

UCH-FC
MA6-B
M538
C.I

**PREFERENCIA OLFATIVA HACIA LA
PLANTA HOSPEDERA EN UN INSECTO
FITÓFAGO, ¿PRIMER PASO EN LA
ESPECIACIÓN SIMPÁTRICA?**

TESIS

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

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Pedro Pablo Méndez Rojas

Octubre, 2013

Director de Tesis: Dr. Jorge Mpodozis Marín

Co-Director de Tesis: Dr. Cristian Villagra Gil

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

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

Pedro Pablo Méndez Rojas

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 23 de enero del año 2013.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis Marin

Co-Director de Tesis:

Dr. Cristian Villagra Gil

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Claudio Veloso Iriarte

Dr. Hermann M. Niemeyer



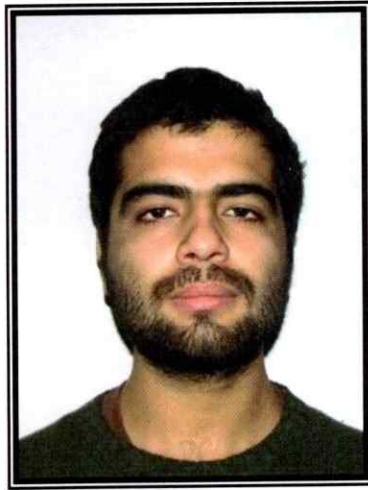
The image shows three handwritten signatures in black ink, each positioned above a horizontal dotted line. A circular stamp is overlaid on the signatures. The stamp contains the text 'FACULTAD DE CIENCIAS' at the top, 'BIBLIOTECA CENTRAL' in the middle, and 'UNIVERSIDAD DE CHILE' at the bottom, with two small stars on either side of the bottom text.



Dedico este trabajo a mis padres, Eva y Pedro,

y a mi hermana, Carolina.

*Gracias por su apoyo incondicional y por
estimular, desde pequeño, mi curiosidad por la naturaleza.*



Pedro Pablo Méndez Rojas nació el 28 de diciembre de 1987 en Santiago, Chile. Su interés por la naturaleza de los seres vivos lo llevó a estudiar Licenciatura en Ciencias con mención en Biología en la Universidad de Chile, donde desarrolló unidades de investigación sobre zoología y evolución, desempeñándose además como ayudante académico. Su interés por la ecología y evolución de los organismos, especialmente de los animales, lo llevó a continuar su formación académica ingresando al programa de Magister en Ciencias Biológicas en la misma casa de estudios usando como modelo de estudio la interacción entre plantas e insectos.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, a mis tutores Dr. Cristian A. Villagra y Dr. Jorge Mpodozis por apoyar, criticar y pulir mis ideas. Les agradezco por enseñarme una forma de abordar los fenómenos biológicos que me ha resultado motivadora y estimulante en la búsqueda de explicaciones a mis inquietudes científicas.

También quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por la formación científica brindada y al Instituto de Entomología de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación por brindar un ambiente académico apropiado para diseñar y desarrollar la presente investigación. Agradezco encarecidamente a mis compañeros de trabajo, colegas y amigos que me brindaron su ayuda, apoyo y críticas durante el desarrollo del presente trabajo.

Finalmente quisiera agradecer a toda mi familia, en especial a mis padres, Eva y Pedro, y a mi hermana, Carolina, por el apoyo y cariño brindado durante toda mi formación. Gracias por estimular, desde pequeño, mis inquietudes y ansias de respuestas, sin las cuales nunca hubiese surgido mi interés por las ciencias naturales.

Este trabajo fue financiado por proyecto FONDECYT de Iniciación a la Investigación 11100109 y proyecto CONICYT de Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia 79100013 otorgados al Dr. Cristian Villagra.



ÍNDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	8
Objetivos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Sitio de estudio.....	10
Caracterización de la fragancia de inflorescencia de plantas hospedadas	10
Caracterización fenológica de la floración de las especies <i>Haplopappus</i>	12
Análisis de la morfogeometría alar	13
Experimentos de preferencia olfativa	15
RESULTADOS.....	18
Objetivo específico 1	18
Objetivo específico 2	22
Objetivo específico 3	34
DISCUSIÓN	40
Plasticidad de la respuesta conductual	41
Diferencias en la morfología geométrica alar	42
Aspectos ecológicos: voltinismo e hibridización.....	44
Aspectos a considerar en futuros estudios	47
ANEXO – Análisis estadísticos y gráficos adicionales	50
BIBLIOGRAFÍA	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tiempos de retención (TR) y cantidad de replicas en las que se identificó cada compuesto entre las especies del género *Haplopappus* estudiadas. Se analizó un total de 19, 17 y 28 réplicas para *H. chrysantemifolius* (HC), *H. decurrens* (HD) y *H. foliosus* (HF) respectivamente. Se indica la probabilidad de identificación (PI), además con asterisco los compuestos identificados por medio de estándares externos.

Tabla 2. Análisis de varianza sobre diferencias en el tamaño de los centroides usando el sexo y el hospedero como fuentes de variación.

Tabla 3. Valores propios, porcentaje de varianza explicada y acumulada, pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y homocedasticidad de Levene para cada uno de los componentes generados por el Análisis *Relative Warps*.

Tabla 4. MANOVA y MANCOVA, usando el tamaño del centroide como covariable, realizado sobre los *relative warps* generados a partir de los hitos de la venación alar seleccionados.

Tabla 5. Prueba de homogeneidad de las pendientes de las relaciones entre las distintas variables.

Tabla 6. Pruebas de normalidad sobre las distribuciones de las latencias e IP para los distintos tratamientos. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk debido a que es la más recomendada cuando el número de réplicas es bajo.

Tabla 7. Latencias e IP para los distintos tratamientos (Promedio \pm EE).

Tabla 8. Proporción de tiempo pasado por el individuo en cada brazo para cada uno de los tratamientos (Promedio \pm EE).

Tabla 9. Pruebas de t de Student para muestras dependientes desarrolladas sobre las proporciones de tiempo pasado en cada uno de los brazos en cada uno de los experimentos y pruebas de normalidad de las distribuciones de las diferencias entre ambas variables.

Tabla 10. Análisis de covarianza utilizando como variable respuesta IP, covariable el sexo y como factores el hospedero de eclosión y el estímulo aplicado.

Tabla 11. Pruebas de t de Student para muestras independientes desarrolladas sobre los IP, y prueba de homocedasticidad de Levene para ambas comparaciones (ver pruebas de normalidad en Tabla 6).



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la vista dorsal del ala derecha de un díptero tefrítido (modificado de White y col. 2001). Se indican los 16 hitos usados en el presente análisis morfológico.

Figura 2. Fenología de la floración de *H. chrysantemifolius*, *H. foliosus* y *H. decurrens* durante el período estival comprendido entre los años 2011 y 2012 representada como el porcentaje promedio de inflorescencias maduras por individuo.

Figura 3. Gráfico de las funciones discriminantes canónicas generadas por el AFDC realizado sobre la fragancia floral de *H. chrysantemifolius* (azul), *H. foliosus* (verde) y *H. decurrens* (rojo), además del respectivo centroide (cuadrado) para cada especie.

Figura 4. Fotografía de la vista dorsal del ala izquierda de un ejemplar de *D. chilensis*. En rojo se indican los 16 hitos morfológicos utilizados en el análisis morfogeométrico; todos ellos corresponden a intersecciones de la venación alar.

Figura 5. Promedio e intervalo de confianza al 95 % del tamaño del centroide de individuos machos (cuadrado, rojo) y hembras (círculos, azul) de la especie *D. chilensis* que parasitaron *H. decurrens* y *H. foliosus*.

Figura 6. Gráfico de los componentes principales 1 y 2 (los cuales explican el 27,7 % y 16,6 % de la varianza respectivamente), con elipse al 95 % de confianza, generados por el ACP sobre la matriz de covarianza generada por el AGP de la morfología alar de ejemplares de *D. chilensis* que usaron a *H. foliosus* (azul) o *H. decurrens* (rojo) como hospedero.

Figura 7. Esquemas de placa delgada de la deformación morfológica expresada por los dos primeros componentes principales graficados en la Fig. 6.

Figura 8. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como

clasificador el hospedero utilizado por cada uno de los ejemplares independiente de su sexo.

Figura 9. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como clasificador el sexo en ejemplares que utilizaron la especie *H. decurrens* como hospedero.

Figura 10. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como clasificador el sexo en ejemplares que utilizaron la especie *H. foliosus* como hospedero.

Figura 11. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como clasificador el hospedero utilizado por ejemplares hembras.

Figura 12. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como clasificador el hospedero utilizado por ejemplares machos.

Figura 13. Latencia de la respuesta de *D. chilensis* en cada tratamiento. Se realizaron 13, 13, 9 y 15 replicas para cada tratamiento respectivamente. Valores en Tabla 7, Anexo.

Figura 14. Proporción de tiempo pasado por ejemplares *D. chilensis* en cada brazo en cada uno de los tratamientos (Hospedero/Estímulo; HF: *H. foliosus*; HD: *H. decurrens*) (Promedio \pm EE) (*: $p = 0,035$). Valores en Tabla 8, Anexo.

Figura 15. Valor del IP para cada tratamiento. (Hospedero/Estímulo; HF: *H. foliosus*; HD: *H. decurrens*) (Promedio \pm EE) (** = $p < 0,02$). Valores en Tabla 7, Anexo.

Figura 16. Cromatograma obtenido mediante un análisis de cromatografía de gases (CG) realizado sobre una muestra colecta de volátiles dinámica en terreno de una inflorescencia madura de la especie *H. decurrens*.

Figura 17. Cromatograma obtenido mediante un análisis de cromatografía de gases (CG) realizado sobre una muestra colecta de volátiles dinámica en terreno de una inflorescencia madura de la especie *H. foliosus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP:	Análisis de componentes principales
AFDC:	Análisis de función discriminante canónica
AGP:	Análisis generalizado de Proustes
ANCOVA:	Análisis de covarianza (<i>Analysis of covariance</i> , en inglés)
ANDEVA:	Análisis de varianza (<i>Analysis of variance</i> , en inglés)
ARW:	Análisis <i>Relative Warp</i>
AVC:	Análisis de variable canónica
CC:	Correlación canónica
CP:	Componente principal
COVs:	Compuestos orgánicos volátiles
EE:	Error estándar
FDC:	Función discriminante canónica
CG:	Cromatografía de gases (<i>gas chromatography</i> , <i>GC</i> , en inglés)
g. l.:	Grados de libertad
HC:	<i>H. chrysantemifolius</i>
HD:	<i>H. decurrens</i>
HF:	<i>H. foliosus</i>
IP:	Índice de preferencia

MANCOVA:	Análisis multivariado de covarianza (<i>Multivariate analysis of covariance</i> , en inglés)
MANOVA:	Análisis multivariado de varianza (<i>Multivariate analysis of variance</i> , en inglés)
MLG:	Modelo lineal general (<i>General linear model, GLM</i> , en inglés)
EM:	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry MS</i> , en inglés)
NS:	No significativo
PI:	Probabilidad de identificación
PVA:	Polivinilacetato
PW:	<i>Partial Warp</i>
RW:	<i>Relative Warp</i>
T _{est} :	Tiempo pasado en el brazo estímulo
T _{con} :	Tiempo pasado en el brazo control
T _t :	Tiempo total
TR:	Tiempo de retención

RESUMEN

Los insectos y las plantas vasculares son los Taxa más diversificados en nuestro planeta. En muchos casos ellos presentan una amplia intersección de sus ciclos de vida. Los insectos fitófagos generalmente se desarrollan durante sus estadios juveniles en algún tejido vegetal, infestando frutos, flores, tallos, etc. Se ha propuesto que la ocurrencia de fidelidad conductual por parte del fitófago hacia su especie hospedera podría ser el paso inicial de una eventual especiación simpátrica mediante la formación de razas hospederos. En este trabajo se utilizó a la especie *Dioxya chilensis* (Diptera: Tephritidae) y sus hospederos *Haplopappus foliosus* y *H. decurrens* (Asteraceae) como modelo de estudio de eventuales diferencias fenotípicas, a nivel conductual y morfológico, producto del uso diferencial de hospedero. Nuestros resultados muestran que *D. chilensis* no presenta fidelidad olfativa significativa hacia el hospedero de desarrollo, es más, se detectó una quimiotaxis negativa hacia el hospedero para el caso de *H. foliosus*, mostrando preferencia hacia *H. decurrens*. Por otro lado se detectaron diferencias significativas en la morfología geométrica de la venación alar entre individuos desarrollados en uno u otro hospedero y diferencias de tamaño entre estas. Nuestros resultados sugieren que ambos hospederos influyen el fenotipo del insecto fitófago, sin embargo, no se detectó la ocurrencia de fidelidad olfativa al hospedero, no obstante estas diferencias fenotípicas. Esto, junto con otros aspectos del ciclo de vida de *D. chilensis*, puede ayudar a explicar su modo de vida relativamente oligófago.



ABSTRACT

Insects and vascular plants are among the most diversified Taxa on Earth. In many cases, their life cycles are highly interrelated. The early stages of phytophagous insects often develop in a given plant tissue, infesting vegetative and reproductive parts. It has been proposed that the occurrence of insect behavioural fidelity towards its host plant may represent the first stage in a diversification process. These changes may drive to the generation of specialized phytophagous varieties, called host races, a first step in sympatric speciation. In this work we studied the effect of differential host use by a phytophagous insect on its behavior and morphology. We used *Dioxyna chilensis* (Diptera: Tephritidae) and their host plants, *Haplopappus foliosus* y *Haplopappus decurrens* (Asteraceae) as study system. Our results show that *D. chilensis* does not display a marked host preference. Even so, we detected negative chemotaxis towards its eclosion host (*H. foliosus*), meanwhile these flies preferred the alternative host (*H. decurrens*). Moreover, we found marked morphological differences on wing venation based on the host used during its development. Our results suggest that, despite our results do not support an augmented host fidelity due to host use, plant hosts exerted a considerable effect on insect phenotype expressed on insect behavior and morphology. We propose that these changes may help to explain *D. chilensis* oligophagous life style found in our study system.

INTRODUCCIÓN

La Clase Insecta y el Reino de las Plantas corresponden a los Taxa más diversificados y abundantes de la biósfera (Mora y col. 2010), tanto en biomasa como en número de especies (Schoonhoven y col. 2005). Ambos grupos forman a su vez una gran variedad de interacciones ecológicas, desde asociaciones antagonistas y parasíticas hasta los más intrincados mutualismos a lo largo de sus ciclos de vida. Alrededor de la mitad de los insectos conocidos (Mora y col. 2010) viven y/o se alimentan de algún tejido de, al menos, una de las aproximadamente 298.000 especies de plantas vasculares descritas (Mora y col. 2010). Dichos insectos se denominan fitófagos. Los insectos fitófagos pueden clasificarse como especialistas (aquellos que se alimentan de una especie particular o especies dentro de una misma familia) o generalistas (aquellos que se alimentan de especies de más de una familia) (Schoonhoven y col. 2005), siendo los primeros los más abundantes comprendiendo más del 90 % de las especies (Bernays 1988). Cabe destacar que dicha clasificación depende de la escala taxonómica, tanto del parásito como del hospedero, a la cual se realiza el análisis (Janz y col. 2001).

La especialización hacia un organismo hospedero ha sido propuesta como una condición recurrente en la evolución animal (Janz y col. 2001). Más aún, los grados de especificidad pueden incluso involucrar la especialización a nivel del tipo de tejido vegetal del cual el insecto fitófago se alimenta, como por ejemplo hojas (folívoros), néctar (nectarívoros), raíces (rizófagos), frutos (frugívoros) o flores (florívoros), entre otros. Dichos modos de alimentación se ven reflejados la morfología, fisiología y conducta de estos insectos.

El dilema de la generalización versus la especialización de hospedero ha sido un tema ampliamente discutido en términos evolutivos, con variadas explicaciones acerca de su origen que intentan responder el por qué de la dominancia de insectos especialistas (Feder 1998).

Dentro de las diferentes ideas presentadas para explicar este fenómeno se ha propuesto que la especialización contribuiría al escape y defensa contra depredadores, los cuales ejercerían una presión selectiva sobre sus presas (Bernays 1989). Adicionalmente se ha sugerido que este modo de vida conferiría ventajas sobre la alternativa generalista en el proceso de búsqueda de hospederos (Bernays 2001).

Alternativamente se ha propuesto que los fenómenos de especialización no necesariamente serían conducidos por ventajas adaptativas en el uso de nuevos hospederos, sino que principalmente surgirían gracias a la plasticidad fenotípica (morfológica y conductual) que permitiría un uso dinámico de distintas alternativas de desarrollo y uso de hospederos (Agrawal, 2001; Janz y col. 2001, Nylin y Wahlberg 2008). Estas características permitirían prevenir la pérdida de variabilidad genética en la capacidad de uso de variados hospederos (“callejón sin salida”, *evolutionary dead end*,

en inglés”) producto de la especialización extrema (Thompson y col. 1997; Kelley y Farrel 1998). Por ejemplo se ha sugerido que en la tribu Nymphalini (Lepidoptera: Nymphalidae) no existe una direccionalidad en la evolución del tipo de hospedero usado por estas mariposas. En reconstrucciones históricas, dicha tribu presenta patrones dinámicos del uso de plantas hospederas pudiendo ampliar o modificar su rango de hospederos sin perder su plasticidad, vale decir; conservando la capacidad de volver a parasitar a antiguos hospederos (Janz y col. 2001).

