



UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
INSTITUTO DE ENTOMOLOGÍA



Tesis:

**“Dípteros asociados a *Cyttaria espinosae* Lloyd, 1917 (Leotiomycetes) y capacidad
atractante de su volatinoma”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
ENTOMOLOGÍA

Por:

ARIEL NICOLÁS AGUILERA CAYUPIL

Director de Tesis

CRISTIAN VILLAGRA

Co-director de Tesis

MARÍA ANTONIETA RUÍZ

SANTIAGO – CHILE

Fecha 22 de Septiembre de 2021

INSTITUTO DE ENTOMOLOGIA
UMCE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa al Instituto de Entomología que la Tesis de Magíster presentada por el candidato,

ARIEL AGUILERA

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de la tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias con Mención en Entomología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día....., de mes..... del año.....

DIRECTOR DE TESIS:

Cristian Villagra

Calificación:

Firma:

COMISIÓN EVALUADORA:

Christian González

Calificación:

Firma:

Claudio Veloso

Calificación:

Firma:



IDENTIFICACIÓN DE TESIS/INVESTIGACIÓN

Título de la tesis: “Dípteros asociados a *Cyttaria espinosae* Lloyd, 1917 (Leotiomycetes) y capacidad atractante de su volatinoma”

Fecha:

Facultad: Ciencias Básicas.

Departamento: Instituto de Entomología.

Programa: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología.

Grado: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología.

Profesor Guía: Cristian Villagra

AUTORIZACIÓN

Se autoriza la reproducción total o parcial de este trabajo de investigación para fines académicos por cualquier medio o procedimiento, siempre que se haga la referencia bibliográfica que acredite el presente trabajo y sus autores/as, y a su vez el alojamiento de éste en el repositorio institucional SIBUMCE del sistema de bibliotecas UMCE.

Ariel Aguilera

Santiago de Chile, Día de Mes, Año.

DEDICATORIAS

Dedicado a todas las personas que me ayudaron a poder realizar de la mejor manera posible esta tesis en pleno periodo de pandemia, a mi familia, a mis profesores, a mis amigos y colegas, que además hicieron de este proceso algo más llevadero y fácil. Muchas gracias por su ayuda y su paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por todo su apoyo, logístico y material, durante esta tesis. También doy las gracias a mi profesor Cristian Villagra Gil por sus consejos, orientación y apoyo durante todo este proceso. Agradezco por otro lado a los profesores María Antonieta Ruiz y Pablo Cornejo por facilitarme materiales y tener la disposición de ayudarme en el proceso de recolección en plena pandemia. Al profesor Christian González Aravena (IEUMCE) y Valéria Cid Maia (UFRJ, Brasil) por sus recomendaciones y asesoramiento respecto a la determinación taxonómica de especímenes de Diptera.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------|----|
| RESUMEN | 7 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 14 |
| III. HIPÓTESIS | 15 |
| IV. OBJETIVOS..... | 16 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 17 |
| VI. RESULTADOS..... | 31 |
| VII. DISCUSIÓN. | 31 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 31 |
| IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |
| X. ANEXOS | 53 |

