10 °C (85% of individuals). As the temperature increased, the IGCO pattern was more frequent, being used for 100% of individuals at 30 °C. Cycle components (amplitude, period and frequency) were strongly influenced by the ambient temperature increases, observing a substantial increase on peaks of CO₂ production and their frequency, and a concomitant decrease in the duration of cycle, which was determined primarily by C and F phases. During activity period of individuals, the patterns were changed to continuous cycle, with a significant increase in metabolic rate. There was no effect of temperature on water loss rate, except for the females at 30 °C, which value was

about twice that at 10 and 20 °C. By partitioning total evaporative water loss in its cuticular and respiratory components in those cyclic patterns, there was a contribution of 80 to 20%, respectively, whose proportion does not differ between 10 and 20 °C. In all three patterns of gas exchange there was a direct and significant association between CO₂ production and water loss rates.

The results suggest that Higric Hypothesis would not be an explanation for the emergence of IGD in *A. crassa*, since at higher temperatures, where more water is lost, this pattern disappeared. Moreover, the low contribution of cuticular water loss over the respiration one, suggesting a low contribution of this component to saving and water balance of individuals. However, the underground habitat of this species and its life history suggest that the appearance of IGD could be explained by a combination of factors, including the environmental condition of hypercapnia (Chthonic H.) and low metabolic demand associated with PO₂ and PCO₂ feedback regulatory system (Neural H.). We conclude that the presence of the IGD may be underestimated in other taxa of insects and arthropods, because they may have been measured under conditions where this pattern may not necessarily be expressed.

1. INTRODUCCIÓN

La respiración de los insectos no sólo depende de la mera difusión de los gases a través de las estructuras respiratorias, sino que corresponde a un proceso más complejo que depende de factores como la temperatura, la disponibilidad de agua y la condición hipoxia/hipercapnia (Chown & Nicolson 2004).

Al igual que todos los seres vivos, los insectos pueden ser catalogados como estructuras disipadoras de energía, capaces de adquirirla junto con nutrientes de forma activa desde el ambiente, modificando tanto a este último como a sí mismos (Chown & Nicolson 2004). Consecuentemente, y en respuesta a condiciones ambientales adversas, los insectos pueden migrar en busca de microclimas más aptos para su desarrollo. Cuando esta respuesta conductual es insuficiente para modular los efectos del cambio, los insectos pueden evadir estas condiciones adversas a través de modificaciones fisiológicas durante sus períodos activos y/o de dormancia o reposo (Danks 2002, 2007).

Las respuestas que los insectos pueden efectuar hacia el ambiente están estrechamente relacionadas con la regulación fisiológica, la que depende, en último término, de la energía producida a través del metabolismo de los sustratos (Chown & Nicolson 2004). Esta energía metabólica representa la "intensidad" de funcionamiento en una situación dada (Nespolo et al. 2007), además de permitir la adquisición de recursos adicionales para crecer, reproducirse y/o ser partícipe de las interacciones propias de una comunidad ecológica (Chown & Nicolson 2004).

Dado que el metabolismo de los insectos durante los períodos de reposo y actividad es generalmente aeróbico (Chown & Nicolson 2004), es posible determinar la tasa metabólica de un animal mediante la medición del consumo de oxígeno y/o de la

liberación de CO₂ asociados a los procesos oxidativos de los sustratos (Schmidt-Nielsen 1997, Chown & Nicolson 2004). En este contexto, es importante distinguir entre el catabolismo oxidativo como un proceso a nivel celular (respiración) y el intercambio gaseoso como la transferencia física de gases entre la atmósfera y los tejidos/hemolinfa (Lighton 1994).

En este último proceso, las capacidades y estrategias de los insectos pueden considerarse como el cruce de intereses entre la fisiología, la ecología, la etología y la evolución (Lighton 1996). Son, de hecho, respuestas de tipo adaptativas las que ha encontrado la mayoría de los investigadores en relación a eventuales desviaciones de los patrones de tasa metabólica. En este sentido, interrupciones en algunos componentes del metabolismo de invertebrados han sido sugeridas como adaptaciones frente a la desecación (Alpert 2006).

Las significancias adaptativas de estas respuestas aún son desconocidas, dado los complejos patrones de intercambio gaseoso presentes en algunos insectos (Nespolo et al. 2007). En este grupo, los patrones respiratorios han sido clasificados en tres tipos principales: intercambio de gases continuo, cíclico y discontinuo (Gibbs & Johnson 2004).

En primer lugar, el intercambio de gases continuo (IGCO) (Figura 1) tiene lugar mediante movimientos ventilatorios que promueven la difusión y/o convección de los gases, y en donde los espiráculos se mantienen abiertos constantemente (Chown & Nicolson 2004).

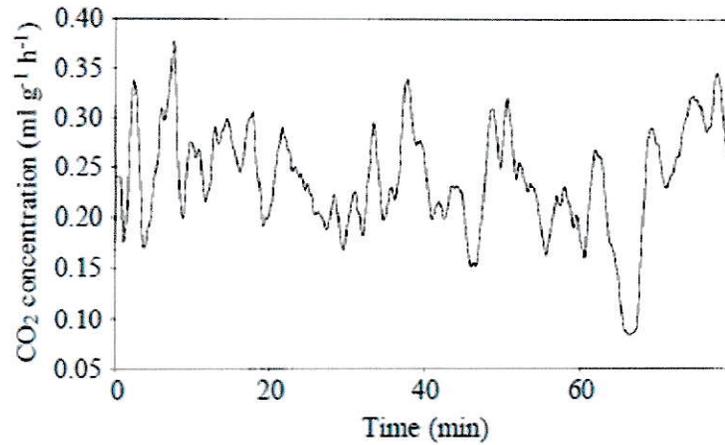


Figura 1. Intercambio gaseoso continuo (IGCO) en *Aphodius fossor* (Scarabaeidae), medido a 15 °C. Chown & Holter 2000.

El intercambio de gases cíclico (IGC) (Figura 2) consta de una producción constante de CO₂ con pequeñas variaciones dadas por los períodos de actividad y/o ruidos aleatorios. Este patrón respiratorio se caracteriza por presentar picos periódicos de producción de CO₂, seguidos de valles de baja liberación de este compuesto (Chown & Nicolson 2004).

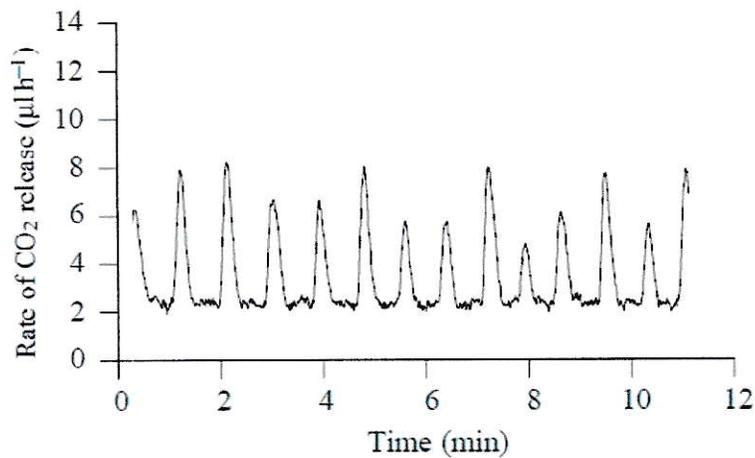


Figura 2. Intercambio gaseoso cíclico (IGC) en *Drosophila melanogaster* (Diptera), medido a 25 °C. Redibujado de Williams et al. 1997.

En contraste, el intercambio de gases discontinuo (IGD) (Figura 3) se caracteriza por presentar picos de producción de CO_2 intercalados por períodos de nulo intercambio gaseoso. De esta forma, en este patrón respiratorio es posible distinguir tres fases (Figura 4), las que están asociadas a la apertura y cierre de los espiráculos (Chown & Nicolson 2004): 1) fase O (*open*), la que corresponde al pico de liberación de CO_2 generado por la apertura de los espiráculos; 2) fase C (*closed*), la que es generada por el cierre de los espiráculos formando valles posteriores a la fase O; y 3) fase F (*flutter*), en donde una leve liberación de CO_2 antecede a la fase O producto de la apertura intermitente de los espiráculos (Chown & Nicolson 2004).

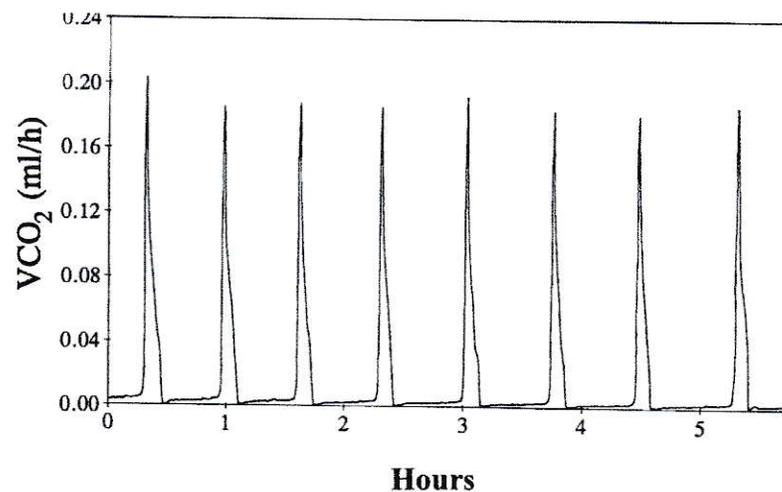


Figura 3. Intercambio gaseoso discontinuo (IGD) en *Omorgus radula* (Coleoptera), medido a 24 °C (Bosch et al. 2000).

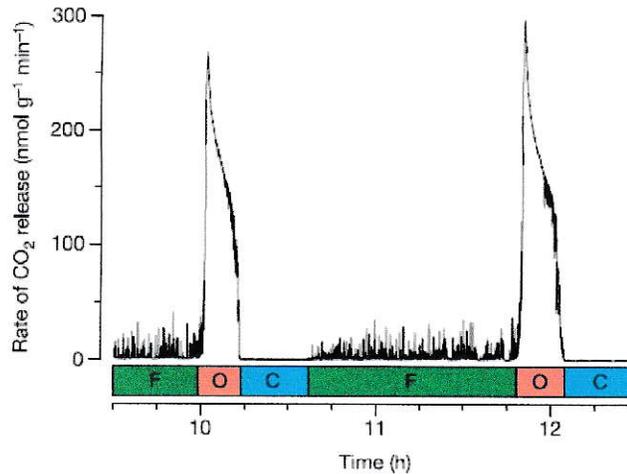


Figura 4. Fases del intercambio gaseoso discontinuo. Medición obtenida desde una pupa de *Attacus atlas* (Lepidoptera) (Hetz & Bradley 2005).

El estudio del IGC y del IGD en insectos, ha tenido un sesgo en términos de la diversidad de especies, siendo los taxa más analizados los coleópteros y otros insectos holometábolos (Chown et al. 2006). Filogenéticamente, Marais et al. (2005) sugieren que la evolución de los patrones de intercambio gaseoso en insectos radica en el IGC como el carácter ancestral del grupo. En este contexto, el IGD pareciera haber evolucionado independientemente sólo en unas pocas especies de distintos órdenes, dentro de los cuales también se presentan los patrones cíclico y continuo (Figura 5).

Se han propuesto al menos seis hipótesis para explicar el origen del intercambio gaseoso cíclico y discontinuo: (1) Hipótesis Hídrica, la que indica que el IGC y/o el IGD representan una adaptación a ambientes xéricos, limitando, de esta forma, la pérdida de agua evaporativa (Buck et al. 1953, Levy & Schneiderman 1966); (2) Hipótesis Ctónica-hídrica, la cual plantea que el IGC y/o el IGD representan una adaptación a ambientes hipóxicos/hipercápnicos, limitando al mismo tiempo la pérdida de agua evaporativa (Lighton & Berrigan 1995); (3) Hipótesis de daño oxidativo, cuya estrategia plantea que el IGC y/o el IGD reducen el daño oxidativo durante los períodos de baja demanda de

oxígeno (Hetz & Bradley 2005); (4) Hipótesis de propiedad emergente, la cual señala que el IGC y/o el IGD representan un epifenómeno no-adaptativo que surge de la interacción entre dos sistemas de retroalimentación que regulan el intercambio gaseoso con una demanda mínima (Chown & Holter 2000); (5) Hipótesis de protección ante invasores, en la que el IGC y/o el IGD son una adaptación que incrementa la frecuencia de cierre de los espiráculos para disminuir así el riesgo de infestación por parásitos (Harrison et al. 2001); y (6) Hipótesis Neuronal, la que asocia la hipótesis de Propiedad Emergente con los sensores de PO_2 y PCO_2 del sistema nervioso (Mathews & White 2011). Sin embargo, la mayoría de los debates se ha centrado en las dos primeras hipótesis (Chown & Nicolson 2004, Gibbs & Johnson 2004, Marais et al. 2005, Nespolo et al. 2007).

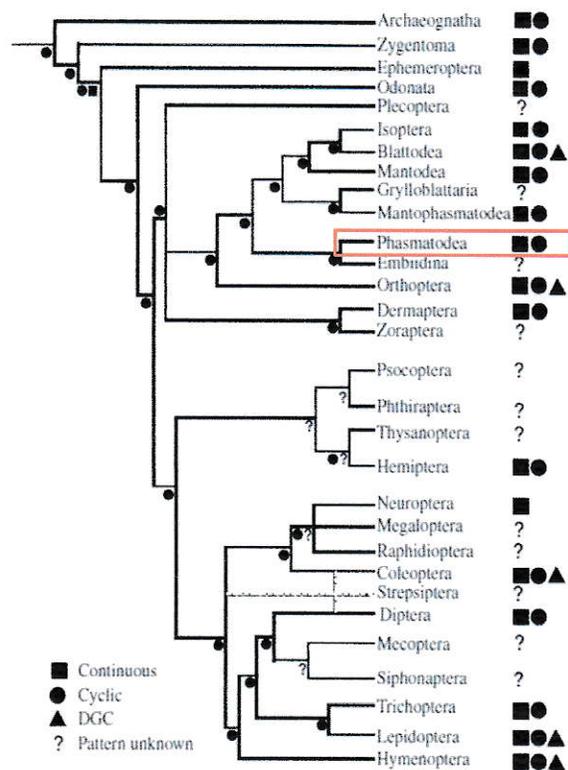


Figura 5. Filogenia de insectos que indica el(los) patrón(es) de intercambio gaseoso exhibido(s) por distintas especies dentro de cada orden. Nótese que el patrón respiratorio discontinuo se presenta en sólo 5 de 30 órdenes de insectos, ausentándose en Phasmatodea, mientras que el cíclico y el continuo han sido observados en todos los taxa estudiados, siendo el primero la condición ancestral del resto (modificado de Marais et al 2005)

Para el orden Phasmatodea, existe un déficit de información respecto al intercambio gaseoso, sin embargo, los patrones descritos hasta ahora muestran la presencia de los mecanismos cíclico y continuo (Marais et al. 2005). No obstante, dados los antecedentes evolutivos que explican la aparición del intercambio gaseoso discontinuo, no es posible descartar que alguna(s) familia(s) de este orden presente(n) este patrón.

Por otra parte, trabajos recientes han dado cuenta de una importante asociación entre los patrones respiratorios y la pérdida de agua respiratoria, haciendo énfasis en la contribución de esta última a la pérdida total de agua evaporativa en insectos (Chown 2002). En este contexto, la pérdida de agua evaporativa ha sido estudiada experimentalmente en insectos que exhiben IGD, procediendo a particionar el intercambio gaseoso en sus componentes relativos a los espiráculos y la cutícula (Lighton et al. 1993). Una reducción en la apertura continua de los espiráculos podría favorecer un ahorro de agua (Lighton et al. 1993), principalmente durante la fase F, debido a la presión endotraqueal negativa generada por un flujo bajo y convectivo de gases. A altas temperaturas, Chappel & Rogowitz (2000) argumentan que, debido a altas tasas metabólicas y presiones de saturación del vapor de agua, la pérdida potencial de agua respiratoria debería ser más alta y los IGD más pronunciados. Sin embargo, y en contraste a este argumento, Chown (2002) observó que los individuos abandonan el IGD cuando la conservación de agua se torna crítica. Por ejemplo, se ha registrado una especie de coleóptero que prácticamente no utilizaba el IGD a altas temperaturas, y cuando lo hacía, el período que comprendía el cierre de los espiráculos (aquel que disminuye la pérdida de agua), se reducía sustancialmente.

