

Comunicación química intra-sexual en lepidópteros: *Pseudaletia adultera* como modelo de estudio

Electrofisiología y Comportamiento

Lic. Guillermo Rehermann

Laboratorio de Ecología Química

Facultad de Química

Universidad de la República

Director: Prof. Andrés González Ritzel

Co-Director: Prof. Jeremy N. McNeil

Tesis de Maestría

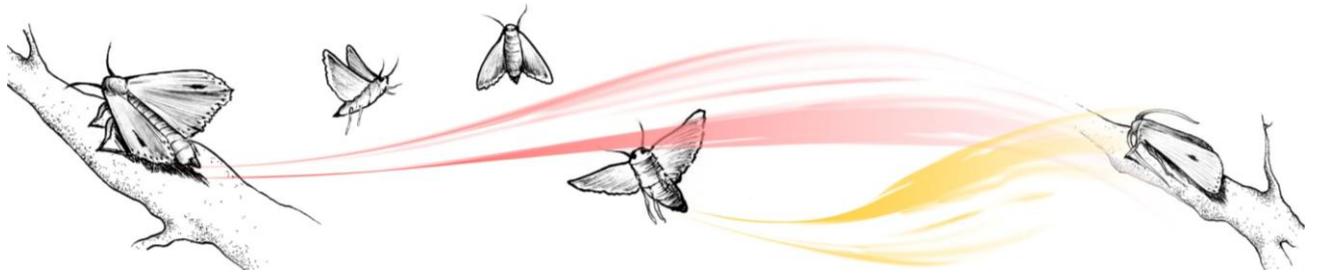
PEDECIBA – Biología

Sub Área Ecología y Evolución

2016

*“There are many reasons for using pheromones.
One is that they are elegant.”*

Arn 1990



ÍNDICE

Agradecimientos	iv
Resumen	v
Estructura de la Tesis	vii
Introducción	1
1. Los insectos y la comunicación química	1
1.1. Comunicación en lepidópteros: Feromonas sexuales	3
1.1.1. Química, producción, emisión y recepción	4
1.1.2. Autodetección	7
2. <i>Pseudaletia adultera</i> Schaus (Lepidoptera: Noctuidae)	11
Objetivo General	15
Objetivo específico 1: Capítulo 1	15
Objetivo específico 2: Capítulo 2	15
Hipótesis	15
Capítulo 1	16
Objetivo	16
Introducción	17
Respuesta electrofisiológica	17
Materiales y Métodos	20
Insectos	20
GC-EAD y EAG	20
Análisis estadísticos	23
Resultados	25
Electroantenograma (GC-EAD y EAG)	25

Capítulo 2	29
Objetivo	29
Introducción	30
Respuesta comportamental	30
Materiales y Métodos	30
Comportamiento de llamada	30
Análisis estadísticos	34
Resultados	36
Edad al primer día de llamada	36
Duración, inicio y patrón temporal de llamada	36
Discusión General	41
Conclusiones y perspectivas	49
Bibliografía	51

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar una Beca de Maestría para el proyecto.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por apoyar el proyecto con una Beca del Programa de Iniciación a la Investigación CSIC 2013.

A Ana Silva, Anita Aisenberg y Martín Bollazzi por aceptar ser miembros del tribunal de esta tesis; por el esfuerzo y dedicación para corregirla en los acotados plazos, por las correcciones y comentarios que contribuyeron a un mejor trabajo y por su calidez.

To Jeremy. For being my co-supervisor and decide to travel thousands of kilometers for sharing his knowledge and passionate discussions.

A Carmen Rossini y Andrés González por seguir acompañándome en este camino de crecimiento.

A los LEQuers'. Personas con tan linda química y a la vez, curiosas de bichos y flores plantas que hacen que los días resulten siempre interesantes.

A Andrés. Por confiar en mí y permitirme desarrollar mis intereses con libertad. Por ir un poco más allá de la ciencia.

A la 13. A la banda crandonena. A los intrépidos y apasionados. A los que un día empezaron a jugar conmigo a querer investigar y descubrir. A los que me han enseñado a correr junto a la vida, y a los que la corren junto a mí.

Al tridente mágico: Fefito, El Big y Mamá.

A Franquita, con quien bailo ciencia, bailo sonrisas y bailo la vida.

Resumen

Los insectos utilizan frecuentemente el sentido del olfato para la ubicación y selección de fuentes de alimento, pareja y sitios de oviposición, detectando y respondiendo activamente a diversos estímulos químicos volátiles. En lepidópteros nocturnos, la actividad sexual es mediada en gran parte por señales químicas, y sigue un ritmo circadiano en el que las hembras emiten feromonas sexuales que atraen a los machos en momentos específicos de la noche. Este ritmo endógeno es también modulado por factores exógenos que pueden modificar el momento en que es emitida la señal, así como la cantidad y composición química de la misma. Para una hembra, la capacidad de detectar feromona de hembras co-específicas (autodetección) podría proveer información sobre el contexto en el cual se encuentra, información que puede serle útil para modular su propia emisión de feromona. Cambios en el comportamiento de llamada —asociado a la liberación de feromonas sexuales— en respuesta a la presencia de hembras co-específicas ha sido demostrado para algunas especies de lepidópteros noctuideos, entre ellas la lagarta de los cereales, *Pseudaletia adultera* (Schaus) (Noctuidae, Hadenini), especie nativa con la que realizamos este trabajo de tesis. Durante el mismo estudiamos el efecto de feromona co-específica en el comportamiento de llamada de *P. adultera*, aislando experimentalmente este estímulo de otros potenciales canales de comunicación. Comparamos la edad de las hembras al primer llamado, así como el patrón temporal de llamada, cuando hembras individuales fueron expuestas a feromona de hembras co-específicas o en ausencia de este estímulo. La feromona de co-específicas no afectó la edad de las hembras en el primer llamado, pero sí el patrón temporal de llamada, observándose una tendencia generalizada a adelantar y alargar el llamado en respuesta a la presencia de feromona

co-específica. Además, utilizando electroantenografía acoplada a cromatografía de gases, demostramos que las antenas de las hembras responden a cada uno de los componentes químicos conocidos de su feromona sexual: (Z)-11-hexadecenal, (Z)-11-hexadecen-1-ol y acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo, y a distintas mezclas de estos tres compuestos. Modificar el patrón de llamada y extender la ventana temporal de la misma en presencia de feromona de hembras co-específicas podría incrementar las probabilidades de atraer potenciales parejas en un contexto de competencia. Sin embargo, los eventuales beneficios deben ser considerados en un contexto ecológico, considerando factores como la migración, selección de hábitat, sistema de apareamiento, y sitios de oviposición, así como posibles interacciones inter-específicas con especies cercanas.

Estructura de la Tesis

Esta tesis se compone de 5 partes: una **introducción**, **dos capítulos**, una **discusión general** y las **conclusiones**. La **introducción** aborda conceptos y conocimiento previo en relación al tema de la tesis, incluyendo generalidades de la comunicación química en insectos e información específica de la comunicación mediada por feromonas sexuales y el fenómeno de autodetección. Además, se introduce la especie en estudio, *Pseudaletia adultera* Schaus (Lepidoptera: Noctuidae), y los antecedentes en el marco de la maestría. **Cada capítulo** comprende un objetivo específico de la tesis, incluyendo materiales y métodos y resultados. El primer capítulo trata del estudio de la respuesta electrofisiológica de las antenas de hembras de *P. adultera* a los componentes químicos individuales y a la mezcla de la feromona sexual co-específica. El capítulo dos, por su parte, comprende el estudio del efecto de la feromona sexual en la expresión del comportamiento de llamada en hembras de *P. adultera*. Por último, se presenta una **discusión general**, donde se discuten los resultados obtenidos en el marco del posible rol adaptativo de la comunicación intra-sexual en hembras de lepidópteros y las **conclusiones y perspectivas**.

Introducción

1. Los insectos y la comunicación química

Los animales, para comunicarse, emplean una gran diversidad de señales que emiten en función de estímulos internos y externos. Según la característica de la señal, esta puede transmitirse por diferentes canales comunicativos como el acústico, visual, táctil, eléctrico, sísmico o químico; siendo este último el más antiguo y compartido por una gran diversidad de organismos (Wilson 1970).

La comunicación química se basa en el flujo de sustancias, mayormente volátiles, desde el organismo señalizador (emisor de la señal) hasta los órganos sensoriales del organismo receptor. Los compuestos químicos que participan de la comunicación —señales químicas o semioquímicos (Law & Regnier 1971)— tienen en general un bajo costo de producción, son capaces de perdurar en el tiempo, pueden recorrer largas distancias, sortear obstáculos sin modificar el mensaje y ser efectivos en pequeñas cantidades. Además, pueden ser utilizados en la oscuridad y ser altamente específicos, dificultando así su detección por depredadores (Howse et al. 1998). Estas características han contribuido a que los semioquímicos, actúen como mediadores en muchos aspectos de la vida de los organismos y sus interacciones ecológicas. El campo de la Ecología Química estudia estas interacciones desde el punto de vista químico de la señal, así como desde el punto de vista fisiológico, ecológico y evolutivo de la interacción; es decir, cómo los organismos producen y perciben las señales químicas, cómo éstas afectan su comportamiento o fisiología, y el valor adaptativo de dicho proceso de comunicación (Cardé & Haynes 2004).

Los semioquímicos se clasifican en aleloquímicos o feromonas según participan en interacciones inter-específicas (organismos de distintas especies) o en comunicación intra-específica (organismos de la misma especie), respectivamente (Brown et al. 1970). Las feromonas (del griego *pherin* = transferir, *hormon* = excitar) son señales que pueden actuar de forma prolongada en la fisiología del individuo receptor, a través de su sistema endócrino (feromonas *promotoras*), o bien pueden tener un efecto inmediato en el comportamiento a través del sistema neuromotor (feromonas *desencadenantes*). En este sentido, las feromonas pueden mediar diversas interacciones, entre ellas, el encuentro de los sexos para la reproducción, la atracción de co-específicos para la explotación de un recurso, la alarma contra un peligro, el marcado de territorios o la organización social (Cardé & Haynes 2004).

En los insectos, la comunicación intra-específica y la percepción general del entorno se basan en gran medida en el uso de señales químicas. Esto ha permitido a la Ecología Química un desarrollo particular para el manejo de insectos perjudiciales para el ser humano, tanto plagas agrícolas como vectores de enfermedades, con el objetivo de desarrollar métodos de manejo que racionalicen el uso de insecticidas, utilizando en su lugar sustancias modificadoras del comportamiento. Los tipos de interacciones químicas mayormente estudiados incluyen la atracción entre sexos a través de feromonas sexuales; la formación de agregaciones mediante feromonas de agregación; y las interacciones entre niveles tróficos (planta-herbívoro-parasitoide/depredador) a través de sustancias químicas liberadas por plantas e insectos (Eisner & Meinwald 1995). En el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química se desarrolla como una de sus principales líneas de investigación el estudio de la comunicación

química de lepidópteros mediada por feromonas sexuales (ver Altesor et al. 2009, Sellanes et al. 2010, González et al. 2012).

1.1. Comunicación en lepidópteros: Feromonas sexuales

Los lepidópteros constituyen uno de los grupos más diversos dentro de los insectos, con aproximadamente 160.000 especies descritas (Cardé & Haynes 2004). Su éxito evolutivo es atribuido a diversos factores, entre los que se destacan un ciclo de vida corto y el desarrollo holometábolo, con una etapa larval especializada en la alimentación y acumulación de energía, y una etapa adulta cuya actividad principal consiste en la dispersión y reproducción. Asimismo, los lepidópteros tienen la habilidad de sobrevivir en pequeñas densidades, lo cual es posible, al menos en parte, por un sistema de comunicación muy eficiente para el encuentro entre sexos con fines reproductivos, basado en feromonas sexuales volátiles (Borror et al. 1989, Cardé & Haynes 2004).

En los lepidópteros nocturnos, comúnmente llamados polillas, el encuentro de los sexos depende casi exclusivamente del uso de feromonas (Howse et al. 1998). Estas señales son de gran importancia para el reconocimiento específico, y tienen un rol significativo en los mecanismos de aislamiento reproductivo y especiación (Roelofs & Rooney 2003, Cardé & Haynes 2004, Symonds & Elgar 2008). Generalmente son las hembras las que inician la señalización química emitiendo compuestos lipofílicos volátiles (Cardé & Willis 2008), mientras que los machos detectan la feromona utilizando un sistema olfatorio altamente especializado, y se orientan por anemotaxis

positiva (a contraviento) para poder localizar a la hembra co-específica que señala (Cardé & Haynes 2004). Una vez en la proximidad, el macho comúnmente libera feromonas de “corto” alcance, que son utilizadas por la hembra para evaluar la calidad de la potencial pareja (Phelan & Baker 1987, Fitzpatrick & McNeil 1988, Birch et al. 1990).

1.1.1. Química, producción, emisión y recepción

La mayoría de las feromonas sexuales en lepidópteros consisten en mezclas complejas de un componente mayoritario y algunos componentes minoritarios cuyas proporciones relativas son precisas y determinan el reconocimiento especie-específico (de Bruyne & Baker 2008). La composición de la mezcla está bajo el control de genes que codifican para distintas enzimas (desaturasas, oxidasas y reductasas) que son las responsables de convertir ácidos grasos precursores en los componentes de la feromona, generalmente alcoholes, aldehídos y acetatos alifáticos insaturados (Roelofs & Rooney 2003, Jurenka 2004). La posición y configuración espacial de las insaturaciones, el largo de cadena, el grupo funcional terminal, y la relación de los distintos componentes de la mezcla, son los principales factores químicos que determinan la especificidad de la señal (Ando et al. 2004).

Un aspecto importante durante la comunicación para la reproducción es cuándo y cómo se emiten las señales. La actividad sexual de lepidópteros nocturnos está sujeta a un ritmo circadiano y se ha demostrado que tanto la biosíntesis de feromona sexual, su emisión, así como la respuesta del macho y el apareamiento están sincronizados y ocurren en momentos específicos (Baker & Cardé 1979, Turgeon & McNeil 1982, por revisión ver Groot 2014).

La producción de la feromona sexual es regulada por la liberación de un neuropéptido activador de la biosíntesis de feromona (PBAN) a nivel central, el cual actúa sobre la glándula productora de feromona sexual ubicada en el extremo terminal del abdomen, disparando la biosíntesis de los componentes de la feromona mediante la activación enzimática de uno o más pasos de la ruta biosintética (Rafaeli & Jurenka 2003, Cardé & Haynes 2004, Jurenka & Rafaeli 2011). Para un gran número de especies de lepidópteros la producción de feromona sexual ocurre *de novo* cada noche y está sincronizada con el *comportamiento de llamada* (revisión Groot 2014).