Esta aproximación, que incorpora la plasticidad como vehículo de diversificación en insectos, tiene sus raíces en los trabajos del entomólogo Benjamín Walsh (1864). Contemporáneamente a la publicación de la teoría de Darwin sobre la selección natural, dicho entomólogo sugirió uno de los primeros modelos de especiación simpátrica. Walsh propuso que el cambio de hospedero del fitófago *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae), desde su hospedero nativo *Crataegus sp.* a la especie introducida aproximadamente en 1850, *Malus pumila* (Rosaceae), generó nuevas variedades o razas (Walsh 1867). Más de 100 años después, Bush revitalizó dicha hipótesis proponiendo que este tipo de cambio sería resultado de selección divergente entre las variedades (Bush 1969). De esta forma, el cambio y posterior uso de determinados hospederos conformarían variantes divergentes conocidas como razas hospederas, etapa que podría ser considerada el primer paso hacia la especiación simpátrica (Bush 1969). La formación de razas hospederas de insectos fitófagos podría ocurrir a través de la reducción de flujo génico entre las variedades en formación (Bush 1992). Esto requiere al menos de: (1) cambios en la preferencia de sitios oviposición y/o alimentación, (2) capacidad fisiológica de adaptación al nuevo hospedero que permita una ampliación del

nicho, (3) preferencia por el hospedero como sitio de apareamiento, y (4) que exista algún grado de aislamiento alocrónico de los períodos de floración y fructificación entre las plantas hospederas que facilite el desarrollo de períodos de eclosión y apareamiento diferenciales de los fitófagos asociados, permitiendo así reducir la posibilidad de introgresión y fusión de las variedades en formación (Craig y col. 1993, Bush 1998, Dres y Mallet 2002).

Por otro lado, se ha comprobado que cambios en las conductas relacionadas al grado de fidelidad al hospedero pueden ser el resultado de aprendizaje durante alguna ventana temporal específica de la ontogenia del insecto fitófago (Prokopy y col. 1982, Craig y col. 1993). Esta preferencia aprendida podría repetirse a través de las generaciones si se mantienen las condiciones que propician el encuentro con las mismas señales y recursos a través de la ontogenia. Respecto a este punto se ha demostrado cómo diferentes factores ambientales, tales como ritmos circadianos diarios (Wynand y col. 1998), concentraciones ambientales de CO₂ (Turner y col. 2009, Sachse y col. 2007) y falta de alimento (Den Otter y col. 1991) juegan un rol importante en el desarrollo y especialización neuronal en insectos, modificando su conducta. Esto sugiere que los dípteros poseen la capacidad neurofisiológica de responder plásticamente frente a distintos ambientes físicos y químicos presentes durante su eclosión, como es el caso de *Drosophila melanogaster*, donde se ha demostrado que las sustancias químicas presentes en el ambiente post-eclosión pueden influir en modificaciones fisiológicas, específicamente en la sensibilidad de las neuronas receptoras olfativas (NRO) (*Olfactory Receptor Neurons*, *ORNs*, en inglés), aumentando su respuesta electrofisiológica a determinados aromas durante su estadio adulto (Iyengar y col. 2010).

Respecto a este punto Agrawal sugiere que la preferencia inducida hacia el nuevo hábitat podría causar posteriormente restricciones en el flujo génico con respecto a los organismos en el hospedero inicial (Agrawal 2001), conduciendo así a la formación de razas hospederas (Bush 1992). Este proceso podría ocurrir sin la necesidad de una pérdida de la capacidad de responder plásticamente a nivel conductual, de la forma en que puede ocurrir en la mosca de la fruta *Rhagoletis pomonella*, la cual ha retenido su plasticidad fenotípica dieta-inducida incluso en la nueva raza hospedera, permitiendo a esta usar a la vez a su antiguo hospedero (Agrawal 2001). De forma similar, como fue mencionado anteriormente, evidencia filogenética sugiere que especies de mariposas tienen la capacidad de volver a utilizar hospederos antiguamente utilizados, proponiéndose este uso plástico como clave en la diversificación de las mismas (Nylin y Janz 2009).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, es posible que en el género *Rhagoletis* (Snow 1984) el aprendizaje asociativo pudiese haber facilitado el cambio de hospedero desde el fruto del espino (*Crataegus spp.*) a la manzana (*Malus pumila*) (Bush 1969, Feder 1998). En este sistema de estudio se ha comprobado que la experiencia temprana post-eclosión con un determinado hospedero tiene un efecto en preferencias durante encuentros futuros con esta misma planta respecto a otros hospederos alternativos (Prokopy y col. 1982). Este fenómeno podría explicar en parte el cambio de hospedero producido mediante una inducción de fidelidad al hospedero, contribuyendo posteriormente en la restricción del flujo génico y la subestructuración de poblaciones naturales en este sistema de estudio, lo que pone especial énfasis en la relevancia del

estudio de rasgos que determinan estos patrones de preferencia de hospedero (Feder y col. 1994, Via 2001).

Dioxya chilensis Macquart (Diptera: Tephritidae) es un díptero que presenta un uso generalista de especies vegetales de la familia de las asteráceas. En particular, estas moscas se han descrito infestando especies del género *Haplopappus* en la Zona Central de Chile, tales como *H. foliosus*, *H. decurrens*, *H. chrysantemifolius* y *H. platylepis*. Presenta un marcado dimorfismo sexual en el cual las hembras presentan un ovipositor cónico sobresaliente en el extremo posterior del abdomen con el cual depositan sus huevos en los discos de las inflorescencias de sus hospederos. En terreno es posible observar a las hembras ovipositando en dichas especies del género *Haplopappus*, donde posteriormente las larvas se alimentan de tejidos vegetales reproductivos para luego pupar y eclosionar cuando la inflorescencia completa su proceso de fructificación (Méndez P., observación personal). No se encontró registro bibliográfico de la biología reproductiva de *D. chilensis*, pero sí de su congénere *Dioxya sororcula* infestando *Callendula officinalis* (Asteraceae) (Grewal y Kapoor 1984). *D. sororcula* prefirió como sitio de apareamiento, oviposición y alimentación las inflorescencias de su especie hospedera. La mayoría de los apareamientos, tanto en observaciones en terreno como en ensayos en laboratorio, se llevaron a cabo en el disco de la inflorescencia, dónde además tuvieron una mayor duración (Grewal y Kapoor 1984). Dichos antecedentes sugieren que la selección de hospedero sería un paso importante para el posterior encuentro entre machos y hembras de dicha especie. Adicionalmente se ha descrito que *Dioxya picciola* es una especie bivoltina o trivoltina oligófaga que infesta al menos diez especies del género *Bidens* (Asteraceae) y cinco especies del género *Coreopsis* (Asteraceae) en

California, EUA, las cuales tienen distintos períodos de floración y fructificación (Headrick y col. 1996, Wasbauer 1972).

Por otro lado, el género *Haplopappus* (Asteraceae: Astereae) está representado por al menos 56 especies, y nueve subespecies, siendo divididas en tres subgéneros (*Haplopappus*, *Grindelioidae* y *Baylahuen*) y cinco secciones (*Leiachaenium*, *Chromochaeta*, *Grindelioidae*, *Gymnocomma* y *Haplopappus*) (Klingerberg 2007). Dentro de estas las especies *H. chrysatemifolius* (sección *Haplopappus*), *H. foliosus* y *H. decurrens* (ambas de la sección *Leiachaenium*) coexisten en el borde costero de la Zona Central de Chile (Klingerberg 2007, Frías 2005). Estudios anteriores han descrito en las plantas hospederas rasgos morfológicos distintivos en sus órganos vegetativos y reproductivos así como también en su fenología, además de diferencias detectables al olfato humano en la fragancia floral, sugiriendo adicionalmente que *H. decurrens* es un híbrido alopoliploide (tetraploide) fértil entre los parentales *H. foliosus* y *H. chrysantemifolius* (Frías 2005).

Dado que *D. chilensis* infesta las inflorescencias de al menos cuatro especies simpátricas del género *Haplopappus*, las cuales además son sus sitios de apareamiento y fuentes de alimento, sumado a que datos preliminares (C. A. Villagra 2011, comunicación personal) muestran que poseen fenologías parcialmente alocrónicas, hacen de este un sistema adecuado para estudiar el valor de la experiencia temprana en el desarrollo de la preferencia olfativa hacia estas plantas, y cómo el uso de un determinado hospedero puede modificar tanto rasgos conductuales como morfológicos importantes en modelos de especiación (Bush 1992).

Hipótesis

Hipótesis 1: El desarrollo y eclosión en una determinada planta hospedera influyen el fenotipo del insecto fitófago que se desarrolla en esta.

Predicción: Ejemplares de la especie *D. chilensis* que se hayan desarrollado y eclosionado en *H. foliosus* o *H. decurrens* presentarán algún grado de diferenciación fenotípica (conductual y/o morfológica).

Hipótesis 2: Los compuestos orgánicos volátiles de las inflorescencias maduras de la planta hospedera de *D. chilensis* corresponden a un estímulo que media la expresión de la fidelidad de este a su hospedero.

Predicción: Conductualmente la diferenciación entre insectos que se desarrollan y eclosionan en distintos hospederos se expresará como quimiotaxis positiva hacia al hospedero por parte de ejemplares adultos de la especie *D. chilensis*.

Objetivos

Objetivo general

Analizar del efecto del uso diferencial de hospederos del género *Haplopappus* sobre el fenotipo desarrollado en ejemplares de *D. chilensis*, y de las condiciones ecológicas de la relación fitófago-hospedero que eventualmente pudiesen sugerir la ocurrencia de razas hospederos de dicho fitófago.

Objetivo específico 1

Evaluar el grado de diferenciación de la fragancia y fenología de floración de *H. chrysantemifolius* y *H. foliosus*, y la especie híbrida *H. decurrens*.

Objetivo específico 2

Evaluar si el uso de diferentes hospederos repercute en diferencias fenotípicas en la morfología geométrica alar de *D. chilensis*.

Objetivo específico 3

Evaluar la posible ocurrencia de quimiotaxis positiva y/o diferencias de latencia por parte de ejemplares imagos recientemente eclosionados de la especie *D. chilensis* hacia compuestos químicos volátiles de sus hospederos *H. foliosus* y *H. decurrens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se realizó en seis grupos de arbustos del género *Haplopappus*, distantes entre 400 y 1.100 m aproximadamente unos de otros, dentro del Parque privado Bioparque Pukén, Los Molles (32°14'16''S, 71°31'16''O), Provincia de Petorca, V Región de Valparaíso, Chile, entre los meses de noviembre de 2011 y marzo de 2012.

Caracterización de la fragancia de *Haplopappus spp.*

Colecta de compuestos orgánicos volátiles. Se realizaron colectas de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) florales y foliares en terreno mediante la técnica de extracción dinámica (*dynamic headspace*, en inglés, Raguso y Pellmyr 1998). Las inflorescencias y hojas fueron envueltas en una bolsa de polivinilacetato (PVA) (215 × 80 mm) atada en un extremo. Mediante un orificio en un extremo de la bolsa de PVA se introdujo la punta de una pipeta Pasteur con 10 mg de polímero adsorbente (Polímero Super Q, Altech Associates, Waukegan, IL) en su interior sujeto con lana de vidrio, mientras que el otro extremo de la pipeta se unió a una bomba de vacío a batería (Supelco PAS-500 Personal Air Sample,

Bellefonte, Pennsylvania, EUA), con la cual se generó un flujo de aire de 200 ml/min durante una hora a través de la bolsa, el polímero adsorbente y la pipeta (orden secuencial). Luego se extrajo la mezcla de volátiles desde el polímero eluyendola con 500 μ L de hexano redestilado en viales ámbar de 2 ml. La muestra fue almacenada a -20 °C para su posterior análisis. Se usaron bolsas de PVA vacías como controles ambientales para evitar posibles contaminaciones emitidas esta u otra fuente cercana. Las colectas se realizaron entre las 10:00 y 14:00 horas con el fin de disminuir la variación en la mezcla de volátiles producto de factores bióticos y abióticos (Theis y col. 2007). Adicionalmente se realizaron colectas control de la fragancia emitida por las inflorescencias utilizadas en los experimentos de preferencia olfativa. Se realizaron un total de 19, 28 y 27 colectas de volátiles en terreno de las especies *H. chrysantemifolius*, *H. foliosus* y *H. decurrens* respectivamente.

Análisis químico. Se analizó la composición química de la fragancia colectada mediante cromatografía de gases (CG; Perkin Elmer Clarus 500) y espectrometría de masas (EM; Perkin Elmer Clarus 560D). Se utilizó una columna capilar Elite-5 (30 m \times 0,20 mm) usando helio como gas transportador. La identificación de compuestos orgánicos se realizó usando la base de datos NIST 2005 (librería de espectros de masas GC-EM-NIST2005). Se consideraron los COVs con índices de identificación mayores a 90% (TurboMass Perkin Elmer Software). Adicionalmente se utilizaron los tiempos de retención (TR) de soluciones estándar para algunos compuestos. La composición relativa de cada compuesto se obtuvo integrando el área bajo la curva de cada pico comparada con el área total del perfil cromatográfico, determinando así el porcentaje de cada compuesto en la mezcla total.

Análisis estadísticos. Con el fin de evaluar diferencias multivariadas en las composiciones porcentuales de los compuestos presentes en la fragancia floral se determinaron las cantidades relativas de todos los compuestos diferenciados en las muestras con respecto al total. Con el fin de reducir la dimensionalidad de los datos (proporción de cada compuesto en cada colecta) se desarrolló un análisis de componentes principales (ACP) sobre el arcoseno de la raíz cuadrada de dichas proporciones (Sokal y Rohlf, 1998). Todos los datos fueron escalados a la unidad (*scaled to unit transformation*, en inglés) (Svensson 2005). Los 15 primeros componentes principales generados por el ACP fueron usados en un posterior análisis de función discriminante canónica (AFDC) usando la especie de hospedero (*H. foliosus*, *H. chrysantemifolius* o *H. decurrens*) como clasificador (Vereecken y col. 2010). Los análisis fueron realizados usando los programas NCSS 07.1.9 2008 y SPSS 19.0.0.

Caracterización fenológica de la floración de *Haplopappus* spp.

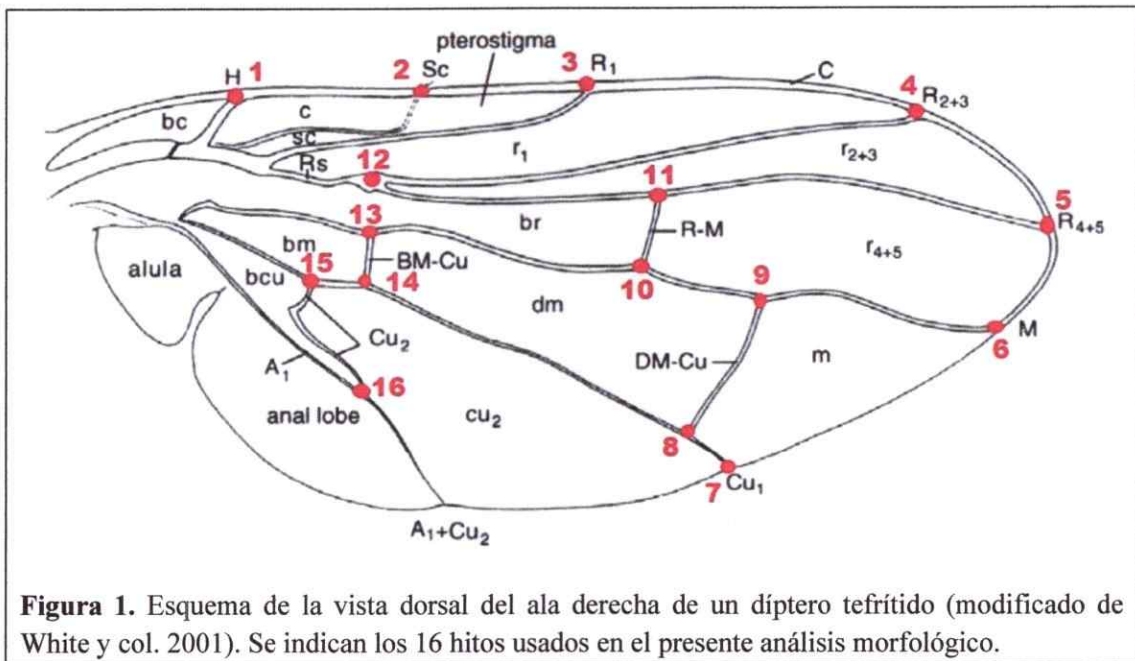
Se determinaron cinco estadios ontogenéticos de las inflorescencias de las especies en estudio: yemas, yemas abiertas, flores maduras, flores senescentes y flores con semillas. Se cuantificó la cantidad de cada uno de dichos estadios en individuos pertenecientes a los seis grupos de *Haplopappus* spp. estudiados. Observaciones de campo indican que *D. chilensis* oviposita sobre los discos de las inflorescencias, aún cuando estas no estén completamente maduras. Debido a esto se consideraron los estadios “yema abierta” y “flor madura” como disponibles para oviposición. Se calculó la proporción de la suma de ambos con respecto al total de inflorescencias en cada

planta. Los registros se realizaron periódicamente cada 15 ó 20 días desde noviembre de 2011 hasta marzo de 2012.

Análisis de la morfogeometría alar

Colecta de muestras. Se colectaron y depositaron en alcohol al 90 % (v/v) ejemplares adultos de *D. chilensis* eclosionados desde los hospederos *H. decurrens* y *H. foliosus*. Posteriormente se disectó y montó su ala izquierda en un portaobjeto para luego ser fotografiada. El resto del cuerpo se conservó nuevamente en alcohol. Se llevó a cabo un análisis de morfología geométrica de la vista dorsal del ala izquierda para lo cual se determinaron 16 hitos morfológicos (*landmarks*, en inglés) homólogos (Fig. 1), cada uno correspondiente a un intersección de la venación alar usando las aplicaciones tpsUtil y tpsDig2 (Rohlf 2004).

Variación del tamaño. Para analizar variaciones en el tamaño de los distintos grupos se obtuvo el tamaño del centroide (*centroid size*, en inglés). Este es definido como la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas de cada hito desde el centroide de la configuración. Las diferencias entre individuos que usaron ambos hospederos y entre sexos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) usando el hospedero y sexo como fuentes de variación.