Dados estos antecedentes, y sobre la base de las hipótesis respecto origen de los mecanismos de intercambio gaseoso cíclico y discontinuo, en este trabajo se analizará el o los patrones presentes en la especie altoandina *Agathemera crassa* (Phasmatodea) y su asociación con la pérdida de agua evaporativa. El ambiente donde habita la especie es, durante el período invernal, de carácter hipóxico/hipercápnic (Jones 1999, Musselman et al. 2005), ya que utiliza refugios bajo tierra y nieve, mientras que durante el verano es extremadamente xérico. Trabajos preliminares, basados en experimentos de 48 horas a 20 °C, han logrado identificar un patrón de respiración discontinuo, cuya frecuencia y magnitud podrían estar asociadas a la temperatura ambiente y al nivel de actividad de los individuos.

1.1. Hipótesis

En función a los antecedentes aportados, se propone las siguientes hipótesis:

- a) Si los ciclos respiratorios discontinuos observados en *A. crassa* corresponden a un mecanismo de ahorro de agua, éstos debieran ser más acentuados a altas T_a , donde las pérdidas de este recurso deberían ser mayores.
- b) La existencia de ciclos discontinuos debería ser más acentuada en períodos de reposo, y desaparecer o modificarse a ciclos continuos y/o cíclicos en períodos de actividad.
- c) Deberá existir una correlación positiva entre los ciclos de liberación de CO_2 y los de pérdida de agua respiratoria.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Determinar los patrones de intercambio gaseoso y su relación con la pérdida de agua evaporativa en el fásmido altoandino *Agathemera crassa* a través de un gradiente de temperatura ambiental.

1.2.2. Objetivos específicos

Tanto para machos como para hembras en estadio adulto, se plantean los siguientes objetivos:

- a) Determinar el patrón de intercambio gaseoso a través de la producción de CO₂ y analizar los aspectos relacionados con su estructura (período, frecuencia, amplitud y caracterización de las fases) a tres temperaturas ambientales contrastantes (10, 20 y 30 °C).
- b) Determinar la pérdida de agua evaporativa total asociada a cada patrón de intercambio gaseoso y la contribución relativa de cada uno de sus componentes (cuticular y respiratorio).
- c) Analizar la posible correlación entre ambas variables de la fisiología de *A. crassa*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Modelo de estudio

Agathemera crassa Blanchard, 1851 (Phasmatodea: Agathemeridae) es un fásrido hemimetábolo que habita ambientes cordilleranos de Chile central, desde el río Aconcagua (Región de Valparaíso) hasta las Termas del Flaco (Región del Lib. Bdo. O'Higgins), por sobre la línea de bosques hasta los 3000 m s.n.m., aproximadamente (Camousseight 1995, Vera et al. 2012). Puede ser encontrado en solitario, en pareja o en grupos con proporciones de sexo y de tamaño corporal variables, bajo y entre rocas, las que generalmente se ubican cercanas a su alimento principal, *Acaena* sp.. El ambiente donde habita la especie se caracteriza por poseer un clima frío de alta radiación solar, con precipitaciones generalmente en forma de nieve o granizo, las que permanecen entre 5 a 6 meses (mayo a octubre/noviembre) (Hoffmann et al. 1998). Durante este último período, *A. crassa* permanece bajo refugios subterráneos, caracterizados por una baja disponibilidad de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono (Jones 1999, Musselman et al. 2005), mientras que durante el período estival, la disponibilidad de agua disminuye, tornándose un ambiente extremadamente xérico (C. Veloso, comunicación personal). Los datos obtenidos hasta la fecha permiten proponer a *Agathemera crassa* como una especie de hábitos nocturnos, que presenta su mayor actividad durante el período de oscuridad (Camousseight 1995, C. Veloso, comunicación personal).

Machos y hembras poseen un marcado dimorfismo sexual en cuanto a tamaño corporal, alcanzando una masa de 4 g y 13 g, respectivamente (Thienel 2010).

2.2. Captura y mantención

Durante septiembre de 2010, correspondiente a inicios de primavera, se capturó un total de 20 individuos adultos (10 hembras y 10 machos) desde la localidad altoandina de Lagunillas (33°25' S 71°28' W, 2400 m s.n.m.), Región Metropolitana, Chile central.

Una vez trasladados al laboratorio y durante toda su permanencia, los animales fueron dispuestos en cajas plásticas separadas por sexo, dentro de cámaras termo-reguladas con foto-períodos diarios de L:O de 14:10 hrs. a 20:5 °C, y alimentados con una dieta *ad libitum* de *Acaena splendens*, su alimento natural.

2.3. Respirometría

El respirómetro utilizado fue similar al de otros autores (e.g. Chappell & Rogowitz 2000, Lighton & Turner 2004, Nespolo et al. 2007), el que consiste en un sistema abierto de flujo continuo (200 ml min⁻¹), del cual se remueve el CO₂ y el vapor de agua presentes, utilizando columnas de cal de hidróxido de bario (Baralyme®) y anhídrido de sulfato de calcio (Drierita®), respectivamente. En este estado, el aire ingresa a la cámara metabólica de vidrio de 127 ml (aquella que contiene el animal), la que se encuentra dentro de la cámara termo- y foto-regulada. Posteriormente, el aire fluye a través de un analizador de vapor de agua Sable Systems International® (Las Vegas, Nevada, EEUU), modelo RH-300, luego del cual el aire se filtra nuevamente por Drierita®, para luego pasar por el analizador de CO₂ Sable Systems International®, modelo FOXBOX. Finalmente, a través de la interfase UI2 de la misma marca anterior, los datos son exportados al computador, en donde son analizados mediante el software ExpeData (Sable Systems International®)

versión 1.0.3. Tanto al inicio como al término de la medición, se realizó una línea de base de 15 min para estabilizar los niveles de los gases del sistema.

Las mediciones de producción de CO₂ y de pérdida de agua evaporativa (TEWL) tuvieron una duración de 24 hrs, con el fin de registrar los períodos de actividad y de reposo de los individuos; y se realizaron a tres temperaturas ambientales contrastantes (10, 20 y 30 °C), con un foto-período L:O de 12:12 hrs. Cada individuo (10 machos y 10 hembras) fue medido una sola vez por cada temperatura. La toma de datos fue cada 5 s.

La masa corporal (m_b) de los individuos fue registrada con una balanza digital de precisión $\pm 0,01$ g, tanto al inicio, como una vez finalizada la medición. De esta manera, el valor de m_b utilizado en el análisis de los datos correspondió al promedio entre ambos momentos, el que no tuvo variación significativa a través de los tratamientos térmicos (ANOVA medidas repetidas: $F=2,66$; $p=0,08$). Sin embargo, se observó una diferencia significativa de la m_b respecto al sexo, presentado las hembras un mayor tamaño corporal que los machos ($F=118,68$; $p<<0,01$), lo que da cuenta del marcado dimorfismo sexual de la especie. La Tabla 1 muestra los valores promedio de masa corporal (\pm DE) de cada individuo medido entre los 3 tratamientos (10, 20 y 30 °C).

Tabla 1. Masa corporal promedio entre tratamientos de individuos adultos de *A. crassa*.

Individuo	m _b (g)	DE
M1	2,45	0,05
M2	2,26	0,09
M3	2,54	0,16
M4	1,84	0,18
M5	2,20	0,16
M8	2,25	0,20
M12	3,16	0,17
M13	2,40	0,06
M14	2,37	0,07
M15	2,54	0,15
H2	6,00	0,23
H3	5,49	0,05
H4	5,46	0,20
H5	4,66	0,29
H6	6,31	0,39
H7	4,94	0,09
H10	6,87	0,22
H12	7,06	0,38
H13	5,02	0,24
H14	5,02	0,21
Promedio ♂	2,40	0,34
Promedio ♀	5,68	0,84

2.4. Determinación de patrones de intercambio gaseoso

Las trazas de producción de CO₂ fueron categorizadas como continuas, cíclicas o discontinuas por inspección, según el método propuesto por Marais et al. (2005), en el cual el patrón discontinuo es rápidamente identificado, debido a la presencia de las fases C y F. Sin embargo, en ausencia de estas fases, la identificación de los demás patrones se basa en el principio de la presencia de picos regulares de producción de CO₂. Según los autores, al trazar una línea por el centro de la traza de producción CO₂, un patrón cíclico tendrá una menor cantidad de puntos (<30%) bajo ésta, y se caracterizará por

poseer períodos e inter-períodos dados por los picos de producción de CO_2 (Figura 6B). Al contrario, si el porcentaje de datos sobre la línea es $>30\%$, el patrón corresponderá a uno continuo y las fluctuaciones entre los valores máximos y mínimos de producción de CO_2 , en estricto rigor, no serán regulares (Figura 6A). En aquellos individuos en cuya medición se observó más de un patrón respiratorio, se utilizó la regla de simple mayoría propuesta por Terblanche et al. (2008), en donde se opta por el patrón predominante en cuanto a número de datos o, en otras palabras, a su mayor duración. Cabe mencionar que en el análisis de cada patrón, sólo fueron incluidos aquellos datos correspondientes al patrón predominante.

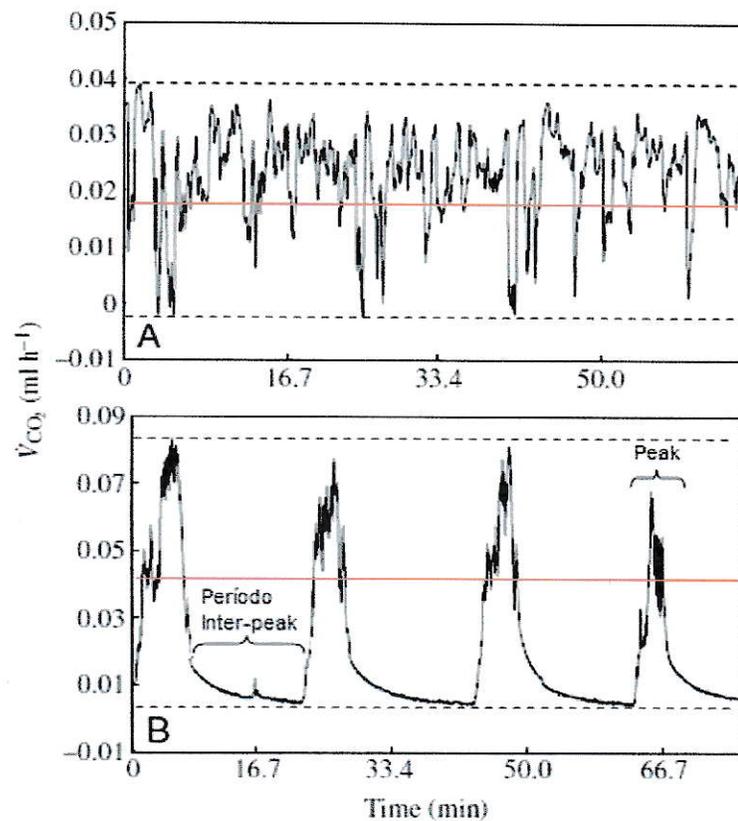


Figura 6. Método de identificación de patrones respiratorios según Marais et al. (2005). El patrón respiratorio continuo (A; desde *Perisphaeria* sp., Blattodea) posee $>30\%$ de los datos sobre la línea central (línea roja), presentando fluctuaciones irregulares entre los puntos máximos y mínimos. El patrón respiratorio cíclico (B; *Cormocephalus elegans*, Chilopoda) posee $<30\%$ de los datos sobre la línea central, presentando períodos regulares entre picos. Modificado de Marais et al. 2005.

2.5. Componentes evaluados

Los componentes evaluados en los patrones respiratorios que presentaron ciclicidad (IGD e IGC) fueron: tasa de emisión de CO₂ (VCO₂), frecuencia y periodicidad. Asimismo, tanto para las fases del IGD (O, F y C), como para los valles y picos del IGC, fueron evaluados su volumen y tasa de emisión de CO₂, y su duración. El patrón respiratorio continuo sólo fue analizado en función de su tasa de emisión de CO₂ (VCO₂).

El cambio metabólico dada una diferencia de 10 °C (Q₁₀) se estimó según la ecuación $Q_{10} = \left(\frac{TMS_2}{TMS_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$, donde TMS_i y T_i corresponden a la tasa metabólica estándar (producción de CO₂) y la temperatura en la condición "i" (Schmidt-Nielsen 1997).

En insectos que exhiben patrones respiratorios con ciclicidad (IGC e IGD) es posible separar el agua que se pierde a través de la cutícula y de la respiración (Bosch et al. 2000, Chown & Nicolson 2004), asumiendo que durante los periodos de cierre total o parcial de espiráculos, es decir, las fases C y F (en IGD) y el valle (en IGC), la pérdida de agua sería sólo a través de la cutícula, mientras que durante la fase O ó el pico de producción de CO₂, la pérdida de agua obtenida representa a la pérdida de agua total (cuticular y respiratoria). De esta forma, la pérdida de agua respiratoria puede ser calculada como la diferencia entre la pérdida de agua evaporativa total y la cuticular, cuyas tasas de emisión de CO₂ fueron expresadas en porcentaje respecto a la pérdida total y analizadas como proporción.

Asociado a lo anterior, Bosh et al. (2000) indican que, al menos en las mediciones realizadas en el escarabajo *O. radula*, en la traza correspondiente a la pérdida de agua no es posible distinguir entre las fases C y F del IGD, difiriendo visualmente esta traza de la de producción de CO₂. Sin embargo, al contar con ambas trazas sincronizadas, se realizó

la separación de estas fases en la traza de pérdida de agua en base a la de producción de CO₂, con el fin de cuantificar y analizar posibles diferencias entre ambas fases de la tasa de pérdida de agua.

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a través de pruebas paramétricas y no paramétricas, según el tipo de dato y el cumplimiento de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia.

El efecto de la temperatura sobre las tasas de producción de CO₂ y de pérdida de agua se estudió mediante un análisis de varianza para medidas de repetidas (ANOVA m.r.), luego del cual se aplicó un análisis de la covarianza (ANCOVA) por cada tratamiento térmico, utilizando la masa corporal como covariable. El Q₁₀ de la tasa metabólica entre los tratamientos térmicos también fue analizado mediante un ANOVA m.r.

Para evaluar la proporción de los patrones de intercambio gaseoso entre los tratamientos térmicos, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. Las diferencias en las tasas de producción de CO₂ y de pérdida de agua entre los patrones de intercambio gaseoso, fueron analizadas mediante las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis, respectivamente.

Para comparar la tasa de producción de CO₂ entre el período de actividad y el de reposo, se aplicó la prueba de Wilcoxon (por patrón y tratamiento térmico). Mientras que para la tasa de pérdida de agua se utilizó la prueba de T de Student (por tratamiento térmico).

Para cada temperatura y sexo, se caracterizaron los distintos componentes de los ciclos de intercambio gaseoso (IGD e IGC): tasa de producción de CO₂ promedio (VCO₂), amplitud (tasa de producción de CO₂ máxima), frecuencia y período. En cada una de las fases del IGD (C, F y O) y del IGC (valle y pico), se cuantificó su duración, volumen y tasa de CO₂ emitido, así como también su volumen y tasa de pérdida de agua. En el caso del IGCO, solamente fueron cuantificadas sus tasas promedio de producción de CO₂ y H₂O.

Las potenciales diferencias en amplitud, período y frecuencia de los ciclos entre los tratamientos térmicos fueron estudiadas a través de la prueba U de Mann-Whitney. La tasa de pérdida de agua masa específica entre las fases del IGD a 10 y 20 °C, fueron analizadas mediante un ANOVA m.r. y la prueba de Kruskal-Wallis, respectivamente, mientras que para las fases del IGC, esta diferencia se estudió a través de la prueba de Wilcoxon.

La proporción entre la pérdida de agua cuticular y la respiratoria fue analizada con un ANOVA m.r.

Finalmente, para conocer la relación entre las tasas de producción de CO₂ y de pérdida de agua, se realizó un análisis de regresión lineal entre ambas variables para cada tratamiento térmico y además, para un ejemplo representativo de cada patrón.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el apoyo bibliográfico de (Zar 1996), considerando un nivel de significancia del 5%. Todos los valores se presentan como promedio ± DE ó EE, según sea el caso.

3. RESULTADOS

3.1. Producción de CO₂

3.1.1. Producción de CO₂ según temperatura

La elevación de la temperatura provocó un aumento significativo de la tasa de producción de CO₂ (ANOVA m.r.: $F_{(2,30)}=260,04$; $p<<0,001$). Al controlar por masa corporal en cada tratamiento térmico, se observó que tanto machos como hembras liberan la misma cantidad de CO₂ (ANCOVA a 10 °C: $F_{(1,14)}=1,67$; $p=0,22$. A 20 °C: $F_{(1,14)}=0,001$; $p=0,97$. A 30 °C: $F_{(1,14)}=0,06$; $p=0,81$) (Figura 7).