RESUMEN

Los hongos presentan distintas estrategias tendientes a resolver diferentes problemas de su ciclo de vida, que están basadas en sus características físicas y químicas y pueden variar según su estado de desarrollo, entre otros factores. Los insectos cumplen un importante rol en estos procesos, teniendo en algunos casos interacciones positivas (mutualismo), neutras (comensalismo) o negativas (depredación, parasitismo). A su vez, el grado de dependencia de insectos con el hongo puede variar desde una asociación facultativa hasta una relación estrecha de codependencia, como ocurre en mutualismo estricto o parasitismo. En cualquiera de estos casos, el hongo provee a los insectos un lugar de desarrollo y alimentación, por lo que las especies asociadas tenderán a emplear los rasgos fenotípicos de su hongo hospedero como claves para su localización y posterior uso. Por ejemplo, se ha destacado el rol de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por hongos como estímulos que permiten su colonización por insectos. En los hongos endémicos *Cyttaria espinosae* Lloyd, 1917 (Leotiomycetes), se ha descrito la presencia de dípteros capaces de emplear sus estromas para el desarrollo de sus larvas. Por lo tanto, las señales derivadas de estas estructuras podrían ser claves para su establecimiento. En este trabajo se caracterizó la comunidad de insectos presentes en *C. espinosae* en asociación con el raulí, *Nothofagus alpina* (Nothofagaceae) en diferentes estados de desarrollo de *C. espinosae* siendo estos recolectados de manera manual y preparado en extractos para trampas semioquímicas, obteniéndose que existe una influencia en la atracción de dípteros en ambos casos cuando los estromas se encontraban con apotecios abiertos, sin embargo se encontró una diversidad mucho menor en los cuerpos fructíferos de *C. espinosae* debido a una predominante presencia de dípteros del género *Anastomyza* (Heleomyzidae). Estos dípteros fueron encontrados en el estroma de *C. espinosae* con apotecios expuestos, sugiriendo que *Anastomyza* pudiese tener una estrecha relación de dependencia trófica con este hongo y, posiblemente, contribuir a la dispersión y mantención de esta asociación multitrófica. Además, se encontró que el volatinoma de *C. espinosae* es capaz de atraer a estos insectos y otros que conforman la comunidad asociada a este hongo parásito. Se discute sobre los factores que permiten la continuidad de interacciones ecológicas complejas entre plantas, hongos e insectos en sistemas nativos.

Palabras claves: Fungivoría, Aleloquímicos, Ingenieros Ecosistémicos, Quimiopercepción

ABSTRACT

Fungi uses different strategies to cope with their needs through their life cycle. These are based on their phenotypic cues (physical and chemical), that can vary through their development. Insects play varied roles in association with fungi such as: mutualists, commensalism and/or parasitism and predation. The degree of mutual dependency may vary in this association. Fungi can provide insects with shelter, food and developmental microhabitats. These offers are sustained and mediated by different fungi features such as their secondary metabolites. Among these are the mixture of volatile organic compounds (or VOCs) that fungi release. VOCs may act as repellent or attractant to different insect associates. In the southern hemisphere *Cyttaria espinosae* Lloyd, (1917) (Leotiomycetes) it has been described that some Diptera can use their stroma as larval developmental resource. In addition, adults of these flies disperse at the same time stroma are opening dispersing *C. espinosae* spores. This suggests a strong codependency between the fungus and their Diptera associates. In addition, it highlights the potential role of *C. espinosae* secondary metabolites, such as VOCs, in the establishment and conservation of this association. In this thesis I characterized insect community found in *C. espinosae*'s fruiting bodies at closed and opened stroma phases. We studied these fungi parasitizing *Nothofagus alpina* (Nothofagaceae) in Araucanía Region, Chile in different stages of development of *C. espinosae*, these being collected manually and prepared in extracts for semiochemical traps, obtaining that there is an influence on the attraction of dipterans in both cases when the stromata were with open apothecia, however a much lower diversity in the fruiting bodies of *C. espinosae* due to a predominant presence of a unknown diptera from genus *Anastomyza* (Heleomyzidae), being the main insect hosted in open apothecia. In addition, I discuss these findings under the light of the relevance of insects and semiochemical stimuli in complex ecological interactions such as biotrophic fungi associated with native forest plant species.