La liberación de feromonas al entorno implica un comportamiento estereotipado, de características variables en distintas especies, pero en general fácilmente determinable por observación directa. En algunas especies, incluyendo nuestro modelo de estudio, la hembra protruye el ovipositor y realiza un aleteo característico que colabora con la dispersión de los compuestos volátiles en el ambiente, aumentando la probabilidad de atraer machos para la cópula (Turgeon & McNeil 1983, Cardé & Haynes 2004). Este patrón de actividad, especie-específico e intrínseco a cada individuo, es modulado por factores fisiológicos como la edad de la hembra y la condición reproductiva (virgen, post-cópula), así como por factores exógenos bióticos y abióticos como la temperatura, el fotoperíodo, la velocidad del viento, humedad o la presencia de plantas hospederas (McNeil 1991); factores que proveen a la hembra información sobre el contexto ecológico en el cual se emite la señal.

Si bien existen variadas estructuras quimiorreceptoras en diversas partes del cuerpo de lepidópteros, las feromonas sexuales son detectadas por neuronas

sensoriales olfativas (ORNs, olfactory receptor neurons) alojadas en sensilias tricoideas. Éstas son órganos quimiorreceptores formados por 2-4 neuronas receptoras bipolares que proyectan una dendrita hacia el lumen de una estructura cuticular porosa en forma de pelo. Los componentes de la feromona atraviesan la cutícula porosa y son solubilizados/transportados a través de la linfa sensilar —medio acuoso que ocupa el lumen del pelo sensorial— por proteínas de unión a feromonas (PBPs, pheromone binding proteins) hacia las dendritas de las ORNs. Las dendritas expresan receptores de feromona (PRs, pheromone receptors) que al unirse con el complejo feromona-PBP inducen la apertura de canales iónicos, la despolarización de la membrana y la generación de un potencial de acción que es transmitido a lo largo del axón de la ORNs hacia el lóbulo antenal (Fig. 1). Mientras que los PRs determinan la especificidad de la ORN, las PBPs modulan esta especificidad. Todas las proyecciones de los axones de las ORNs de la misma clase —que expresan el mismo tipo de receptor— convergen a un único glomérulo del lóbulo antenal, donde ocurre un primer procesamiento de la información. Desde el glomérulo, neuronas de proyección envían información a centros superiores implicados en la integración del estímulo, como el proto-cerebro lateral y cuerpos pedunculados (mushroom bodies), y de estos centros superiores a su vez salen proyecciones neuronales hacia centros del control motor (Jacquin-Joly & Merlin 2004, Galizia & Rössler 2010).

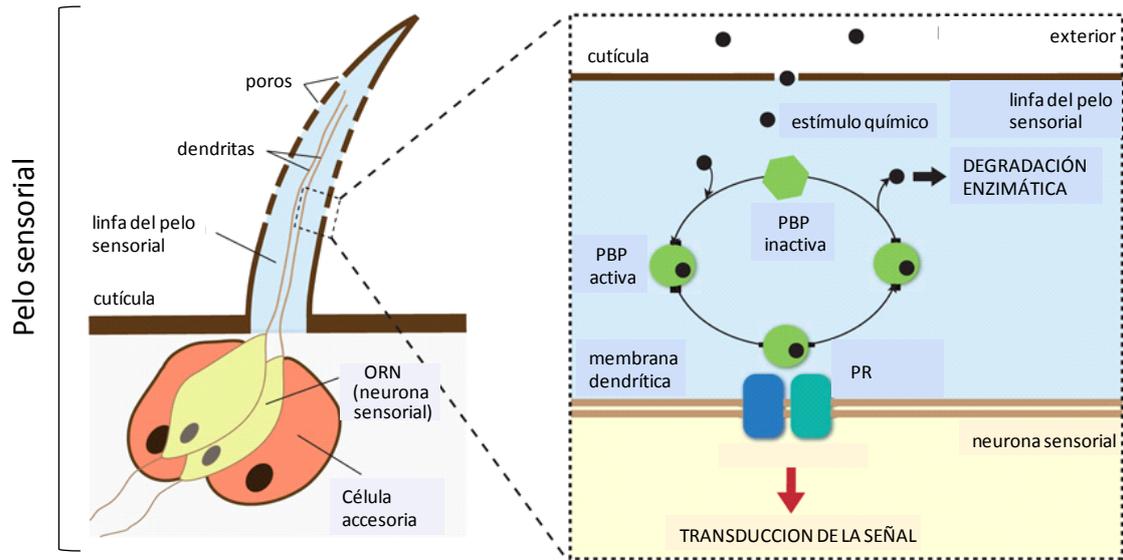


Figura 1. Esquema de un pelo sensorial de la antena de un insecto (tomado y modificado de Sánchez-Gracia *et al.*, 2009).

1.1.2. Autodetección

Existe un importante volumen de conocimiento sobre la comunicación hembra-macho mediada por feromonas sexuales en lepidópteros. Por otro lado, ha sido reportado para distintas familias de lepidópteros que las hembras son capaces de detectar y responder a la feromona sexual femenina de hembras co-específicas, fenómeno denominado *autodetección* (Ochieng *et al.* 1995). Estos estudios muestran distintos efectos en el comportamiento de las hembras como resultado de la autodetección de feromonas, y que los potenciales beneficios de dichos cambios comportamentales varían considerablemente dependiendo de la especie (Lim *et al.* 2007, Sadek *et al.* 2012, Stelinski *et al.* 2014, Cruz & Eizaguirre 2015).

Aunque el fenómeno de autodetección no ha sido extensamente estudiado, existen reportes que cubren diversos componentes de este proceso. A nivel molecular,

las hembras poseen la maquinaria para detectar feromonas sexuales. Si bien la expresión de los genes involucrados en la recepción de la feromona están predeciblemente sesgados hacia los machos (Xiu et al. 2008), bajas pero detectables cantidades de PRs y PBPs han sido reportados en antenas de hembras (Xiu et al. 2008, Wanner et al. 2010, Glaser et al. 2014). También se registraron respuestas en hembras a nivel celular (sensilia), por ejemplo en *Heliothis virescens* y *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). La primera presenta sensilias tricoideas cortas con ORNs que responden específicamente a un componente minoritario de la feromona femenina; por su parte, *S. littoralis* posee 3 tipos de sensilias tricoideas largas donde cada una responde a un componente de la mezcla de la feromona, y son tan sensibles como las sensilias de los machos, aunque se encuentran en menor número (Ljungberg et al. 1993, Binyameen et al. 2012).

A nivel de la antena, la respuesta electrofisiológica frente a feromona co-específica ha sido demostrada a través de experimentos de electroantenografía (EAG). Estos estudios incluyen especies de polillas diurnas y nocturnas agrupadas dentro de la familia Arctiidae (Schneider et al. 1998, Grant & O'Connell 2000), así como de la familia Tortricidae (Den Otter et al. 1978, Palaniswamy & Seabrook 1978, Den Otter et al. 1996, De Cristofaro et al. 2004, DeLury et al. 2005, Stelinski et al. 2006, Gökçe et al. 2007), Sphingidae (Kalinova et al. 2001), Sesiidae (Pearson & Schal 1999), y en los noctúideos *Trichoplusia ni* (Light & Birch 1979), *Spodoptera littoralis* (Ljungberg et al. 1993), *Helicoverpa armigera* (Fan et al. 2003), *H. virescens*, *H. subflexa* (Groot et al. 2005), *Spodoptera exigua* (Yang et al. 2009) y *Sesamia nonagrioides* (Cruz & Eizaguirre 2015). Asimismo, se ha descrito la respuesta a nivel de neuronas del lóbulo antenal,

primer centro integrador de la señal, en hembras de *Grapholita molesta* (Tortricidae) (Varela et al. 2011).

La mayoría de los estudios sobre autodetección se han centrado en el efecto comportamental de la detección de feromonas co-específicas, demostrando que no existe un patrón único de respuesta. Hembras de *T. ni* (Noctuidae) (Birch 1977) y *Utetheisa ornatrix* (Arctiidae) (Lim & Greenfield 2008) por ejemplo, se orientan y vuelan hacia las hembras que están señalizando, sugiriendo que la atracción hembra-hembra resulta en la agregación de hembras con posibles efectos en el éxito reproductivo grupal e individual (cooperación a nivel grupo, competencia a nivel individuo). Por el contrario, las hembras también pueden ser repelidas por hembras co-específicas, como ocurre en *H. armigera* y *Heliothis zea* (Noctuidae) (Saad & Scott 1981). En este contexto, la autodetección sería importante para disminuir la competencia entre hembras, por ejemplo evitando la interferencia de las plumas de olor, o como un mecanismo general de espaciamiento/distribución de los individuos (Den Otter et al. 1996) mediado por una mayor actividad en términos de cantidad y distancia de vuelos (Stelinski et al. 2014).

Entre los efectos comportamentales estudiados, la autodetección puede modular el propio comportamiento de llamada de la hembra. Por ejemplo, la detección de feromona de co-específicas induce la señalización en hembras de *U. ornatrix*, las que inician el llamado antes y por períodos más prolongados de tiempo (Lim et al. 2007). Ejemplos con efectos similares incluyen especies nocturnas como los tortricidos *Choristoneura fumiferana* (Palaniswamy & Seabrook 1985), *G. molesta* (Stelinski et al. 2006) y *Lobesia botrana* (Harari et al. 2011). Asimismo, en dos especies

relacionadas de noctuideos, *S. littoralis* y *S. exigua*, se observan efectos opuestos: en hembras de *S. littoralis* la probabilidad de llamar aumenta y llaman por más tiempo cuando son expuestas a feromona de co-específicas (Sadek et al. 2012), mientras que hembras de *S. exigua* llaman menos y retrasan el pico de llamada (Yang et al. 2009). Por otra parte, el retraso en el inicio del llamado sexual ha sido demostrado en los tortricidos *Adoxophyes orana* y *Homona magnanima* (Noguchi & Tamaki 1985), y la combinación de posponer el inicio de la señalización con una reducción de la ventana temporal del llamado fue reportado para otros dos tortricidos, *Choristoneura rosaceana* y *Argyrotaenia velutiana* (Gökçe et al. 2007).

A pesar de observarse estos diferentes e incluso contrastantes efectos en relación a la autodetección de feromona sexual en distintas especies de lepidópteros (incluso en especies filogenéticamente muy próximas, ej.: *S. littoralis* y *S. exigua*), parece existir un mecanismo general por el cual las hembras detectan la feromona sexual de co-específicas y responden ajustando su propia emisión de feromona sexual. Esta plasticidad en el comportamiento de llamada en función de una señal química externa podría ser relevante y adaptativa, pudiendo ser considerada tanto en el contexto de interacciones de competencia o cooperación hembra-hembra, así como en el posible efecto en cuanto a la atracción de machos para la reproducción. Claramente, un patrón único de respuesta comportamental a la autodetección no es esperable, ya que ésta ocurre enmarcada en la ecología e historia de vida de cada especie.

2. *Pseudaletia adultera* Schaus (Lepidoptera: Noctuidae)

La lagarta de los cereales, *P. adultera*, es un insecto polífago que se alimenta en su fase de larva principalmente de gramíneas cultivadas como trigo, avena, cebada, centeno y maíz, así como de gramíneas de praderas naturales (Bentancourt & Scatoni 2006) (Fig. 2). Es una especie nativa que se distribuye en el norte de Argentina, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay, desarrollándose en nuestro país entre 3 ó 4 generaciones anuales (Zerbino 2007). Las plantas sobre las que se alimenta ocupan una importante área en la región agrícola-ganadera, y los ataques son frecuentes y causan importantes daños, por lo que este insecto es considerado plaga (Bentancourt & Scatoni 2006). Hasta el momento, la única estrategia para su control es el uso de insecticidas, y la información disponible del comportamiento reproductivo y la comunicación química en esta especie es escasa. En este sentido, nuestro grupo (Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química) desarrolla una línea de investigación sobre comunicación química reproductiva en *P. adultera*, incluyendo la caracterización química de la feromona sexual, así como aspectos básicos de su ecología. Estos estudios son relevantes para la optimización de estrategias de monitoreo y predicción poblacional, aportando al desarrollo de métodos alternativos de manejo de esta plaga.



Figura 2. Adulto de *Pseudaletia adultera*

Los adultos de ambos sexos, similares en tamaño y aspecto, son de color pardo ceniza claro y presentan en el centro del ala anterior un punto blanco sobre una banda oscura. Miden aproximadamente 25 mm de longitud y 30 a 40 mm de expansión alar (Fig. 2). En condiciones de laboratorio la proporción sexual se aproxima a 1:1 y si bien se desconoce, se asume que en condiciones naturales dicha proporción es similar. Las hembras inician el comportamiento de llamada entre los 3-8 días de emergidas. Este comportamiento ocurre en las últimas horas de la fase oscura y la duración del mismo varía entre los individuos pero generalmente se extiende entre 30-70 min. Los machos por su parte alcanzan la madurez sexual a partir del 4 día de emergidos y tanto machos como hembras en condiciones controladas tienen el potencial de copular más de una vez (obs. personal).

En estudios previos demostramos que hembras de *P. adultera* modifican su comportamiento de llamada cuando están agrupadas con hembras co-específicas: las hembras agrupadas llaman en mayor proporción, más jóvenes y por más tiempo que

hembras aisladas (Rehermann 2012, Tesina; Rehermann, Altesor, McNeil & González 2016). Estos resultados sugieren que las interacciones intra-sexuales estimulan un comportamiento de llamada más precoz e intenso, pudiendo implicar una estrategia de cooperación o competencia intra-sexual en esta especie por el acceso a pareja. Nuestro estudio previo no es concluyente sobre la causa de este efecto, ya que las hembras agrupadas pueden interactuar por múltiples canales de comunicación. Considerando la hipótesis de que fuera un fenómeno de autodetección de feromonas sexuales, en este trabajo de Tesis de Maestría nos propusimos aportar nueva evidencia experimental sobre la existencia de comunicación química intra-sexual en *P. adultera*, y su posible rol ecológico.

Dicha evidencia fue procurada en dos niveles, uno fisiológico y otro comportamental. Como primer objetivo intentamos demostrar que las hembras de *P. adultera* son capaces de detectar los componentes químicos de la feromona sexual de hembras co-específicas. Para esto estudiamos la respuesta electrofisiológica de las antenas de las hembras a los componentes y a la mezcla de la feromona sexual. Por otro lado, nos propusimos estudiar el efecto de la autodetección en el comportamiento de llamada de hembras que interaccionan con co-específicas, aislando para esto el canal químico de comunicación respecto a otras modalidades de comunicación posibles. Desde un punto de vista del conocimiento fundamental en biología reproductiva y comunicación química en lepidópteros, nuestra propuesta apunta a investigar un fenómeno poco estudiado en esta área; esto es, la comunicación química intra-sexual en hembras de lepidópteros. El paradigma clásico de las feromonas sexuales femeninas de lepidópteros como atrayentes de machos a

largas distancias, y el enfoque netamente aplicado de la mayoría de estos estudios, sin dudas ha sesgado la investigación en este tema, posiblemente pasando por alto fenómenos biológicamente relevantes en cuanto al rol de las feromonas sexuales en otros niveles de comunicación e interacción biológica.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el fenómeno de autodetección —comunicación química intra-sexual mediada por feromonas sexuales— en *Pseudaletia adultera* (Lepidoptera: Noctuidae).