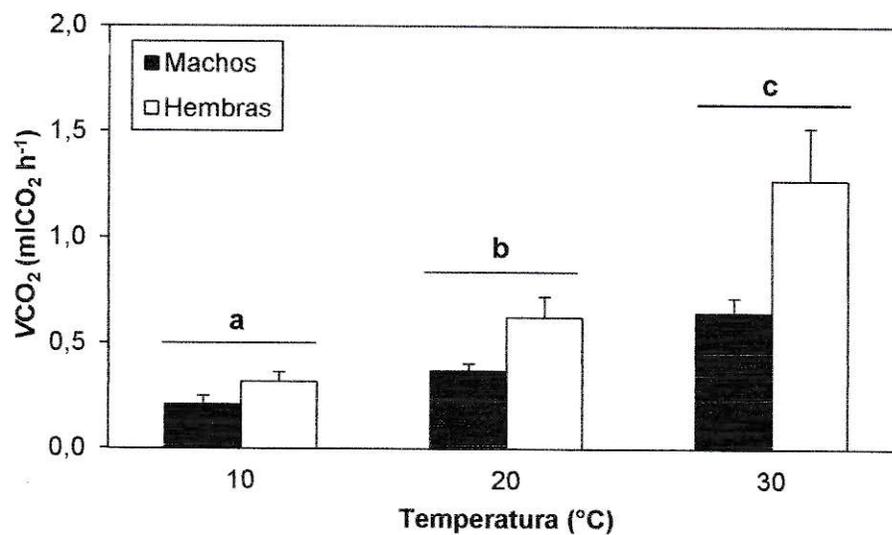


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la tasa de producción de CO₂ en adultos de *A. crassa*. Se indican valores promedio \pm DE. Letras distintas indican diferencias significativas.

El Q_{10} calculado (Tabla 2, Figura 8) no tuvo diferencias significativas entre los intervalos de temperatura (ANOVA m.r.: $F_{(1,15)}=0,005$; $p=0,95$), sin embargo, se encontró efecto del sexo entre 20-30 °C ($F_{(1,15)}=11,344$; $p=0,004$), donde las hembras presentaron un Q_{10} mayor al de los machos (Unequal N HSD: $p<0,05$).

Tabla 2. Valores de Q_{10} de machos y hembras en estadio adulto de *A. crassa*.

	$Q_{10} (10-20\text{ °C}) \pm \text{DE}$	$Q_{10} (20-30\text{ °C}) \pm \text{DE}$
Machos	$1,84 \pm 0,33$	$1,75 \pm 0,21$
Hembras	$1,99 \pm 0,38$	$2,07 \pm 0,34$

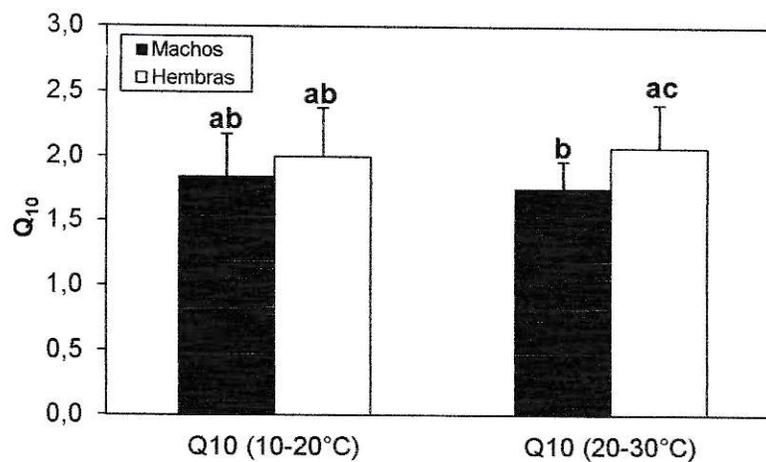


Figura 8. Q_{10} calculado a partir de la producción de CO_2 en los tratamientos térmicos y entre machos y hembras. Se indican valores promedio \pm DE. Letras distintas indican diferencias significativas.

3.1.2. Caracterización de patrones de intercambio gaseoso

3.1.2.1. Presencia de patrones de intercambio gaseoso según temperatura

En los tres tratamientos térmicos aplicados (10, 20 y 30 °C), se observó una disímil presencia de los 3 patrones respiratorios (véase Tabla 3 y Figura 9). Considerando el total de individuos medidos (10 machos y 10 hembras), a 10 °C sólo se observó la presencia de patrones respiratorios con ciclicidad: un 85% presentó IGD, mientras que el 15% restante exhibió IGC. A 20 °C, se observó la presencia de los tres patrones: un 60% presentó IGCO, un 25% exhibió IGC y un 15% mostró IGD. Finalmente, a 30 °C no se observó presencia de patrones cíclicos, debido a que el 100% de los individuos exhibió IGCO.

Tabla 3. Porcentaje de presencia de los tres patrones respiratorios identificados en hembras y machos en estadio adulto de *A. crassa* en las temperaturas medidas.

	10 °C			20 °C			30 °C		
	IGD	IGC	IGCO	IGD	IGC	IGCO	IGD	IGC	IGCO
Machos	80%	20%	0%	20%	20%	60%	0%	0%	100%
Hembras	90%	10%	0%	10%	30%	60%	0%	0%	100%

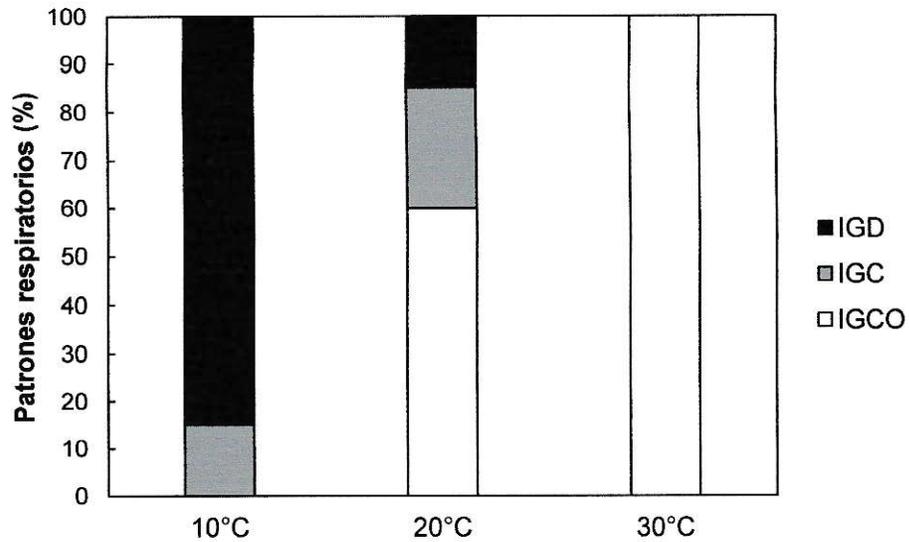


Figura 9. Porcentaje de presencia de patrones respiratorios en el total de individuos de *A. crassa* medidos a tres temperaturas.

Al evaluar a nivel inter-sexual la frecuencia de los patrones respiratorios a las tres temperaturas medidas, no se presentaron diferencias significativas ($X^2= 0,925$; $df=5$; $p=0,97$). Sin embargo, al eliminar el factor sexo, se observaron diferencias significativas entre la proporción de patrones respiratorios presentes en los distintos tratamientos ($X^2= 48,45$; $df=4$; $p<<0,0001$). A 10 °C, existió significativamente una mayor presencia de patrones cíclicos (IGD e IGC) respecto a 20 °C y más aún a 30 °C (véase Tabla 4). Asimismo, la presencia de estos patrones a 20 °C fue mayor que a 30 °C.

Tabla 4. Chi-cuadrado para la proporción de patrones respiratorios presentados en las temperaturas medidas.

Tratamiento (°C)	Chi-cuadrado (X^2)	df	p
10 – 20	22,3	2	$<<0,00001$
10 – 30	40,0	2	$<<0,0001$
20 – 30	10,0	2	0,007

A 10 °C (Figura 10A), la tasa metabólica masa específica registrada en aquellos individuos que exhibieron IGD no difirió de aquella observada en aquellos con IGC (Prueba U de Mann-Whitney: $Z=-1,0$; $p=0,31$). Asimismo, a 20 °C (Figura 10B) tampoco hubo diferencias en la tasa metabólica masa específica entre los distintos patrones (Prueba de Kruskal-Wallis: $H=0,81$; $p=0,7$).

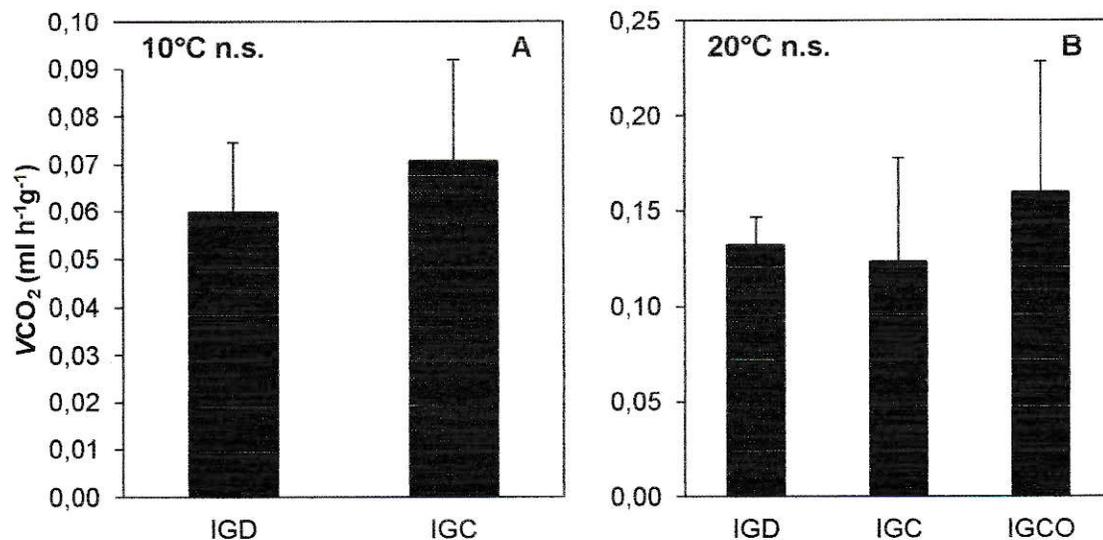


Figura 10. Tasa metabólica de *A. crassa* utilizando diferentes patrones de intercambio gaseoso a 10 (A) y 20 °C (B). Se indica promedio \pm DE.

3.1.2.2. Intercambio Gaseoso Discontinuo

La presencia del IGD fue observada a 10 y 20 °C sólo durante el período de reposo de los individuos, en donde fue posible identificar claramente las 3 fases que caracterizan a este patrón respiratorio (Tabla 5). Al respecto, la Figura 11 muestra cuatro registros representativos del IGD, exhibido por machos y hembras a 10 y 20 °C.

Tabla 5. Resultados descriptivos del intercambio gaseoso discontinuo (IGD) exhibido por individuos adultos de *A. crassa* a 10 y 20 °C.

	10 °C				20 °C			
	Machos (n=8)		Hembras (n=9)		Machos (n=2)		Hembras (n=1)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Mb (g)	2,33	0,23	5,75	0,86	2,33	0,18	5,49	
VCO ₂ (ml CO ₂ h ⁻¹)	0,160	0,020	0,292	0,069	0,307	0,025	0,611	
Amplitud (ml CO ₂ h ⁻¹)	0,548	0,232	1,053	0,481	0,771	0,163	2,133	
Frecuencia (mHz)	0,235	0,140	0,187	0,069	0,917	0,436	0,883	
Período (h)	1,98	1,20	1,78	0,56	0,38	0,15	0,35	
Fase C								
Volumen de emisión (μL)	31,60	16,12	62,33	38,38	13,84	2,78	16,0	
Duración (min)	21,90	7,95	28,14	11,07	6,89	1,96	6,34	
Tasa emisión (μL min ⁻¹)	1,375	0,379	2,315	0,997	2,034	0,176	3,059	
Fase F								
Volumen de emisión (μL)	151,07	114,38	221,72	118,37	36,00	8,87	50,7	
Duración (min)	82,48	55,40	74,58	49,40	12,14	4,74	10,91	
Tasa emisión (μL min ⁻¹)	1,705	0,280	3,203	1,328	3,055	0,462	4,649	
Fase O								
Volumen de emisión (μL)	108,61	30,59	240,02	75,47	104,26	11,85	153,8	
Duración (min)	16,53	2,59	19,04	1,59	11,32	2,82	7,59	
Tasa emisión (μL min ⁻¹)	6,623	1,610	12,667	3,912	9,371	1,287	20,271	

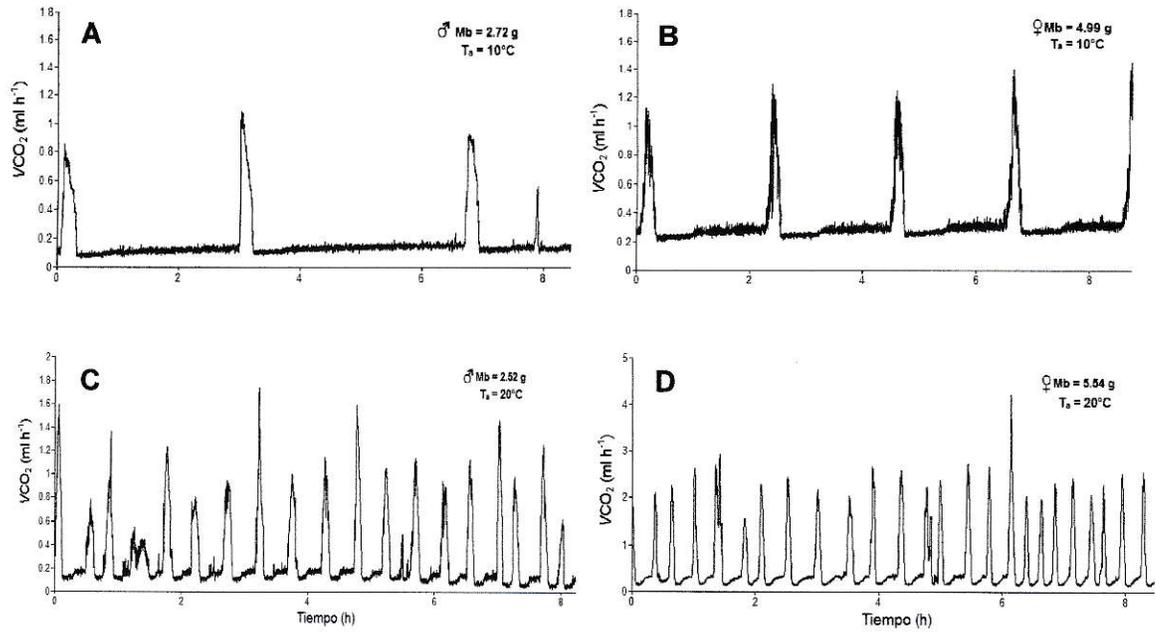


Figura 11. Cuatro registros representativos del patrón de intercambio gaseoso discontinuo presentados en machos (A y C) y hembras (B y D) a 10 (A y B) y 20 °C (C y D) durante el período de reposo.

Al analizar el efecto de la temperatura sobre los componentes del IGD (Figura 12) se observó una dependencia directa y significativa de la amplitud (Prueba de Mann-Whitney: $Z=-2,268$; $p<0,023$) y la frecuencia del ciclo ($Z=-2,646$; $p<0,008$), con un aumento de 1,5 y 2,5 veces, respectivamente. Por su parte, el período del ciclo varió inversamente a la T_a ($Z = 2,646$; $p<0,008$), disminuyendo 2,5 veces de 10 a 20 °C.