Keywords: Fungivory, Allelochemicals, Ecosystem Engineers, Chemoperception

I. INTRODUCCIÓN

Los insectos y hongos se encuentran dentro de los grupos de organismos más numerosos en el mundo con estimaciones de hasta 5,5 y 2,2–3,8 millones de especies respectivamente (Stork *et al.*, 2015). Ambos grupos son abundantes en muchos ecosistemas y han convivido durante más de 400 millones de años (Misof *et al.*, 2014; Sherwood-Pike & Gray, 1985), pudiendo encontrarse interacciones ecológicas entre estos organismos tales como: mutualismo, comensalismo, parasitismo, entre otras (Bronstein, 2015). En cuanto a las relaciones de mutualismo, los hongos proveen a los insectos de microhábitats y alimento, permitiendo las condiciones para su resguardo y la continuidad de su desarrollo (Jakovlev, 2012). Por otro lado, se ha reportado frecuentemente casos en los cuales insectos asociados a hongos participan en la dispersión de las esporas, lo que en algunos casos es esencial para el ciclo de vida de algunos hongos (Spiteller, 2008).

Al igual que las plantas, los hongos producen diversos compuestos químicos orgánicos, dentro de los que se destacan los metabolitos secundarios (Spiteller, 2008). El fenotipo químico (o quimiotipo) del hongo puede estar influenciado tanto por el estado de desarrollo del mismo como por los microorganismos estrechamente asociados a éstos (como levaduras y bacterias) (Benucci & Bonito, 2016; Kües *et al.*, 2018). Este quimiotipo le permite interactuar con sus conespecíficos por medio de feromonas (*e.g.* Cottier & Mühlischlegel, 2012). Dentro de este fenotipo químico destacan los compuestos orgánicos volátiles “COVs”. Estos son compuestos de bajo peso molecular, en su mayoría lipófilos (Morath, Hung & Bennett, 2012), que en hongos han sido relevados por su gran importancia en ecología. Los hongos son capaces de emitir mezclas muy variadas de COVs capaces de mediar múltiples interacciones tanto con otros hongos como con otros niveles tróficos, en diversos ambientes y estados de desarrollo (Quintana-Rodríguez *et al.*, 2018; Werner *et al.*, 2016; Kakumyan *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

En el caso particular de su interacción con insectos, se ha encontrado que las señales químicas volátiles de los hongos son altamente relevantes (Wenke, 2010). Por ejemplo, en casos de dependencia trófica y reproductiva, son los COVs de hongos los empleados por los insectos para la búsqueda de sitios de oviposición y alimentación (Kühnholz, 2004; Boucias *et al.*, 2012;

Witzgal *et al.*, 2012), Además, se ha observado que hay hongos capaces de reclutar insectos que, en algunos casos, pueden actuar como vectores de dispersión de sus esporas, de manera análoga a lo que ocurre en la polinización de plantas, donde pueden obtener nutrientes y elementos esenciales (Biedermann & Vega, 2020). Siendo esta una relación beneficiosa para ambos; sin embargo, en algunos casos las señales producidas por un emisor son captadas por organismos que no le otorgan ningún beneficio al hongo e inclusive, en algunos casos, pueden dañar estructuras importantes en el ciclo de desarrollo, este fenómeno se conoce como espionaje de señal o “*eavesdropping*” (Rebolleda-Gómez & Wood, 2019) y ha sido descrito, por ejemplo, en interacciones de plantas con microorganismos patógenos que inducen en estas la liberación de COVs que atraen insectos parasitoides, ocasionando daños a la misma planta, para posteriormente utilizar estos insectos como vectores y colonizar así nuevas superficies vegetales (Martini *et al.*, 2014).