Objetivo específico 1 (capítulo 1)

Estudiar la respuesta electrofisiológica de las antenas de hembras de *P. adultera* a los componentes químicos individuales y a la mezcla de la feromona sexual.

Objetivo específico 2 (capítulo 2)

Estudiar el efecto de la feromona sexual co-específica en la expresión del comportamiento de llamada en hembras vírgenes de *P. adultera*.

HIPÓTESIS

Las hembras de *Pseudaletia adultera* son capaces de detectar la feromona sexual de hembras co-específicas (autodetección), y en un contexto de posible competencia intra-sexual, incrementar su comportamiento de llamada de modo de maximizar sus probabilidades de apareamiento.

CAPÍTULO 1

Objetivo

Estudiar la respuesta electrofisiológica de las antenas de hembras de *P. adultera* a los componentes químicos individuales y a la mezcla de la feromona sexual.

Introducción

Respuesta electrofisiológica (GC-EAD y EAG)

Determinar cuáles son las moléculas odoríferas relevantes en la modulación del comportamiento de los animales es uno de los desafíos más importantes en la Ecología Química. En este sentido, el sistema olfativo de los insectos, y particularmente el sistema nervioso periférico, es un excelente modelo que ofrece la posibilidad de realizar estudios electrofisiológicos analizando la respuesta de la totalidad de la antena mediante la técnica denominada electroantenograma (EAG), o de una única sensilia olfativa mediante la técnica de registro en sensilio único (SSR, por sus siglas en inglés) frente a moléculas volátiles. Fue el biólogo alemán Dietrich Schneider (1957) quien reportara por primera vez estudios electrofisiológicos en antenas de insectos. Desde entonces, las técnicas más comúnmente empleadas para estudiar la selectividad y sensibilidad de los insectos por distintos olores y para identificar moléculas con actividad biológica (ej.: feromonas) son el EAG y su variante acoplada a la cromatografía gaseosa (GC) en la cual el EAG actúa como detector, técnica conocida como GC-EAD. En el EAG se ubica la antena, ya sea unida al insecto o inmediatamente de ser removida, entre dos electrodos y se registra la diferencia de potencial entre los electrodos cuando la superficie de la antena es expuesta a un pulso de flujo de aire que transporta un estímulo volátil (Fig. 3). La medida es extracelular, y la diferencia de potencial observada resulta de la suma de los potenciales de las neuronas olfativas (ORNs) que expresan receptores olfativos (ORs) que responden al estímulo presentado.

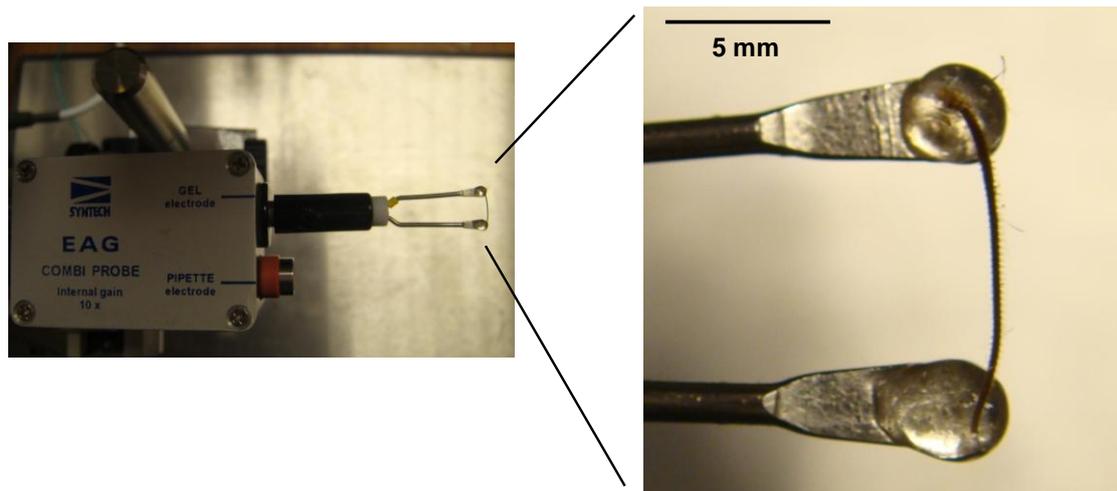


Figura 3. Antena de hembra de *P. adultera* ubicada entre los electrodos de una sonda de electroantenograma, luego de una pre-amplificación en la misma sonda (x10), la señal se adquiere en un amplificador de alta impedancia (IDAC2, Syntech, no se muestra).

Por su parte, la técnica GC-EAD consiste en inyectar una pequeña cantidad del estímulo volátil (en el orden de ng) en un cromatógrafo de gases. Al momento de la inyección, la muestra se vaporiza y los distintos componentes del estímulo, usualmente mezclas de compuestos, son transportados y separados a lo largo de la columna cromatográfica en base a la solubilidad relativa en la fase estacionaria líquida y a sus presiones de vapor, resultando en distintos tiempos de retención. Al final de la columna el efluente se divide en partes iguales de manera que una fracción se dirige al detector por ionización de llama del cromatógrafo (FID, por su sigla en inglés), y otra a la antena del insecto (EAD). De esta manera se obtiene en simultáneo la respuesta química y electrofisiológica a cada componente del estímulo separado en la columna cromatográfica. Cada pico observado en el cromatograma corresponde a un compuesto, permitiendo determinar la actividad de la antena a los mismos de manera cualitativa (presenta actividad o no) y cuantitativa (respuesta en mV) (Fig. 4).

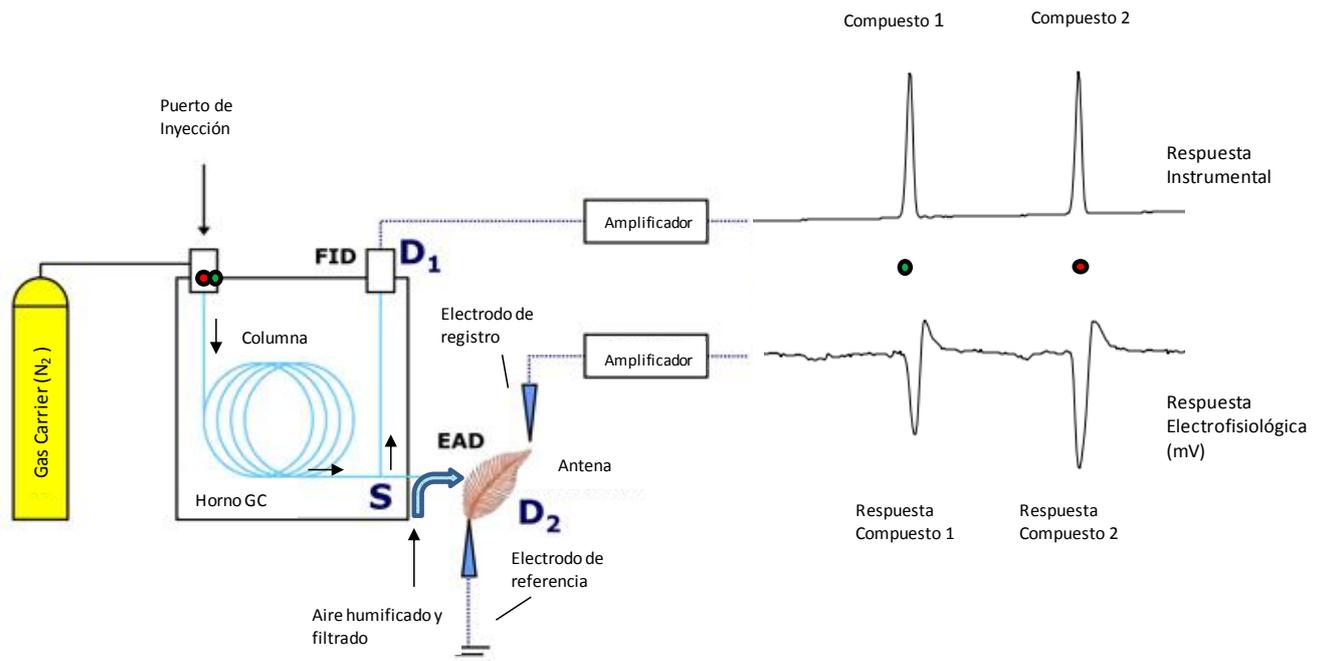


Figura 4. Esquema de Cromatógrafo de Gases acoplado a electroantenograma (GC-EAD). La mezcla de compuestos es inyectada a través del puerto de inyección, pasando en fase vapor a la columna cromatográfica ubicada en el horno. A medida que la temperatura del horno aumenta, los compuestos son separados a lo largo de la columna y en el punto S (split) se divide el efluente, yendo una mitad hacia el detector de ionización por llama del GC (FID) y la otra mitad hacia la antena (EAD). Una vez que sale de la columna cromatográfica, el efluente es transportado por un flujo continuo de aire hacia la antena del insecto. La señal generada en simultáneo por el FID y por el EAD (diferencia de potencial entre ambos extremos de la antena) es amplificada y se determina la respuesta electrofisiológica de la antena a cada componente de la mezcla.

Materiales y Métodos

Insectos

Las hembras de *Pseudaletia adultera* utilizadas fueron obtenidas de una colonia de laboratorio del Laboratorio de Ecología Química, establecida a partir de la colecta de larvas de campo del litoral noroeste uruguayo (EEMAC, Paysandú, 32°38'S, 58°06'O), mantenida a 23 ± 2 °C, 65 ± 5 % HR bajo un fotoperiodo invertido de 14:10 (Luz:Oscuridad), y periódicamente renovada con insectos de campo. En el laboratorio las larvas fueron mantenidas en recipientes plásticos (20 x 10 x 10 cm) en grupos de 20-30 individuos y alimentadas con dieta artificial específica para noctuides conteniendo porotos de manteca (100 g), levadura seca (15 g), germen de trigo (50 g), sémola de maíz (50 g), ác. sorbico (1 g), ác. asórbico (3 g) y agar (18 g) en 400 mL de agua. En base a la morfología del segmento terminal del abdomen los individuos fueron sexados y las hembras separadas y mantenidas de forma individual. Inmediatamente luego de emergidas las hembras adultas fueron asignadas aleatoriamente a los distintos tratamientos experimentales y alimentadas *ad libitum* con una dieta artificial a base de agua destilada y miel al 10%.

GC-EAD y EAG

Para determinar la respuesta de las antenas de las hembras de *P. adultera* a los componentes individuales de la feromona sexual se utilizó un GC-EAD compuesto por un GC HP 5890 Series II Gas Chromatograph, equipado con una columna Permabond SE-52 (25 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm espesor de película), operando a un flujo constante de gas carrier a 2 mL/min (H₂). La temperatura inicial del horno fue de 120 °C,

programándose una rampa de ascenso de temperatura desde 120 °C (1 min) a 280 °C a una velocidad de 7 °C/min. La inyección (1 µl) del estímulo olfativo a evaluar fue en modo *splitless*, con la temperatura del inyector y detector a 220 °C y 280 °C, respectivamente. Para la división del efluente de la columna se utilizó una pieza vítrea divisora (SGE Inc., USA), utilizando N₂ como gas suplementario (make-up gas, 30 mL/min), de manera que ambas fracciones del estímulo pasen simultáneamente a través de los detectores FID y EAD. Como estímulo se utilizó una mezcla sintética de los tres componentes conocidos de la feromona sexual, (Z)-11-hexadecenal, (Z)-11-hexadecen-1-ol y acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo (Pherobank, The Netherlands) en iguales proporciones (1:1:1, 10 ng/µL cada componente). La fracción efluente de la columna hacia el EAD fue calentada a 240 °C y transportada hacia la antena a través de un tubo de vidrio (1 cm de diam) mediante una corriente de aire (150 mL/min) humidificado y filtrado con carbón activado. Como fue mencionado anteriormente, la antena es dispuesta entre dos electrodos (soportes) metálicos con un gel conductor de electricidad (Fig. 3). La señal eléctrica de la antena es primero amplificada (10X) por una sonda pre-amplificadora y luego amplificada con un amplificador de alta impedancia (IDAC 2), de manera de poder analizar la señal utilizando el software GC-EAD 2014 (v. 1.2.5) (equipamiento y software: Syntech, Alemania).

Se utilizaron hembras vírgenes en edad reproductiva de 4-5 días de edad (N = 13) anestesiadas con frío (5-10 min), registrando la respuesta de una antena de cada individuo, extirpada y dispuesta entre los electrodos. Asimismo, con el objetivo de realizar un estudio comparativo, antenas de machos vírgenes (N = 16) también fueron evaluadas.

Para determinar la respuesta de las antenas de las hembras de *P. adultera* a mezclas de los componentes de la feromona sexual de distinta composición se utilizó el mismo EAG anteriormente descrito, sin acoplarlo al GC. En este caso, los estímulos fueron aplicados a la antena mediante un dispositivo controlador de estímulos volátiles (Stimulus Controller CS-SS, Syntech). Este equipo opera generando un flujo de aire constante, humificado y filtrado con carbón activado, que es dirigido hacia la preparación de la antena. A su vez, el controlador presenta una segunda salida de aire que en intervalos de tiempo programado genera un segundo flujo de aire como pulsos de duración regulable, que es conducido hacia una pipeta *Pasteur* que contiene un papel de filtro (1.5 x 1 cm) donde se aplicó el estímulo a través de una solución de los componentes en hexano (10 µg de la mezcla de componentes en 10 µL de hexano). Este flujo de aire transporta el estímulo volátil al flujo de aire principal, llegando así a la antena en fracciones de segundo. Los estímulos sintéticos evaluados fueron: el componente mayoritario, (Z)-11-hexadecen-1-ol; la mezcla binaria (Z)-11-hexadecen-1-ol + acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo [95:5 (OH:OAc)]; y la mezcla terciaria (Z)-11-hexadecen-1-ol + acetato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo + (Z)-11-hexadecenal [95:5:0.1 (OH:OAc:Ald)]. Como control se utilizó hexano (10 µL) aplicado en idénticas condiciones. El diseño experimental consistió en exponer cada antena de hembra a 3 series de una secuencia de los cuatro tratamientos (hexano control primero y luego los tres estímulos en orden aleatorio) de la siguiente manera: cada 1 minuto, el controlador de estímulo generó 3 pulsos de 0.3 seg de duración, con una separación de 3 seg entre pulsos. Entre cada intervalo de 1 minuto el estímulo fue cambiado. A su

vez, los estímulos fueron renovados para cada nueva antena. Fueron testeadas un total de $N = 8$ antenas de hembras vírgenes de 4-6 días de edad.