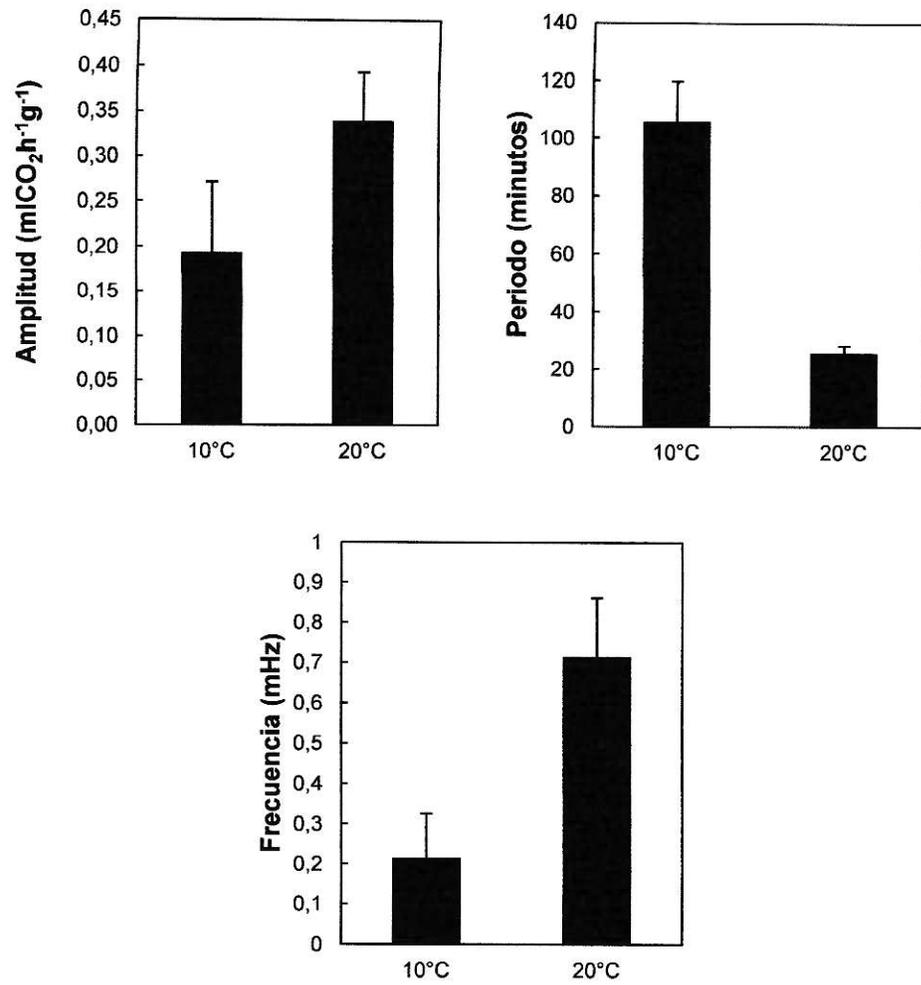


Figura 12. Efecto de la temperatura ambiental sobre componentes del IGD en *A. crassa* durante el período de reposo (promedio \pm DE). Todas las diferencias son significativas ($p < 0,05$).

3.1.2.3. Intercambio Gaseoso Cíclico

La presencia del IGC fue observada a 10 y 20 °C, sólo durante el período de reposo de los individuos, y en donde fue posible identificar tanto los valles como los picos de emisión de CO₂, distribuidos de forma regular a lo largo de la medición (Tabla 6). Al respecto, la Figura 13 muestra cuatro registros representativos del IGC, exhibidos por machos y hembras en estadio adulto a 10 y 20 °C.

Tabla 6. Resultados descriptivos del intercambio gaseoso cíclico (IGC) exhibido por individuos adultos de *A. crassa* a 10 y 20 °C durante el período de reposo.

	10 °C				20 °C			
	Machos (n=2)		Hembras (n=1)		Machos (n=2)		Hembras (n=3)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Mb (g)	2,70	0,64	5,02		2,40	0,20	5,75	0,72
VCO ₂ (mlCO ₂ h ⁻¹)	0,064	0,002	0,070		0,101	0,043	0,125	0,073
Amplitud (mlCO ₂ h ⁻¹)	0,349	0,165	0,352		0,361	0,03	1,277	0,744
Frecuencia (mHz)	0,555	0,003	0,444		2,302	0,337	1,834	0,012
Período (h)	0,57	0,02	0,63		0,13	0,01	0,15	0,002
Valle								
Volumen de emisión (μL)	26,03	9,38	35,41		8,064	2,313	9,027	4,34
Duración (min)	15,53	6,9	19,79		2,96	0,95	2,37	0,56
Tasa emisión (μL min ⁻¹)	1,711	0,158	1,789		2,737	0,097	3,639	1,067
Pico								
Volumen de emisión (μL)	94,54	43,31	120,51		45,35	0,216	97,55	43,18
Duración (min)	18,03	4,24	20,19		5,67	0,23	6,91	0,34
Tasa emisión (μL min ⁻¹)	5,102	1,201	5,9693		8,009	0,368	14,18	6,59

Al analizar el efecto de la temperatura sobre los componentes del IGC (Figura 14) se observó una dependencia directa y significativa de la frecuencia del ciclo ($Z=-2,23$; $p<0,025$), aumentando 3 veces su valor de 10 a 20 °C. Por su parte, el período del ciclo varió inversamente a la T_a ($Z=2,23$; $p<0,025$), disminuyendo aproximadamente 2,5 veces de 10 a 20 °C. No se encontraron diferencias significativas en la amplitud del ciclo dado el cambio de temperatura ($Z=-1,64$, $p=0,10$).

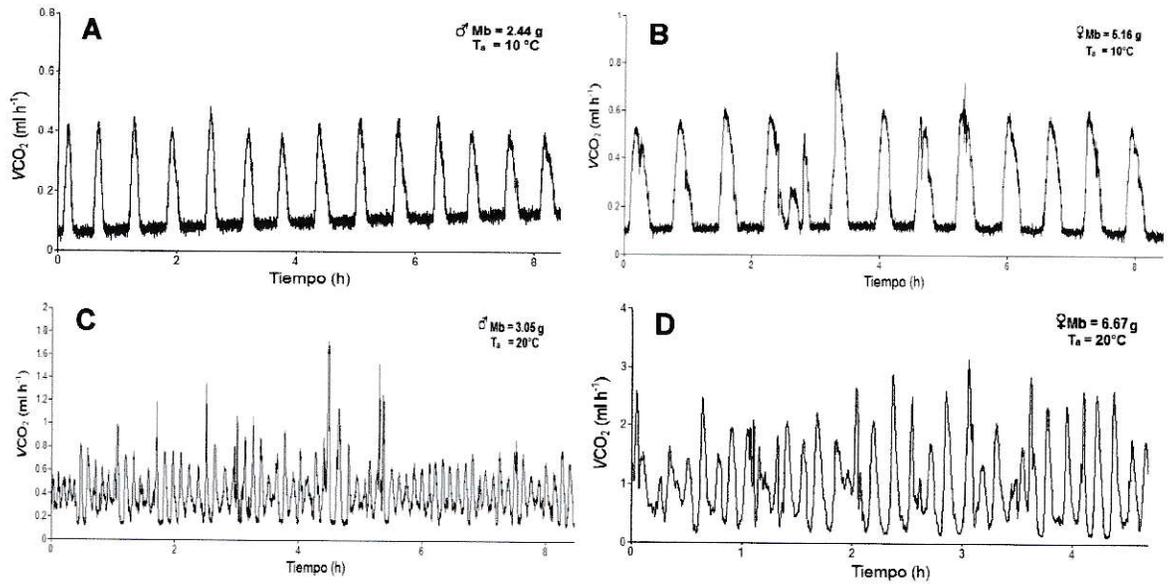


Figura 13. Cuatro registros representativos del patrón de intercambio gaseoso cíclico presentados en machos (A y C) y hembras (B y D) a 10 (A y B) y 20 °C (C y D) durante el período de reposo.

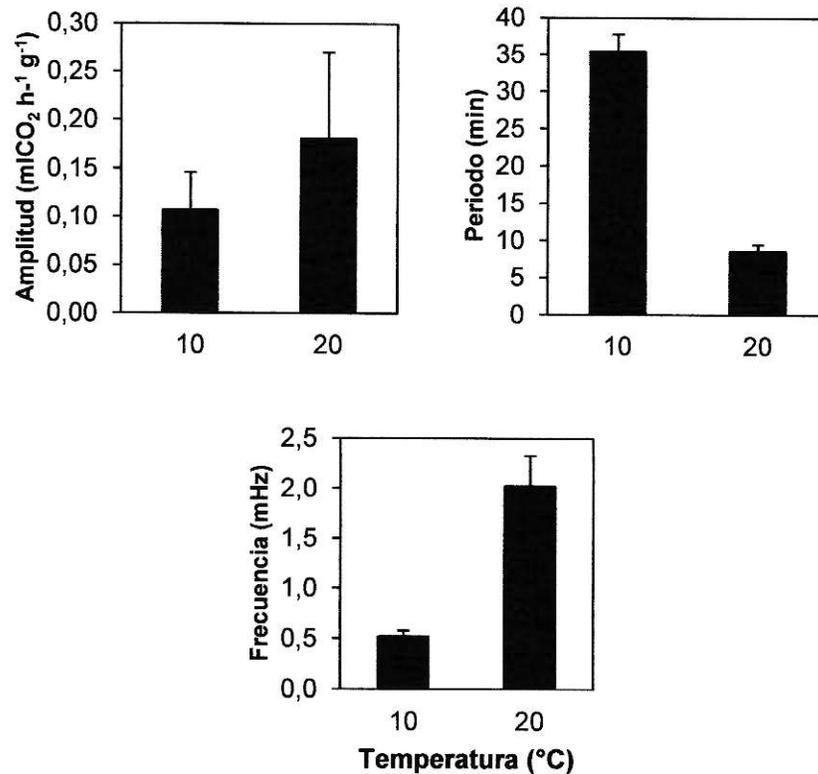


Figura 14. Efecto de la temperatura ambiental sobre componentes del IGC en *A. crassa* durante el período de reposo (promedio \pm DE). Todas las diferencias son significativas, excepto para la amplitud.

3.1.2.4. Intercambio Gaseoso Continuo

Este patrón respiratorio, caracterizado por la ausencia de valles y picos regulares, fue registrado tanto en el período de reposo como en el de actividad, sin embargo, durante el reposo de los individuos sólo se presentó a 20 y 30 °C. Por otro lado, este patrón se presentó en todos aquellos períodos de actividad distinguibles y en las tres temperaturas medidas, lo que se analiza en mayor detalle en la parte siguiente (3.1.3.). Para el período de reposo, la Tabla 7 describe la tasa de producción de CO₂ a 20 y 30 °C, y la Figura 15 muestra cuatro registros representativos del IGCO exhibido por machos y hembras en estadio adulto.

Tabla 7. Resultados descriptivos del intercambio gaseoso continuo (IGCO) exhibido por individuos adultos de *A. crassa* a 20 y 30 °C durante el período de reposo.

	20 °C				30 °C			
	Machos (n=6)		Hembras (n=6)		Machos (n=10)		Hembras (n=10)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Mb (g)	2,28	0,24	5,68	1,03	2,40	0,34	5,68	0,84
VCO ₂ (ml CO ₂ h ⁻¹)	0,371	1,041	0,697	1,745	0,672	0,112	1,536	0,393

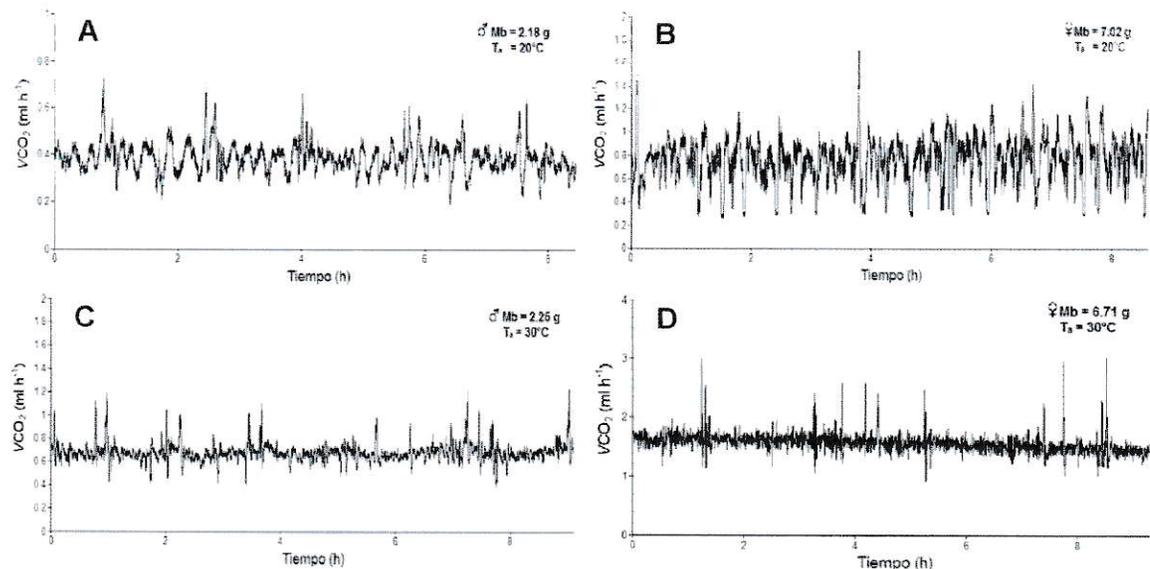


Figura 15. Cuatro registros representativos del patrón respiratorio continuo exhibidos por machos (A y C) y hembras (B y D) de *A. crassa* a 20 (A y B) y 30 °C (C y D) durante el período de reposo.

3.1.3. Producción de CO₂ durante el período de actividad

Durante el período de actividad, entendido como el aumento abrupto, significativo y mantenido de la tasa metabólica en condiciones de oscuridad por un tiempo determinado, se observó que a 10 °C un 82,4% de aquellos individuos que exhibieron discontinuidad respiratoria (IGD) en reposo, modificaron su traza de CO₂ a una continua (IGCO), desapareciendo el ciclo y sus 3 fases (Figura 16A). El 17,6% restante no presentó período de actividad, manteniendo el IGD durante toda la medición. Asimismo, el 100% de aquellos individuos que exhibieron IGC durante su período de reposo, modificaron su traza de CO₂ hacia IGCO en actividad (Figura 16B).

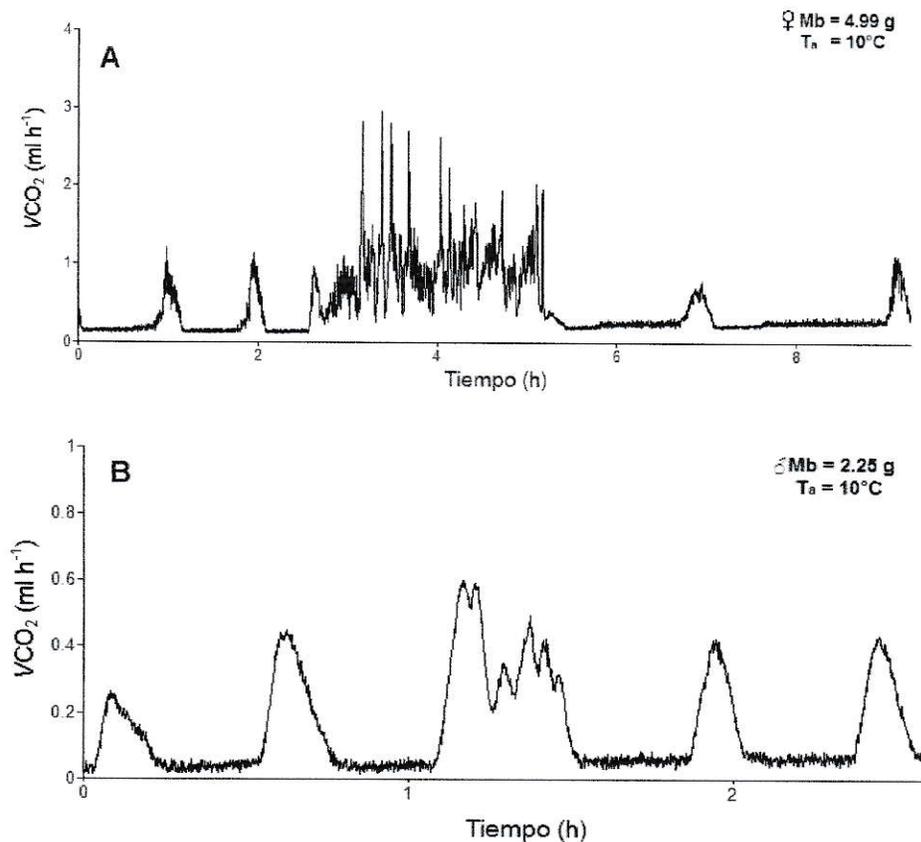


Figura 16. Registros representativos de la modificación del IGD (A) e IGC (B) a IGCO desde el período de reposo al de actividad durante el tratamiento a 10 °C. Nótese la pérdida de ciclicidad durante el período de actividad.

La tasa metabólica durante el período de actividad a 10 °C en aquellos individuos que presentaron IGD, fue significativamente mayor a la exhibida durante el período de reposo (Prueba de Wilcoxon: $Z=3,30$, $p<0,001$), con un incremento promedio del 65%. Al no existir una diferencia significativa en la tasa metabólica entre los individuos que presentaron IGD e IGC (Mann-Whitney: $Z=1,76$; $p=0,07$), entonces se incorporó al análisis a estos últimos, cuya diferencia siguió siendo significativa ($Z=3,62$, $p<0,0003$), con un incremento total de la tasa metabólica del 61% desde el período de reposo al de actividad. La Figura 17 muestra un ejemplo de la superposición de las trazas de producción de CO_2 durante el período de reposo y de actividad, pudiéndose observar que los valores de este último poseen una magnitud similar a los generados durante los picos en reposo.