Dentro de este tipo de interacciones destacan los dípteros, considerados uno de los 4 Ordenes de insectos holometábolos más grandes y dominantes, en el cual sus estados larvales y adultos se encuentran en gran parte de ecosistemas terrestres, además de ser anatómicamente variados y ecológicamente innovadores que representa el 10–15% de todas las especies animales conocidas (Courtney *et al.*, 2009; Yeates & Wiegmann, 2005; Yeates *et al.*, 2007). Este orden de insectos es el más comúnmente asociado a interacciones con hongos o micofagia, incluyendo más de 25 familias dentro de las cuales se pueden encontrar algunas especies que solo se asocian con estructuras fúngicas en alguna parte de su ciclo de vida, principalmente larvas micófagas y otras, por lo que se conoce, comprenden especies asociadas con hongos en estadíos adultos (por ejemplo, Bolitophilidae, Platypezidae) (Ševčík, 2010). Dentro de las familias de dípteros micófilos podemos encontrar a Mycetophilidae *Sensu lato* que representa el grupo de dípteros más ampliamente distribuido y mejor estudiado en cuanto su asociación con hongos. Otra familia con algunas especies asociadas a hongos es Phoridae, que son considerados peste ya que normalmente son atraídos por los compuestos volátiles del micelio activo del champiñón común *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (Agaricales: Agaricaceae) Donde ocurre una relación de antagonismo del díptero hacia el hongo, ocasionando daños debido a que las larvas se alimentan exclusivamente de micelio del champiñón y en algunas ocasiones incluso del esporóforo, estructuras vitales para completar su ciclo de vida (Rinker y Snetsinger, 1984; Sandhu y Bhattal,

1987) un ejemplo de estos es *Megaselia sandhui* Disney, 1981 y *Megaselia halterata* Wood 1910. Por otro lado también ocurre esta relación hongo-díptero como una interacción mutualista en otros casos, como es el caso de las levaduras, donde se ha registrado el caso de *Drosophila* y levaduras del género *Saccharomyces*, donde estos dípteros se ven atraídos por COVs liberados por las levaduras, logrando que estos microorganismos colonicen nuevas superficies (Christiaens *et al.*, 2014).

En cuanto a las especies de hongos endémicas de Chile, con registros de asociación con dípteros (Gamundí & Horak, 1993), encontramos a las especies del género *Cyttaria* Berk. (Leotiomycetes, Cyttariales, Cyttariaceae). Estos hongos presentan asociaciones biotróficas estrictas con el género *Nothofagus* (Hamamelididae, Nothofagaceae) por este motivo en el sur de Sudamérica se encuentra distribuido en Chile y Argentina, pero también está presente en otros lugares del hemisferio sur como Australia y Nueva Zelanda. Existe bastante información basada en trabajos taxonómicos sobre las especies sudamericanas de este género (Barrera, 2004; Espinosa, 1926; Marchionatto, 1940; Gamundí, 1971, 1986; Gamundí *et al.*, 2004; Sandoval-Leiva, 2012), con relevante información de estas especies y donde se describe la presencia en Chile de *C. berteroi* Berk., *C. darwinii* Berk., *C. espinosae* Lloyd, *C. hariatii* E. Fisch., *C. hookeri* Berk., *C. johowii* Espinosa y *C. exigua* Gamundí. Con respecto a estas especies existen registros sobre interacciones del tipo hongo-insecto descritos principalmente por micólogos como Gamundí & Horak (1993) quienes describieron la presencia de larvas de dípteros “micetofílicos” (Mycetophilidae) en estromas de *C. hariatii* en bosques andino-patagónicos. Por otro lado, Espinosa (1926) también describió la presencia de larvas a las que el describía como larvas de “microlepidopteros” presentes en los estromas de *C. darwinii*. Por otro lado *Cyttaria espinosae* Lloyd (Cyttariaceae), conocido como digüeñe del Mapudungun “diweñ”, siendo de gran relevancia alimentaria y nutricional para estos pueblos y que en la actualidad ha demostrado tener un relevante contenido proteico y lipídico en comparación con otros hongos. (Inzunza, 2016; Salazar, 2019; Salazar *et al.*, 2020; Schmeda-Hirshmann *et al.*, 1999; Schmeda *et al.*, 2001; Toledo *et al.*, 2016), Este hongo se caracteriza por ser parásito de árboles del género *Nothofagus* donde se suele encontrar en racimos (Gamundí y de Lederkremer, 1989; Gamundí, 1991). A modo de clasificación de las etapas de madurez de estas setas según Libkind *et al.* (2011) se considera lo siguiente: (I) inmaduras: apotecios cubiertos por una piel dura, elástica o

capa cortical, que se vuelve membranoso y se estira fuertemente (Figura 1, B)(Figura 2, (2));
(II) maduro: ruptura de la capa cortical que expone las apotecios (Figura 1, B)(Figura 2, (3,4));
(III) sobremadurada: donde los apotecios han perdido turgencia, la corteza envejece y puede percibirse el olor característico de la fermentación alcohólica.