Variación de la forma. Los siguientes análisis se llevaron a cabo usando la aplicación MorphoJ (Klingenberg 2011). Se realizó un análisis generalizado de Procrustes (AGP) (Bookstein 1996) para llevar todos los individuos a un sistema de coordenadas usando alineación en los ejes principales, obteniendo así variables de forma llamadas *Partial Warps* (PW) (Rohlf 1993). Para averiguar cambios en la forma de la venación alar se redujo la dimensionalidad de la matriz de PW mediante un Análisis *Relative Warps* (ARW), un análisis de componentes principales sobre la matriz de PW. Luego se utilizó la matriz de *Relative Warps* (RW) en un análisis multivariado de la varianza (MANOVA, del inglés *multivariate analysis of variance*) usando el sexo y hospedero como fuentes de variación. Con el mismo diseño y agregando el tamaño del centroide como covariable se realizó un análisis multivariado de la covarianza (MANCOVA, del inglés *multivariate analysis of covariance*), previamente

comprobando la homogeneidad de las pendientes de las relaciones entre el tamaño y la forma, y los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Soto y col. 2007). Finalmente se aplicó un análisis de variables canónicas (AVC) (Campos y col. 2011, Ruiz-C y col. 2011) usando como clasificador el hospedero y el sexo en dos análisis independientes. Este último análisis maximiza la varianza entre grupos, a diferencia del ACP que lo hace entre individuos, de este modo el AVC es útil para distinguir afinidades entre grupos definidos *a priori* (Ruiz-C y col 2011). Para visualizar las variaciones de la disposición de cada hito se confeccionaron los gráficos de placa delgada (*thin-plate spline*, en inglés) generados por el ARW (Bookstein 1991, Rohlf 1993).

Experimentos de preferencia olfativa

Muestreo de individuos. Se colectaron inflorescencias en proceso de fructificación de los hospederos *H. foliosus* y *H. decurrens*, para luego individualizarlas en frascos de 25 cm³ a temperatura ambiente. Las colectas se llevaron a cabo durante febrero y marzo de 2012. La eclosión de imagos de *D. chilensis* fue evaluada diariamente y los ejemplares obtenidos fueron aislados en tubos Eppendorf® para su posterior uso en los experimentos conductuales.

Arena y diseño experimental. Los experimentos conductuales se llevaron a cabo en el laboratorio en un olfatómetro de elección dual en forma de Y de las siguientes dimensiones: zona central de 9 cm de largo y 1,3 cm de diámetro interno, con brazos de 6 cm de largo y 0,6 cm de diámetro interno formando un ángulo de 80°. Cada adulto eclosionado de *D. chilensis* fue expuesto a la fragancia de su hospedero de origen o a la

del hospedero alternativo en experimentos independientes usando como control aire purificado en cada uno de ellos (véase Villagra y col. 2005). Como fuente de volátiles se utilizaron tres inflorescencias junto a 5 ± 1 cm de tallo con hojas de la planta con la región inferior sellada con cinta de teflón para minorizar la difusión de compuestos químicos producto del daño tisular producido por el corte realizado al retirar el ápice (Fontana 2009). Dichas inflorescencias fueron ubicadas en campanas de vidrio de 1.100 ml aprox. El aire utilizado fue previamente purificado mediante un filtro de carbón activado de 10 cm de ancho y 30 cm de largo, con una capacidad aproximada de 700 g, y luego humedecido mediante un filtro de agua destilada de 1.000 ml. Se usó un flujo de aire de 250 ml/min. Para confirmar que esta forma de presentación permitía la emisión del estímulo olfativo hacia la arena experimental, se realizaron colectas dinámicas de volátiles desde la campana control y estímulo. Los experimentos fueron registrados con una cámara digital. Cada prueba tuvo una duración máxima de cinco minutos; sin embargo, el experimento se detuvo cuando (1) el individuo escapó de la arena experimental por la entrada de esta, o (2) cuando el individuo escapó de la arena experimental por la manguera conectada a uno de los brazos. En el primer caso el bioensayo fue realizado nuevamente, mientras que en el segundo se consideró dentro del análisis. Debido a estos últimos el tiempo de duración de los experimentos no fue constante, por lo que las preferencias fueron analizadas en términos de proporciones de tiempo en lugar de tiempo absoluto. A partir de datos de asignación temporal durante los experimentos conductuales de preferencia olfativa se determinó la latencia de la respuesta, la cual se definió como el tiempo que el individuo demoró en tomar la primera elección, es decir, en entrar a alguno de los brazos del olfatómetro. A los

individuos que no presentaron elección por alguno de los brazos se les asignó como latencia el tiempo máximo del experimento, es decir, cinco minutos. Se realizó un total de 51 experimentos de preferencia.

Análisis estadísticos. Se determinó el tiempo pasado hasta la primera elección por algún brazo (latencia) y la proporción de tiempo en cada brazo mediante el programa JWatcher 1.0 (Blumstein 2000). Como una primera aproximación se realizó un análisis binomial de las elecciones tomadas por los individuos en el olfatómetro. Se realizó un análisis de las elecciones realizadas mediante la Prueba de McNemar para comparaciones dentro de un mismo tratamiento, mientras que para comparaciones entre experimentos se utilizó la Prueba exacta de Fisher. Adicionalmente, con el fin de incluir las proporciones de tiempo con los períodos de latencia en una variable única, se utilizó un Índice de Preferencia (IP) (según Villagra y col. 2007). De este modo valores positivos del IP indican quimiotaxis positiva mientras que valores negativos indican quimiotaxis negativa. Para efectos del análisis estadístico, los valores de los IP fueron escalados mediante una constante a proporciones positivas y transformadas mediante la raíz cuadrada del arcoseno para satisfacer el supuesto de normalidad. El índice de preferencia se calculó según la siguiente ecuación.

$$IP = \frac{T_{est} - T_{con}}{T_t}$$

Donde T_{est} es el tiempo pasado en el brazo estímulo, T_{con} el tiempo pasado en el brazo control y T_t el tiempo total de duración del experimento.

RESULTADOS

Objetivo específico 1. Evaluar el grado de diferenciación de la fragancia y fenología de floración de *H. chrysantemifolius* y *H. foliosus*, y la especie híbrida *H. decurrens*.

A partir del registro fenológico de los hospederos estudiados se graficó el porcentaje promedio de flores maduras con respecto al total de flores en cada individuo (Fig. 2). Se determinó que las tres especies presentan picos de floración en distintos períodos de la estación estival. El período de floración de *H. chrysantemifolius* comenzó a finales de octubre y culminó durante el mes de febrero, mientras que la floración de *H. foliosus* comenzó a mediados de febrero y terminó en una fecha indeterminada del mes de abril. Por otro lado *H. decurrens* presentó un período de floración que se sobrepuso al de las especies anteriores, comenzando a mediados de noviembre y culminando a finales de marzo. En consecuencia individuos de la comunidad de insectos que interactuaba específicamente con las inflorescencias de *H. chrysantemifolius* y *H. foliosus* compartían como posible recurso, en términos temporales, a *H. decurrens*.

El AFDC indica que las fragancias florales de las tres especies poseen matrices de covarianza heterogéneas ($W_{\lambda 1} = 0,12$, g. l. = 30, $p_1 < 0,001$; $W_{\lambda 2} = 0,55$, g. l. = 14, $p_2 =$

0,004). Los valores de correlación canónica (CC) cercanos a 1 indican que los grupos no se superponen en el gráfico de las funciones discriminantes canónicas. En nuestro caso los valores de CC no fueron suficientes para evitar el solapamiento ($CC_1 = 0,89$; $CC_2 = 0,67$); sin embargo, son suficientes para distinguir claramente tres grupos (Fig. 3). Las funciones discriminantes canónicas (FDC) dan cuenta del 100 % de la varianza total ($FDC_1 = 85,2$ %; $FDC_2 = 17,5$ %) (Fig. 3). El poder de predictibilidad del análisis se ve reflejado en el resultado de la correcta clasificación individual de cada muestra usando ambas FDC; la predicción se realizó correctamente en un 78,9 %, 96,4 % y 82,4 % de las muestras realizadas en *H. chrysantemifolius*, *H. foliosus* y *H. decurrens* respectivamente. (Ver compuestos identificados en Tabla 1 y ejemplos de cromatogramas en Figuras 16 y 17 adjuntas en Anexo).

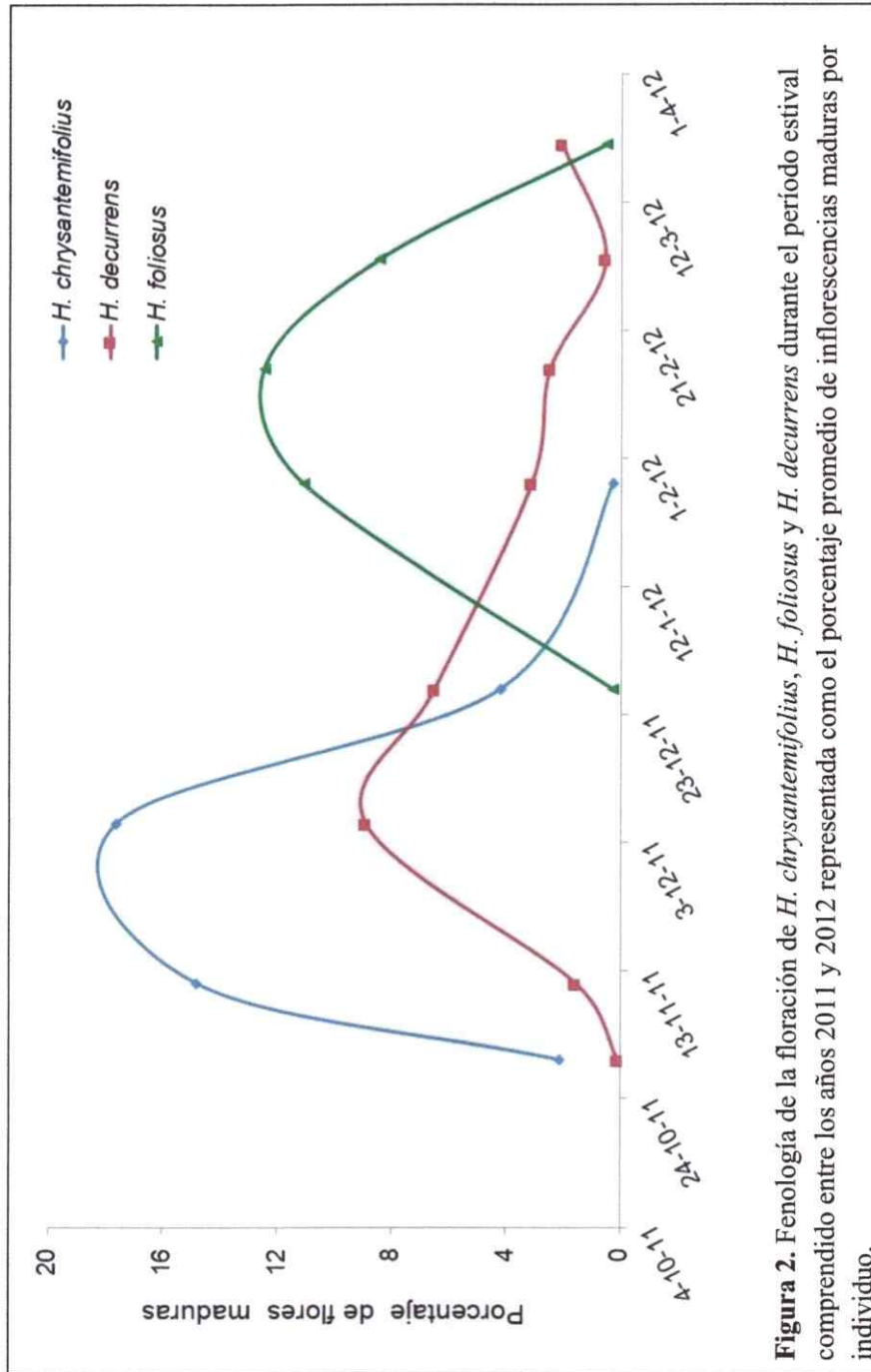
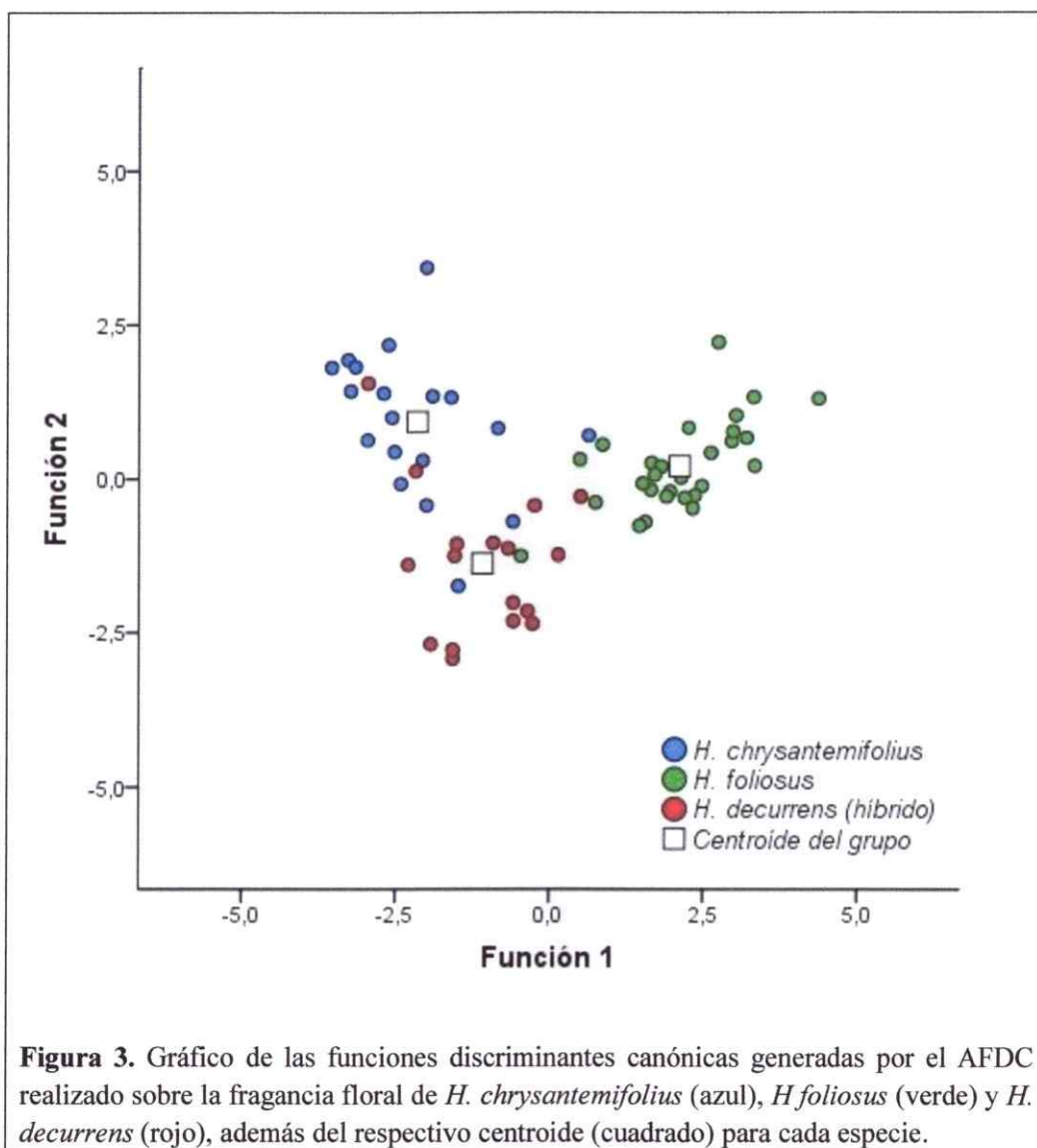


Figura 2. Fenología de la floración de *H. chrysantemifolius*, *H. foliosus* y *H. decurrens* durante el período estival comprendido entre los años 2011 y 2012 representada como el porcentaje promedio de inflorescencias maduras por individuo.



Objetivo específico 2. Evaluar si el uso de diferentes hospederos repercute en diferencias fenotípicas en la morfología geométrica alar de *D. chilensis*.

Se llevó a cabo un análisis de morfología geométrica de la vista dorsal del ala izquierda de un total de 18 hembras y 18 machos de individuos eclosionados en *H. foliosus*, y 31 hembras y 29 machos de individuos eclosionados en *H. decurrens* (Fig. 4).

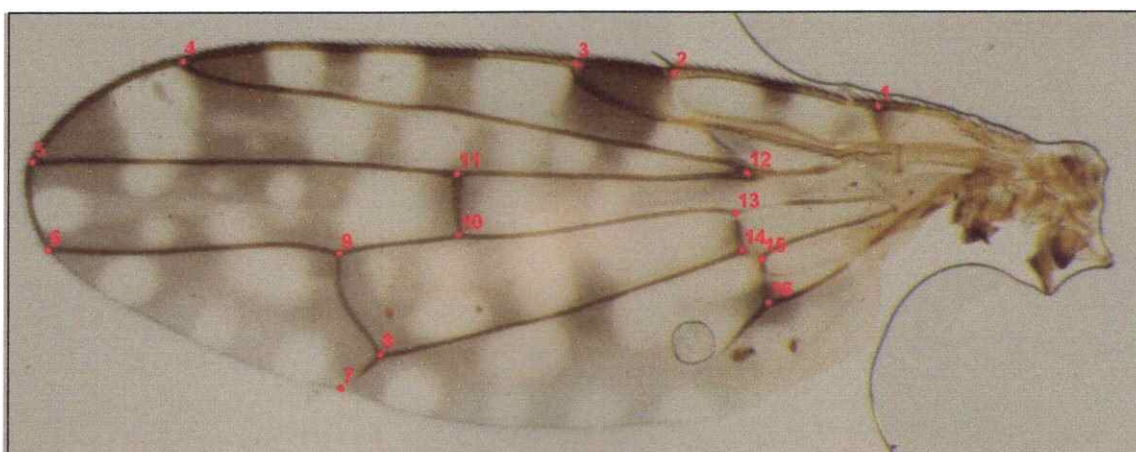


Figura 4. Fotografía de la vista dorsal del ala izquierda de un ejemplar de *D. chilensis*. En rojo se indican los 16 hitos morfológicos utilizados en el análisis morfogeométrico; todos ellos corresponden a intersecciones de la venación alar.