Análisis estadísticos

La respuesta en el GC-EAD de antenas de hembras y machos fue analizada utilizando un modelo lineal mixto (MLM), incluyendo la antena de cada individuo como efecto aleatorio. La respuesta de la antena (medida en mV) fue transformada a *log* para homogeneizar la varianza (Test Fligner, $P > 0.05$). De manera análoga, para analizar la respuesta en el EAG de antenas de hembras al componente mayoritario de la feromona (OH), así como a la mezcla binaria (OH:OAc) y terciaria (OH:OAc:Ald) se empleó un MLM, modelando la variabilidad entre antenas como efecto aleatorio y transformando (*log*) la variable de respuesta. Como fue mencionado en la metodología, el protocolo experimental para obtener la respuesta EAG consistió en exponer cada antena a 3 series de una secuencia de hexano primero y luego los tres estímulos en orden aleatorio, recibiendo tres pulsos consecutivos de cada tratamiento en cada serie. De esta manera, cada antena fue expuesta 9 veces a cada tratamiento (3 series, 3 pulsos/serie). El valor de la respuesta de una antena a cada estímulo, valor utilizado para el análisis estadístico, resulta del promedio de las respuestas a cada pulso dentro de una serie, restando el promedio de las tres respuestas al hexano (control) de la serie correspondiente, para luego promediar esta respuesta con las correspondientes de las otras dos series. Por último, en todos los modelos se analizaron los residuales para verificar la distribución de los errores y la distribución normal de los efectos aleatorios. Los coeficientes de regresión de los modelos, los

errores estándar, el estadístico (t) y los valores de probabilidad se muestran en la Tabla 1. Asimismo, los promedios de las respuestas son presentados en las figuras como la media \pm EE. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico R Statistical Software (R Core Team 2014).

Resultados

Electroantenograma (GC-EAD y EAG)

Las antenas de ambos sexos de *P. adultera* respondieron a los tres componentes individuales de la feromona sexual evaluados (GC-EAD, Fig. 5A). Sin embargo, la respuesta de las hembras fue de menor amplitud que la de los machos ($P < 0.001$, MLM). Además, el patrón de respuesta difirió entre los sexos, provocando el componente mayoritario (Z11-16:OH, *aprox.* 95% de la mezcla natural) la mayor respuesta en la antena de machos, pero la menor en hembras ($P < 0,001$, MLM, Fig. 5B). Asimismo, al evaluar la respuesta de antenas de hembras a distintas mezclas de los componentes de la feromona sexual, se observa que todas responden significativamente al Z11-16:OH, a la mezcla binaria (Z11-16:OH + Z11-16:OAc), y a la terciaria (Z11-16:OH + Z11-16:OAc + Z11-16:Ald), con respecto al control (hexano) (EAG, Fig. 6A). A su vez, la respuesta de la antena a la mezcla binaria es significativamente mayor a la provocada únicamente por el componente mayoritario ($P < 0.001$, MLM) o la mezcla terciaria ($P < 0.05$, MLM)(Fig. 6B).

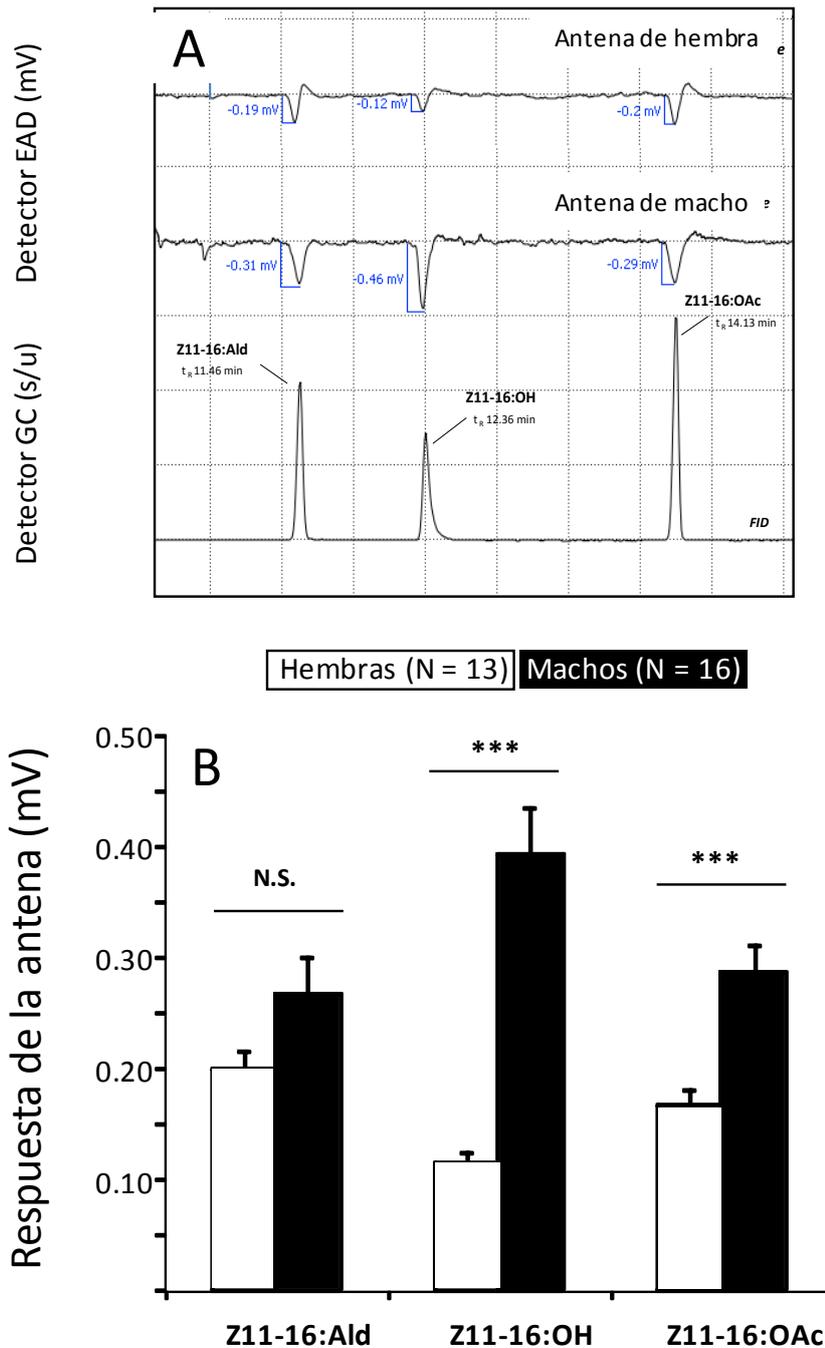


Figura 5. Típica respuesta en GC-EAD (A) y promedio de amplitudes de respuesta (B) de antenas de hembras (blanco, N = 13) y machos (negro, N = 16) de *P. adultera* a los tres componentes de la feromona sexual: Z11-16:Ald, Z11-16:OH y Z11-16:OAc (relación del área de picos: 1.1 : 1 : 1.4, respectivamente). En A: t_R indica tiempos de retención en cromatógrafo de gases. En B: N.S. = no significativo; *** $P < 0.001$.

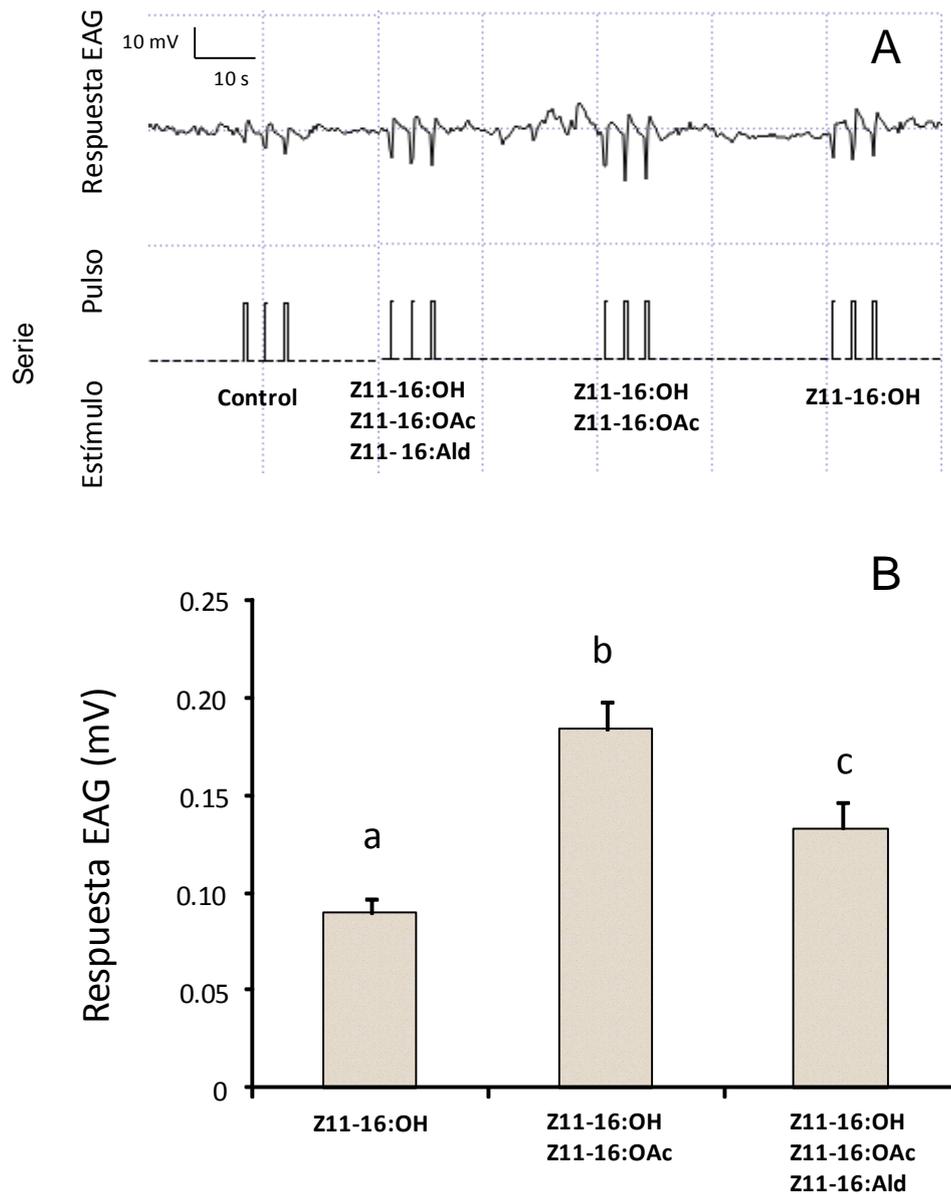


Figura 6. (A) Típica respuesta en EAG de la antena de una hembra virgen de *P. adultera* a los componentes de la feromona sexual de la especie (mezclas de estándares sintéticos y hexano como control. Dosis: 10 μ g en 10 μ L de hexano. Mezcla binaria: 95:5 (OH:OAc); mezcla ternaria: 95:5:0.1 (OH:OAc:Ald). (B) Promedio de las amplitudes de respuesta (media \pm EE, N = 8 antenas) al componente sintético mayoritario de la feromona sexual y a las mezclas binaria y ternaria (letras diferentes indican respuestas significativamente distintas; respuesta al hexano sustraída para el análisis).

Tabla 1. Coeficientes estimados de los modelos estadísticos y sus valores de significancia de la respuesta de antenas de *Pseudaletia adultera* en GC-EAD y EAG, ante los componentes de la feromona sexual de *P. adultera*.

Efecto	Componente/ Mezcla	Sexo	Estimado ^a	Error Est. ^a	t valor	P-valor
Respuesta electrofisiológica GC-EAD	Z11-16:Ald	Hembra	-1.652	0.096	1.94	0.0627
		Macho	0.251	0.129		
	Z11-16:OH	Hembra	-2.186	0.096	9.15	< 2e-16
		Macho	1.184	0.129		
	Z11-16:OAc	Hembra	-1.803	0.096	3.88	0.0006
	Macho	0.502	0.129			
Respuesta electrofisiológica EAG	Z11-16:OH	OH vs	-2.495	0.093	6.44	< 2e-16
		OH:OAc	0.739	0.115		
	Z11-16:OH Z11-16:OAc	OH:OAc:Ald	0.362	0.114	3.15	0.0029
		OH:OAc vs	-1.756	0.093		
	Z11-16:OH Z11-16:OAc	OH:OAc:Ald	-0.377	0.114	-3.29	0.0019
		Z11-16:Ald				

^a Coeficientes estimados y sus errores estándar se muestran en la escala de la función de conexión del modelo (ver Figuras 5 y 6 para los valores reales de las respuestas; ver Tabla S1 para el detalle de los modelos).

CAPÍTULO 2

Objetivo

Estudiar el efecto de la feromona sexual co-específica en la expresión del comportamiento de llamada en hembras vírgenes de *P. adultera*.

Introducción

Respuesta comportamental

En el estudio de las moléculas odoríferas relevantes en la vida de los organismos además del estudio químico y electrofisiológico, otro aspecto crucial son los bioensayos. Obtener una respuesta electrofisiológica frente a determinados compuestos odoríferos (OSN con receptores para los compuestos) no necesariamente implica que dichos compuestos desencadenen respuestas comportamentales en los organismos que las perciben. Es por esto que deben realizarse, en concierto, estudios electrofisiológicos y comportamentales para caracterizar y poder concluir en relación a la actividad biológica de un compuesto. En este estudio fue diseñado un bioensayo en el que los estímulos volátiles se movieron en una corriente de aire hasta las hembras de *P. adultera* y el comportamiento de llamada fue observado.

Materiales y Métodos

Comportamiento de llamada

Para determinar la respuesta comportamental de hembras vírgenes de *P. adultera* a la feromona sexual de hembras co-específicas, se comparó la llamada sexual de hembras individuales expuestas a una corriente de aire proveniente de hembras sexualmente maduras y en postura de llamada, con hembras individuales expuestas a una corriente de aire limpio como control.

Las hembras provenientes de la colonia y criadas en las condiciones descritas en el capítulo 1, fueron separadas en fase de pupa, pesadas y clasificadas en tres grupos: pequeñas, promedio y grandes ya que el tamaño corporal puede afectar el comportamiento de llamada (Harari et al. 2011). Los experimentos fueron realizados

solo con hembras vírgenes pertenecientes al grupo promedio (peso de pupa: 0.23 ± 0.04 g, media \pm desvío estándar). Como la duración de la fase de pupa afecta el comportamiento de llamada en *Pseudaletia sequax* Franclemont, una especie emparentada (Almeida et al. 2008), solo pupas con un desarrollo entre 8 - 10 días fueron utilizadas. A partir de emergidas, las hembras fueron dispuestas de forma individual, bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que las utilizadas en el mantenimiento de la colonia, en cajas experimentales plásticas transparentes (20 x 20 cm base x 24 cm altura) con dieta artificial *ad libitum* de agua-miel al 10 %. Las cajas fueron tapadas con vidrio y recubiertas en sus caras laterales con papel opaco a fin de evitar el intercambio de estímulos químicos y visuales, respectivamente, entre individuos experimentales.