Figura 1. *C. espinosae* parasitando árbol de *N. alpina*. (A) Estroma de *C. espinosae* con ascos abiertas; (B) Estroma de *C. espinosae* con ascos cerrados.

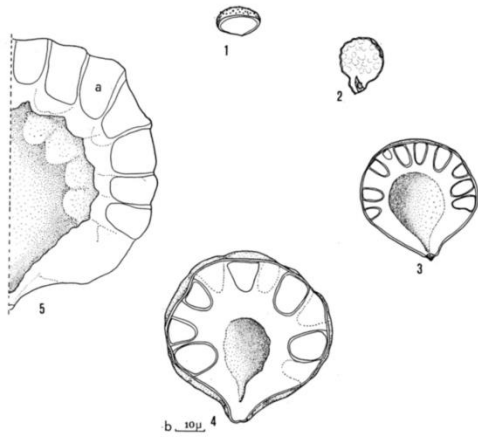


Figura 2. desarrollo del estroma de *Cyttaria espinosae*, en corte sagital. 1) primordio. 2) primordio en desarrollo secundario 3) Estroma en desarrollo primario de apotecios 4) Estroma con apotecios parcialmente abiertos 5) Estroma maduro (Gamundi, 1971).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a los antecedentes descritos por diferentes autores (Espinosa, 1926; Gamundi & Horak, 1993) de la interacción hongo-díptera y según lo observado por el autor de este trabajo donde los estromas pueden proveer a insectos presentes en bosque de *Nothofagus* un recurso que podría ser considerado parte de su nicho ecológico, es posible proponer que esta interacción está siendo modulada por los COVs de la estructura fúngica durante su desarrollo y que estos compuestos podrían estar actuando como alomonas que facilitarían la detección del cuerpo fructífero por parte de dípteros que aún no han sido descritos a mayor detalle. Considerando esto, en esta tesis se propuso establecer el efecto de atracción de COVs de estromas de *C. espinosae* con apotecios abiertos y cerrados frente a dípteros y además se busca determinar qué tipo de dípteros predominan en el nicho otorgado por el cuerpo fructífero de *C. espinosae* tanto en estromas con apotecios abiertos como en estromas con apotecios cerrados.

III. HIPÓTESIS

La riqueza y abundancia de dípteros alojados en estromas de *C. espinosae* variará dependiendo de si el hongo se encuentra en estado de desarrollo con apotecios abiertos o cerradas.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar la influencia de los diferentes estados de desarrollo de *C. espinosae* en la presencia de dípteros.

2. Objetivos específicos

- Cuantificar y determinar los dípteros con mayor abundancia presentes en estroma de *C. espinosae* con apotecios abiertos vs cerrados
- Determinar la capacidad atrayente de extractos *C. espinosae* con apotecios abiertos y apotecios cerrados frente a insectos

-

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los meses de septiembre y octubre de 2020 se recolectaron 500 g de estromas de *C. espinosae* con apotecios de abiertos y cerrados provenientes de troncos y ramas de *N. alpina* de forma manual en cada uno de los tres sitios de muestreo correspondientes a: sector 1) Renovales de *N. alpina*; Sector 2) Bosque maduro *N. alpina*; Sector 3) Renovales de *N. alpina* entre plantaciones de eucalipto. Esto en el sector El Escudo (38°34'1,5"S/72°5'2,5"O), Región de La Araucanía, Chile (Figura 3). Los hongos fueron identificados usando la clave taxonómica de Gamundi (1971) basado en caracteres morfológicos del estroma. A modo de clasificación según lo descrito por Libkind *et al.* (2011) respecto de las etapas de madurez del hongo se consideró lo siguiente: (a) inmaduras: apotecios cubiertos por una piel dura, elástica o capa cortical membranosa y se estira fuertemente; (b) maduro: ruptura de la capa cortical que expone a los apotecios. Por último los hongos fueron transportados en una bolsa cerrada al lugar de almacenamiento, para su posterior análisis.