Variación del tamaño. Los individuos que se desarrollaron en inflorescencias de *H. foliosus* presentaron alas de mayor tamaño que aquellos desarrollados en *H. decurrens* ($F = 27,01$; $p < 0,001$), mientras que las hembras, en ambos casos, presentaron alas de mayor tamaño que los machos ($F = 104,57$; $p < 0,001$). Sin embargo, la variación producto de la interacción entre ambos factores no fue significativa ($F = 0,12$; $p = 0,733$) (Fig. 5, valores en Tabla 2, Anexo).

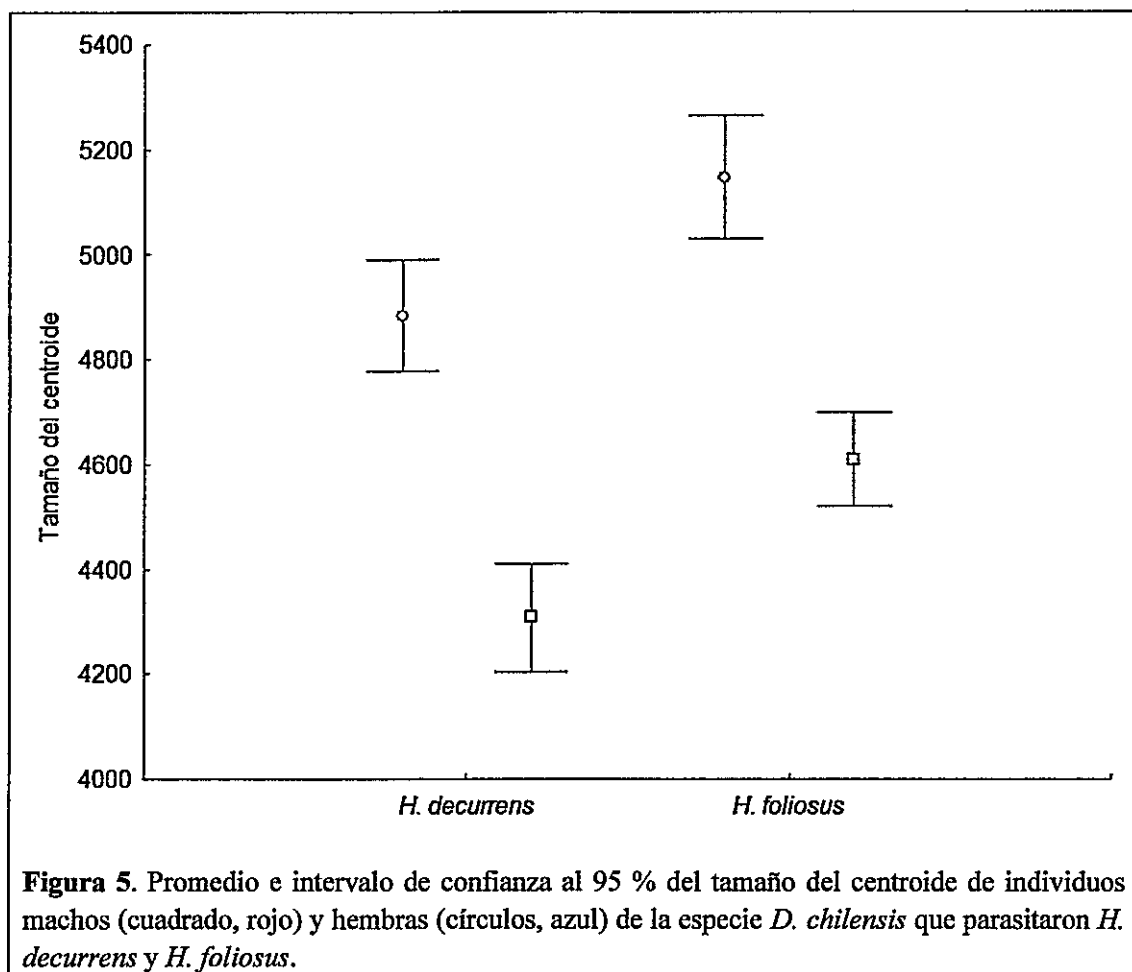
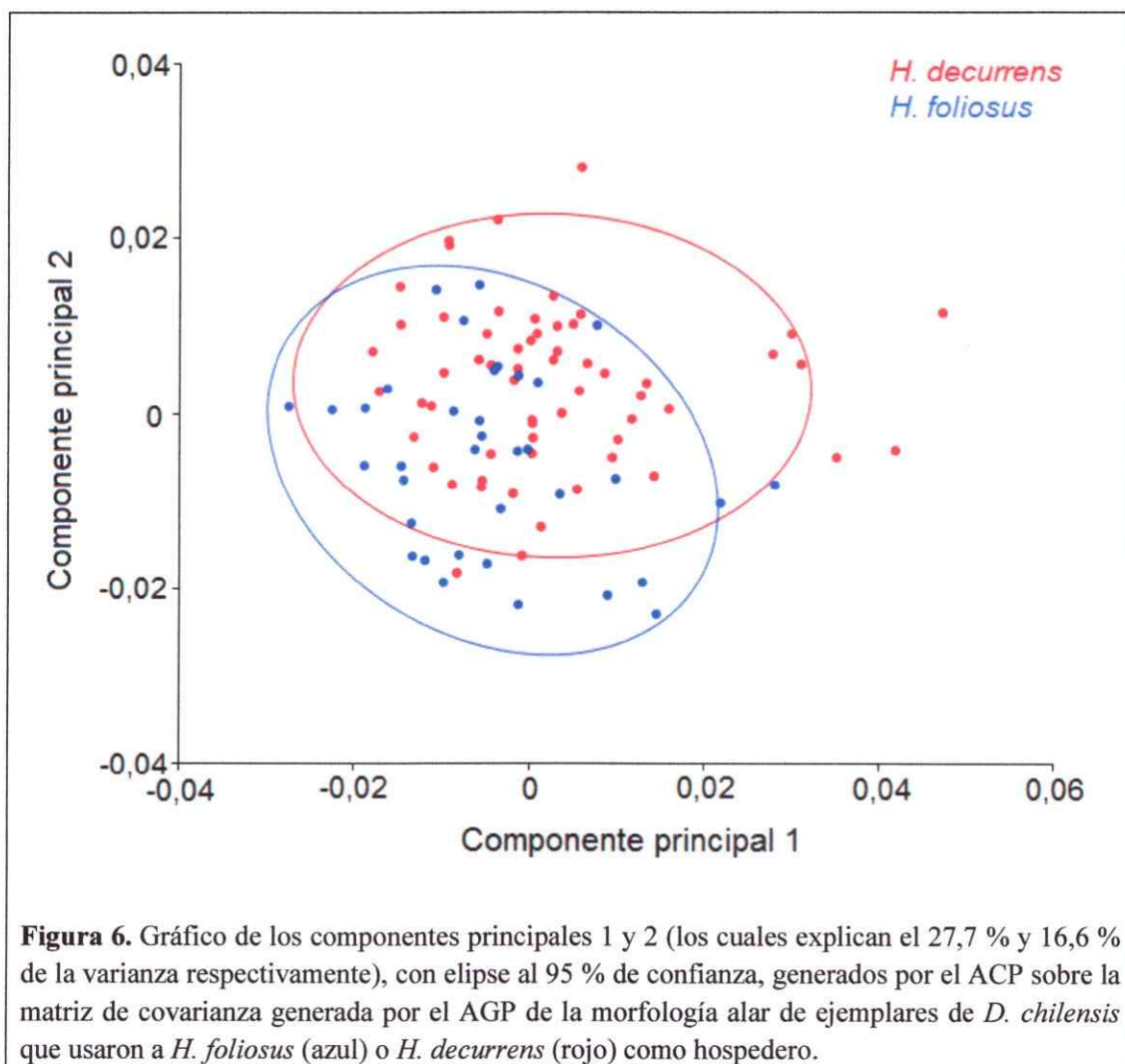


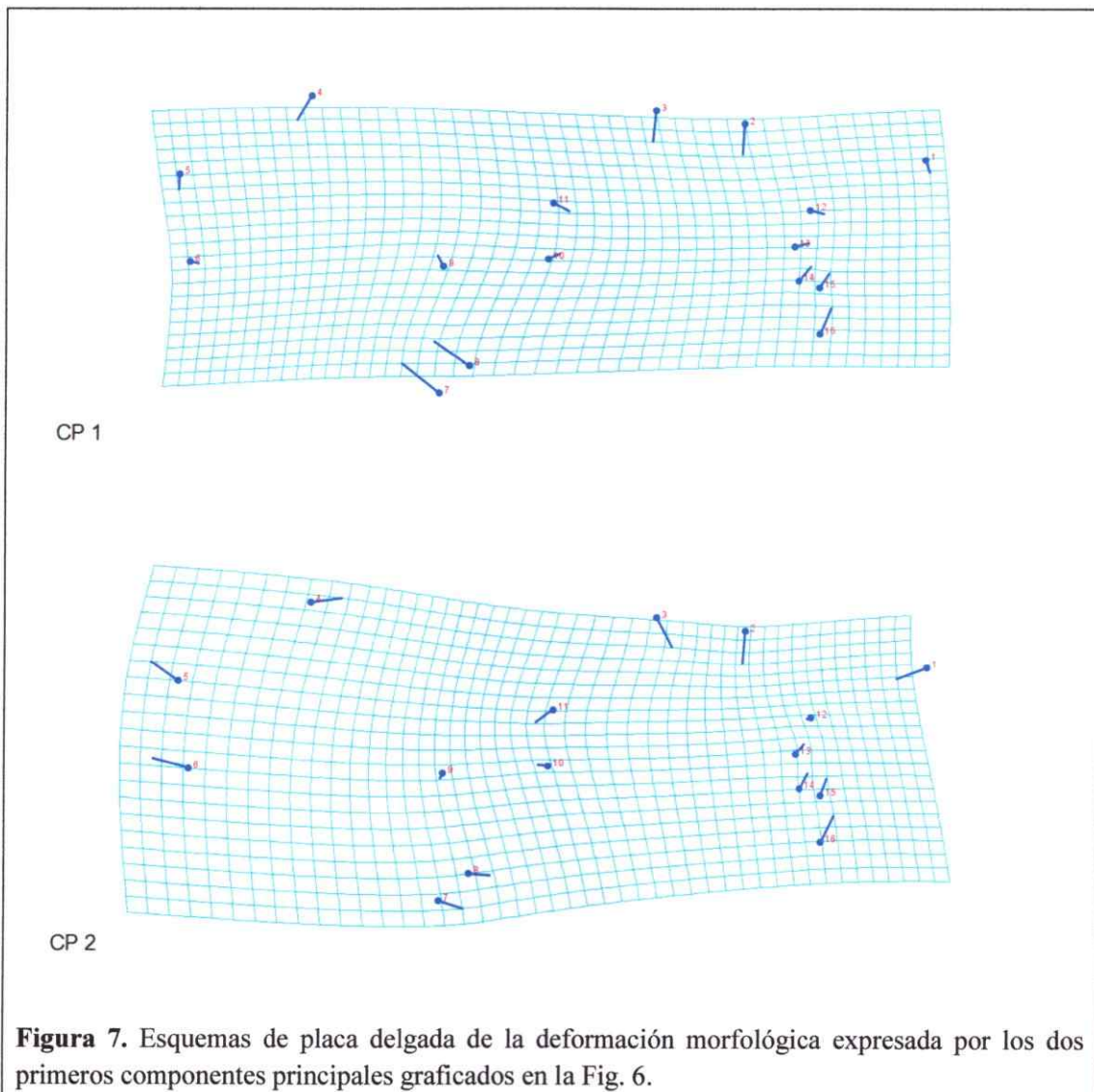
Figura 5. Promedio e intervalo de confianza al 95 % del tamaño del centroide de individuos machos (cuadrado, rojo) y hembras (círculos, azul) de la especie *D. chilensis* que parasitaron *H. decurrens* y *H. foliosus*.

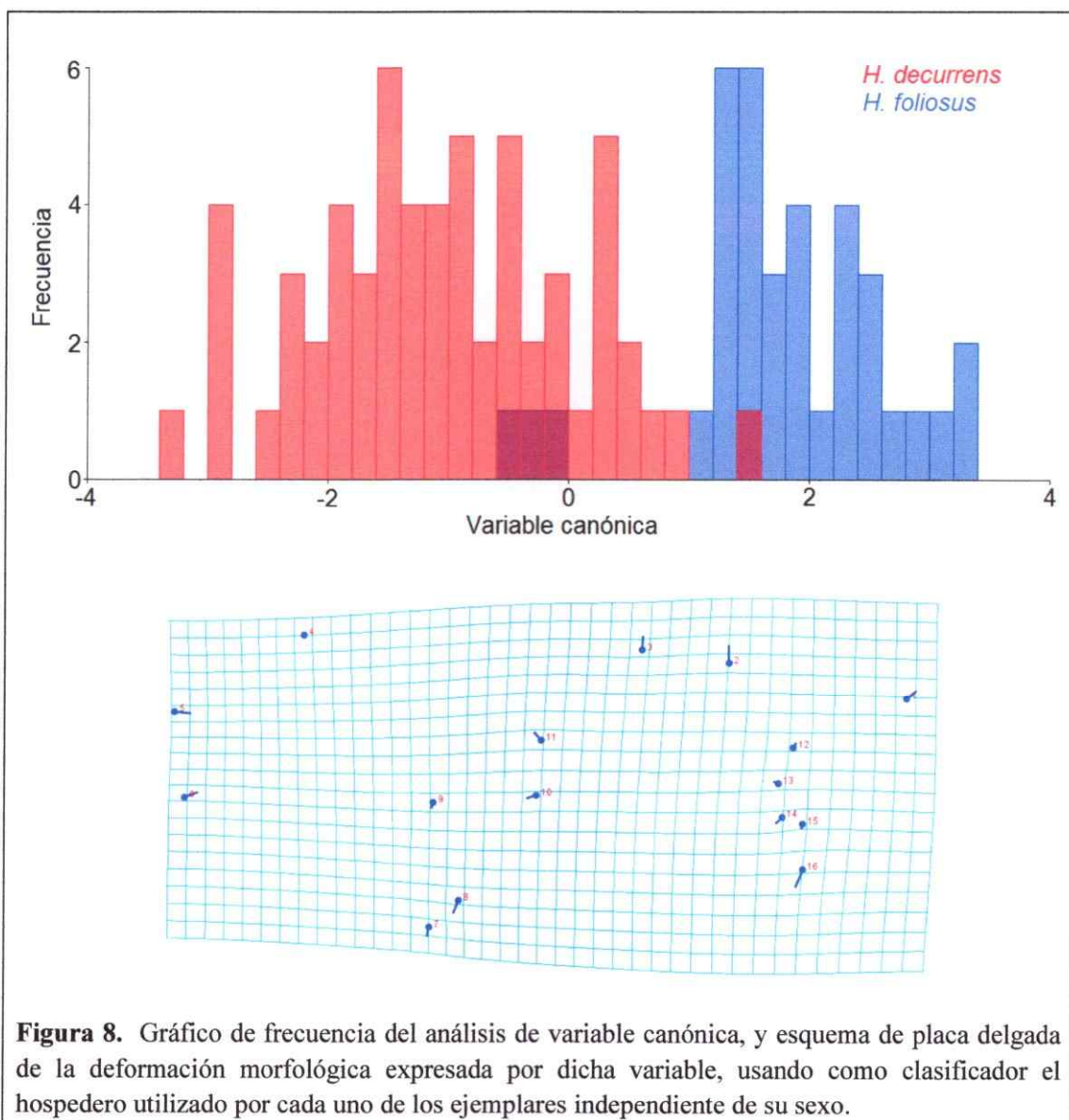
Variación de la forma y efecto alométrico. El análisis de componentes principales sobre los *Partial Warps* muestra que los tres primeros componentes generados describen el 27,7 %, 16,6 % y 12,2 % de la varianza total, representando en conjunto un 56,5 % de la varianza total (Tabla 3, Anexo). La disposición de los individuos en el morfoespacio generado por el análisis de componentes principales se encuentra levemente separada y agrupada, tal como lo indica la elipse de confianza al 90 % para cada grupo, lo que sugiere que existen leves diferencias en la disposición espacial de las intersecciones de la venación alar entre individuos eclosionados en *H. foliosus* y *H. decurrens* (Fig. 6 y Fig. 7). Para asumir los supuestos de homocedasticidad y normalidad el primer y duodécimo *Relative Warp* fueron tratados con la transformación de Box-Cox. El MANCOVA desarrollado muestra que tanto el sexo ($W_\lambda = 0,57$; $F = 1,72$; $p = 0,037$), el hospedero utilizado ($W_\lambda = 0,42$; $F = 3,25$; $p < 0,001$) y el tamaño del centroide ($W_\lambda = 0,52$; $F = 2,18$; $p = 0,005$) inducen diferencias significativas en la morfología alar (Tabla 4, Anexo). Pruebas de homogeneidad de las pendientes de las relaciones entre tamaño y forma mostraron que las relaciones alométricas entre estas no presentan diferencias significativas (Tabla 5, Anexo). Esto nos permite remover el tamaño del centroide como covariable del análisis multivariado con el fin de contrastar su efecto en las variaciones de la forma (Soto y col. 2007). De este modo por medio de un MANOVA comprobamos que las diferencias en la morfología alar continuaron siendo significativas producto del uso diferencial de hospedero ($W_\lambda = 0,32$; $F = 4,90$; $p < 0,001$) y del sexo ($W_\lambda = 0,52$; $F = 2,17$; $p < 0,005$); es decir, las diferencias encontradas en el MANCOVA inducidas por el sexos y el hospedero no son consecuencia de un efecto alométrico producto de las diferencias significativas de tamaño entre machos y hembras (Tabla 4, Anexo). La

variación de la significancia del efecto del tamaño en ambas fuentes de variación no fue igual, lo que sugiere una tendencia a que el sexo y el hospedero son fuentes de variación parcialmente independientes.

Análisis de variable canónica. Debido a que los dos primeros ejes del ACP explican sólo el 44,3 % de la variabilidad y los individuos pueden ser divididos en grupos *a priori*, se llevó a cabo un análisis de variables canónicas usando como clasificador el hospedero de origen de los individuos (Fig. 8). La variable canónica generada representa el 100 % de la varianza (valor propio = 1,925). Los grupos presentan una distancia significativa (distancia de Mahalanobis = 2,84, prueba de permutaciones de 1.000 rondas: $p < 0,001$), lo que indica que las diferencias morfológicas geométricas alares entre individuos originales de ambos hospederos generan una función discriminante que permitiría clasificar con precisión nuevos individuos en uno de los dos grupos.