Para transferir el estímulo odorífero a los recipientes, se diseñó un sistema de tubos conectores de teflón (6 mm diam. int.) a través de los que se pasó un flujo de aire de calidad medicinal/respirable, obtenido desde un cilindro de aire comprimido, previamente humidificado por barboteo en agua y filtrado con carbón activado (Fig. 7). El aire del cilindro se dividió primeramente en dos partes iguales, y cada una de ellas fue medida y regulada mediante rotámetros a 2 lt/min. Una de las dos fracciones de aire se dirigió hacia una caja conteniendo hembras vírgenes adultas en posición de llamada (n = 8), y la otra fracción a una caja igual a la anterior y vacía. Las cajas se sellaron en forma hermética para evitar la pérdida de aire, y de cada una se extrajo un tubo efluente que se dividió en 6 fracciones iguales mediante tubos de teflón, dirigiendo así el aire a 6 cajas experimentales conteniendo una hembra. De este modo, 6 hembras vírgenes individuales, a partir del primer día de emergidas, recibieron aire conteniendo feromona sexual de hembras co-específicas, y 6 hembras en idénticas

condiciones recibieron aire limpio como control. El estímulo químico a evaluar fue por lo tanto la feromona natural de la especie, en las cantidades producidas por las hembras, y en el período de la fase oscura que naturalmente es emitida la feromona. El grupo de hembras utilizadas como fuente de feromona se compuso con individuos que ya habían llamado el día anterior al inicio del experimento. Asimismo, al 4^o día de observación, estas hembras fueron sustituidas por un nuevo grupo de hembras (n = 8) adoptando el mismo criterio. A lo largo del experimento, siempre hubo un mínimo de 4 hembras de la caja experimental expresando el comportamiento de llamada en la hora pico de llamada.

El comportamiento de llamada de las hembras *P. adultera* es visible a simple vista: la hembra protruye el ovipositor y curva su abdomen hacia adentro, mientras despliega sus alas ligeramente sobre el abdomen y realiza un aleteo característico (Fig. 8). Se registró este comportamiento a través de un muestreo de barrido en intervalos de 10 minutos, a lo largo de la fase oscura durante 8 noches consecutivas. De esta manera se determinó la edad a la que cada hembra llamó por primera vez, la hora de inicio y duración del llamado en cada noche, y la proporción de hembras llamando a lo largo de la fase oscura. Un total de 30 hembras por tratamiento fueron observadas (6 hembras x tratamiento x 5 réplicas), pero 2 hembras expuestas a feromona sexual de co-específicas y 5 hembras control no llamaron, por lo que fueron excluidas de los análisis. Para todas las observaciones se utilizó una luz roja Philip PAR38 E (ver Fig. 7).

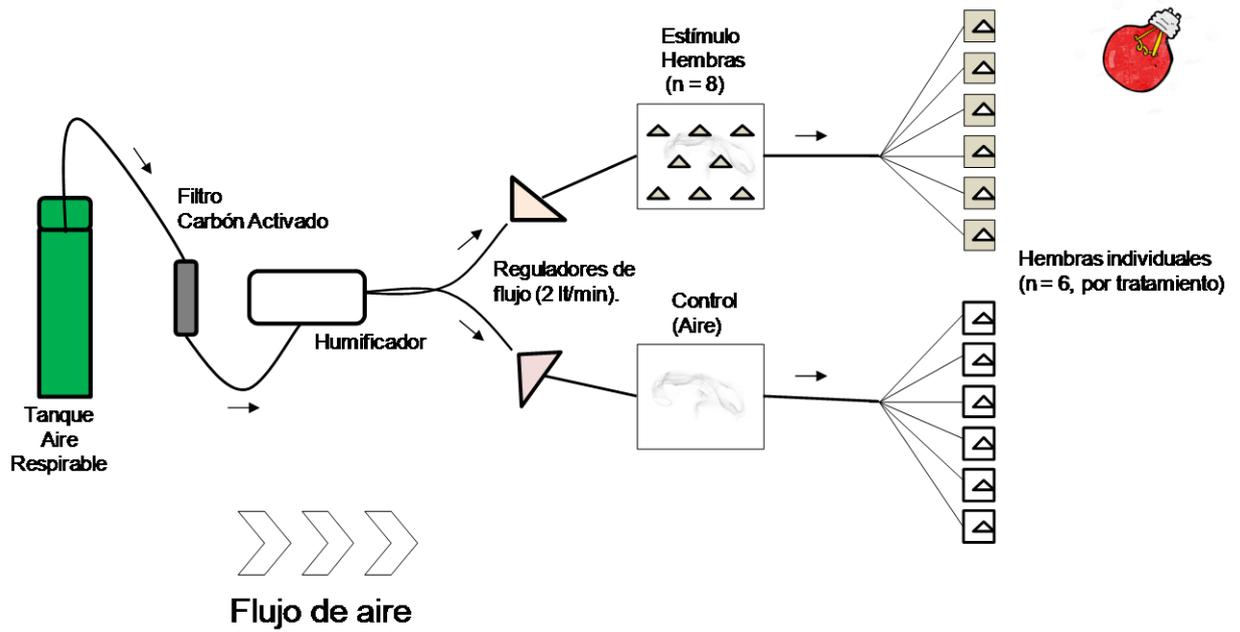


Figura 7. Esquema del dispositivo experimental para el estudio del comportamiento de llamada de hembras de *P. adultera*. El flujo de aire es generado a partir de un tanque de aire respirable que luego es filtrado y humificado. A continuación el flujo se divide en dos, yendo una mitad hacía la caja experimental estímulo con hembras maduras sexualmente y la otra hacía la caja experimental vacía (control). La salida de cada caja experimental se divide a su vez en 6 de manera que cada hembra individual recibe una fracción de aire cargado con feromona sexual co-específica o control.



Figura 8. Hembra virgen de *P. adultera* en posición de llamada.

Análisis estadísticos

La duración e inicio del llamado, y la proporción de hembras llamando, fueron calculados y analizados estadísticamente considerando la edad de llamado sexual (noches de llamada) en lugar de la edad cronológica, ya que no todas las hembras inician el llamado sexual a la misma edad cronológica, y existe asimismo un efecto de la edad de llamada en el comportamiento de emisión de feromona sexual (Turgeon & McNeil 1982; Rehmann, Altesor, McNeil & González 2016).

Posterior a testear la homogeneidad de varianza de los datos, un modelo lineal generalizado (GLM) con errores de distribución Poisson fue utilizado para evaluar el efecto de los tratamientos (feromona sexual de co-específicas vs aire control) en la edad a la que las hembras iniciaron el llamado sexual. Para evaluar la proporción de hembras llamando, así como el inicio y la duración, se utilizaron modelos lineales generalizados con efectos mixtos (GLMM). Estos modelos fueron seleccionados para remover el efecto de la pseudo-replicación; esto es, observar a la misma hembra en días consecutivos a lo largo del experimento, y considerar el posible efecto de las réplicas experimentales. La frecuencia de hembras llamando fue modelada con errores de distribución Binomial, mientras que las otras 2 variables con errores de distribución Poisson. En todos los modelos se analizaron los residuales para verificar la distribución de los errores y la distribución normal de los efectos aleatorios. Los modelos fueron inicialmente corridos incluyendo todas las variables independientes y sus interacciones. Interacciones no significativas ($P > 0.05$) fueron subsecuentemente removidas del modelo, y el modelo simplificado fue elegido luego de la comparación con el modelo previo (Likelihood ratio test, $P > 0.05$, Tabla S1). Los coeficientes de

regresión de los modelos, los errores estándar, el estadístico (z) y los P-valores se muestran en la Tabla 2. En resultados, los promedios son presentados como la media \pm error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico R Statistical Software (R Core Team 2014).

Resultados

Edad al primer día de llamada

Hembras expuestas a feromona sexual de co-específicas no mostraron diferencias significativas en la edad que iniciaron el llamado (4.4 ± 0.3 días, $N = 28$) respecto a las expuestas a aire limpio (4.5 ± 0.3 días, $N = 25$) ($P > 0.05$, Fig. 9).

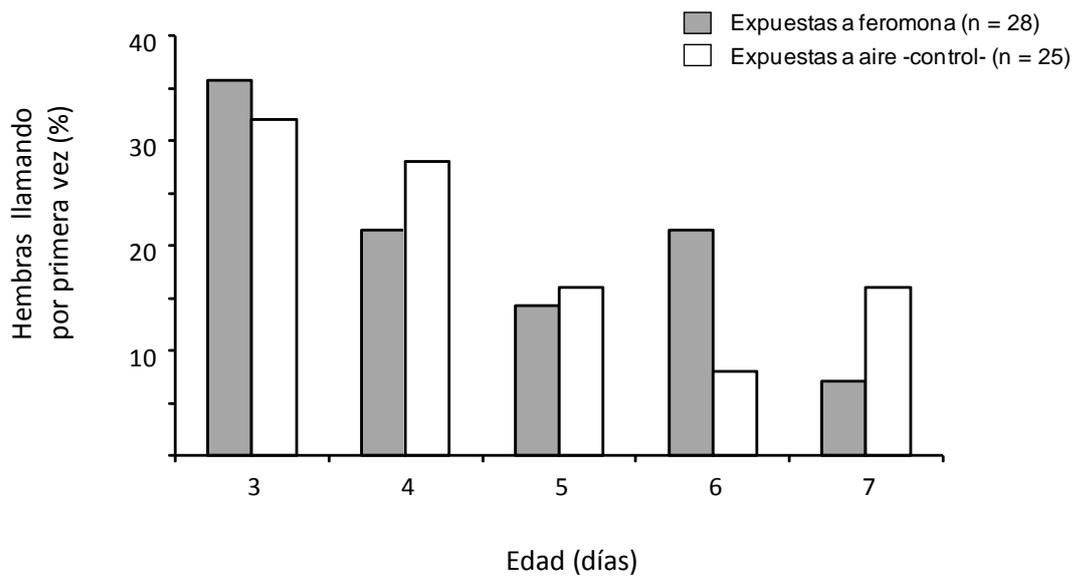


Figura 9. Edad de hembras vírgenes de *P. adultera* al primer día de llamada. Barras grises: hembras expuestas a feromona sexual ($N = 28$; promedio de inicio de llamada = 4.4 días). Barras blancas: hembras expuestas a aire limpio (control; $N = 25$; promedio de inicio de llamada = 4.5 días).

Patrón temporal del llamado, duración e inicio

Al analizar el patrón temporal del llamado a lo largo de la fase oscura, esto es, número de hembras realizando el comportamiento de llamada en cada intervalo de la fase oscura, considerando las tres noches de llamada de manera conjunta, se observa que las hembras expuestas a feromona co-específica adelantaron el pico de llamada respecto a las hembras control ($P < 0.05$, GLMM). Este efecto es marcado en la primer noche ($P < 0.05$, GLMM) pero se ve diluido en la segunda ($P > 0.05$, GLMM) y es

marginalmente no significativo durante la tercer noche de llamada ($P = 0.06$, GLMM), denotando un efecto de los días de llamada en el patrón temporal del llamado cuando las noches son analizadas de manera independiente (Fig. 10).

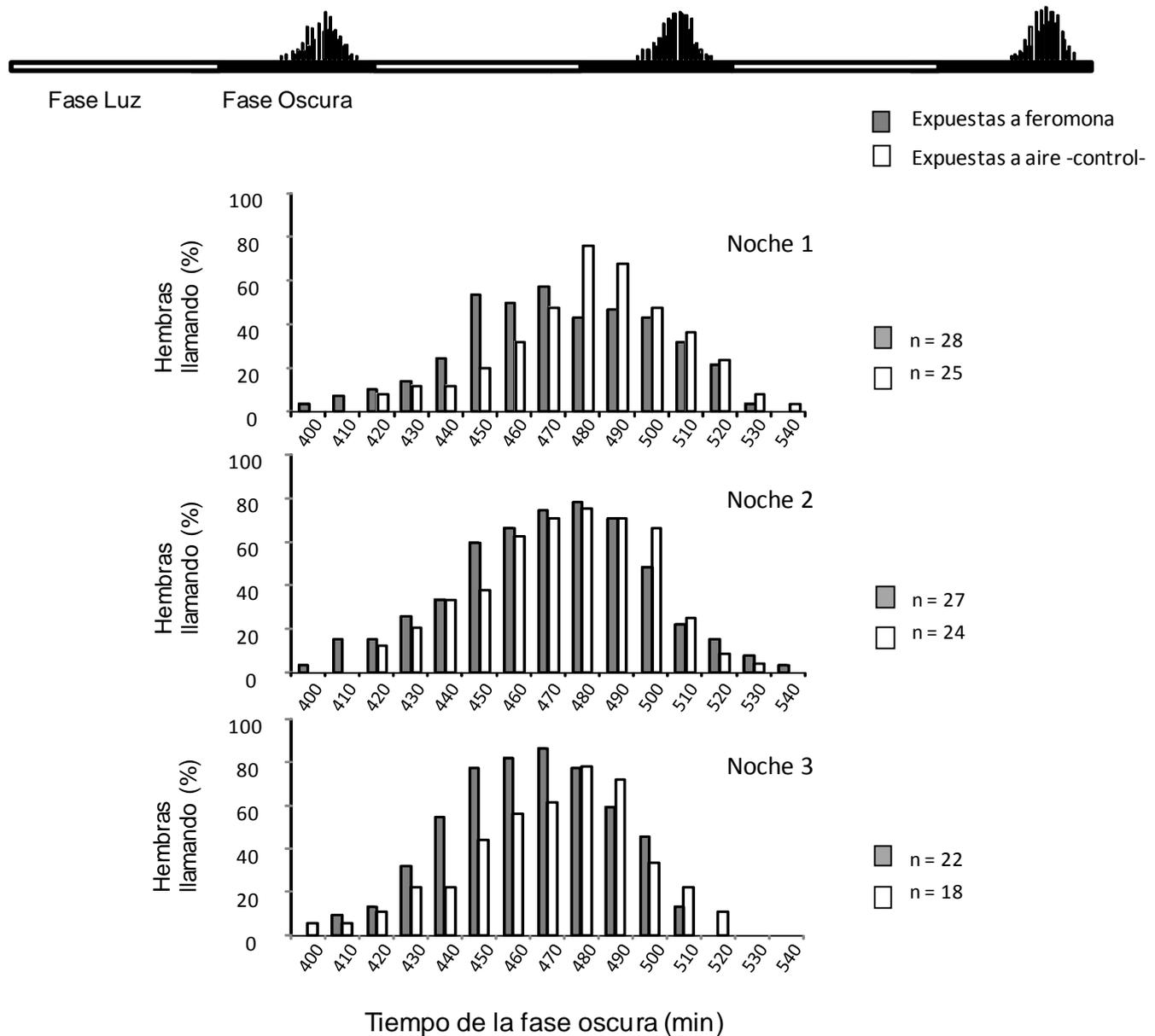


Figura 10. Hembras de *P. adultera* llamando (%) a lo largo de la fase oscura en las primeras tres noches de llamada, cuando son expuestas a feromona co-específica (gris) o aire control (blanco).