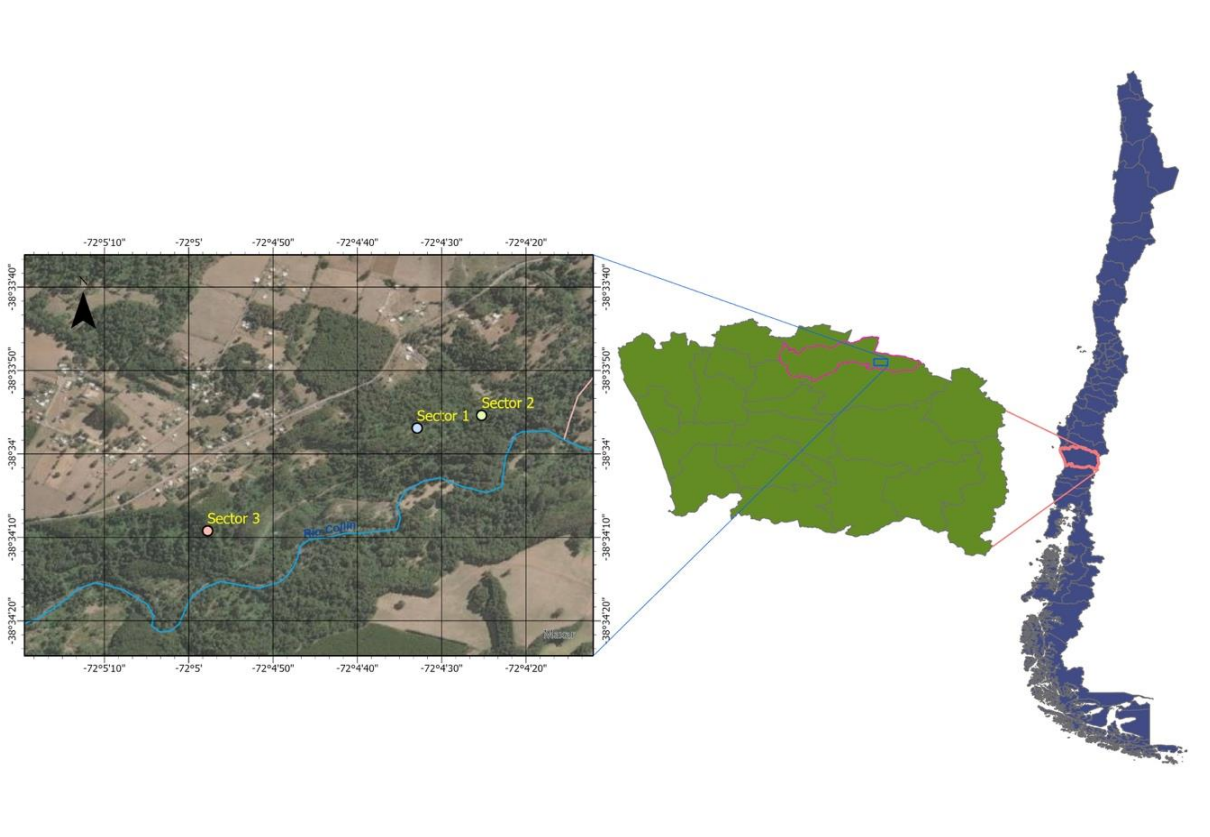


Figura 3. Mapa de la zona de El Escudo, Región de La Araucanía, donde se destacan los tres sitios de recolección de *C. espinosae* parasitando *N. alpina* (Nothofagaceae).