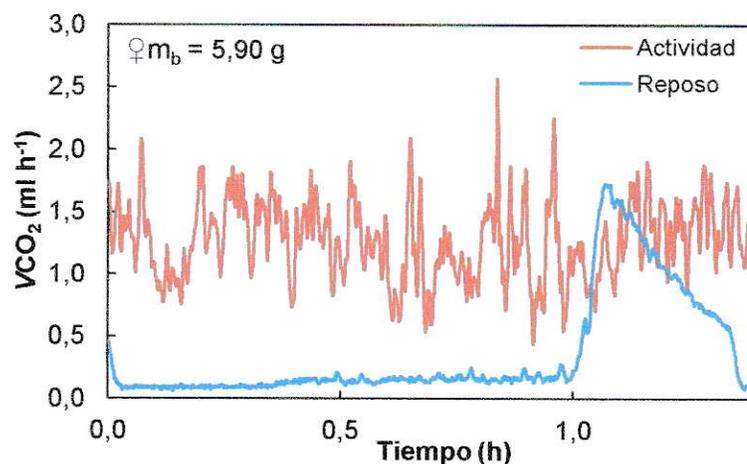


Figura 17. Trazas de producción de CO_2 durante los períodos de actividad y reposo (IGD) a 10 °C.

En el tratamiento a 20 °C, el 100% de los individuos que exhibieron IGD e IGC durante el período de reposo, modificó su traza de CO_2 hacia IGCO en actividad (Figura 18A y B, respectivamente). Por otra parte, el 100% de aquellos individuos que exhibieron IGCO durante el período de reposo, mantuvo este patrón en el período de actividad, pero con una mayor exacerbación de la traza de CO_2 (Figura 18C).

Al no contar con un n suficiente para aplicar una prueba estadística con los individuos que exhibieron IGD, cuyas trazas superpuestas de CO_2 se muestran en la Figura 19, el análisis de la diferencia entre la tasa metabólica en reposo y en actividad consideró a todos los individuos que presentaron ciclicidad en su patrón respiratorio a 20°C (IGD e IGC). De esta forma, se observó una diferencia significativa de la tasa metabólica entre ambos periodos (Wilcoxon: $Z=2,52$; $p=0,01$), con un incremento del 67% desde el período de reposo al de actividad. Asimismo, la tasa metabólica durante el período de actividad de los individuos que presentaron IGCO fue significativamente mayor a la presente durante el período de reposo ($Z=2,93$; $p=0,003$), con un incremento del 63%.

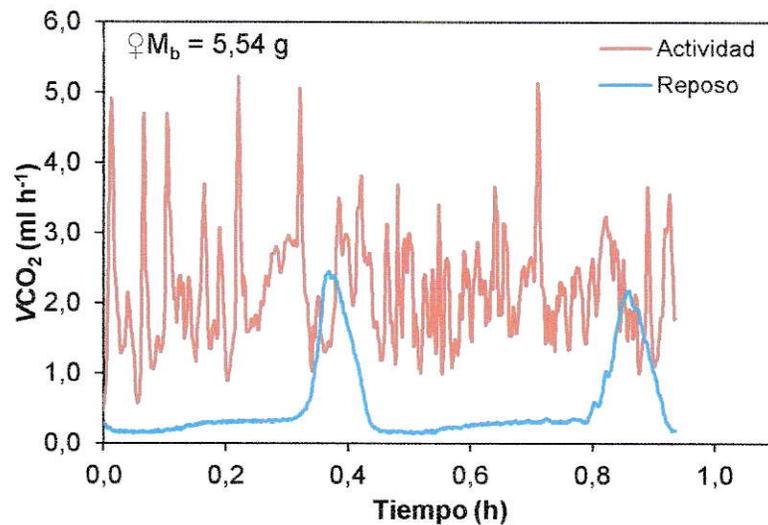


Figura 19. Trazas de producción de CO_2 durante los períodos de actividad y reposo (IGD) a 20°C .

Al no encontrar diferencias significativas en las tasas metabólicas entre los individuos con diferentes patrones respiratorios (IGD, IGC e IGCO), tanto para el período de actividad como de reposo, se realizó un análisis que consideró a todos los individuos medidos a 20 °C en los cuales fue posible distinguir su período de actividad. La prueba de Wilcoxon para muestras pareadas arrojó diferencias significativas de la tasa metabólica entre ambos períodos ($Z=3,82$; $p=0,0001$), con incremento del 65% desde el período de reposo al de actividad.

Finalmente, los individuos medidos a 30 °C (100% IGCO), cuyos períodos de actividad pudieron ser detectados, presentaron diferencias significativas de la tasa metabólica entre el período de actividad y el de reposo (Wilcoxon: $Z=2,67$; $p=0,008$), con un incremento del 53% desde el período de reposo al de actividad (Figura 20).

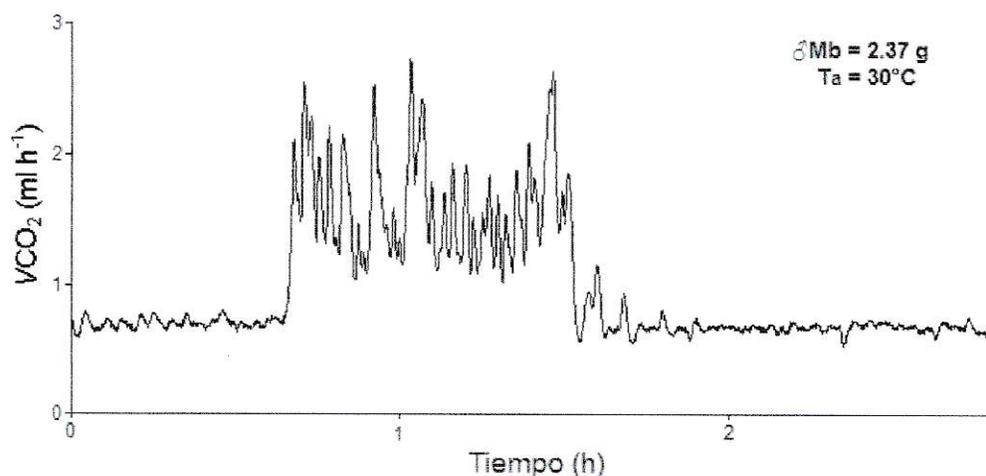


Figura 20. Registro representativo de la exacerbación del IGCO desde el período de reposo al de actividad en el tratamiento de 30 °C.

3.2. Pérdida de agua evaporativa

3.2.1. Pérdida de agua evaporativa total según temperatura

La tasa de pérdida de agua evaporativa (en reposo) aumentó significativamente durante el tratamiento a 30 °C (ANOVA m.r.: $F_{(2,28)}=40,75$; $p<<0,001$) (Figura 21). Al controlar por masa corporal en cada tratamiento, se observó que a 10 y 20 °C tanto machos como hembras no difieren en la tasa de agua perdida (ANCOVA a 10 °C: $F_{(1,13)}=0,23$; $p=0,64$. A 20 °C: $F_{(1,13)}=0,01$; $p=0,91$), sin embargo, a 30 °C las hembras perdieron una mayor cantidad de agua que los machos (ANCOVA a 30 °C: $F_{(1,13)}=12,02$; $p<0,01$).

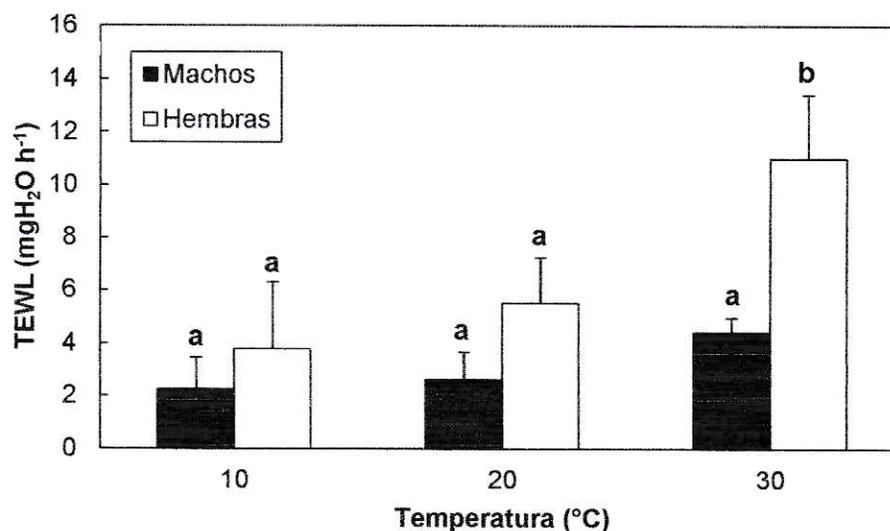


Figura 21. Efecto de la temperatura sobre la tasa de pérdida de agua en adultos de *A. crassa*. Se indican valores promedio \pm DE. Letras distintas corresponden a diferencias significativas.

3.2.2. Caracterización de patrones de pérdida de agua

3.2.2.1. Pérdida de agua durante el Intercambio Gaseoso Discontinuo

En la traza de pérdida de agua evaporativa exhibida durante el IGD, fue posible distinguir visualmente la presencia de picos y valles regulares (Figura 23A), los que fueron menos acentuados respecto a la traza de producción de CO₂. En los valles no fue posible la diferenciación de las fases C y F, por lo que se utilizó la traza de producción de CO₂ como base para este ejercicio, pudiendo cuantificar entonces la TEWL, volumen de pérdida y duración de cada fase, incluyendo además a la fase O (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados descriptivos de la pérdida de agua evaporativa de *A. crassa* durante el intercambio gaseoso discontinuo (IGD) a 10 y 20 °C.

	10 °C				20 °C			
	Machos (n=8)		Hembras (n=9)		Machos (n=2)		Hembras (n=1)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Mb (g)	2,33	0,23	5,75	0,86	2,33	0,18	5,49	
Fase C								
Volumen de pérdida (mg)	0,72	0,40	2,23	1,68	0,23	0,10	0,24	
Duración (min)	21,90	7,95	28,14	11,07	6,89	1,96	6,34	
TEWL (mg h ⁻¹)	2,24	1,10	3,97	2,12	2,28	1,78	3,65	
Fase F								
Volumen de pérdida (mg)	3,62	2,06	5,64	6,33	0,58	0,07	0,91	
Duración (min)	82,48	55,40	74,58	49,40	12,14	4,74	10,91	
TEWL (mg h ⁻¹)	2,20	1,01	4,00	2,20	2,30	1,79	3,66	
Fase O								
Volumen de pérdida (mg)	0,68	0,31	1,35	0,71	0,44	0,34	0,54	
Duración (min)	16,53	2,59	19,04	1,59	11,32	2,82	7,59	
TEWL (mg h ⁻¹)	2,40	0,88	4,25	2,23	2,27	1,51	3,86	

Al analizar mediante un ANOVA de medidas repetidas las diferencias de TEWL masa específica entre las fases del IGD a 10 °C (Figura 22), se obtuvieron diferencias significativas entre éstas ($F_{(2,30)}=10,61$; $p=0,0003$), dadas por la desigualdad entre las fases C y F respecto a la fase O (Prueba de Tukey HSD: $p<0,001$ para ambas fases). No se observó una diferencia significativa entre las fases C y F, obteniéndose un promedio \pm

EE de $0,83 \pm 0,08 \text{ mgH}_2\text{O h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Tampoco se observó efecto del sexo sobre la tasa de pérdida de agua ($F_{(1,30)}=1,94$; $p>0,05$). A 20°C , las diferencias entre las fases del IGD no fueron significativas (Prueba de Kruskal-Wallis: $H_{(2,9)}=0,27$; $p=0,87$) (Figura 22)

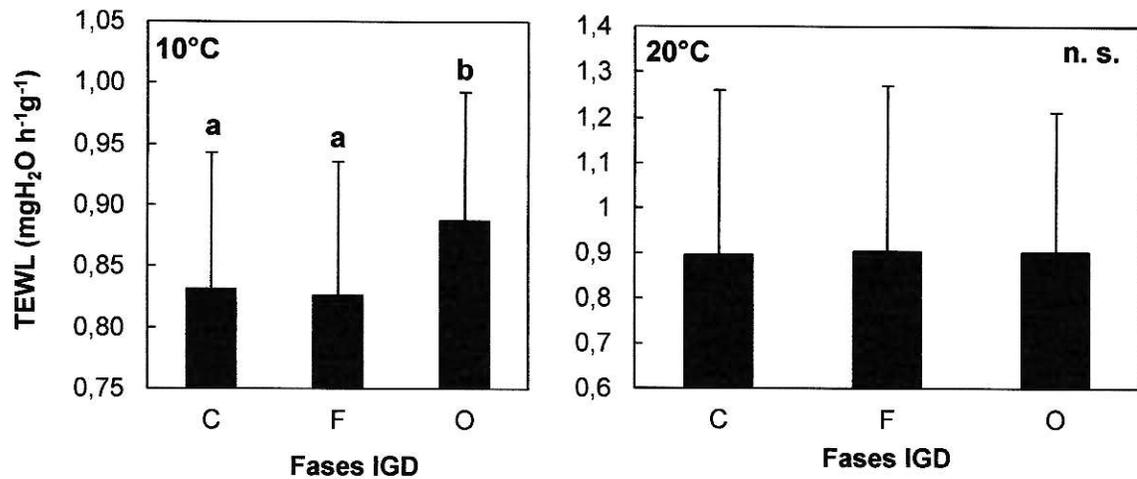


Figura 22. Efecto de las fases del IGD sobre la tasa de pérdida de agua de individuos adultos de *A. crassa* durante los tratamientos a 10 y 20°C . Se muestran valores promedio \pm EE y letras distintas indican diferencias significativas.

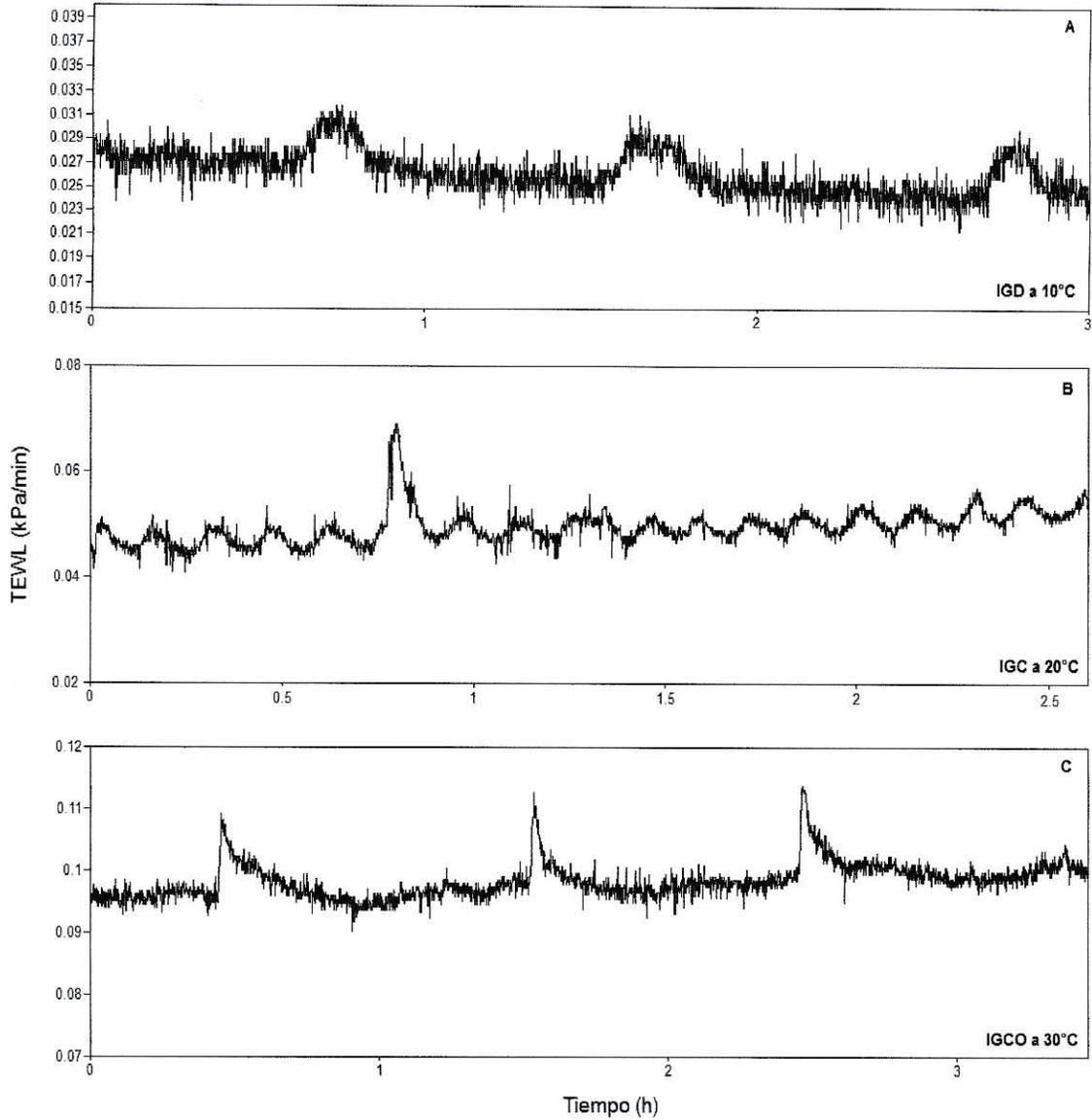


Figura 23. Registros representativos de tres patrones distintos de pérdida de agua evaporativa exhibidos por un mismo individuo ($\text{♀}m_b = 4,94 \text{ g}$) durante los tratamientos térmicos. En A, B y C se muestra el registro de TEWL a 10, 20 y 30 °C, correspondientes a un patrón respiratorio de IGD, IGC e IGCO, respectivamente.