Como previamente fue reportado para un gran número de especies de polillas (McNeil 1991), y en particular para *P. adultera* (Rehermann, Altesor, McNeil & González 2016), la duración del llamado sexual aumenta con los sucesivos días de llamada en hembras vírgenes ($P < 0.01$, GLMM, Fig. 11A). Al comparar la duración de llamada en ambos tratamientos, las hembras en presencia de feromona de conspecíficas no mostraron diferencias respecto a la duración de la llamada de las hembras control para la primer y segunda noche de llamada ($P > 0.05$, GLMM) pero sí para la tercera ($P < 0.05$, GLMM), en donde las primeras llamaron significativamente por más tiempo (Fig. 11A). Las hembras expuestas a feromona sexual llamaron 41.1 ± 2.7 min en la primer noche de llamada, incrementando el llamado en 12.6 y 13.9 min en la segunda y tercer noche de llamada, respectivamente. Las hembras control por su parte llamaron 38.8 ± 3.3 min en la primer noche, extendiendo la llamada en 9.9 y 5.6 min en las siguientes dos noches.

El aumento generalizado en la duración del llamado se debe a que las hembras iniciaron el llamado más temprano en las sucesivas noches de llamada ($P < 0.05$, GLMM, Fig.11B), y si bien no hay diferencias entre tratamientos ($P = 0.06$, GLMM), se observó una tendencia a que hembras expuestas a feromona de co-específicas inicien el llamado sexual más temprano que las hembras control (Fig. 11B). Cuando cada noche es examinada de manera independiente se observa que en la tercer noche las hembras adelantaron significativamente el inicio del llamado ($P < 0.05$, GLMM).

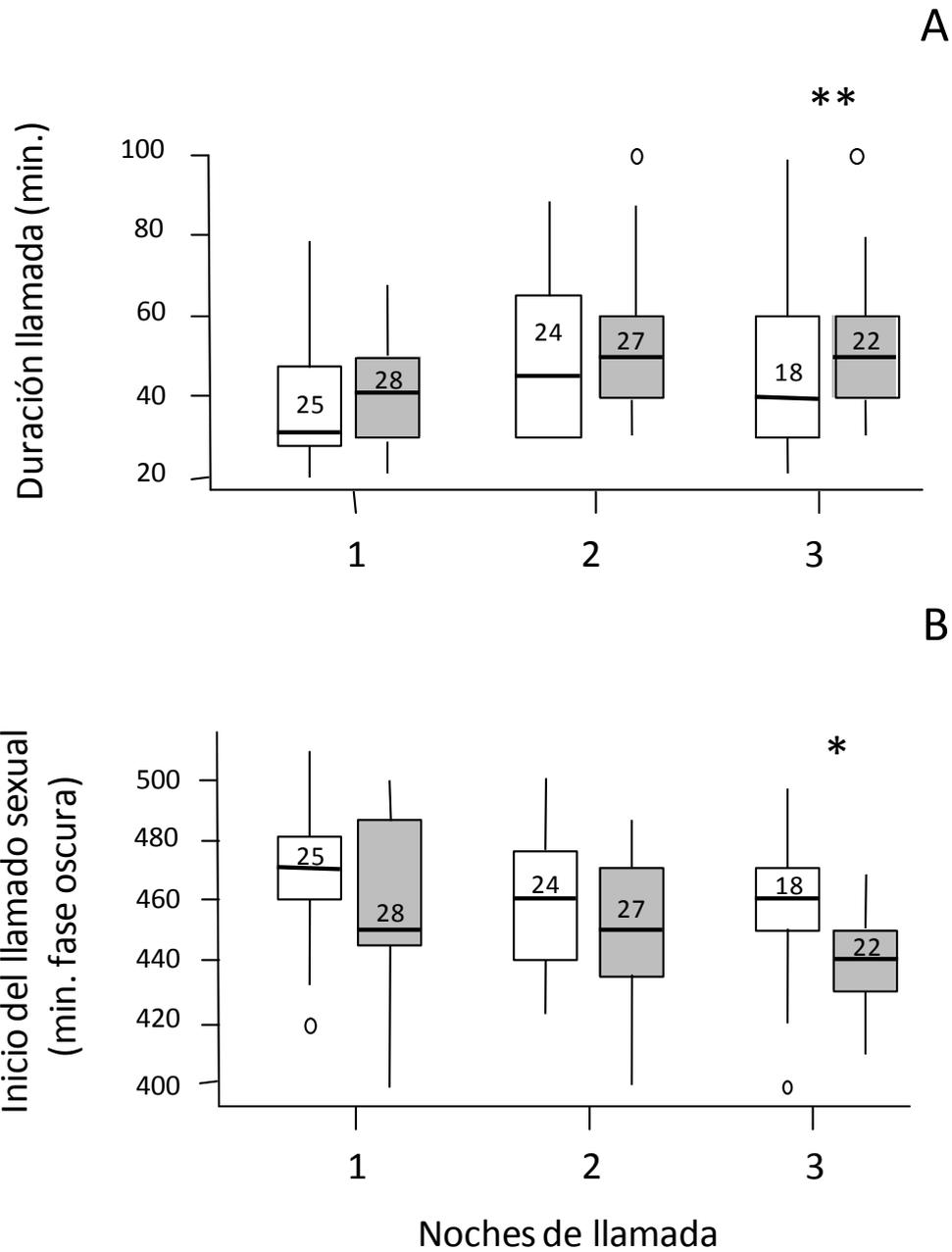


Figura 11. Duración (A) e inicio (B) del comportamiento de llamada de hembras vírgenes de *P. adultera* expuestas a feromona sexual de co-específicas (grises) y aire limpio (blancas) para las primeras tres noches de llamada. Número dentro de las cajas indican número de hembras; cajas indican 1er y 3er cuartil; líneas verticales indican dispersión (1.5 veces el rango inter-cuartil); círculos representan datos atípicos (outliers); * indica $P < 0.05$ entre tratamientos.

Tabla 2. Coeficientes estimados de los modelos estadísticos y sus valores de significancia de la respuesta del comportamiento de llamada de hembras *Pseudaletia adultera* expuestas a feromona sexual co-específica o aire control.

Efecto	Día llamada	Tratamiento	Estimado ^a	Error Est. ^a	z valor	P-valor
Edad al primer llamado		Exp. Aire ^b	1.499	0.130		
		Exp. Feromona ^c	1.487	0.010	0.089	0.929
Duración de la llamada		Exp. Aire	3.526	0.075		
		Exp. Feromona	3.675	0.080	1.86	0.063
		Días llamada	0.089	0.015	5.70	<0.001
	Día 1	Exp. Aire	3.620	0.084		
		Exp. Feromona	3.686	0.043	0.96	0.335
	Día 2	Exp. Aire	3.808	0.074		
		Exp. Feromona	3.939	0.086	1.53	0.126
	Día 3	Exp. Aire	3.660	0.078		
		Exp. Feromona	3.927	0.090	2.96	0.003
	Inicio del llamado		Exp. Aire	6.162	0.013	
Exp. Feromona			6.138	0.012	-1.9	0.062
Días llamada			-0.015	0.004	-2.9	0.004
Día 1		Exp. Aire	6.150	0.009		
		Exp. Feromona	6.130	0.012	-1.6	0.102
Día 2		Exp. Aire	6.126	0.010		
		Exp. Feromona	6.109	0.013	-1.3	0.194
Día 3		Exp. Aire	6.125	0.011		
		Exp. Feromona	6.092	0.014	-2.2	0.026
# Hembras llamando			Exp. Aire	-3.165	0.779	
	Exp. Feromona*MFO		0.005	0.002	-2.38	0.017
	Día 1	Exp. Aire	-5.549	1.349		
		Exp. Feromona*MFO	-0.007	0.004	-2.0	0.046
	Día 2	Exp. Aire	-2.272	1.205		
		Exp. Feromona*MFO	-0.003	0.003	-0.84	0.399
	Día 3	Exp. Aire	-1.204	1.297		
		Exp. Feromona*MFO	-0.005	0.004	-1.84	0.065

^a Coeficientes estimados y sus errores estándar se muestran en la escala de la función de conexión del modelo (ver Figuras (9, 10 y 11) para los valores reales de las respuestas; ver Tabla S1 para el detalle de los modelos).

^b Exp. Aire: Hembras vírgenes expuestas a aire (control)

^c Exp. Feromona: Hembras vírgenes expuestas a feromona sexual de co-específicas

^d MFO: Minutos de la fase oscura

* Interacción entre las variables *Tratamiento* (Exp. Feromona vs Exp. Aire) y *MFO*.

Discusión General

Los resultados de esta tesis muestran que las hembras de *P. adultera* detectan a nivel periférico feromona sexual de otras hembras, tanto los tres componentes principales en forma individual, como sus mezclas en diferentes proporciones. Asimismo, las hembras modifican su comportamiento de llamada en presencia de compuestos volátiles provenientes de hembras co-específicas en postura de llamada, sin que participe en esta interacción otro tipo de comunicación que la mediada por sustancias volátiles, muy probablemente feromonas sexuales.

Se ha propuesto que la plasticidad en el comportamiento de llamada en respuesta a feromona sexual co-específica podría incrementar la probabilidad de apareamiento de las hembras en un contexto de competencia intra-sexual. Generalmente la ventana temporal en la que los machos lepidópteros responden a la feromona sexual es mayor al período en que las hembras llaman (Sadek et al. 2012), por lo que aumentar la duración del llamado es una estrategia potencial para aumentar la probabilidad de atraer machos. En línea con lo anterior, se ha demostrado para varias especies que la señalización aumenta con la edad mientras la hembra se mantiene virgen (Umbers et al., 2015). Una hipótesis razonable que se propone es que a medida que envejecen, las hembras vírgenes incrementan sus esfuerzos de señalización de manera de asegurar una cópula para fertilizar sus huevos (Turgeon & McNeil 1982, Webster & Cardé 1982, Delisle & Royer 1994, Umbers et al. 2015).

En nuestros experimentos con *P. adultera* todas las hembras se mantuvieron vírgenes, tanto las expuestas a feromona como las hembras control, y el patrón general fue un adelanto en el inicio de la llamada con las sucesivas noches. Sin

embargo, este cambio fue más pronunciado en las hembras expuestas a feromona co-específica, las que mostraron una clara tendencia, significativa en la tercera noche, a llamar más temprano que las hembras control (Fig. 11B). Asimismo, la duración total de la llamada fue significativamente mayor en la tercera noche para las hembras expuestas a feromona co-específica, mostrando la misma tendencia en noches anteriores (Fig. 11A). Al considerar de manera más detallada el patrón temporal de llamada durante períodos cortos (10 min) de la fase oscura, se observó que en la primer noche de llamada un mayor número de hembras expuestas a feromona co-específica llamó de forma anticipada respecto a las hembras control (Fig. 10). Esta diferencia podría también existir en noches subsecuentes, en las que se observa como una tendencia no significativa. Alternativamente, es posible que durante la primer noche, al detectar feromona co-específica, la estrategia sea anticiparse al llamado, mientras que en las siguientes noches exista una combinación entre llamar antes y hacerlo por más tiempo.

Similares resultados —un adelanto en el inicio de la llamada— han sido reportados para dos especies de tortricidos (Stelinski et al., 2006, 2014) y para *U. ornatrix* (Lim & Greenfield, 2007). Este adelantamiento, en contraposición a una extensión del llamado más tarde en la fase oscura, podría ser ventajoso para la hembra en distintos escenarios; como la competencia con hembras más jóvenes, variaciones temporales en la sensibilidad de los machos, o eventuales cambios en la calidad de los machos atraídos, por ejemplo debido a cópulas anteriores durante la misma noche. Estos factores, desconocidos para *P. adultera*, deberán considerarse en futuros estudios.

Más allá de un análisis restringido a la atracción de machos y sus consecuencias en el éxito reproductivo de las hembras, existen otros rasgos de la historia de vida que pueden asociarse a la autodetección. Las hembras de *P. adultera* no inician el llamado sexual sino hasta varios días después de emerger (Fig. 9), un rasgo que ha sido asociado a especies que migran (McNeil 1987). La mayoría de las especies de noctúdeos que exhiben autodetección son consideradas migratorias, por lo que es posible que las hembras de especies migratorias, al arribar a un nuevo hábitat donde la densidad de individuos es desconocida, utilicen la feromona de co-específicas como clave para censar la abundancia de individuos. Al mismo tiempo, podrían emplear la estrategia de llamada en coro para atraer machos a sitios con elevada concentración de feromona. Sin embargo, si esta estrategia es utilizada, dentro de cada coro existiría competencia hembra-hembra por el acceso a los machos atraídos, como ha sido señalado para el caso de *U. ornatrix*, una especie diurna de Arctiidae (Lim & Greenfield 2007, 2008). Para los noctúdeos en general, y particularmente para *P. adultera* se desconoce la distribución en el campo de las hembras al llamar, y no existen reportes de agregación tipo lek. Sin embargo, considerando las características de las feromonas sexuales femeninas volátiles uno podría pensar en un aumento generalizado de la feromona y en competencia intra-sexual a una mayor escala, por ejemplo, a nivel de parche, sin la necesidad de que las hembras estén agregadas.

Otro rol ecológico relevante de consideración es que la detección de la feromona de hembras co-específicas puede modular tanto la búsqueda de plantas hospederas como la oviposición. En este sentido, Cruz y Eizanguirre (2015) demostraron que estos cambios comportamentales pueden tener consecuencias a nivel de competencia intra e inter-específica por fuentes de alimento, y que la

autodetección no debe considerarse como un fenómeno aislado de la condición fisiológica de la hembra.

La detección de componentes de feromonas sexuales por parte de hembras también puede poseer implicancias evolutivas, específicamente en procesos de especiación y aislamiento reproductivo. Nuestros resultados en electroantenograma muestran una respuesta diferencial de machos y hembras de *P. adultera* a los distintos componentes de la feromona (Fig. 6). El componente mayoritario de la feromona sexual femenina, (Z)-11-hexadecenol, es el que dispara una mayor respuesta en las antenas de machos, como podría esperarse, pero el mismo compuesto se asocia a una menor respuesta en las hembras, las que responden más a los dos componentes minoritarios de la feromona. Esta sensibilidad diferencial entre machos y hembras a nivel periférico probablemente refleja presiones selectivas diferentes en ambos sexos como resultado de funciones diferentes: mientras en machos es clara la función de encontrar a la hembra, para ésta podría servir como un mecanismo para detectar la presencia de hembras de especies relacionadas.