Por otro lado se desarrollaron análisis de variables canónicas usando como clasificador el sexo en forma independiente en individuos desarrollados en cada hospedero para establecer si existen diferencias en el dimorfismo sexual entre dichos grupos. Individuos que parasitaron inflorescencias de *H. decurrens* (Fig. 9; distancia de Mahalanobis = 2,56, prueba de permutaciones de 1.000 rondas: $p < 0,001$) presentan un grado de dimorfismo sexual en la morfología geométrica alar menor al presentado en individuos que parasitaron inflorescencias de *H. foliosus* (Fig. 10; distancia de Malahanobis = 3,80, prueba de permutaciones de 1.000 rondas: $p < 0,001$).

Mediante el procedimiento mencionado en el párrafo anterior se usó como clasificador el hospedero usado en forma independiente para cada sexo. Individuos hembras presentan un grado de dimorfismo en la morfogeometría alar (Fig 11; distancia de Malahanobis = 3,01, prueba de permutaciones de 1.000 rondas: $p < 0,001$) menor al presentado en individuos machos (Fig. 12; distancia de Mahalanobis = 5,85, prueba de permutaciones de 1.000 rondas: $p < 0,001$) producto del uso diferencial de hospedero.

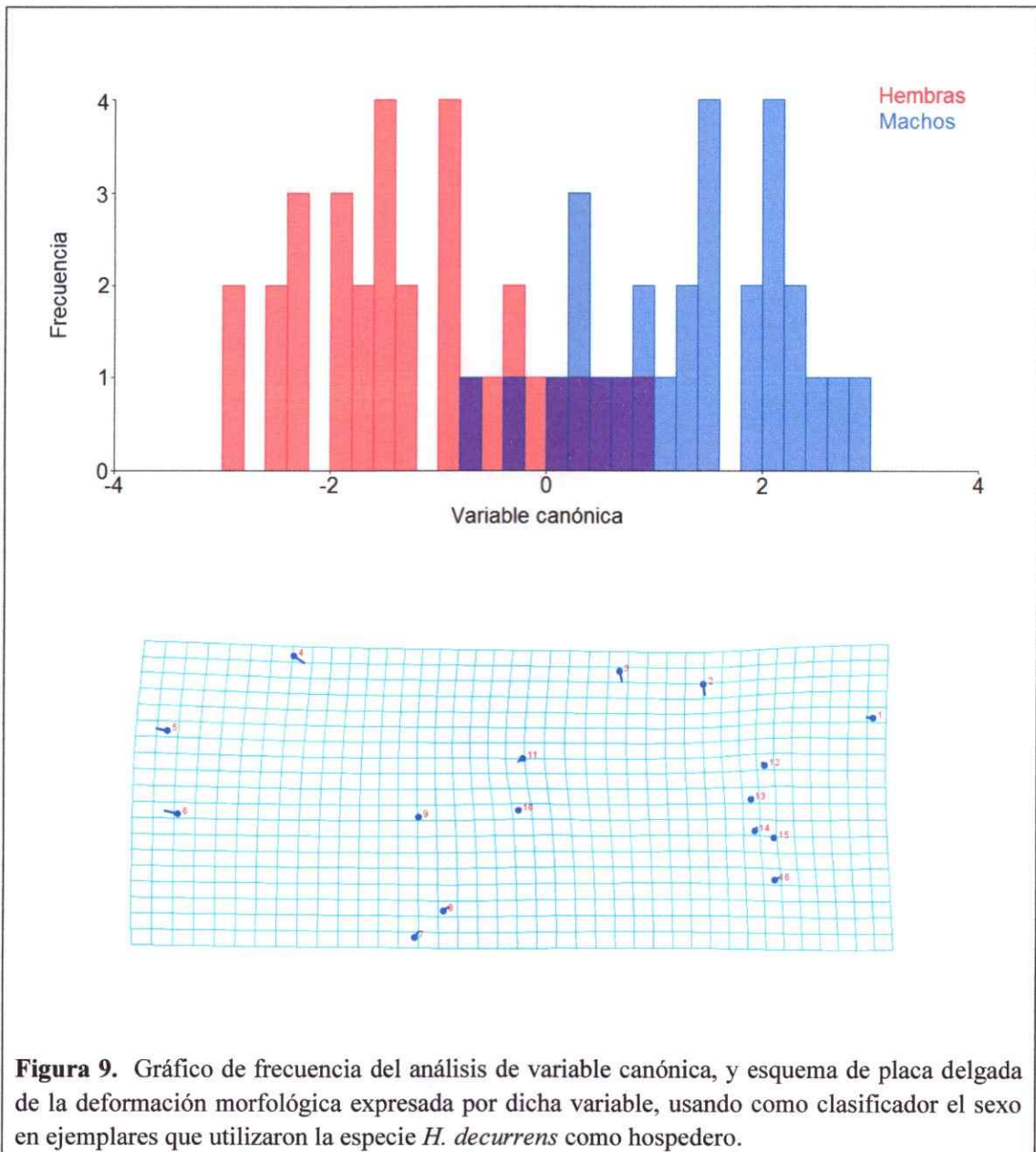


Figura 9. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como clasificador el sexo en ejemplares que utilizaron la especie *H. decurrens* como hospedero.

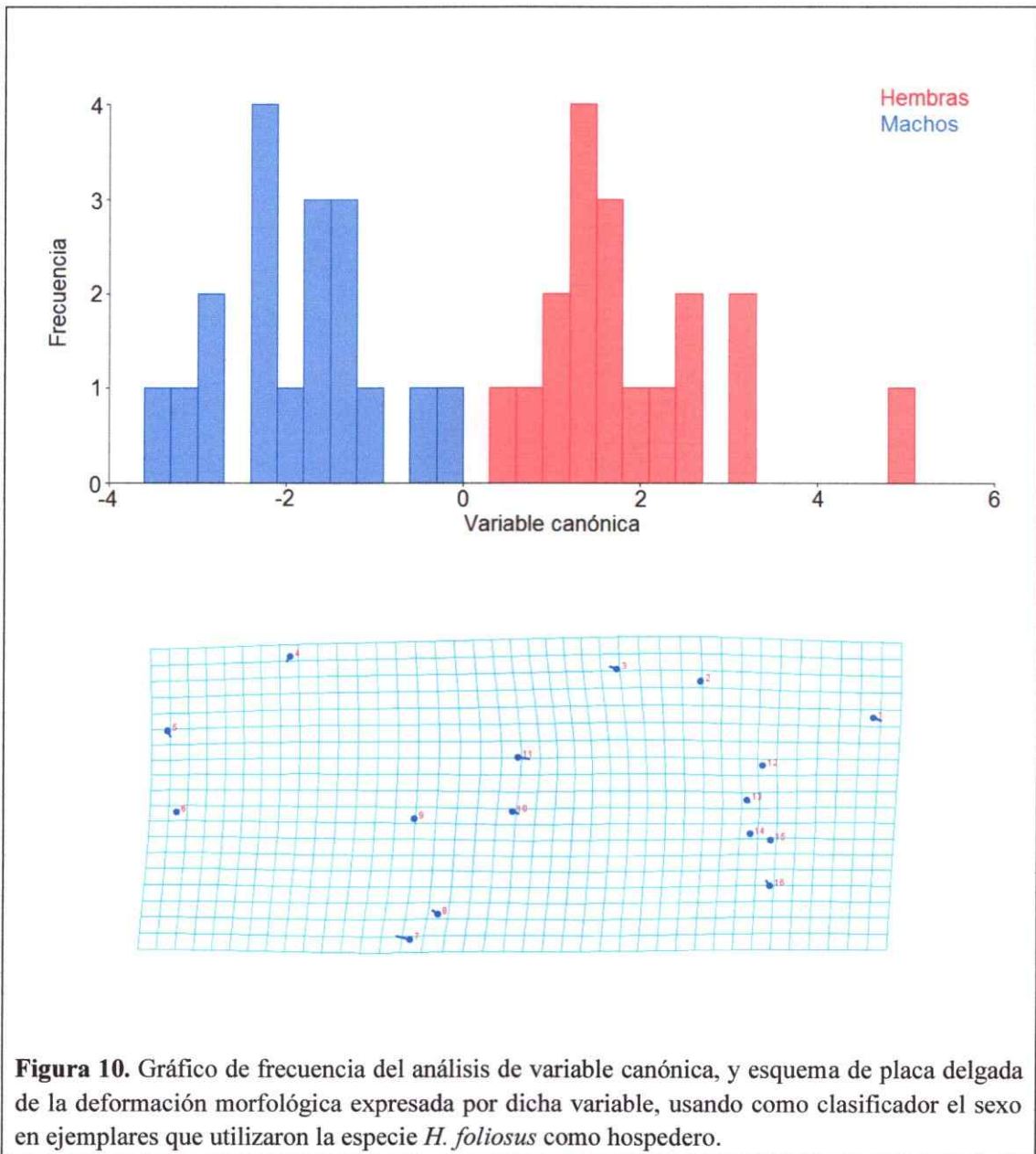


Figura 10. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como clasificador el sexo en ejemplares que utilizaron la especie *H. foliosus* como hospedero.

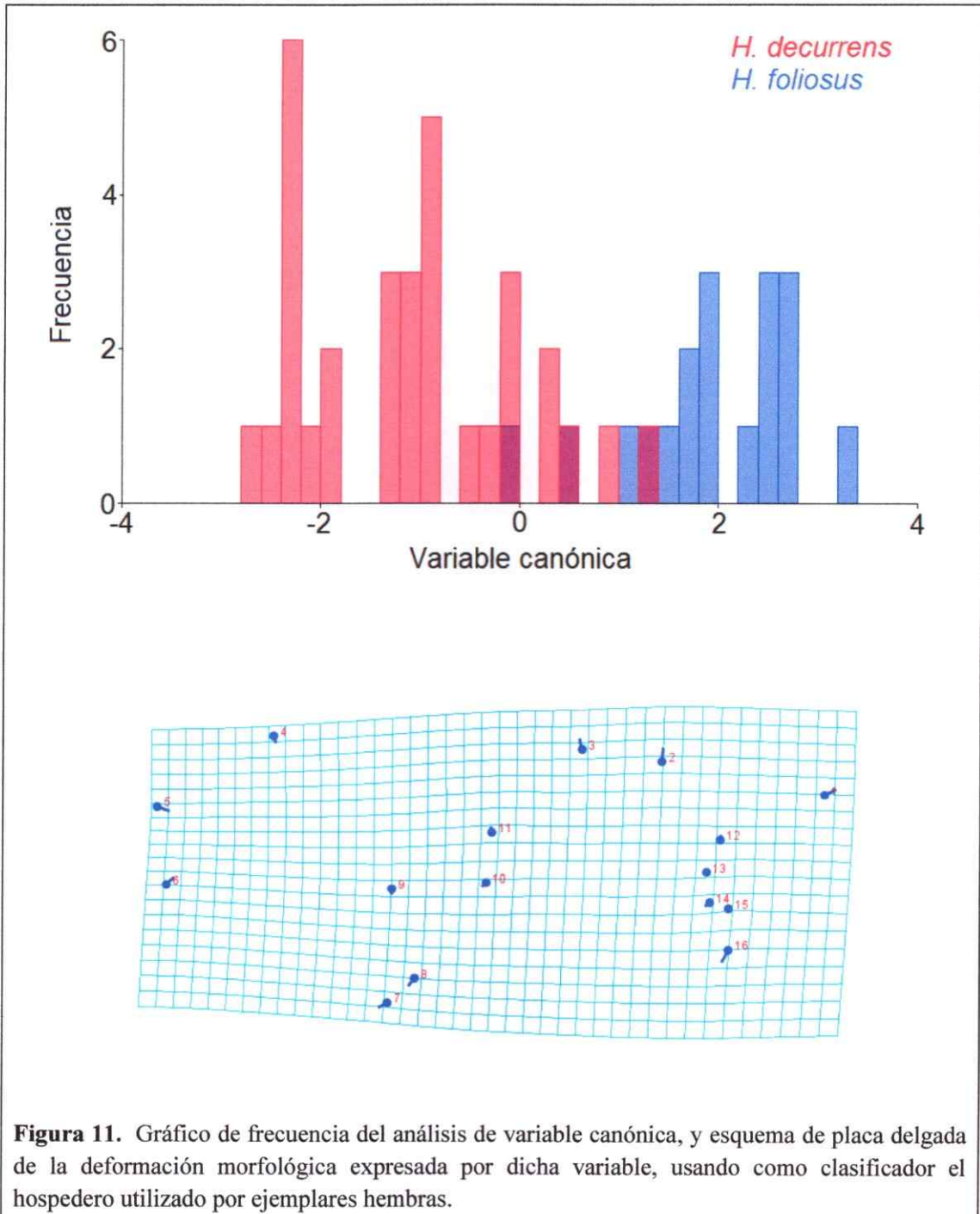
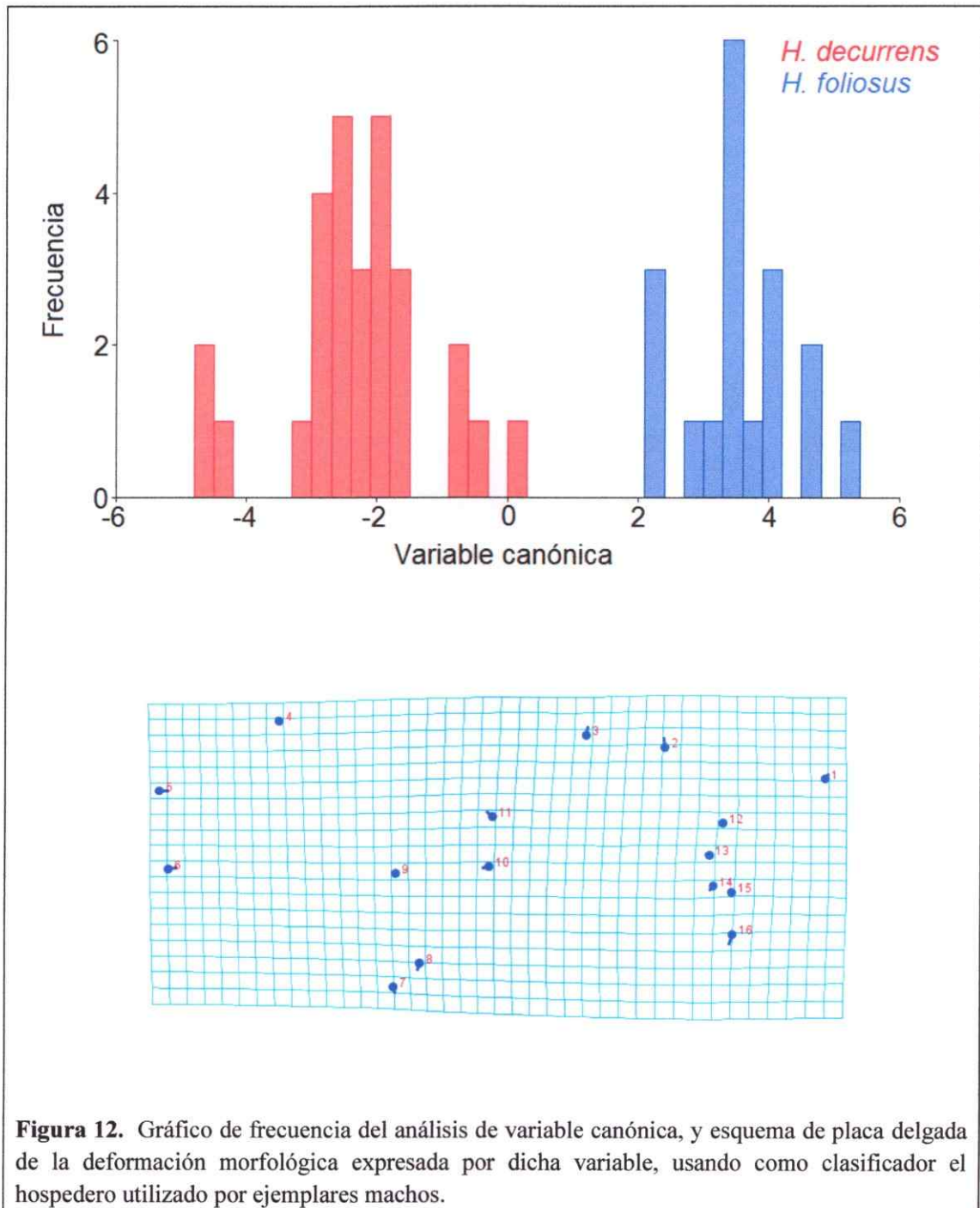


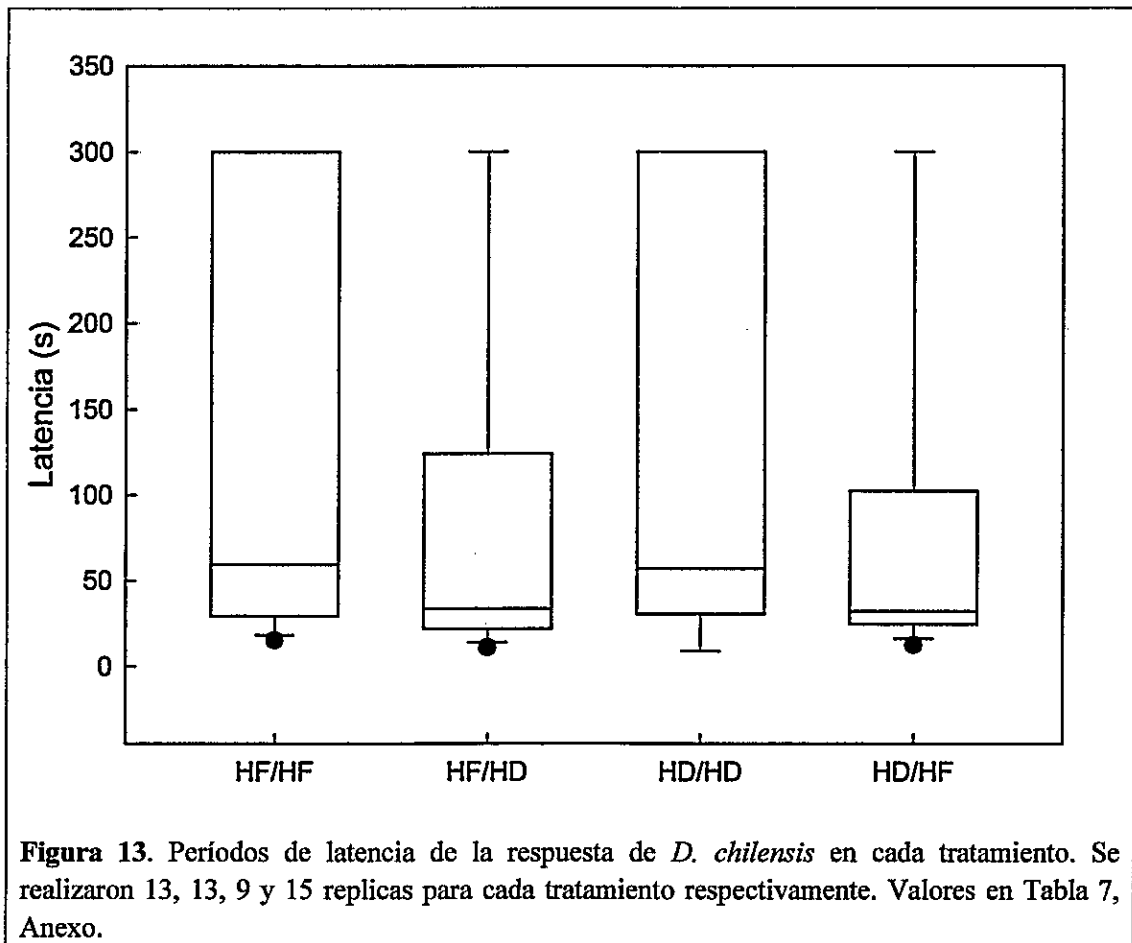
Figura 11. Gráfico de frecuencia del análisis de variable canónica, y esquema de placa delgada de la deformación morfológica expresada por dicha variable, usando como clasificador el hospedero utilizado por ejemplares hembras.