3.2.2.2. Pérdida de agua durante el Intercambio Gaseoso Cíclico

Al igual que en la traza de producción de CO₂, fue posible la distinción visual de picos y valles regulares (Figura 23B), en los cuales se cuantificó tanto la TEWL, el volumen de pérdida y la duración de las fases (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados descriptivos de la pérdida de agua evaporativa de *A. crassa* durante el intercambio gaseoso cíclico (IGC) a 10 y 20 °C.

	10 °C				20 °C			
	Machos (n=2)		Hembras (n=1)		Machos (n=2)		Hembras (n=2)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Mb (g)	2,70	0,64	5,02		2,40	0,20	5,47	0,75
Valle								
Volumen de pérdida (mg)	0,89	0,23	0,64		0,85	1,10	0,22	0,15
Duración (min)	15,53	6,9	19,79		2,96	0,95	2,37	0,56
TEWL (mg h ⁻¹)	3,72	0,85	1,80		2,11	0,17	5,50	1,69
Pico								
Volumen de pérdida (mg)	1,00	0,34	0,63		0,21	0,04	0,65	0,12
Duración (min)	18,03	4,24	20,19		5,67	0,23	6,91	0,34
TEWL (mg h ⁻¹)	3,90	0,90	1,92		2,21	0,26	5,64	1,62

Al evaluar la tasa de pérdida de agua masa específica producida en cada fase del IGC (Figura 24), se observó que en ninguno de los tratamientos hubo diferencias significativas entre ellas (Prueba de Wilcoxon: a 10 °C $Z=1,60$; $p=0,12$. A 20 °C, $Z=1,83$; $p=0,07$).

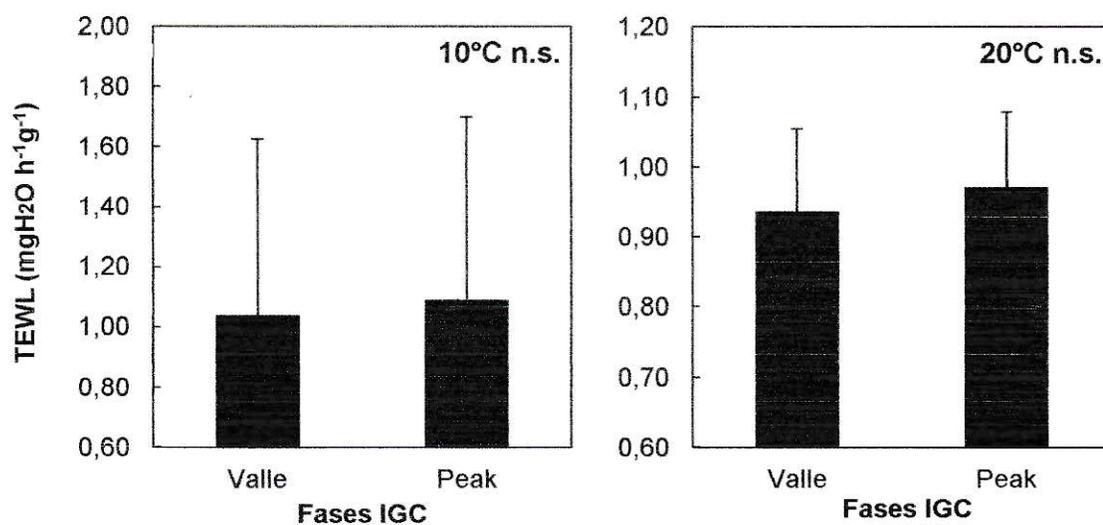


Figura 24. Efecto de las fases del IGC sobre la tasa de pérdida de agua de individuos adultos de *A. crassa* durante los tratamientos a 10 y 20 °C. Se muestran valores promedio \pm DE y letras distintas indican diferencias significativas.

3.2.2.3. Pérdida de agua durante el Intercambio Gaseoso Continuo

Durante el IGCO, la traza de pérdida de agua siguió el mismo patrón que el de producción de CO₂, con ausencia de picos y valles regulares (Figura 23C), cuyos valores de TEWL se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados descriptivos de la pérdida de agua evaporativa de *A. crassa* durante el intercambio gaseoso continuo (IGCO) a 20 y 30 °C.

	20 °C				30 °C			
	Machos (n=6)		Hembras (n=6)		Machos (n=9)		Hembras (n=10)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Mb (g)	2,28	0,24	5,68	1,03	2,46	0,29	5,68	0,84
TEWL (mg h ⁻¹)	2,39	0,96	5,30	1,66	4,18	0,60	9,85	2,85

3.2.3. TEWL según patrón de intercambio gaseoso

En aquellos tratamientos térmicos donde se exhibió más de un patrón respiratorio (10 y 20 °C), la tasa de pérdida de agua masa específica no presentó diferencias entre los distintos patrones identificados. A 10 °C (Figura 25A), la tasa masa específica de agua perdida de los individuos que exhibieron IGD no se diferencia de aquellos que mostraron IGC (Prueba de Kruskal-Wallis: $H_{(1,20)}=1,01$; $p=0,79$). Asimismo, a 20 °C (Figura 25B) el tipo de patrón respiratorio no tuvo efectos sobre la tasa de pérdida de agua masa específica ($H_{(2,18)}=2,35$; $p=0,31$).

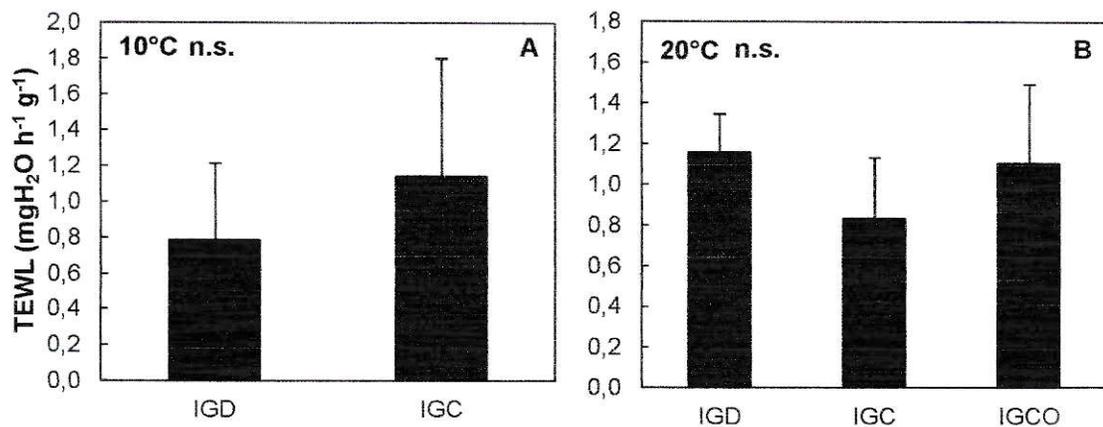


Figura 25. Efecto del tipo de patrón respiratorio sobre la TEWL masa específica durante los tratamientos térmicos a 10 (A) y 20 °C (B). Se indican promedios \pm DE.

3.2.4. TEWL durante el período de actividad

Durante el período de actividad se observó un aumento sustancial de la TEWL masa específica. La Figura 26 muestra que durante los tratamientos térmicos a 10 y 20 °C, la tasa de pérdida de agua sufrió un aumento significativo del 71% desde el período de reposo al de actividad (a 10 °C $t_{(13)}=8,58$; a 20 °C $t_{(16)}=9,37$; ambos $p<<0,001$), mientras que a 30 °C, esta variable presentó un aumento del 48% ($t_{(7)}=4,48$; $p=0,003$).

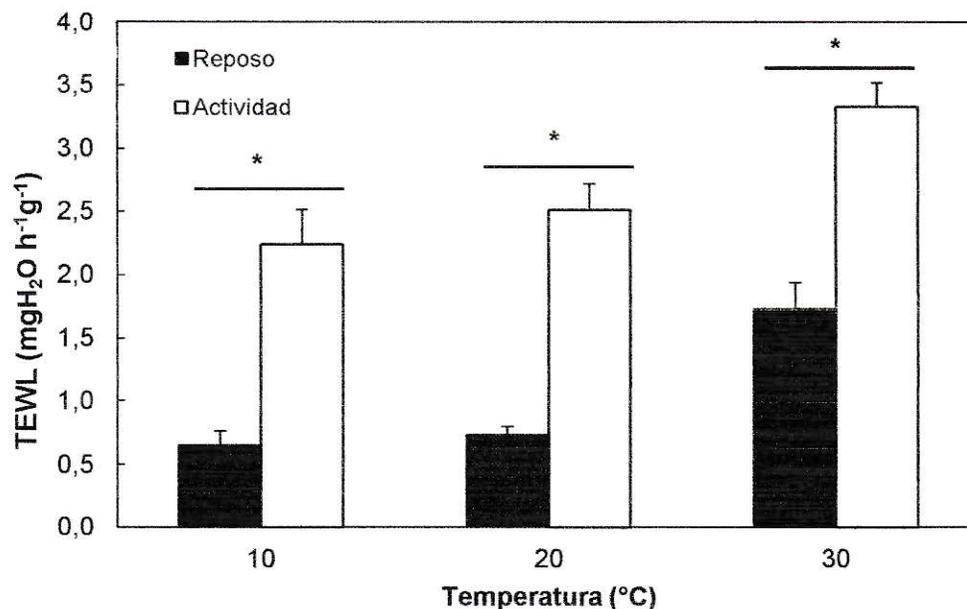


Figura 26. Tasa de pérdida de agua durante los períodos de reposo (barras negras) y de actividad (barras blancas). Se indican valores promedio \pm EE y diferencias significativas entre ambos períodos en cada tratamiento térmico dadas por la Prueba de t ($p<<0,05$).

3.2.5. Contribución relativa de la pérdida de agua cuticular y respiratoria a la pérdida de agua evaporativa total

La Tabla 11 muestra la contribución relativa de la pérdida de agua mediante la cutícula y el sistema respiratorio a la pérdida de agua total en aquellos individuos que exhibieron patrones respiratorios cíclicos (IGD e IGC a 10 y 20 °C). La prueba de ANOVA de medidas repetidas, en cuyo análisis se utilizó la proporción entre el agua evaporativa perdida vía cutícula y vía respiración (Tabla 12), indicó que la cuticular fue significativamente mayor a la respiratoria, no habiendo efecto de la temperatura ni del sexo sobre esta variable. De esta forma, se observó que a temperaturas bajas y moderadas (10 y 20 °C) y tanto en machos como en hembras, en promedio un 83% del agua evaporativa fue perdida a través de la cutícula y solo un 17% mediante las vías respiratorias (Figura 27).

Tabla 11. Contribución relativa de la pérdida de agua cuticular y respiratoria a la pérdida de agua total en individuos adultos de *A. crassa* durante el IGD e IGC.

Temperatura	Sexo (n)	% Pérdida de agua	
		Cuticular	Respiratoria
10	Machos (9)	78,2	21,8
10	Hembras (10)	80,2	19,8
20	Machos (3)	81,5	18,5
20	Hembras (4)	91,3	8,7

Tabla 12. ANOVA de medidas repetidas para el efecto de la temperatura y el sexo sobre la pérdida de agua cuticular y respiratoria.

Factor	SC	GL	CM	F	p
Temperatura	0,00	1	0,00		
Sexo	0,00	1	0,00		
Temperatura*Sexo	0,00	1	0,00		
Error	0,00	21	0,00		
Vía de pérdida	17326,40	1	17326,40	172,7927	<<0,001
Vía de pérdida*Temperatura	354,11	1	354,11	3,5315	0,074164
Vía de pérdida*Sexo	159,27	1	159,27	1,5884	0,221383
Vía de pérdida*Temperatura*Sexo	219,10	1	219,10	2,1851	0,154197
Error	2105,73	21	100,27		

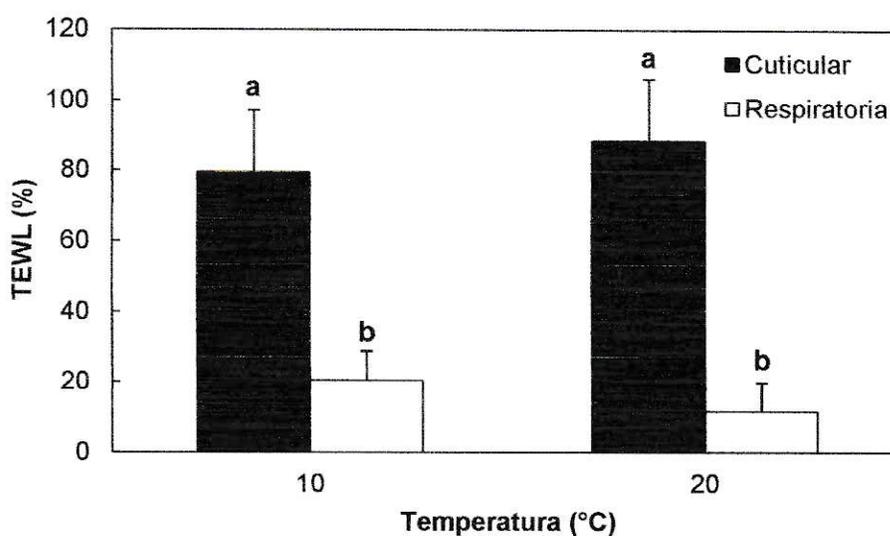
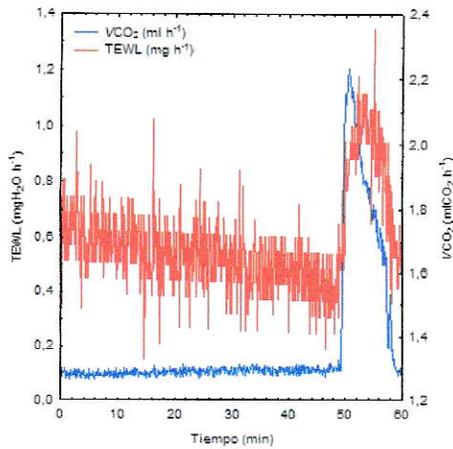


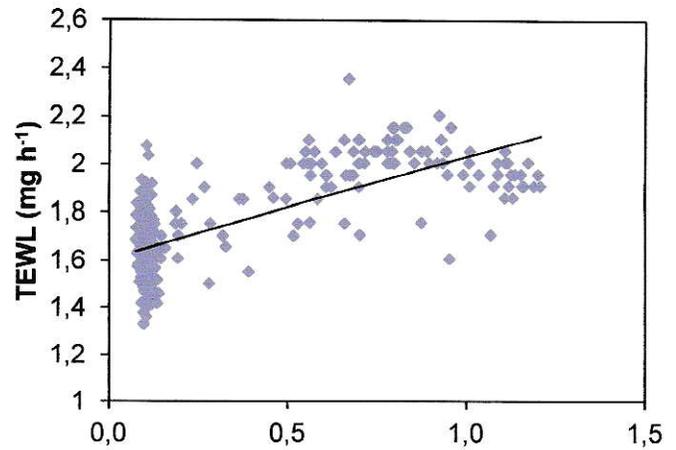
Figura 27. Vías de pérdida de agua evaporativa de individuos adultos de *A. crassa* en las temperaturas donde se presentaron patrones con ciclo (IGD e IGC). Se indican valores de promedio \pm DE y diferencias significativas dadas por la prueba Unequal HSD ($p < 0,05$).