En nuestro sistema de estudio, *P. adultera* co-ocurre con una especie filogenéticamente cercana, *Pseudaletia sequax*, al norte de nuestro país y en el sur de Brasil. La feromona sexual femenina de *P. sequax* fue caracterizada en forma preliminar (Almeida et al. 2008) como una mezcla de los mismos tres componentes identificados en la feromona de *P. adultera*, pero en distintas proporciones relativas. Es posible, por lo tanto, que las hembras de *P. adultera* detecten preferencialmente los componentes mayoritarios emitidos por las hembras de especies relacionadas como *P. sequax*, y modifiquen en algún aspecto la propia emisión de feromonas para evitar la atracción inter-específica. Realizar estudios comparativos en relación a la

comunicación intra- e inter-específica de *P. adultera* y *P. sequax* es uno de nuestros próximos objetivos.

Los costos asociados a la atracción cruzada entre especies podrían implicar una fuerte presión selectiva tanto sobre los machos como sobre las hembras, especialmente en especies relacionadas en regiones de simpatría. En los primeros, es de esperar un refinamiento en los mecanismos de reconocimiento específico, mientras que en las hembras podría preverse una mayor divergencia en la señal, por ejemplo, en las proporciones relativas de componentes en la mezcla que conforma la feromona sexual (Paterson 1985, Symonds & Elgar 2008). En línea con lo anterior, en áreas donde las especies de satúrnidos *Hemileuca electra* y *H. burnsi* co-ocurren, las señales de reconocimiento de pareja difieren más que en áreas de alopatría (McElfresh & Millar 2001). Igualmente, la evolución de respuestas antagónicas a componentes de la feromona de especies simpátridas puede prevenir la atracción cruzada inter-específica. Por ejemplo, cuando las especies hermanas *H. virescens* y *H. subflexa* co-ocurren, la última produce una mayor cantidad relativa (> 5%) de un componente que previene la atracción de machos de *H. virescens*, causando selección direccional (Groot et al. 2006). Sumado a esto, otro mecanismo importante que mantiene el aislamiento reproductivo es la separación en el tiempo de la actividad sexual, sin embargo, aún se conoce poco del rol y la importancia de la diferenciación alocrónica de los ritmos circadianos en la evolución de la comunicación sexual de lepidópteros (Groot 2014). Cualquiera de estos mecanismos probablemente implique autodetección en mayor o menor medida.

Basados en la escasa pero creciente literatura, es evidente que la autodetección de feromona sexual existe en varias familias de lepidópteros y con diversas funciones, tanto a nivel de interacciones intra-específicas como inter-específicas (Schneider et al. 1998, Lim et al. 2007, Sadek et al. 2012). En el caso de las especies nocturnas, la abundancia natural de las hembras es difícil de determinar, pero hay un amplio consenso en que la mayoría de las especies se encuentran en bajas densidades. De hecho, la habilidad de sobrevivir en pequeñas densidades se atribuye a la eficacia del empleo de feromonas sexuales para localizar potenciales parejas durante el comportamiento reproductivo (Cardé & Haynes 2004). A priori, las bajas densidades de individuos podrían contradecir la idea de que la autodetección puede tener un rol ecológico, sin embargo, los componentes de feromonas sexuales femeninas de lepidópteros difunden a lo largo de cientos de metros y son aún detectables (Elkinton et al. 1987), por lo que las hembras estarían expuestas a feromona sexual de co-específicas en condiciones naturales y de baja densidad.

Claramente se necesitan más estudios para establecer patrones generales sobre el rol de la autodetección en lepidópteros y sus posibles implicancias adaptativas y/o evolutivas. Sería beneficioso que se utilicen aproximaciones más estandarizadas para investigar el fenómeno de autodetección. Por ejemplo, en la literatura algunos estudios utilizan (i) hembras co-específicas llamando como estímulo, al igual que en este trabajo, mientras que otros utilizan mezclas sintéticas de feromona, (ii) hembras expuestas a feromona sexual cuando están agrupadas, o cuando están expuestas de manera individual a un flujo de aire con feromona, y (iii) hembras continuamente expuestas a feromona sexual o exposiciones más breves durante el periodo de llamada. Estas diferencias pueden influenciar los resultados obtenidos, algo que se

observa en los estudios de autodetección del noctuideo *Spodoptera littoralis*, donde se reporta que no hay un efecto (Dunkelblum et al. 1987, El-Sayed & Suckling 2005), que hay una disminución de la llamada (Ellis et al. 1980) o incluso un aumento en el comportamiento de llamada (Sadek et al. 2012).

En nuestro trabajo anterior, al estudiar el comportamiento de llamada en hembras agrupadas de *P. adultera*, demostramos que inician el comportamiento de llamada significativamente más jóvenes que cuando son mantenidas individuales (Rehermann et al. 2012, Tesina). Sin embargo, en el presente estudio no se observan diferencias en la edad de inicio de llamada cuando las hembras son expuestas a feromona de co-específicas o un flujo de aire control. Si bien no fue cuantificada, en nuestro primer experimento existió una mayor actividad de vuelo en cajas experimentales con hembras agrupadas, y una posible explicación es que la alta frecuencia de los vuelos haya resultado en un incremento de la temperatura corporal (Bartholomew & Heinrich 1973), potencialmente desencadenando una maduración sexual más temprana por una mayor producción de hormona juvenil (Cusson, McNeil et al. 1990).

Futuras investigaciones en autodetección deberían asimismo ser llevadas a cabo examinando distintos rasgos biológicos de las especies (ej. monandria y poliandria, fitófagos especialistas y generalistas, migrantes y no migrantes), en conjunto con estudios filogenéticos comparativos, para determinar si existe un “patrón generalizable”. Finalmente, desde el punto de vista aplicado el estudio de autodetección también resulta importante, ya que puede ser un factor subestimado en la eficacia de programas de confusión sexual empleados para el control de plagas de lepidópteros, en los que se aplica una gran cantidad de feromona sintética de hembras

en un cultivo para crear falsas plumas de olor provenientes de fuentes discretas (dispensadores) y así desorientar a los machos y disminuir el encuentro entre los sexos, ignorando el efecto que pueda tener en el comportamiento de llamada de las hembras (Stelinski et al. 2006, Harari et al. 2015).

Conclusiones y Perspectivas

En las últimas décadas, el paradigma clásico de comunicación sexual en lepidópteros, en donde las hembras señalizan emitiendo feromonas altamente específicas y los machos responden volando a contraviento, lejos de ser objetado, se ha visto enriquecido y flexibilizado por nuevas interacciones y funciones descritas a nivel intra- e inter-específico.

Las hembras de lepidópteros modulan el ritmo del comportamiento de llamada sexual en función de su estado fisiológico y la interacción con el ambiente. El ambiente químico, entendido como presencia de feromona sexual de hembras co-específicas, puede inducir a cambios en la llamada, con posibles consecuencias en la comunicación entre los individuos. En *P. adultera* demostramos que las hembras vírgenes detectan su propia feromona sexual y responden adelantando el inicio del comportamiento de llamada. Esta respuesta comportamental es más sutil a la observada en un estudio anterior cuando las hembras se encontraban agrupadas; sin embargo, ofrece un escenario más realista en donde las diferencias resultan únicamente de la autodetección de cantidades pequeñas y naturales de feromona sexual. De qué manera los machos de *P. adultera* acompañan los cambios temporales del llamado sexual, y cuáles son las posibles ventajas adaptativas para las hembras, son algunas preguntas a responder próximamente. Asimismo, sería interesante determinar si existe plasticidad a nivel del sistema olfativo periférico en la detección de la feromona según el estado fisiológico y reproductivo de los sexos, por ejemplo: hembras y machos recién emergidos, hembras y machos vírgenes sexualmente maduros, hembras y machos post-cópula, etc.

Finalmente, feromonas de co-específicas y de especies relacionadas también pueden afectar otros rasgos de la vida de los individuos. En este sentido, nos proponemos estudiar si además de responder a la autodetección modulando la emisión de feromona, existe una modulación en la composición de la señal. Nuestra futura hipótesis para poner a prueba es que las hembras *P. adultera* podrían variar la proporción de los compuestos emitidos de manera de ser más atractivas en un contexto de alta competencia por el acceso a parejas, algo que de nuestro conocimiento no ha sido puesto a prueba en ninguna especie de lepidóptero. Por último, nos proponemos examinar la comunicación química de *Pseudaletia adultera* y la especie simpátrida y emparentada *P. sequax*, un modelo que puede contribuir al estudio del rol de las feromonas sexuales en la diversificación de los lepidópteros.

El desarrollo de esta Maestría valió una Beca de Maestría otorgada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (POS_NAC_2013_1_11344, ANII). Además parte del proyecto fue apoyado por una Beca del Programa de Iniciación a la Investigación CSIC 2013.

Los resultados de esta Tesis han sido presentados en el III Congreso Uruguayo de Zoología (2014), en la Conferencia Internacional de Ecología Química (ISCE, Suecia, 2015), valiendo una beca para la participación, y en el Congreso Internacional de Neuroetología (ICN, Montevideo, 2016). Asimismo, parte de los resultados han sido aceptados para su publicación en la revista arbitrada *Entomologia Experimentalis et Applicata* (DOI: 10.1111/eea.12448).

Bibliografía

1. Almeida, Â. A., E. R. Lima and R. Reis Jr (2008). "Pupal period affects calling behavior of the wheat moth, *Pseudaletia sequax* (Lepidoptera: Noctuidae)." Ethology **114**(5): 499-503.
2. Altesor, P., C. Rossini, P. Zarbin and A. González (2009). "Sex Pheromone of the Bud Borer *Epinotia aporema*: Chemical Identification and Male Behavioral Response." Journal of Chemical Ecology **35**:349-354.
3. Ando, T., S. Inomata and M. Yamamoto (2004). *Lepidopteran Sex Pheromones. The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I*, Springer Berlin Heidelberg. **239**: 51-96.
4. Baker, T. C. and R. T. Cardé (1979). "Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholitha molesta* (Busck)." Journal of Insect Physiology **25**(12): 943-950.
5. Bartholomew, G. A. and B. Heinrich (1973). "A Field Study of Flight Temperatures in Moths in Relation to Body Weight and Wing Loading." Journal of Experimental Biology **58**(1): 123-135.
6. Bentancourt, C. and I. Scatoni (2006). "Lepidópteros de importancia económica en Uruguay. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. ." Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L **351**: 352-359.
7. Binyameen, M., P. Anderson, R. Ignell, M. Saeda, B. Hansson and F. Schlyter (2012). "Spatial organization of antennal olfactory sensory neurons in the female *Spodoptera littoralis* moth: Differences in sensitivity and temporal characteristics." Chemical Senses **37**(7):1-17.
8. Birch, M. C. (1977). "Response of both sexes of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) to virgin females and to synthetic pheromone." Ecological Entomology **2**(2): 99-104.
9. Birch, M. C., G. M. Poppy and T. C. Baker (1990). "Scents and eversible scent structures of male moths." Annual Review of Entomology **35**(1): 25-54.
10. Borror, D. J., C. A. Triplehorn and N. F. Johnson (1989). An introduction to the study of insects. Harcourt Brace Jovanovich College.
11. Brown, W. L., T. Eisner and R. H. Whittaker (1970). "Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers." BioScience **20**: 21-22.

12. Cardé, R. and M. Willis (2008). "Navigational Strategies Used by Insects to Find Distant, Wind-Borne Sources of Odor." Journal of Chemical Ecology **34**(7): 854-866.
13. Cardé, R. T. and K. F. Haynes (2004). Structure of the pheromone communication channel in moths. *Advances in Insect Chemical Ecology*, Cambridge University Press.
14. Cruz, D. and M. Eizaguirre (2015). "Response to conspecific and heterospecific semiochemicals by *Sesamia nonagrioides* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) gravid females." Bulletin of Entomological Research **105**(03): 347-354.
15. Cusson, M., J. N. McNeil and S. S. Tobe (1990). "In vitro biosynthesis of juvenile hormone by corpora allata of *Pseudaletia unipuncta* virgin females as a function of age, environmental conditions, calling behaviour and ovarian development." Journal of Insect Physiology **36**(2): 139-146.
16. de Bruyne, M. and T. C. Baker (2008). "Odor detection in insects: volatile codes." Journal of Chemical Ecology **34**(7): 882-897.
17. De Cristofaro, A., C. Ioriatti, E. Pasqualini, G. Anfora, G. S. Germinara, M. Villa and G. Rotundo (2004). "Electrophysiological responses of *Cydia pomonella* to codlemone and pear ester ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate: Peripheral interactions in their perception and evidences for cells responding to both compounds." Bulletin of Insectology **57**(2): 137-144.
18. Delisle, J. and L. Royer (1994). "Changes in pheromone titer of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*, virgin females as a function of time of day, age, and temperature." Journal of Chemical Ecology **20**(1): 45-69.
19. DeLury, N. C., G. J. R. Judd and M. G. T. Gardiner (2005). "Antennal detection of sex pheromone by female *Pandemis limitata* (Robinson) (Lepidoptera: Tortricidae) and its impact on their calling behaviour." Journal of the Entomological Society of British Columbia **102**.
20. Den Otter, C. J., A. De Cristofaro, K. E. Voskamp and G. Rotundo (1996). "Electrophysiological and behavioural responses of chestnut moths, *Cydia fagiglandana* and *C. splendana* (Lep., Tortricidae), to sex attractants and odours of host plants." Journal of Applied Entomology **120**(7): 413-421.
21. Den Otter, C. J., H. A. Schuil and A. S.-V. Oosten (1978). "Receptor of host plant odours and female sex pheromone in *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae): electrophysiology and morphology." Entomologia Experimentalis Et Applicata **24**(3): 570-578.