Objetivo específico 3. Evaluar la posible ocurrencia de quimiotaxis positiva y/o diferencias de latencia por parte de ejemplares imagos recientemente eclosionados de la especie *D. chilensis* hacia los compuestos químicos volátiles de sus hospederos *H. foliosus* y *H. decurrens*.

Latencia. Para efectos de presentación de los datos se indicará de ahora en adelante cada uno de los experimentos como "Hospedero usado/Estímulo aplicado", siendo HD: *H. decurrens* y HF: *H. foliosus*. No existen diferencias significativas entre las proporciones de individuos que presentaron o no elección entre los distintos tratamientos (Procedimiento de Marascuilo, $\chi^2 = 3,854$; g. l. = 3; $p = 0,278$), indicando que estos no ejercen un efecto sobre la capacidad de responder de los individuos puestos a prueba. Los períodos de latencia no presentan distribución normal (Tabla 6, Anexo). No se encontraron diferencias significativas entre los períodos de latencias observados en los distintos experimentos ($H = 2,44$; g. l. = 3; $p = 0,485$) (Fig. 13, valores en Tabla 7, Anexo).

Preferencia Olfativa. Se encontró una preferencia estadísticamente significativa en la elección de los individuos de tratamiento HF/HD por el brazo estímulo (Prueba de McNemar = 4,45; $p = 0,035$), mientras que para los tratamientos HF/HF (Prueba de McNemar = 2; $p = 0,157$), HD/HD (Prueba de McNemar = 0,69; $p = 0,406$) y HD/HD (Prueba de McNemar = 0; $p = 1$) no se encontraron diferencias significativas.



Para las comparaciones entre grupos se consideró como elección válida hacia el estímulo aplicado a aquellas respuestas de los individuos que sólo entraron al brazo estímulo. La proporción de individuos que prefirió el brazo estímulo fue significativamente mayor en el tratamiento HF/HD que en HF/HF ($p = 0,015$), mientras que las proporciones de individuos que prefirieron el brazo estímulo entre HD/HF y HD/HD ($p = 0,381$), HF/HD y HD/HF ($p = 0,460$), y entre HD/HD y HF/HF ($p = 0,587$) no fueron significativamente distintas.

Adicionalmente se determinó la proporción del tiempo total pasado por el individuo en cada brazo en cada experimento (Fig. 14, valores en Tabla 8, Anexo). Se llevaron a cabo pruebas de t de Student pareadas para cada uno de los experimentos con el fin de determinar si existe una preferencia significativa por alguno de los brazos. Se determinó que sólo los individuos eclosionados en *H. foliosus* presentan una diferencia significativa en el tiempo pasado en el brazo correspondiente al hospedero alternativo *H. decurrens* por sobre el control ($t = 2,38$; g. l. = 12; $p = 0,035$). Ninguna de las otras comparaciones fue significativa; sin embargo, se observa una tendencia no significativa por preferir el brazo control en individuos eclosionados en *H. foliosus* (Tabla 9, Anexo).

Los valores del IP (Fig. 15) cumplieron los supuestos de normalidad (Tabla 6, Anexo) y homocedasticidad (Prueba de Levene = 0,284; $p = 0,837$). Se realizó un análisis mediante el modelo lineal general (MLG) usando como variable respuesta el IP, covariable el sexo y como factores la especie de hospedero y el estímulo. No se encontró un efecto estadísticamente significativo del sexo ($F = 0,03$; g. l. = 1; $p = 0,861$), del hospedero usado por el individuo ($F = 0,01$; g. l. = 1; $p = 0,935$), ni del estímulo aplicado en el bioensayo ($F = 2,34$; g. l. = 1; $p = 0,132$), aunque si se encontró una

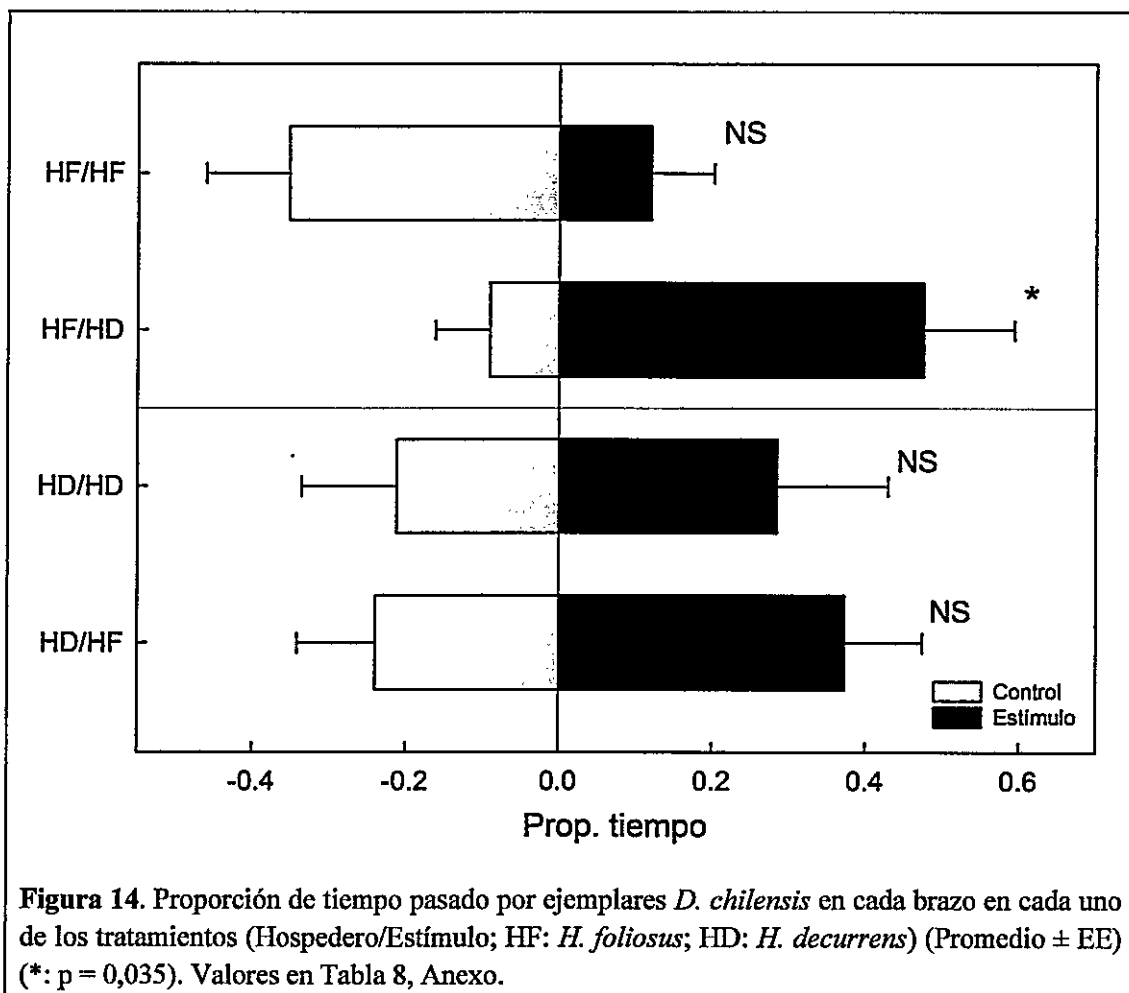
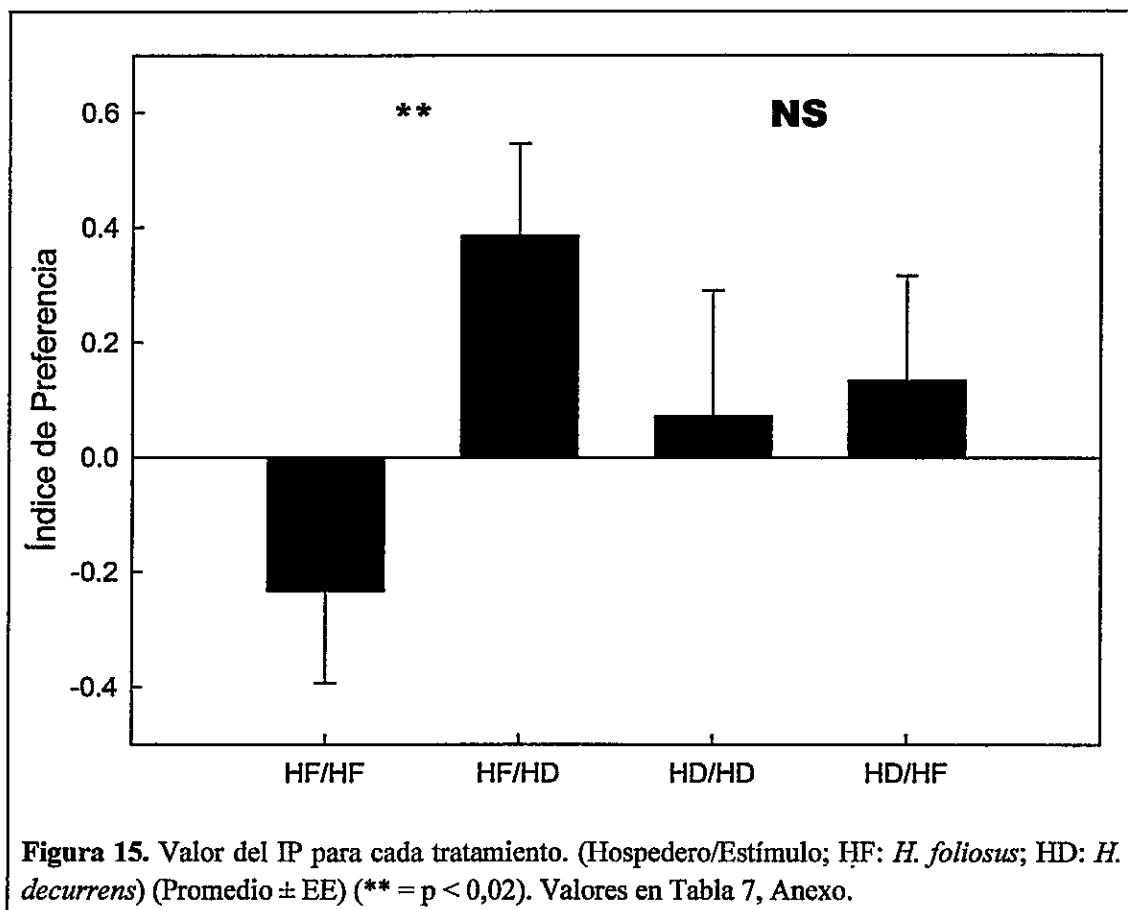


Figura 14. Proporción de tiempo pasado por ejemplares *D. chilensis* en cada brazo en cada uno de los tratamientos (Hospedero/Estímulo; HF: *H. foliosus*; HD: *H. decurrens*) (Promedio \pm EE) (*: $p = 0,035$). Valores en Tabla 8, Anexo.

tendencia no significativa en el efecto de la interacción entre el hospedero usado y el estímulo aplicado ($F = 2,92$; g. l. = 1; $p = 0,094$) (Tabla 10, Anexo).

Adicionalmente se realizaron pruebas de t de Student para comparar los IP de individuos eclosionados en un mismo hospedero frente a la aplicación de distintos estímulos (Tabla 11, Anexo). Se determinó que individuos que tuvieron como hospedero de desarrollo a *H. foliosus* presentaron una preferencia significativamente mayor por la fragancia de *H. decurrens* que por la fragancia de su hospedero ($t = 2,63$; g. l. = 1; $p = 0,015$, Prueba de Levene = 0,16; $p = 0,696$). Por otro lado, aquellos individuos cuyo hospedero fue *H. decurrens* no presentaron una quimiotaxis diferencial frente a la fragancia de *H. foliosus* y la de su hospedero ($t = 0,12$; g. l. = 1; $p = 0,902$, Prueba de Levene = 0,31; $p = 0,585$) (Fig. 15).

Los análisis de las colectas de COVs provenientes de las campanas utilizadas en los bioensayos no fueron concluyentes. Los análisis de cromatografía de gases de dichas colectas muestran la presencia de múltiples compuestos orgánicos, de los cuales ninguno pudo ser identificado en un porcentaje mayor al 25% al comparar sus espectrometrías con la base de datos utilizada.



DISCUSIÓN

A pesar de no poder confirmar la ocurrencia de fidelidad olfativa al hospedero de desarrollo, nuestros resultados sí muestran que el uso de un determinado hospedero no es trivial en la posterior definición de distintos rasgos fenotípicos de los insectos asociados, como su morfología y comportamiento. Nuestros resultados muestran que ejemplares de la especie *D. chilensis* que usaron como hospedero a *H. foliosus* y *H. decurrens* presentan una diferenciación estadísticamente significativa en su morfología alar, la que a su vez se ve afectada de forma diferencial en cada sexo. Estas diferencias no son causadas por un efecto alométrico debido al mayor tamaño alar presentado por los ejemplares que infestaron *H. foliosus*, sino que son producto de un desarrollo diferencial en ambos hospederos. Adicionalmente la respuesta conductual exhibida por *D. chilensis* en los experimentos de preferencia muestra que cuando infesta a *H. foliosus* muestra una preferencia por la fragancia del hospedero alternativo, *H. decurrens*, por sobre la fragancia de su propio hospedero. En cambio, al infestar a *H. decurrens* no presenta una preferencia significativa por alguno de los dos hospederos. Sin embargo es necesario utilizar en futuros bioensayos plantas hospederas en su estado

natural como fuentes de compuestos volátiles para descartar posibles efectos del tratamiento utilizado en el presente estudio. En conclusión, nuestros resultados apoyan la primera hipótesis de diferenciación fenotípica, tanto a nivel morfológico como conductual; sin embargo, dichas diferencias conductuales no son una evidencia que respalde una eventual fidelidad olfativa al hospedero durante el período post-eclosión, rechazando así la segunda hipótesis de fidelidad olfativa al hospedero. No obstante, ambas especies de hospederos poseen distintas fragancias de sus inflorescencias. A pesar de no mediar una posible fidelidad al hospedero son discriminadas por ejemplares que infestan a *H. foliosus* y son utilizadas por sí solas como clave sensorial para su identificación y posterior rechazo o preferencia mediante una posible generación de improntas sensoriales durante alguna etapa de su desarrollo larval, pupal o adulto temprano.

Plasticidad de la respuesta conductual

Basado en nuestros resultados, es posible sugerir que *D. chilensis* presenta la capacidad conductual de responder plásticamente en su estadio adulto dependiendo del sitio en el cual se desarrolló y eclosionó. Con relación al origen de dicha plasticidad, es plausible que esta esté estructurada bajo algún mecanismo neuronal, como por ejemplo de sensibilización (Iyengar y col. 2010) o inhibición de receptores (Turner y col. 2009), sin embargo, opuestamente a lo documentado por Prokopy y col. (1982) en *R. pomonella*, *D. chilensis* expresa conductualmente dicho efecto del hospedero como un rechazo hacia la fragancia de la especie hospedera en la cual se desarrolló (*H. foliosus*) y

una preferencia por un hospedero alternativo (en este caso, *H. decurrens*). Alternativamente, existe la posibilidad de que el hospedero ejerza un efecto neutro en futuras respuestas conductuales, como es el caso de los individuos que se desarrollaron en inflorescencias de *H. decurrens*.

Si bien en el presente trabajo no se estudiaron directamente las preferencias por el sitio de oviposición, sí se analizó la preferencia por hospedero inmediatamente posterior a la eclosión, preferencia crucial para la búsqueda de sitios de encuentro para el apareamiento. Este evento conductual podría ser mucho más relevante en el establecimiento de preferencias perdurables si fuese el caso en que la especie no poseyera feromona sexual que medie el encuentro, como es el caso de la especie congénere *D. sororcula* (Grewal y Kapoor 1984). En estos casos la preferencia por el sitio de encuentro es un paso previo crítico al subsecuente encuentro entre conespecíficos, posibilitando una posterior cópula.