3.3. Correlaciones entre la pérdida de agua y la producción de CO₂ en cada patrón de intercambio gaseoso

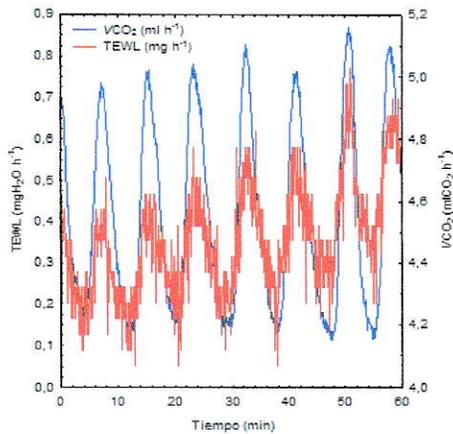
La Figura 28 muestra un ejemplo representativo de cada patrón de intercambio gaseoso. Por un lado, se muestra la medición simultánea de las trazas de CO₂ y agua, y por otro, la correlación entre ambas variables, cuyo análisis de regresión lineal arrojó una relación positiva y significativa en cada patrón.



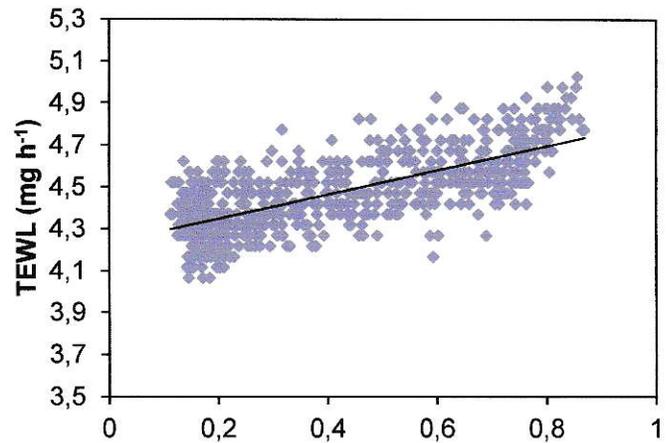
IGD a 10 °C



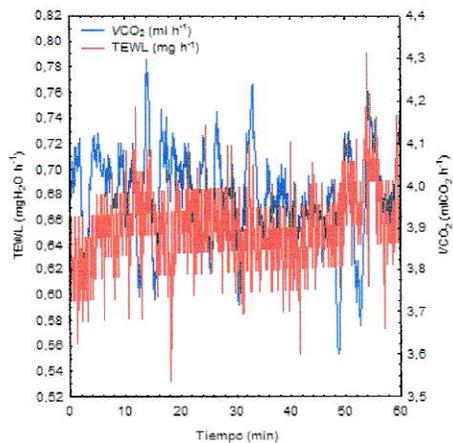
$$y=0,4248x+1,6085; R^2=0,4894; p<<0,0001$$



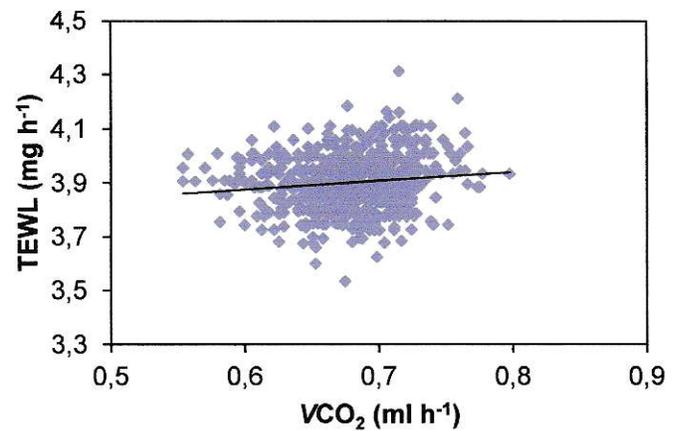
IGC a 20 °C



$$y=0,5792x+4,2329; R^2= 0,5246; p<<0,0001$$



IGCO a 30 °C



$$y=0,3311x+3,6769; R^2= 0,0150; p<0,001$$

Figura 28. Mediciones simultáneas (izquierda) y correlaciones (derecha) de las tasas de pérdida de agua y de producción de CO₂ correspondientes a ejemplos representativos del IGD, IGC e IGCO.

4. DISCUSIÓN

4.1. Patrones de intercambio gaseoso y de pérdida de agua

El fásmidio altoandino *Agathemera crassa* exhibió los tres patrones respiratorios descritos en la literatura (discontinuo, cíclico y continuo), cuya aparición dependió tanto de la temperatura del tratamiento como también del período de reposo y/o actividad de los individuos.

La aparición del patrón de intercambio gaseoso discontinuo (IGD) estuvo asociada a temperaturas bajas y moderadas, con gran predominancia durante el tratamiento a 10 °C y sólo durante el período de reposo. El patrón de intercambio gaseoso cíclico (IGC) fue exhibido a las mismas temperaturas que el IGD, también sólo durante el período de reposo, sin embargo, su aparición nunca fue predominante. Por su parte, la aparición del patrón de intercambio continuo (IGCO) estuvo asociada a temperaturas moderadas y altas (20 y 30 °C) y al período tanto de reposo como de actividad, con alta predominancia en ambos tratamientos. Esta variación en la exhibición de patrones de intercambio gaseoso estuvo asociada a un aumento en la producción de CO₂ a través del gradiente térmico, incrementándose así la demanda metabólica. Al respecto, Lehmann & Schützner (2010) argumentan que la variación en la exhibición de patrones depende principalmente de la dinámica espiracular, la cual es mediada por la temperatura y la demanda metabólica asociada. De esta manera, el IGD predominaría en condiciones de baja demanda, cuando los espiráculos cerrados son la norma. A medida que la demanda se incrementa, el intercambio gaseoso se tornaría cíclico, con los espiráculos no completamente cerrados. Y finalmente, el IGCO ocurriría durante una alta demanda metabólica, con los espiráculos abiertos. Lo anterior además concuerda con lo expuesto por Basson & Terblanche (2011), quienes proponen que la variación en los patrones de

intercambio gaseoso a escalas de tiempo cortas, estaría dada por la interacción entre la demanda metabólica celular, las características morfo-fisiológicas del sistema de intercambio gaseoso (sistema traqueal y conducta espiracular) y la capacidad de amortiguamiento del CO₂. De acuerdo a esto, se ha considerado que los distintos patrones de intercambio gaseoso corresponderían a una serie de respuestas respiratorias impulsadas por la demanda metabólica experimentada por el insecto, y en donde el IGD sería un extremo cuyos valores varían de forma tal que no sería posible considerar a este patrón como una característica discreta (Bradley 2007, Contreras & Bradley 2010). No obstante, la presencia de dos o tres patrones distintos a una misma temperatura observada en este trabajo no evidencia totalmente lo expuesto anteriormente, dado que no se encontraron diferencias significativas entre las tasas metabólicas de cada patrón. Lo anterior podría explicarse por lo sostenido por Hadley & Quinlan (1993), Williams & Bradley (1998) y Williams et al. (2010), en mediciones realizadas en otros taxa de insectos, quienes postulan que la existencia de desigualdades marginales en algunos componentes de los ciclos, como también así en la tasa metabólica, no necesariamente difiere entre los patrones de intercambio gaseoso, lo que dificulta incluso la determinación del patrón (especialmente entre el IGD e IGC). Esta ausencia de diferencias en la tasa metabólica entre individuos de *A. crassa* utilizando el IGD, IGC o IGCO a una misma temperatura, no podría apoyar la hipótesis de daño oxidativo sostenida por Contreras & Bradley (2010), la que predice que la exhibición de un patrón específico por un individuo en cualquier momento dado sería una función de la cantidad de oxígeno contenido en el insecto en el instante del cierre espiracular y de su tasa metabólica aeróbica.

La influencia de la temperatura sobre los componentes de los ciclos de intercambio gaseoso en insectos ha sido ampliamente documentada (Davis et al. (1999), Chappell & Rogowitz (2000), Lighton & Joos (2002), Chown & Davis (2003) y Contreras & Bradley

(2010), entre otros). Como es esperado en ectotermos, todos ellos coinciden en que el aumento de la temperatura, con su consecuente incremento de la tasa metabólica, está acompañado de un aumento en la frecuencia y una disminución en la duración de las fases del ciclo. En *A. crassa*, el comportamiento de los componentes de los ciclos del IGD e IGC de acuerdo a la temperatura, se asemeja bastante a lo descrito en la literatura. En particular, la duración del ciclo del IGD de este fásrido estuvo determinada principalmente por las fases C+F, correspondiendo al 85 y 66% del ciclo total a 10 y 20 °C, respectivamente, mientras que la fase O, contribuyó en una baja proporción. Sin embargo, a pesar de que la fase O ocupó una pequeña fracción del IGD, los valores de la tasa de producción de CO₂ y del volumen de emisión siempre fueron altos, evidenciando así que es durante esta fase donde se produce el mayor intercambio gaseoso del ciclo, coincidiendo así con lo expuesto por Lighton (1996), Chown et al. (2006) y Quinlan & Gibbs (2006). Además, esta contribución relativa de cada una de las fases (especialmente de la F) al ciclo completo del IGD, tampoco dista de aquella encontrada por Davis et al. (1999), Bosch et al. (2000) y Chappell & Rogowitz (2000), todos ellos en coleópteros de ambientes xéricos medidos en similares condiciones, quienes sugieren que el control de la duración proporcional de las fases podría ser importante en la modulación de los cambios asociados a la aridez ambiental.

Respecto a la pérdida de agua evaporativa entre los tratamientos térmicos, se observó que al controlar por masa corporal, tanto machos como hembras presentaron una tasa relativamente constante y sin diferencias significativas entre las temperaturas, a excepción de las hembras, quienes a 30 °C aumentaron su tasa casi al doble respecto a 10 y 20 °C, y alrededor del triple respecto a los machos a la misma temperatura. A pesar de esta diferencia, a 30 °C ningún individuo exhibió el patrón discontinuo, como se hubiera esperado en caso de que este patrón fuera un mecanismo de ahorro hídrico.

En general, las trazas de pérdida de agua en cada patrón de intercambio gaseoso fueron menos acentuadas, con picos de liberación marcados sutilmente. La separación de las fases del IGD en la traza de pérdida de agua en base a la de producción de CO₂, permitió evidenciar que a 10 °C, la mayor salida de este elemento ocurre durante la fase O, cuando los espiráculos se encuentran totalmente abiertos. Sin embargo, a 20 °C esta diferenciación no fue significativa entre las fases. No obstante, este análisis podría estar influenciado por la inestabilidad en el registro del agua perdida, cuyos valores van en descenso durante toda la medición y rara vez alcanzan a estabilizarse, lo que dificulta establecer la baja diferenciación existente entre las fases, especialmente entre la C y F.

Aspecto relevante observado en este trabajo fue la ausencia de diferencias en la tasa de pérdida de agua evaporativa entre los patrones de intercambio gaseoso. Particularmente, en aquellos tratamientos térmicos donde el IGD fue exhibido (10 y 20 °C), este no distó significativamente de los valores de tasa de pérdida de agua observados durante el IGC e IGCO. Esto indica que la apertura tanto parcial como total de espiráculos durante el tiempo en que ésta ocurre en el IGD, no estaría contribuyendo a la conservación de agua de los individuos de *A. crassa*, y no sería distinta de la dinámica espiracular que rige al IGC y al IGCO. Conjuntamente, la fase con los espiráculos cerrados que caracteriza al IGD no sería crucial en el ahorro de agua evaporativa. Resultados similares obtuvieron Gibbs & Johnson (2004) en la hormiga *P. barbatus*, sosteniendo que esta especie aparentemente abre sus espiráculos más allá del tiempo que “debería” para conservar agua, aspecto que no sería objetivo de la regulación del intercambio gaseoso llevada a cabo por el IGD.

Por otra parte, al analizar la contribución relativa a la pérdida de agua evaporativa total por vía cutícula y vía respiratoria, se observó que la mayor parte del agua que se pierde se produce a través del exoesqueleto (83%). Por lo tanto, el 17% restante que se

pierde a través de la respiración no afectaría mayormente el balance hídrico de *A. crassa*. La inexistencia de diferencias significativas de esta proporción entre 10 y 20 °C se condice con la constante tasa de pérdida de agua evaporativa que *A. crassa* presentó en estos tratamientos térmicos. Al respecto, mediciones de la pérdida de agua durante la fase O del IGD y del pico del IGC en diferentes insectos indican que la vasta mayoría del agua perdida es cuticular (55-98%) y no respiratoria (2-45%) (Machin et al. 1991, Lighton 1992 y Hadley & Quinlan 1993, Chown 2002). Al contrario, Zachariassen (1996) observó en insectos de hábitat áridos que la pérdida de agua cuticular se reducía a un nivel tal que la respiratoria es el principal contribuyente. Esto sugiere que los patrones que regulan el intercambio gaseoso mediante ciclos, pueden jugar un importante rol en el balance hídrico de algunos, pero no necesariamente de todos los insectos que exhiben estos patrones, como es el caso de *A. crassa*. Por otra parte, y aunque no fue particionada por carecer de ciclos, la proporción de pérdida de agua cuticular y respiratoria a 30 °C, probablemente permanezca constante en los machos, no obstante, puede que las hembras posean una mayor proporción de pérdida de agua cuticular, debido a su morfología. Ésta se diferencia de los machos en que el abdomen posee una mayor capacidad de expansión dada la potencial retención de huevos en su interior y, por ende, poseería una mayor superficie por la cual el agua pueda evaporarse (C. Veloso, comunicación personal). Al mismo tiempo, según Rourke & Gibbs (1999), un incremento en la temperatura ambiental podría ser un factor crucial en el aumento de permeabilidad de la principal barrera para la pérdida de agua cuticular, correspondiente a la capa lipídica epicuticular, facilitando así la deshidratación de los individuos.

En conjunto, y de acuerdo a la primera hipótesis planteada en este trabajo ("si los ciclos respiratorios discontinuos observados en *A. crassa* corresponden a un mecanismo de ahorro de agua, éstos debieran ser más acentuados a altas T_a , donde las pérdidas de

este recurso deberían ser mayores”), los resultados aquí expuestos no permiten sugerir que el IGD sea un mecanismo de ahorro hídrico, debido a que a altas temperaturas (30 °C), cuando se pierde la mayor cantidad de agua, este patrón desaparece, siendo utilizado principalmente a bajas temperaturas (10 °C). Según lo anterior, la Hipótesis Hídrica debiese rechazarse, pues no sería una explicación adecuada al surgimiento del IGD en Phasmatodea, particularmente en *A. crassa*. Ahora bien, la hipótesis adaptativa que mejor podría responder este surgimiento sería la Ctónica, dada la historia de vida de este fásmidio, que comprende gran parte de su ciclo en ambientes subterráneos y subnavales con condiciones de hipoxia e hipercapnia (Jones 1999, Musselman et al. 2005). Sin perjuicio de lo anterior, recientemente Matthews & White (2011) postularon que la discontinuidad en el intercambio de gases estaría explicada por la Hipótesis Neuronal, la que incluye un componente adaptativo, dado por el ahorro energético de una baja actividad cerebral, y otro no-adaptativo mecánico, dado por una retroalimentación regulatoria de las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono. El apoyo a estas hipótesis no excluye que otras también puedan estar actuando, debido que hay múltiples orígenes evolutivos independientes que explican la aparición del IGD y no una sola función subyacente a su génesis (Matthews & White 2012).

Finalmente, la aparición del IGD en *A. crassa* principalmente en condiciones de temperatura ambiental baja, podría implicar que este patrón se encuentre subestimado en otros taxa de insectos e incluso de artrópodos, debido a que la mayoría de los estudios se ha efectuado en base a mediciones con temperaturas ambientales moderadas (20-25 °C) y/o bajo condiciones en donde el IGD no necesariamente puede expresarse. De esta forma, a partir de la filogenia propuesta por Marais et al. (2005) respecto al origen del IGD, es posible afirmar que este es el primer registro empírico de IGD en el orden

Phasmatodea, el cual sería interesante extrapolar hacia otras especies de la familia Agathemeridae, cuyas relaciones filogenéticas se encuentran en Vera et al. (2012).