22. Dunkelblum, E., M. Kehat, M. Harel and D. Gordon (1987). "Sexual behaviour and pheromone titre of the *Spodoptera littoralis* female moth." Entomologia Experimentalis et Applicata **44**(3): 241-247.
23. Eisner, T. and J. Meinwald (1995). "The chemistry of sexual selection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(1): 50-55.
24. El-Sayed, A. M. and D. M. Suckling (2005). "Behavioural observations of mating disruption in three lepidopteran pests." Behaviour **142**(6): 717-729.
25. Elkinton, J. S., C. Schal, T. Ono and R. T. Cardé (1987). "Pheromone puff trajectory and upwind flight of male gypsy moths in a forest." Physiological Entomology **12**: 399-406.
26. Ellis, P. E., L. C. Brimacombe, L. J. Mcveigh and A. Dignan (1980). "Laboratory experiments on the disruption of mating in the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) by excesses of female pheromones." Bulletin of Entomological Research **70**(04): 673-684.
27. Fan, W., C. Sheng and S. J. Su (2003). "Electrophysiological and behavioral responses of both sexes of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner to sex pheromones." Acta Entomologica Sinica **46**: 138-143.
28. Fitzpatrick, S. M. and J. N. McNeil (1988). "Male scent in lepidopteran communication: the role of male pheromone in mating-behavior of *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae)." Memoirs of the Entomological Society of Canada **120**(146): 131-151.
29. Galizia, C. G. and W. Rössler (2010). "Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function." Annual Review of Entomology (55): 399-420.
30. Glaser, N., B. Frérot, E. Leppik, C. Monsempes, C. Capdevielle-Dulac, B. Ru, T. Lecocq, M. Harry, E. Jacquin-Joly and P.-A. Calatayud (2014). "Similar Differentiation Patterns Between PBP Expression Levels and Pheromone Component Ratios in Two Populations of *Sesamia nonagrioides*." Journal of Chemical Ecology **40**(8): 923-927.
31. Gökçe, A., L. L. Stelinski, L. J. Gut and M. E. Whalon (2007). "Comparative behavioral and EAG responses of female obliquebanded and redbanded leafroller moths (Lepidoptera: Tortricidae) to their sex pheromone components." European Journal of Entomology **104**(2): 187-194.
32. González, A., P. Altesor, C. Sellanes and C. Rossini (2012). Aplicación de feromonas sexuales en el manejo de lepidópteros plaga de cultivos agrícolas. J.C. Rojas & E.A. Malo (Eds.) Temas Selectos en Ecología Química. El Colegio de l Frontera Sur. México. 343-360

33. Grant, A. J. and R. J. O'Connell (2000). "Responses of olfactory receptor neurons in *Utetheisa ornatrix* to gender-specific odors." Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology **186**(6): 535-542.
34. Groot, A. T. (2014). "Circadian rhythms of sexual activities in moths: a review." Frontiers in Ecology and Evolution **2**: 43.
35. Groot, A., C. Gemeno, C. Brownie, F. Gould and C. Schal (2005). "Male and Female Antennal Responses in *Heliothis virescens* and *H. subflexa* to Conspecific and Heterospecific Sex Pheromone Compounds." Environmental Entomology **34**(2): 256-263.
36. Groot, A. T., J. L. Horovitz, J. Hamilton, R. G. Santangelo, C. Schal and F. Gould (2006). "Experimental evidence for interspecific directional selection on moth pheromone communication." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**: 5858-5863.
37. Harari, A. R., T. Zahavi and H. Steinitz (2015). "Female detection of the synthetic sex pheromone contributes to the efficacy of mating disruption of the European grapevine moth, *Lobesia botrana*." Pest Management Science **71**(2): 316-322.
38. Harari, A. R., T. Zahavi and D. Thiery (2011). "Fitness cost of pheromone production in signaling female moths." Evolution **65**(6): 1572-1582.
39. Howse, P., J. M. Stevens and O. T. Jones (1998). Insect pheromones and their use in pest management. London Chapman & Hall.
40. Jacquin-Joly, E. and C. Merlin (2004). "Insect olfactory receptors: Contributions of molecular biology to chemical ecology." Journal of Chemical Ecology **30**: 2359-2397.
41. Jurenka, R. (2004). "Insect pheromone biosynthesis." Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I. S. Schulz. Berlin: 97-131.
42. Jurenka, R. and A. Rafaeli (2011). "Regulatory role of PBAN in sex pheromone biosynthesis of heliothine moths." Frontiers in Endocrinology. **2**(46).
43. Kalinova, B., I. Hoskovec M Fau - Liblikas, C. R. Liblikas I Fau - Unelius, B. S. Unelius Cr Fau - Hansson and B. S. Hansson (2001). "Detection of sex pheromone components in *Manduca sexta* (L.)." Chemical Senses **26**(9): 1175-1186.
44. Law, R. and F. Regnier (1971). "Pheromones." Annual Review of Biochemistry **40**: 533 - 548.

45. Light, D. M. and M. C. Birch (1979). "Electrophysiological basis for the behavioural response of male and female *Trichoplusia ni* to synthetic female pheromone." Journal of Insect Physiology **25**(2): 161-167.
46. Lim, H. and M. D. Greenfield (2007). "Female pheromonal chorusing in an arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*." Behavioral Ecology **18**(1): 165-173.
47. Lim, H. and M. D. Greenfield (2008). "Female arctiid moths, *Utetheisa ornatrix*, orient towards and join pheromonal choruses." Animal Behaviour **75**(2): 673-680.
48. Lim, H., K. C. Park, T. C. Baker and M. D. Greenfield (2007). "Perception of conspecific female pheromone stimulates female calling in an arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*." Journal of Chemical Ecology **33**(6): 1257-1271.
49. Ljungberg, H., P. Anderson and B. S. Hansson (1993). "Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)." Journal of Insect Physiology **39**(3): 253-260.
50. McElfresh, J. and J. Millar (2001). "Geographic variation in the pheromone system of the saturniid moth *Hemileuca eglanterina*." Ecology **82**: 3505-3518.
51. McNeil, J. N. (1987). "The true armyworm, *Pseudaletia unipuncta*: A victim of the Pied Piper or a seasonal migrant?" International Journal of Tropical Insect Science **8**(Special Issue 4-5-6): 591-597.
52. McNeil, J. N. (1991). "Behavioral Ecology of Pheromone-Mediated Communication in Moths and its Importance in the Use of Pheromone Traps." Annual Review of Entomology **36**: 407-430.
53. Noguchi, H. and Y. Tamaki (1985). "Conspecific female sex pheromone delays calling behaviour of *Adoxophyes* sp. and *Homona magnanima* (Lepidoptera: Tortricidae)." Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology **29**: 113-118.
54. Ochieng, S. A., P. Anderson and B. S. Hansson (1995). "Antennal lobe projection patterns of olfactory receptor neurons involved in sex pheromone detection in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae)." Tissue & Cell **27**(2): 221-232.
55. Palaniswamy, P. and W. D. Seabrook (1978). "Behavioral responses of the female eastern spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera, Tortricidae) to the sex pheromone of her own species." Journal of Chemical Ecology **4**(6): 649-655.

56. Palaniswamy, P. and W. D. Seabrook (1985). "The alteration of calling behaviour by female *Choristoneura fumiferana* when exposed to synthetic sex pheromone." Entomologia Experimentalis Et Applicata **37**(1): 13-16.
57. Paterson, H. (1985). The recognition concept of species. Species and Speciation. E. Vrba. Pretoria, Transvaal Mus.: 21-30.
58. Pearson, G. A. and C. Schal (1999). "Electroantennogram responses of both sexes of grape root borer (Lepidoptera: Sesiidae) to synthetic female sex pheromone." Environmental Entomology **28**(6): 943-946.
59. Phelan, P. L. and T. C. Baker (1987). "Evolution of male pheromones in moths: reproductive isolation through sexual selection?" Science **235**(4785): 205-207.
60. R Core Team (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.
61. Rafaeli, A. and R. Jurenka (2003). "PBAN regulation of pheromone biosynthesis in female moths." G. Blomquist and R. Vogt. London, Elsevier: 107-136.
62. Rehermann, G., P. Altesor and A. González (2012). Efecto de factores bióticos y abióticos en el comportamiento de llamada de hembras de *Pseudaletia adultera* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesina de Grado, Facultad de Ciencias, UdelaR.
63. Rehermann, G., P. Altesor, J.N. McNeil and A. González (2016). "Conspecific females promote calling behaviour in the noctuid moth, *Pseudaletia adultera*." Entomologia Experimentalis Et Applicata **159**:362-369.
64. Roelofs, W. L. and A. P. Rooney (2003). "Molecular genetics and evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(16): 9179-9184.
65. Saad, A. D. and D. R. Scott (1981). "Repellency of pheromones released by females of *Heliothis armigera* and *H. zea* to females of both species." Entomologia Experimentalis Et Applicata **30**(2): 123-127.
66. Sadek, M. M., G. von Wowern, C. Löfstedt, W.-Q. Rosén and P. Anderson (2012). "Modulation of the temporal pattern of calling behavior of female *Spodoptera littoralis* by exposure to sex pheromone." Journal of Insect Physiology **58**(1): 61-66.
67. Schneider, D. (1957). "Electrophysiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation." Cellular and Molecular Life Sciences **13**(2): 89-91.

68. Schneider, D., S. Schulz, E. Priesner, J. Ziesmann and W. Francke (1998). "Autodetection and chemistry of female and male pheromone in both sexes of the tiger moth *Panaxia quadripunctaria*." Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology **182**(2): 153-161.
69. Sellanes, C., C. Rossini, A. González (2010). "Formate analogs as antagonists of the sex pheromone of the honeydew moth, *Cryptoblabes gnidiella*: electrophysiological, behavioral and field evidence." Journal of Chemical Ecology **36**: 1234–1240
70. Stelinski, L., R. Holdcraft and C. Rodriguez-Saona (2014). "Female Moth Calling and Flight Behavior Are Altered Hours Following Pheromone Autodetection: Possible Implications for Practical Management with Mating Disruption." Insects **5**(2): 459-473.
71. Stelinski, L. L., A. L. Il'ichev and L. J. Gut (2006). "Antennal and behavioral responses of virgin and mated oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) females to their sex pheromone." Annals of the Entomological Society of America **99**(5): 898-904.
72. Symonds, M. R. E. and M. A. Elgar (2008). "The evolution of pheromone diversity." Trends in Ecology & Evolution **23**(4): 220-228.
73. Turgeon, J. and J. N. McNeil (1982). "Calling behaviour of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*." Entomologia Experimentalis Et Applicata **31**(4): 402-408.
74. Turgeon, J. J. and J. N. McNeil (1983). "Modification in the calling behavior of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae), induced by temperature conditions during pupal and adult development." Canadian Entomologist **115**(8): 1015-1022.
75. Umbers, K. D. L., M. R. E. Symonds and H. Kokko (2015). "The mathematics of female pheromone signaling: Strategies for aging virgins." The American Naturalist **185**(3): 417-432.
76. Varela, N., J. Avilla, C. Gemeno and S. Anton (2011). "Ordinary glomeruli in the antennal lobe of male and female tortricid moth *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) process sex pheromone and host-plant volatiles." Journal of Experimental Biology **214**(4): 637-645.
77. Wanner, K. W., A. S. Nichols, J. E. Allen, P. L. Bunger, S. F. Garczynski, C. E. Linn Jr, H. M. Robertson and C. W. Luetje (2010). "Sex pheromone receptor specificity in the european corn borer moth, *Ostrinia nubilalis*." Plos One **5**(1).
78. Webster, R. P. and R. T. Cardé (1982). "Relationships among pheromone titre, calling and age in the omnivorous leafroller moth (*Platynota stultana*)." Journal

- of Insect Physiology **28**(11): 925-933.
79. Wilson, E. (1970). "Chemical communication among within animal species." Chemical Ecology **9**: 133-155.
80. Xiu, W. M., Y. Z. Zhou and S. L. Dong (2008). "Molecular characterization and expression pattern of two pheromone-binding proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius)." Journal of Chemical Ecology **34**(4): 487-498.
81. Yang, M.-W., S.-L. Dong and L. Chen (2009). "Electrophysiological and Behavioral Responses of Female Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) to the Conspecific Female Sex Pheromone." Journal of Insect Behavior **22**(2): 153-164.
82. Zerbino, M. (2007). Manejo de insectos en trigo y cebada. Jornada de Cultivos de Invierno: 61-63.

Tabla S1. Resumen de los modelos empleados: variables de respuesta, efectos fijos (comportamiento de llamada: tratamiento, edad, día de llamada /GC-EAD: sexo, compuesto /EAG: compuesto ó mezcla), efectos aleatorios (hembra, réplica / antena) y la varianza estimada, los parámetros, tamaño de la muestra, criterio de información Akaike [AIC] y test de relación de verosimilitud (LTR) de los efectos fijos.

Pregunta / Modelo ^a	Interacciones removidas	AIC ^b	LTR
Edad al primer llamado			
Modelo: edad inicio llamado ~ tratamiento ^c familia = poisson n (hembras) = 53, df = 1	No	202.3	-
Duración de la llamada			
Modelo: duración llamada ~ tratamiento*día llamada ^c + (1 réplica / hembra) familia = poisson Efectos fijos: tratamiento, día de llamada Efecto aleatorio: hembra [var (1 réplica / hembra) = 0.075] n (obs.) = 144, n (hembras) = 53, replicas = 5	Ninguna	1241.3	-
Modelo: duración llamada ~ tratamiento + día llamada + (1 réplica / hembra) family = poisson Efectos fijos: tratamiento, día de llamada Efecto aleatorio: hembra [var (1 réplica / hembra) = 0.075] n (obs.) = 144, n (hembras) = 53, réplicas = 5	Tratamiento * día llamada	1245.9	df = 2 P = 0.0137
Inicio del llamado			
Modelo inicial: inicio llamado ~ tratamiento * día llamada + (1 réplica / hembra) familia = poisson Efectos fijos: tratamiento, día de llamada Efecto aleatorio: hembra [var (1 réplica / hembra) = 0.001] n (obs.) = 144, n (hembras) = 53, réplicas = 5	No	1292.2	-
Mod. simplificado: inicio llamado ~ tratamiento + día llamada + (1 réplica / hembra) familia = poisson Efectos fijos: tratamiento, día de llamada Efecto aleatorio: hembra [var (1 réplica / hembra) = 0.001] n (obs.) = 144, n (hembras) = 53, réplicas = 5	Tratamiento * día llamada	1290.6	df = 1 P = 0.5231
Patrón del llamado (probabilidad de llamar)			
Modelo inicial: prob llamar ~ tratamiento * min fase oscura * día llamada + (1 réplica / hembra) familia = binomial Efectos fijos: tratamiento, día llamada, min fase oscura Efecto aleatorio: hembra [var (1 réplica/hembra) = 0.089] n (obs.) = 2159, n (females) = 53, réplicas = 5		2664.6	-
Mod. simplificado: prob llamar ~ tratamiento*min fase oscura + día llamada + (1 réplica/ hembra) familia = binomial Efectos fijos: tratamiento, día de llamada, min fase oscura (MFO) Efecto aleatorio: hembra [var (1 réplica/hembra) = 0.088] n (obs.) = 2159, n (hembras) = 53, réplicas = 5	Tratamiento * MFO * día llamada	2662.0	df = 6 P = 0.1506
Respuesta electrofisiológica EAD			
Modelo: EAD ~ sexo*compuestos + (1 antena) familia = gaussiana Efectos fijos: sexo, compuestos Efectos aleatorios: individuos [des.est. (1 antenna) = 0.295] n (obs.)= 87, n (individuos) = 29	No	10.7	-
Respuesta electrofisiológica EAG			
Modelo: EAG ~ compuesto/mezcla + (1 antena) familia = gaussiana Efectos fijos: sexo, compuestos Efectos aleatorios: individuos [des.est. (1 antenna) = 0.259] n (obs.)= 96, n (individuos) = 8	No	125.4	-

^a Modelos empleados en negrita. Modelos simplificados fueron seleccionados si $P > 0.05$ de LTR al compararlo con el modelo inicial.

^b Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert KP. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. Behav Ecol Sociobiol. 2011;65: 23-35. doi: DOI 10.1007/s00265.

^c Tratamiento y día de llamada son variables categóricas que representan los dos grupos experimentales: hembras expuestas a feromona de co-específicas y hembras expuestas a aire, y los tres primeros días de llamada (día 1, día 2, día 3), respectivamente.