Diferencias en la morfología geométrica alar

Debido a que nuestros resultados conductuales rechazan la primera hipótesis de fidelidad al hospedero, las diferencias encontradas en la morfología geométrica alar han sido interpretadas como parte de una respuesta plástica producto del uso diferencial de hospedero de forma similar a lo descrito de manera experimental en especies cactofilicas del género *Drosophila* (Soto y col. 2007). Nuestros resultados sugieren que tanto el hospedero como el sexo son fuentes de variación significativa, es decir, el hospedero

utilizado y el sexo inducen en forma independiente el desarrollo de distintos fenotipos morfológicos alares de *D. chilensis*.

Estudios previos han mostrado diferencias morfológicas de estadios larvales de *D. chilensis* asociadas al uso de hospedero de otros géneros, específicamente en las especies *Bidens aurea* (Asteraceae) y *Flourenzia thurifera* (Asteraceae) (Céspedes 2008). Tales diferencias son la densidad de espículas en la región caudal y variación en el número de espiráculos de la región cefálica durante el segundo estadio larval, así como en el grosor de la base del ovipositor de hembras y el apodema eyaculador de machos. Estas diferencias son congruentes con las registradas en el imago en el presente estudio, mostrando que *D. chilensis* presenta una plasticidad morfológica en diferentes estadios ontogenéticos asociada al hospedero en el cual se desarrolla.

Además nuestros resultados muestran que las hembras desarrolladas en ambos hospederos (Fig. 11) presentaron una menor plasticidad de forma en comparación a los machos (Fig. 12), cuyas distribuciones de frecuencia no se superponen, es decir, se generó un dimorfismo sexual diferencial, siendo mayor en los individuos desarrollados en *H. foliosus* que en *H. decurrens*. Considerando que en la especie congénere *D. sororcula* se ha descartado la existencia de alguna feromona que medie el cortejo (Grewal y Kapoor 1984), y si hipóticamente *D. chilensis* tampoco posee una, las claves visuales pueden jugar un rol central para el reconocimiento entre conespecíficos. De este modo el grado de diferenciación podría afectar el reconocimiento previo al apareamiento, pudiendo incluso ser la morfología geométrica alar un conjunto de rasgos susceptibles a selección sexual. Si esto operase de esta forma, el uso diferencial de hospedero podría ser una fuente de variación relevante respecto a la selección sexual.

Adicionalmente nuestros resultados muestran que ejemplares que infestaron a *H. foliosus* presentaron un mayor tamaño que aquellos que infestaron a *H. decurrens*. Dichas diferencias pueden ser atribuidas a diferencias en la calidad nutricional de ambos hospederos y/o capacidades de detoxificación de *D. chilensis* frente a compuestos químicos presentes en los tejidos de ambos hospederos.

Aspectos ecológicos: voltinismo e hibridización

En respuesta a los cambios ambientales estacionales los insectos han desarrollado modificaciones de sus ciclos de vida que les permiten llevar a cabo la reproducción en algún período específico donde esta se vea favorecida (Andrewartha 1952, Tauber y Tauber 1976). De este modo insectos de climas templados han sincronizado sus períodos reproductivos a la temporada estival, pudiendo permanecer el resto del año en estado de diapausa (Tauber y col. 1986). Así, los insectos pueden presentar una (univoltinismo), dos (bivoltinismo), tres (trivoltinismo) o más generaciones (poli o multivoltinismo) por estación. Dicha condición es dependiente no sólo de factores abióticos como el clima, sino que también de la disponibilidad de recursos, tales como el ciclo fenológico del hospedero, en el caso de insectos fitófagos.

Frías describió y propuso, mediante análisis de cariotipos y comparación univariada de rasgos morfológicos, que *H. decurrens* es un híbrido aloploiploide fértil entre *H. chrysantemifolius* y *H. foliosus* (Frías 2005). Recientemente se ha confirmado mediante análisis multivariado de la morfología de la inflorescencia que efectivamente *H. decurrens* presenta un fenotipo de sus inflorescencias intermedio al de sus parentales

(C. A. Villagra 2011, comunicación personal). En el presente trabajo el estudio de la fragancia reafirma dicha hipótesis, mostrando que el volatiloма (Maffei 2011) del híbrido es intermedio al de sus parentales, tal como se muestra en la Fig. 3. Adicionalmente se confirma (Frías 2005) que *H. decurrens* presenta un máximo de su período de floración estacionalmente intermedio con extremos superponibles con cada especie parental, al inicio de su floración con *H. chrysantemifolius* y al final con *H. foliosus*.

Nuestros resultados muestran que la especie *D. chilensis* no está especializada en el consumo de una especie de hospedero vegetal en particular. Por el contrario, en conjunto con estudios en curso se confirma que puede parasitar al menos 4 especies simpátricas del género *Haplopappus*: *H. chrysantemifolius*, *H. decurrens*, *H. foliosus* y *H. platylepis* (C. A. Villagra 2011, comunicación personal), además de *B. aurea* y *F. thurifera* (Céspedes 2008). Experimentos de campo donde se utilizó a *D. chilensis* como florívoro de *H. chrysantemifolius* muestran que dicha especie efectivamente oviposita en estadios tempranos del desarrollo de sus inflorescencias y que el estadio adulto eclosiona antes o junto con la dispersión de las semillas (Villagra, Méndez y Rasmann 2011, observación personal). Adicionalmente observaciones focales de visitantes florales de las especies del género *Haplopappus* mencionadas anteriormente muestran que durante todo el período de floración, es decir, durante los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo, *D. chilensis* visitó activamente los discos florales de inflorescencias maduras e inmaduras, siendo, además, continuamente observada ovipositando en dichos estadios (C. A. Villagra 2011, comunicación personal). Considerando que *D. chilensis* presentó un rechazo hacia la fragancia de *H. foliosus* y una respuesta neutra hacia *H.*

decurrens, y los períodos de actividad de *D. chilensis* como visitante floral durante la temporada estival, nuestros resultados sugieren que dicha especie presenta al menos dos generaciones por temporada, es decir bivoltinismo, sin descartar un posible polivoltinismo, pudiendo utilizar como hospedero a más de una especie, extendiendo así su período de actividad reproductiva. La posibilidad de múltiples poblaciones univoltinas sincronizadas con los distintos máximos de floración se ve reducida debido a la continuidad de la abundancia de *D. chilensis* como visitante floral de las especies del género *Haplopappus* mencionadas anteriormente durante el período estival.

De este modo proponemos que, dada la calidad de híbrido de fenotipo intermedio, *H. decurrens* abre a *D. chilensis* la posibilidad de expandir su período de actividad al poseer una fenología estacionalmente intermedia, generando un continuo temporal en la disponibilidad de recursos en los sitios donde estas especies de plantas hospederas se encuentren simpátricamente y tengan cierto grado de superposición fenológica. Dicha hipótesis es apoyada por el ciclo de vida descrito para *Dioxya picciola*, especie bivoltina o trivoltina que infesta a *Coreopsis spp.* en el sur de California, Estados Unidos, durante los meses de abril y mayo, mientras que la siguiente generación infesta a una variedad de cultivos durante los meses de junio y agosto, emergiendo en septiembre para infestar a *Bidens spp.* y generar una tercera generación o entrar en diapausa (Headrick 1996).

Con respecto a la eventual formación de razas hospedero de *D. chilensis*, su calidad de especie bi, tri, o multivoltina podría constituir un impedimento, debido a que dichos modos de vida dificultarían un aislamiento reproductivo mediante alocronía de sus períodos de actividad (Feder 1998). Dicho impedimento se vería acentuado si las

diferencias morfológicas descritas en el presente estudio no son lo suficientemente relevantes en el proceso de reconocimiento visual entre conoespecíficos que hayan infestado distintos hospederos (Boake 1997), siendo posible la reproducción entre ejemplares que hayan infestado diferentes hospederos. Este caso es contrario al que ocurre en las especies univoltinas *R. pomonella* (infestando manzanas y acacias), *T. foliosi* (infestando *H. foliosus*) y *T. simpatica* (infestando *H. decurrens*) (Frías 2005). En el caso de estas últimas, sumado a otros antecedentes de historia natural del sistema, se ha sugerido que el uso diferencial de hospedero de dichas especies del género *Haplopappus* pudo haber jugado un rol en la divergencia de ambas especies del género *Trupanea* (Frías 2005) mediante la formación de razas hospedero (Bush 1969, 1992).

Aspectos a considerar en futuros estudios

Nuestros resultados conductuales son una primera aproximación al estudio del rol de la fragancia floral y vegetativa en la relación de este insecto florívoro con su hospedero. Si bien constatan lo que ocurre luego de la eclosión, también es crítico analizar la capacidad de aprendizaje asociativo que el insecto puede desarrollar durante su cópula y su relación con las preferencias por sitios de oviposición. Este último punto es relevante ya que determina la especie hospedera donde se desarrollará la próxima generación.

Adicionalmente es relevante estudiar si existen diferencias entre las respuestas conductuales de machos y hembras producto del uso de distintos hospederos. Un dimorfismo sexual en las preferencias olfativas inducido por el uso diferencial de

hospedero podría explicar la variabilidad conductual registrada en el presente estudio, en el cual el análisis no tuvo ese grado de resolución (Fig. 13, 14 y 15).

Dado que el reconocimiento de hospedero es un fenómeno multisensorial, y en el presente estudio sólo se estudió primariamente el efecto del canal químico-volátil, se hace relevante considerar en futuros estudios rasgos como la forma, densidad de borde, reflectancia o factores químicos no volátiles, con el objetivo de integrar diversas señales que pudieran intervenir entre sí minorizando o sinergizando (Raguso 2002, 2004) la respuesta conductual del florívoro al encontrarse con el hospedero.

Adicionalmente, con el fin de realizar una metodología con variables más controladas, se hace relevante en futuros estudios lograr criar y cultivar linajes de las especies de insectos fitófagos y plantas hospederas, respectivamente, en condiciones de laboratorio. De este modo se minimizarían los efectos propios de un estudio de campo, como en este caso serían diferencias entre la fuente de COVs utilizada y los COVs liberados por el hospedero en condiciones naturales, diferencias que no pudieron ser descartadas en el presente estudio.

Por otro lado, para corroborar que las diferencias en la morfología geométrica alar corresponden al efecto del hospedero sobre la plasticidad fenotípica de los insectos se hace relevante considerar la realización de crianza e intercambio cruzado de hospederos a partir de individuos que eclosionen de ambas especies. De este modo se podría determinar si las diferencias en la morfología geométrica de la venación alar es producto solamente de la especie de hospedero usado o existen otros factores no considerados en el presente estudio, como podrían ser el efecto de parasitoides en individuos adyacentes

dentro de la misma inflorescencia o factores abióticos, tales como el microclima donde se ubica el hospedero.

ANEXO – Análisis estadísticos y gráficos adicionales.

El análisis canónico discriminante de la fragancia floral se llevó a cabo con la aplicación IBM SPSS Statistics 19. El análisis de la morfología geométrica se realizó con la aplicaciones tpsUtil 1.46, tpsDig2 2.16 (Rohlf 2003, 2004) y MorphoJ 1.05a (Klingerberg 2011). Los datos de conducta fueron adquiridos mediante el programa JWatcher 1.0. El resto de los análisis estadísticos se llevaron a cabo en la aplicación NCSS 07.1.9 2007 y STATISTICA 7.0.

Tabla 1. Tiempos de retención (TR) y cantidad de replicas en las que se identificó cada compuesto entre las especies del género *Haplopappus* estudiadas. Se analizó un total de 19, 17 y 28 réplicas para *H. chrysantemifolius* (HC), *H. decurrens* (HD) y *H. foliosus* (HF) respectivamente. Se indica la probabilidad de identificación (PI), además con asterisco los compuestos identificados por medio de estándares externos.

TR	Compuesto	PI	HC	HD	HF
2,61	No identificado			1	
2,62	2,4-dimetilhexano	94 %	1	2	
2,66	2,2,3-trimetilpentano	94 %	1	2	
2,67	No identificado		1		
2,80	2,3-dimetilhexano	94 %	2	5	1
2,88	2,3,5,8-tetrametildecano	89 %	2	5	1
3,17	3-hexanona	92 %			
3,23	2-hexanona	93 %			
3,52	1,4-dimetil-(cis o trans) ciclohexano	96 %			2
3,67	2,4-dimetilheptano	89 %	6	1	
4,02	No identificado		1		
4,04	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	83 %		3	
4,37	2-O-(4-metilpentil) 1-O-pentiloxalato	78 %		1	
4,73	n-butileter	90 %	1		
4,95	Estireno	95 %			22
5,60	Butanal	72 %	2		4
5,69	Alfa-felandreno	97 %*		8	23

5,87	Alfa-pineno	92 %*	12	15	24
6,05	Hidroperóxido, 1-etilbutil	86 %	13	13	26
6,27	4-careno	*	13	12	25
6,31	2-etilhexanal	93 %		1	
6,54	Benzaldehido	93 %			6
6,61	Ácido 3-hexenilester-(E)-butanoíco	80 %			5
6,63	No identificado				1
6,80	Beta-felandreno	97 %*		7	26
6,93	Beta-pineno	93 %*	11	11	21
7,18	Beta-mirceno	85 %		6	24
7,33	Butirato de butilo	90 %			1
7,58	No identificado			1	
7,63	Alfa-felandreno	79 %	1	1	
8,11	1,3,8-p-mentatrieno	92 %	5	16	27
8,25	D-limoneno	95 %*	16	15	26
8,90	No identificado		2		
8,91	5,7-dimetilundecano	90 %	11	4	
8,92	3,3,4-trimetildecano	81 %	3		1
9,02	(1s,3r,6r)-(-)-careno	97 %*		7	24
9,06	5,7-dimetilundecano	90 %	7	2	
9,08	No identificado		1		
9,37	γ -Terpineno	94 %		7	22
9,89	p-Cimeneno	94 %			1
9,91	3,4-dimetilestireno	88 %			3
10,17	4,7-dimetilundecano	95 %	15	3	1
10,22	No identificado			4	
10,29	Nonanal	94 %	11	4	11
10,49	(1-metoxipropil)-benceno	85 %		1	1
10,51	1-etil-4-metoxibenceno	95 %			14
11,03	No identificado		1		
11,05	No identificado		2		
11,19	No identificado			1	

Tabla 2. Análisis de varianza sobre diferencias en el tamaño de los centroides usando el sexo y el hospedero como fuentes de variación.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g. l.	Cuadrado medio	F	p
Sexo	$6,95 \cdot 10^6$	1	$6,95 \cdot 10^6$	104,57	< 0,001
Hospedero	$1,79 \cdot 10^6$	1	$1,79 \cdot 10^6$	27,01	< 0,001
Sexo \times Hospedero	$7,78 \cdot 10^3$	1	$7,78 \cdot 10^3$	0,12	0,733
Error	$6,11 \cdot 10^6$	92	$6,64 \cdot 10^4$		

Tabla 3. Valores propios, porcentaje de varianza explicada y acumulada, pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y homocedasticidad de Levene para cada uno de los componentes generados por el Análisis *Relative Warps*.

Componente Principal	Valores propios ($\cdot 10^{-4}$)	Varianza explicada	Varianza acumulada	Prueba de Shapiro-Wilk	
				W	p
1	1,8207	27,7	27,7	0,99	0,825
2	1,0882	16,6	44,3	0,99	0,556
3	0,8019	12,2	56,5	0,98	0,131
4	0,5325	8,11	64,6	0,98	0,088
5	0,3688	5,62	70,2	0,99	0,906
6	0,3229	4,92	75,2	0,99	0,514
7	0,2761	4,21	79,4	0,98	0,303
8	0,2271	3,46	82,8	0,99	0,532
9	0,1772	2,70	85,5	0,98	0,143
10	0,1647	2,51	88,0	0,99	0,934
11	0,1448	2,21	90,2	0,99	0,984
12	0,1096	1,67	91,9	0,99	0,530
13	0,0904	1,38	93,3	0,99	0,880
14	0,0722	1,10	94,4	0,98	0,123
15	0,0604	0,92	95,3	0,99	0,506
16	0,0535	0,82	96,1	0,99	0,642
17	0,0428	0,65	96,8	0,99	0,730
18	0,0354	0,54	97,3	0,98	0,156
19	0,0335	0,51	97,8	0,99	0,933
20	0,0247	0,38	98,2	0,98	0,303
21	0,0234	0,36	98,6	0,99	0,851
22	0,0196	0,30	98,9	0,99	0,983

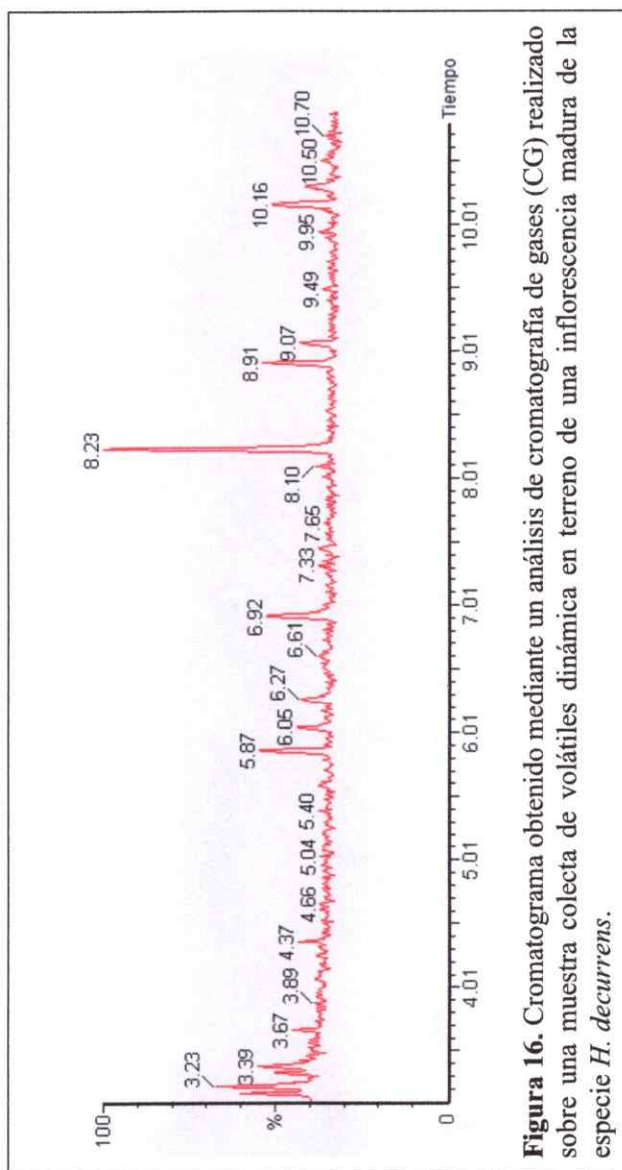


Figura 16. Cromatograma obtenido mediante un análisis de cromatografía de gases (CG) realizado sobre una muestra colecta de volátiles dinámica en terreno de una inflorescencia madura de la especie *H. decurrens*.