4.2. Período de actividad

En las temperaturas donde apareció, el IGD (y el IGC) fue exhibido solamente durante el período de reposo de los individuos (condición diurna), mientras que durante el periodo de actividad (condición nocturna) toda ciclicidad desapareció, modificándose a una traza de producción de CO₂ continua, con una consecuente elevación de la tasa metabólica y la de pérdida de agua. Esta situación no constituye ninguna extrañeza, debido a que la aparición de los patrones de intercambio gaseoso con ciclo ha sido siempre observada durante el estado de reposo de los animales (Chown & Nicolson 2004, Chown 2011). Esto sugiere que la mayor demanda metabólica sostenida durante la actividad requiere de una mayor ventilación, en donde la apertura de los espiráculos llega a ser tan frecuente, que su cierre completo e incluso parcial se torna improbable, provocando así la pérdida de los ciclos.

La fuente que provocó el aumento sustancial de la demanda metabólica (y su concomitante liberación de agua) no fue posible de determinar, debido a que la actividad no fue un factor considerado en el diseño experimental del estudio. Sin embargo, se ha descrito en insectos de otros taxa que dichos incrementos podrían estar asociados al mayor costo provocado por la locomoción y/o a la actividad de estructuras sensoriales (Chown & Nicolson 2004, Harrison et al. 1991), lo que podría traducirse en un aumento de la actividad cerebral y así, de la demanda metabólica. Al respecto, Matthews & White (2011), postulan que la aparición del IGD estaría explicada por consideraciones energéticas que promueven una disminución de la tasa metabólica, lo que se traduce en una baja actividad cerebral. De esta manera, el IGD aparecería como consecuencia del

control respiratorio generado por el ganglio segmentario del tórax y del abdomen, lo que sería indicativo de un estado de reposo.

De acuerdo a lo anterior, la segunda hipótesis planteada (“la existencia de ciclos discontinuos debería ser más acentuada en períodos de reposo, y desaparecer o modificarse a ciclos continuos y/o cíclicos en períodos de actividad”) se cumpliría cabalmente.

4.3. Correlación entre producción de CO₂ y pérdida de agua

En cada ejemplo representativo de los patrones de intercambio gaseoso se observó una asociación bastante estrecha entre las tasas de pérdida de agua y la de producción de CO₂. Por un lado, las mediciones simultáneas de ambas variables sugieren la existencia de una sincronización entre ellas, dada por la apertura espiracular que permite la salida de ambos elementos en forma conjunta. Esta sincronización permitió la partición de la pérdida de agua cuticular y respiratoria en los patrones con ciclos, y posee un comportamiento similar a trabajos realizados por Hadley & Quinlan (1993), Quinlan & Hadley (1993), Bosch et al. (2000), Williams et al. (2010), entre otros, respecto a la dinámica espiracular. Por otra parte, el análisis de regresión lineal de los datos de ambas variables arrojó una relación significativamente positiva en cada ejemplo de patrón de intercambio gaseoso, lo que concuerda con los análisis de Gibbs & Johnson (2004). Estos autores proponen que la pendiente de cada regresión estima el costo hídrico del intercambio gaseoso para cada individuo, es decir, el incremento de pérdida de agua asociado a la liberación de CO₂. En este caso, la Hipótesis Ctónica sería apoyada si los menores valores de las pendientes correspondieran a aquellos individuos que exhiben IGD, debido a que esta hipótesis permite que el CO₂ sea liberado mientras minimiza la

pérdida de agua respiratoria (Lighton & Berrigan 1995), lo cual sería interesante probar en un próximo paso para ampliar la información aquí expuesta.

Dado lo anterior, la tercera hipótesis planteada en este trabajo (“deberá existir una correlación positiva entre los ciclos de liberación de CO₂ y los de pérdida de agua respiratoria”) estaría siendo apoyada sólidamente por los resultados obtenidos.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la presencia de los patrones de intercambio gaseoso está íntimamente ligada a la temperatura ambiente, la que modula en gran medida la fisiología de los individuos, en conjunto con otros factores abióticos. Es así como los patrones de intercambio gaseoso serían la expresión de los requerimientos metabólicos de cada individuo. En *A. crassa*, la expresión de la producción de CO_2 a través del gradiente térmico varió desde la presencia de ciclos, a temperaturas bajas y medias, cuya frecuencia fue en aumento hasta transformarse en un continuo a altas temperaturas. La pérdida de ciclos discontinuos a altas temperaturas refuta la primera hipótesis planteada en este trabajo, lo que sugiere que la Hipótesis Hídrica debe rechazarse, pues no sería una explicación adecuada a la aparición de este patrón en *A. crassa*, debido a que en esas condiciones es donde se pierde mayor cantidad de agua, especialmente en las hembras. Por lo tanto, la aparición del IGD en *A. crassa* podría estar dada por un conjunto de factores, entre los cuales es posible sugerir a la actividad cerebral (ligada a la demanda metabólica) la que se encontraría asociada a la mecánica de retroalimentación regulatoria de PO_2 y PCO_2 . No obstante, el ambiente subterráneo con condiciones de hipoxia e hipercapnia que habita *A. crassa* durante gran parte de su ciclo de vida, sugiere que la Hipótesis Ctónica también sea una explicación interesante de probar.

Por otra parte, la baja contribución que presentó la pérdida de agua respiratoria a la evaporativa total, sugiere que el cierre espiracular no interviene mayormente en el balance hídrico de los individuos que exhiben patrones con ciclo, debido a que la mayor parte del agua se pierde a través del exoesqueleto.

Los ciclos discontinuos de intercambio gaseoso efectivamente fueron más acentuados durante el período de reposo de los individuos, mientras que durante la actividad éstos desaparecieron, modificándose a continuos. Esto estaría dado por la mayor necesidad de ventilación que implica la elevación de la demanda metabólica, y que imposibilita el cierre de espiráculos, evitando así la exhibición de ciclos. Este resultado apoyaría la hipótesis que explica que el IGD se expresaría en condiciones de baja demanda metabólica.

En cada patrón de intercambio gaseoso, la producción de CO₂ se correlacionó significativamente con la pérdida de agua, lo que sumado al análisis visual de la mediciones simultáneas de ambas variables, podría sugerir una probable sincronía entre las trazas, dada por la dinámica espiracular que regula la salida de los elementos.

La presencia del IGD en *A. crassa* descrita en este trabajo correspondería al primer registro empírico de este patrón en el orden Phasmatodea. La aparición de este patrón estuvo fuertemente ligada a las condiciones experimentales en las cuales fue medido, lo que sugiere que la presencia del IGD podría estar subestimada en otros taxa de insectos y artrópodos al ser medidos bajo condiciones en donde este patrón no necesariamente puede expresarse.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPERT, P. (2006) Constraints to tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small and or rare? *The Journal of Experimental Biology* 209: 1575 – 1584.
- BRADLEY, T.J. (2007) Control of the respiratory pattern in insects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 618: 211-228.
- BASSON, C.H. & TERBLANCHE, J.S. (2011) Respiratory pattern transitions in three species of *Glossina* (Diptera, Glossinidae) *Journal of Insect Physiology* 57: 433-443.
- BOSH, M., CHOWN, S.L. & SCHOLTZ, C. (2000) Discontinuous gas exchange and water loss in the keratin beetle *Omorgus radula*: further evidence against the water conservation hypothesis? *Physiological Entomology* 25: 309-314.
- BUCK, J., KEISTER, M. & SPECHT, H. (1953) Discontinuous respiration in diapausing *Agapema pupae*. *Anatomical Record* 117: 541.
- CAMOUSSEIGHT, A. (1995) Revisión Taxonómica del Género *Agathemera* (Phasmatodea: Pseudophasmatidae) en Chile. *Revista Chilena de Entomología* 22: 35 – 53.
- CHAPPELL, M.A. & ROGOWITZ, G.L. (2000) Mass, temperature and metabolic effects on discontinuous gas exchange cycles in eucalyptus-boring beetles (Coleoptera: Creambycidae). *The Journal of Experimental Biology* 203: 3809 – 3820.
- CHOWN, S.L. (2002) Respiratory water loss in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133: 791 – 804.
- CHOWN, S.L. (2011) Discontinuous gas exchange: new perspectives on evolutionary origins and ecological implications. *Functional Ecology* 25: 1163-1168.
- CHOWN, S.L. & HOLTER, P. (2000) Discontinuous gas exchange cycles in *Aphodius fossor* (Scarabaeidae): a test of hypotheses concerning origins and mechanisms. *The Journal of Experimental Biology* 203: 397-403.

- CHOWN, S.L. & DAVIS, A.L.V. (2003) Discontinuous gas exchange and the significance of respiratory water loss in scarabaeine beetles. *The Journal of Experimental Biology* 206: 3547-3556.
- CHOWN, S.L. & NICOLSON, S. W. (2004) Insect Physiological Ecology. Mecanismos and Patterns. *Oxford University Press*. 243 pp.
- CHOWN, S.L., GIBBS, A.G., HETZ, S.K., KLOK, C.J., LIGHTON, J.R.B. & MARAIS, E. (2006) Discontinuous gas exchange in insects: a clarification of hypothesis and approaches. *Physiological and Biochemical Zoology* 79: 333 – 343.
- CONTRERAS, H.L. & BRADLEY, T.J. (2010) Metabolic rate controls respiratory pattern in insects. *The Journal of Insect Physiology* 212: 424-428.
- CONTRERAS, H.L. & BRADLEY, T.J. (2010) Transitions in insects respiratory patterns are controlled by changes in metabolic rate. *The Journal of Insect Physiology* 56: 522:528.
- CORTÉS, R. (1968) Taquínidos chilenos (Dipt., Tachinidae), parásitos de phasmidos (Phasmoidea). *Bol. Soc. Biol. Concepción* 40: 101 – 114.
- DANKS, H.V. (2002) Modifications of adverse conditions by insects. *Oikos* 99: 10 – 24.
- DANKS, H.V. (2007) The elements of seasonal adaptations in insects. *Can. Entomol.* 139: 1-44.
- DAVIS, A.L., CHOWN, S.L. & SCHOLTZ, C.H. (1999) Discontinuous gas-exchange cycles in *Scarabaeus* dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae): mass-scaling and temperature dependence. *Physiological and Biochemical Zoology* 72(5): 555-565.
- GIBBS, A.G. & JOHNSON, R.A. (2004) The role of discontinuous gas exchange in insects: the chthonic hypothesis does not hold water. *The Journal of Experimental Biology* 207: 3477-3482.

- HADLEY, N.F. & QUINLAN M. (1993) Discontinuous carbon dioxide release in the eastern lubber grasshopper *Romalea guttata* and its effect on respiratory transpiration. *The Journal of Experimental Biology* 177:169-180.
- HARRISON, J.F., PHILLIPS, J.E. & GLEESON, T.T. (1991) Activity physiology of the two-striped grasshopper, *Melanoplus bivittatus*: gas exchange, hemolymph acid-base status, lactate production, and the effect of temperature. *Physiological Zoology* 64: 451-472.
- HARRISON, J.F., CAMAZINE, S., MARDEN, J.H., KIRKTON, S.D., ROZO, A. & YANG, X. (2001) Mite not make it home: tracheal mites reduce the safety margin for oxygen delivery of flying honeybees. *The Journal of Experimental Biology* 204: 805-814.
- HETZ, S.K. & BRADLEY, T. (2005) Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 433: 513-519.
- HOFFMANN, A., ARROYO, M., LIBERONA, F., MUÑOZ, M. & WATSON, J. (1998) Plantas altoandinas en la Flora Silvestre de Chile. *Ediciones Fundación Claudio Gay*. Santiago de Chile. 281 pp.
- JONES, H.G. (1999) The ecology of snow covered systems: a brief overview of nutrient cycling and life in the cold. *Hydrological Processes* 13, 2135 – 2147.
- LEHMANN, F.O. & SCHÜTZNER, P. (2010) The respiratory basis of locomotion in *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*, 56: 543-550.
- LEVY, R.I. & SCHNEIDERMAN, H.A. (1966) Discontinuous respiration in insects II. The direct measurement and significance of changes in tracheal gas composition during respiratory cycle of silkworm pupae. *Journal of Insect Physiology* 12: 83-104.
- LIGHTON, J.R.B. (1992) Direct measurement of mass loss during discontinuous ventilation in two species of ants. *The Journal of Experimental Biology* 173: 289-293.
- LIGHTON, J.R.B. (1994) Discontinuous ventilation in terrestrial insects. *Physiological Zoology* 67: 142 – 162.

- LIGHTON, J.R.B. (1996) Discontinuous gas exchange in insects. *Annual Review of Entomology* 41: 309 – 324.
- LIGHTON, J.R.B., GARRIGAN, D.A., DUNCAN, F.D. & JOHNSON, R.A. (1993) Spiracular control of respiratory water loss in female alates of the harvester ant *Pogonomyrmex rugosus*. *The Journal of Experimental Biology* 179: 233 – 244.
- LIGHTON, J.R.B. & BERRIGAN, D. (1995) Questioning paradigms: caste-specific ventilation in harvester ants, *Messor pergandei* and *M. julianus* (Hymenoptera: Formicidae). *The Journal of Experimental Biology* 198: 521-530.
- LIGHTON, J.R.B. & JOOS, B. (2002) Discontinuous gas exchange in a tracheate arthropod, the pseudoscorpion *Garypus californicus*: Occurrence, characteristics and temperature dependence. *Journal of Insect Science* 2:23. 4pp.
- LIGHTON, J.R.B. & TURNER, R. (2004) Thermolimit respirometry: an objective assessment of critical thermal maxima in two desert harvester ants, *Pogonomyrmex rugosus* and *P. californicus*. *The Journal of Experimental Biology* 207: 1903 – 1913.
- MACHIN, J., KESTLER, P., LAMPERT, G.J. (1991) Simultaneous measurements of spiracular and cuticular water loss in *Periplaneta americana*: implications for whole-animal mass loss studies. *The Journal of Experimental Biology* 161: 439-453.
- MARAIS, E., KLOK, C.J., TERBLANCHE, J.S. & CHOWN, S.L. (2005) Insect gas exchange patterns: a phylogenetic perspective. *The Journal of Experimental Biology* 208: 4507 – 4516.
- MATTHEWS, P.G.D. & WHITE, C.R. (2011) Discontinuous gas exchange in insects: is it all in their heads? *The American Naturalist* 177: 130-134.
- MATTHEWS, P.G.D. & WHITE, C.R. (2012) Discontinuous gas exchange, water loss, and metabolism in *Protaetia cretica* (Cetoniinae, Scarabaeidae). *Physiological and Biochemical Zoology* 85(2): 174-182.

- MUSSELMAN, R.C., MASSMAN, W.J., FRANK, J.M., KORFMACHER, J.M. (2005) The temporal dynamics of carbon dioxide under snow in a high elevation rocky mountain subalpine forest and meadow. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 37 (4), 527 – 538.
- NESPOLO, R.F., ARTACHO, P. & CASTAÑEDA, L.E. (2007) Cyclic gas-exchange in the Chilean red cricket: inter-individual variation and thermal dependence. *The Journal of Experimental Biology* 210: 668 – 675.
- QUINLAN, M.C. & GIBBS, A.G. (2006) Discontinuous gas exchange in insects. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 54: 18-29.
- ROURKE, B.C. & GIBBS, A.G. (1999) Effects of lipid phase transitions on cuticular permeability: model membrane and *in situ* studies. *The Journal of Experimental Biology* 202: 3255-3262.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. (1997) *Animal Physiology. Adaptations and Environment*. Cambridge University Press, 5ta. Edición. 612 pp.
- THIENEL, M. (2010) Carga parasitaria aparente de los machos de *Agathemera crassa* (Phasmatodea: Agathemeridae): ¿implicancias en la selección sexual? Seminario de Título de Pre-grado en Biología con mención en Medio Ambiente. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- VERA, A., PASTENES, L., VELOSO, C. & MÉNDEZ, M. (2012) Phylogenetic relationships in the genus *Agathemera* (Insecta: Phasmatodea) inferred from the genes *16S*, *COI* and *H3*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 165: 63-72.
- WILLIAMS, A.E., ROSE, M.R. & BRADLEY, T. (1997) CO₂ release patterns in *Drosophila melanogaster*: the effect of selection for desiccation resistance. *The Journal of Experimental Biology* 200: 615-624.
- WILLIAMS, A.E. & BRADLEY, T. (1998) The effect of respiratory pattern on water loss in desiccation-resistant *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology* 201: 2953-2959.

- WILLIAMS, C.M., PELINI, S.L., HELLMANN, J.J. & SINCLAIR, B.J. (2010) Intra-individual variation allows an explicit test of the hygric hypothesis for discontinuous gas exchange in insects. *Biology Letters* 6: 274-277.
- ZACHARIASSEN, K.E. (1996) The water conserving physiological compromise of desert insects. *Eur. J. Entomol.* 93: 359-367.
- ZAR, J.H. (1996) Biostatistical Analysis. *Prentis Hall*, 3ª Edición. 662 pp.