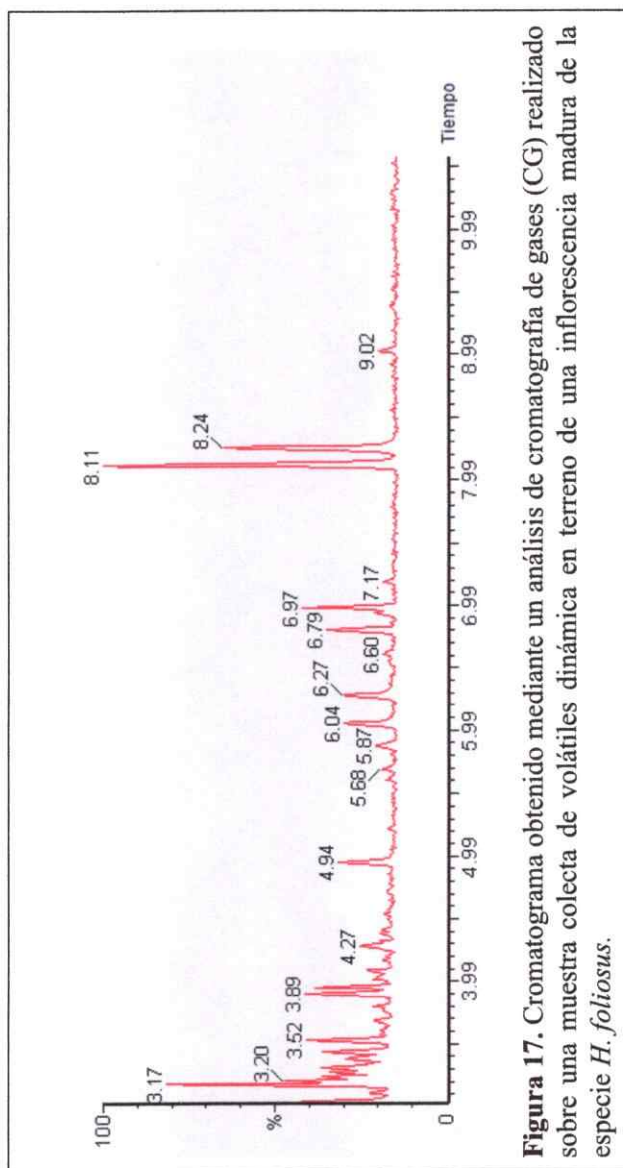


Figura 17. Cromatograma obtenido mediante un análisis de cromatografía de gases (CG) realizado sobre una muestra colecta de volátiles dinámica en terreno de una inflorescencia madura de la especie *H. foliosus*.

Tabla 4. MANOVA y MANCOVA, usando el tamaño del centroide como covariable, realizado sobre los *relative warps* generados a partir de los hitos de la venación alar seleccionados.

Análisis	Fuente de variación	g. l. efecto	g. l. error	Prueba de Wilk	F	p
MANOVA	Sexo	28	65	0,52	2,17	0,005
	Hospedero	28	65	0,32	4,90	< 0,001
	Sexo × Hospedero	28	65	0,75	0,78	0,759
MANCOVA	Tamaño del centroide	28	64	0,52	2,18	0,005
	Sexo	28	64	0,57	1,72	0,037
	Hospedero	28	64	0,42	3,25	< 0,001
	Sexo × Hospedero	28	64	0,75	0,77	0,774

Tabla 5. Prueba de homogeneidad de las pendientes de las relaciones entre las distintas variables.

Fuente de variación	g. l. efecto	g. l. error	Prueba de Wilk	F	p
Sexo	28	61	0,69	1,00	0,52
Hospedero	28	61	0,75	0,73	0,82
Centroide	28	61	0,54	1,86	0,02
Sexo × Hospedero	28	61	0,75	0,72	0,83
Sexo × Centroide	28	61	0,70	0,95	0,55
Hospedero × Centroide	28	61	0,76	0,70	0,85
Sexo × Hospedero × Centroide	28	61	0,76	0,70	0,85

Tabla 6. Pruebas de normalidad sobre las distribuciones de las latencias e IP para los distintos tratamientos. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk debido a que es la más recomendada cuando el número de réplicas es bajo.

Hospedero	Estímulo	Latencia		IP	
		Shapiro-Wilk W	p	Shapiro-Wilk W	p
<i>H. foliosus</i>	<i>H. foliosus</i>	0,75	0,002	0,90	0,150
	<i>H. decurrens</i>	0,71	< 0,001	0,90	0,133
<i>H. decurrens</i>	<i>H. decurrens</i>	0,72	0,002	0,91	0,328
	<i>H. foliosus</i>	0,67	< 0,001	0,89	0,072

Tabla 7. Latencias e IP para los distintos tratamientos (Promedio \pm EE).

Hospedero	Estímulo	Latencia (s)	IP
<i>H. foliosus</i>	<i>H. foliosus</i>	129,17 \pm 34,44	-0,24 \pm 0,16
	<i>H. decurrens</i>	87,51 \pm 28,50	0,38 \pm 0,16
<i>H. decurrens</i>	<i>H. decurrens</i>	152,34 \pm 46,89	0,07 \pm 0,22
	<i>H. foliosus</i>	86,94 \pm 26,92	0,13 \pm 0,18

Tabla 8. Proporción de tiempo pasado por el individuo en cada brazo para cada uno de los tratamientos (Promedio \pm EE).

Hospedero	Estímulo	T _{con}	T _{est}
<i>H. foliosus</i>	<i>H. foliosus</i>	0,35 \pm 0,11	0,12 \pm 0,08
	<i>H. decurrens</i>	0,09 \pm 0,07	0,48 \pm 0,12
<i>H. decurrens</i>	<i>H. decurrens</i>	0,22 \pm 0,11	0,26 \pm 0,13
	<i>H. foliosus</i>	0,24 \pm 0,10	0,37 \pm 0,10

Tabla 9. Pruebas de t de Student para muestras dependientes desarrolladas sobre las proporciones de tiempo pasado en cada uno de los brazos en cada uno de los experimentos y pruebas de normalidad de las distribuciones de las diferencias entre ambas variables.

Hospedero	Estímulo	t	g. l.	p	Prueba de normalidad			
					Prueba de Kewness		Prueba de Kurtosis	
					Valor	p	Valor	p
<i>H. foliosus</i>	<i>H. foliosus</i>	-1,45	12	0,17	1,08	0,281	0,08	0,935
	<i>H. decurrens</i>	2,38	12	0,03	-1,41	0,156	0,35	0,725
<i>H. decurrens</i>	<i>H. decurrens</i>	0,33	8	0,75	-0,13	0,897	-0,26	0,796
	<i>H. foliosus</i>	0,73	14	0,48	-0,86	0,390	-1,68	0,093

Tabla 10. Análisis de covarianza utilizando como variable respuesta IP, covariable el sexo y como factores el hospedero de eclosión y el estímulo aplicado.

Fuente de variación	F	g. l.	p
Sexo	0,03	1	0,861
Hospedero	0,01	1	0,935
Estímulo	2,34	1	0,133
Hospedero × Estímulo	2,92	1	0,094

Tabla 11. Pruebas de t de Student para muestras independientes desarrolladas sobre los IP, y prueba de homocedasticidad de Levene para ambas comparaciones (ver pruebas de normalidad en Tabla 6).

Hospedero	Estímulo	t	g. l.	p	Prueba de Levene	
					Valor	p
<i>H. foliosus</i>	<i>H. foliosus</i>	2,63	24	0,015	0,16	0,696
	<i>H. decurrens</i>					
<i>H. decurrens</i>	<i>H. decurrens</i>	0,12	22	0,902	0,31	0,585
	<i>H. foliosus</i>					

BIBLIOGRAFÍA

Agrawal, A. A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294: 321-326.

Andrewartha, H. G. 1952. Diapause in relation to the ecology of insects. *Biol. Rev.* 27:50-107.

Bernays, E. A. 1988. On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology* 69: 886-892.

Bernays, E. A. 1989. Host range in phytophagous insects: the potential role of generalist predators. *Evolutionary Ecology* 3: 299-311.

Bernays, E. A. 2001. Neural limitations in phytophagous insects: implications for dieth bradth and evolution of host affiliation. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 703-727.

Boake, C. R. B., DeAngelis, M. P. y Andreadis, D. K. 1997. Is sexual selection and species recognition a continuum? Mating behavior of the stalk-eyed fly *Drosophila heteroneura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12442-12445.

Bookstein, F. L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bull. Math. Biol.* 58: 313-365.

Bookstein, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge.

Blumstein, D. T., Evans, C. S. y Daniel, J. C. 2000. JWatcher 0.9. An introductory user's guide. Animal Behaviour Laboratory, Macquarie University, Australia. <http://www.jwatcher.ucla.edu/>

Bush, G. L. 1992. Host race formation and sympatric speciation in *Rhagoletis* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Psyche* 99: 335-357.

Bush, G. L. 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera, Tephritidae). *Evolution* 23(2): 237-251.

Bush, G. L. 1998. The conceptual radicalization of an evolutionary biologist. pp 425-438. En *Endless Forms, Species and Speciation*, Howard, D.J. and Berlocher, S.H., eds, Oxford University Press.

Campos, R., Botto-Mahan, C., Coronado, X., Jaramillo, N., Panzera, F. y Solari, A. 2011. Wing shape differentiation of *Mepraia* species (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution* 11: 329-333.

Céspedes, P. 2008. Diferencias morfológicas y ecológicas de poblaciones de *Dioxya chilensis* Macquart (Diptera: Tephritidae). Memoria para optar al título de Profesor de Biología y Ciencias Naturales. Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. 80 pp.

Craig, T. P., Itami, J. K., Abrahamson, W. G. y Horner, J. D. 1993. Behavioral evidence for host-race formation in *Eurosta solidaginis*. *Evolution* 47(6): 1696-1710.

Den Otter, C. J., Tchicaya, T. y Schutte, A. M. 1991. Effects of sex, age and hunger on the antennal olfactory sensitivity of tsetse flies. *Physiol. Entomol.* 16: 173-182

Dres, M. y Mallet J. 2002. Host races in plant feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B* 357: 471-92.

Feder, J. L., Opp, S. B., Wlazlo, B., Reynolds, K., Go, W., y Spisak S. 1994. Host fidelity is an effective premating barrier between sympatric races of the apple maggot fly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91(17): 7990-7994.

Feder, J. L. 1998. The apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*: flies in the face of conventional wisdom about speciation? pp. 130-144 En *Endless Forms, Species and Speciation*, Howard, D.J. and Berlocher, S.H., eds, Oxford University Press.

Fontana, A., Reichelt, M., Hempel, S., Gershenzon, J. y Unsicker, S. 2009. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on direct and indirect defense metabolites of *Plantago lanceolata* L. *J. Chem. Ecol.* 35(7): 833-843.

Frías, D. 2005. *Trupanea simpatica* a new species of Tephritinae (Diptera: Tephritidae) infesting an endemic *Haplopappus* hybrid (Asteraceae) in Chile. *Acta Ent. Chilena* 29(1): 13-45.

Grewal, J. S. y Kapoor, V. C. 1984. Courtship and mating behavior in the Fruit Fly *Dioxya sororcula* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Aust. J. Zool.* 32: 671-676.

Headrick, D. H., Goede, R. D. y Teerink, J. A. 1996. Life history and description of immature stages of *Dioxya picciola* (Bigot) (Diptera: Tephritidae) on *Coreopsis* spp. (Asteraceae) in southern California. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 98: 332-349.

Iyengar, A., Chakraborty, T. S., Goswami, S. P., C. Wu y Siddiqi, O. Post-eclosion odor experience modifies olfactory receptor neuron coding in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 9855-9860.

Janz, N., Nyblom, K. y Nylin, S. 2001. Evolutionary dynamics of host-plant specialization: a case study of the tribe Nymphalini. *Evolution* 55: 783-796.

Kelley, S. T. y Farrel, B. D. 1998. Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* Bark Beetles (Scolyridae). *Evolution* 52: 1731-1743.

Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.

Klingenberg, L. 2007. Monographie der südamerikanischen Gattungen *Haplopappus* Cass. und *Notopappus* L. Klingenberg (Asteraceae – Astereae). Bibliotheca Botanica Heft 157, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany.

Maffei, M. 2011. Essay 13.7 The Plant Volatilome. En Taiz, T. y Zeiger, E. (eds), *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. Versión online (<http://5e.plantphys.net/index.php>).

Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B. y Worm, B. 2010. How many species are there on the earth and in the ocean?. *PLoS Biol* 9(8): e1001127.

Nylin, S. y Janz, N. 2009. Butterfly host plant range: an example of plasticity as a promoter of speciation? *Evol Ecol* 23: 137-146.

Nylin, S. y Wahlberg, N. 2008. Does plasticity drive speciation? Host-plant shifts and diversification in nymphaline butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) during the tertiary. *Biol. Jour. Linnean Society* 94: 115-130.

Prokopy, R. J., Averill, A. L., Cooley S. S. y Roitberg, C. A. 1982. Associative learning in egg-laying site selection by apple maggot flies. *Science* 218(4567): 76-77.

Raguso, R. A. y Pellmyr, O. 1998. Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods. *Oikos* 81: 238-254.

Raguso, R. A. y Willis, M. A. 2002. Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by naïve hawkmoths, *Manduca sexta*. *Animal Behavior* 64: 685-695.

Raguso, R. A. 2004. Flowers as sensory billboards: progress towards an integrated understanding of floral advertisement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(4): 434-440.

Rohlf, F.J. 1993. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In: Contributions to Morphometrics (L. F. Marcus, E. Bello y A. Garcia-Valdecasas, eds), pp. 131-159. Monografías, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Rohlf, F. J. 2004. *TpsSmall, version 1.20*. Department of Ecology and Evolution, State Univ. of New York at Stony Brook.

Rohlf, F. J. 2004. *tpsUtil, file utility program. Version 1.26.* Department of Ecology and Evolution, State Univ. of New York at Stony Brook.

Rohlf, F. J. 2004. *tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.0.* Department of Ecology and Evolution, State Univ. of New York at Stony Brook.

Ruiz-C, R. I., Román-Valencia, C., Herrera-M, B. E., Peláez, O. E. y Ermekova-A., A. 2011. Variación morfológica de las especies de *Astyanax*, subgénero *Zygodaster* (Teleostei, Characidae). *Animal Biodiversity and Conservation* 34.1:47-66.

Sachse, S., Rueckert, E., Keller, A., Okada, R., Tanaka, N. K., Ito, K. y Vossball, L. B. 2007. Activity-dependent plasticity in an olfactory circuit. *Neuron* 56: 838-850.

Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A. y Dicke M. 2005. *Insect-plant biology.* 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York. 421 pp.

Snow, W. A. 1894. Descriptions of North American Trypetidae, with notes. *Kan Univ. Quart.* 2: 1159-1174.

Sokal, R. y Rohlf, J. F. 1998. *Biometry, the principles and practice of statistics in biological research.* WH Freeman and Company, New York.

Soto, I. M., Carreira, V. P., Soto, E. M., y Hasson, E. 2007. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *J. Ecol. Biol.* 21: 598-609

Tauber, M. J. y Tauber, C. A. 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. *Ann. Rev. Ent.* 21: 81-107.

Tauber, M. J., Tauber, C. A. y Masaki, S. 1986. Seasonal Adaptations of Insects. Oxford University Press, 414 pp.

Theis, N., Lerdau, M. y Raguso, R. A. 2007. The challenge of attracting pollinators while evading floral herbivores: patterns of fragrance emission in *Cirsium arvense* and *Cirsium repandum* (Asteraceae). *Int. J. Plant Sci.* 168(5): 587-601.

Thompson, J. N., Cunningham, B. M., Segraves, K. A., Althoff, D. M. y Wagner, D. 1997. Plant polyploidy and insect-plant interactions. *The American Naturalist* 150: 730-743.

Turner, S. L. y Ray, A. 2009. Modification of CO₂ avoidance behavior in *Drosophila* by inhibitory odorants. *Nature* 461: 277-281.

Vereecken, J. N., Cozzolino, S. y Schiestl, F. P. 2010. Hybrid floral scent novelty drives pollinator shift in sexually deceptive orchids. *BMC Evolutionary Biology* 10: 103.

Via, S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grow up. *Trends Ecol. Evol.* 16: 381-390.

Villagra, C. A., Vásquez, R. A. y Niemeyer, H. M. 2005. Associative odour learning in *Aphidius ervi* males (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology* 102: 557-559.

Villagra, C. A., Pennacchio, F. y Niemeyer, H. M. 2007. The effect of larval and early adult experience on behavioural plasticity of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Naturwissenschaften* 94: 903-910.

Walsh, B. D. 1864. On phytophagic varieties and phytophagic species. *Proc. Entomol. Soc. Philadelphia* 3: 403-430.

Walsh, B. D. 1867. The apple-worm and the apple maggot. *J. Hortie.* 2: 338-343.

Wasbauer, M W. 1972. An annotated host catalog of fruit flies of America north of Mexico (Diptera: Tephritidae). California Department of Agriculture, Bureau of Entomology Occasional Pappers No. 19, 172 pp.

White, I. M., Headrick, D. H., Norrbom, A. L. y Carroll, L. E. 2001. Glossary.
En M. Aluja y A. L. Norrbom (eds), Fruit flies (Tephritidae) Phylogeny and Evolution
of Behavior. pp 881-923. CRC Press, USA.