Recolección y determinación de insectos alojados en estromas de hongos

Para estromas abiertos (maduros y sobremaduros) el cuerpo fructífero se sacudió en una placa Petri 90x15 mm para que los insectos que estaban en la capa externa en el estroma fueran expulsados por efecto mecánico. Se recolectaron y preservaron en etanol 95%. Luego, se buscaron larvas al interior del estroma con la ayuda de una lupa estereoscópica Dimeri modelo NSZ70. Este último paso se realizó en forma directa en los estromas en estado cerrado o “inmaduro”.

Para la determinación taxonómica de dípteros, hemípteros, lepidópteros y orthopteros se utilizaron las claves de Triplehorn *et al.* (2005). Para dípteros, hemípteros, lepidópteros y orthopteros. Por otro lado para la identificación de coleópteros se utilizó el libro de Werner, 1961. para thysanópteros Mound & Kibby (1998). En el caso de abejas, superfamilia Apoidea (Hymenoptera) se empleó las claves disponibles en el libro de Michener (2007) y la clave para

los géneros de abejas de Chiappa (1990). Para la manipulación de los insectos se utilizaron pinzas blandas, alfileres, plastilina, Placas Petri 90x15 mm, Alcohol desnaturalizado al 95%. Para cada grupo de insectos se determinó su abundancia en cada sitio y estado de maduración de las estructuras de la asociación *C. espinosae-Nothofagus alpina*. Se calcularon los índices de diversidad alfa de Shannon (H), “Evenness” y Dominancia (D) (Stewart *et al.*, 2017) y se comparó la diversidad encontrada entre hongos con estromas cerrados y abiertos empleado un test de t para el índice de Shannon (Past 4.03; Hammer *et al.*, 2001).

El índice de diversidad alfa de Shannon (H) corresponde a la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad (Pla, 2006), Mientras que “Evenness” o Igualdad corresponde al grado de homogeneidad existente en las abundancias relativas de las especies (Alcolado, 1998) (en este caso familias). Finalmente, el índice de Dominancia (D), representa la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar de un conjunto de datos pertenezcan a la misma especie (en este caso familia) (Moreno, 2001).

Se compararon las proporciones de cada familia de los tres órdenes encontrados: Hymenoptera, Coleoptera y Diptera en el total de muestras, y para cada estado de desarrollo de los estromas, empleado Chi cuadrado (Zar, 1999).

Para determinar la identidad taxonómica de larvas en desarrollo (principalmente Diptera) presentes en el interior de los estromas, se mantuvo a las larvas en una cámara de crianza que consistía en un contenedor de polipropileno transparente cubierto por una tela de fibra de nylon, además en su interior esta fue cubierta con papel absorbente que era humedecido 2 veces al día y mantenida a temperatura ambiente (entre 19° a 26°C) entre el 29 de septiembre al 4 de octubre de 2020, alimentadas con estromas de *C. espinosae ad libitum*. Una vez que emergieron los imagos se utilizó la clave taxonómica de Triplehorn *et al.* (2005) para familia y McAlpine (1985) para género. Junto con esto, se consultó al especialista en Diptera Profesor Christian González Aravena (IEUMCE).

Trampas semioquímicas

Se confeccionaron trampas semioquímicas (Figura 4) con tela de fibra de nylon y alambre galvanizado recubierto de plástico, ubicándose 4 trampas por cada sector de recolección a 30 cm del suelo. Para establecer diferencias tanto de la capacidad atractante de ambos estados de desarrollo de *C. espinosae* se realizaron tres tratamientos: (1) solo con solvente (control); (2) extracto con estromas de apotecios abiertos y (3) extracto con estromas de apotecios cerrados. Los cuáles fueron ubicados en cada uno de los lugares de colecta señalados en la Figura 3. La realización de extractos se hizo según metodología de Chaiphongpachara *et al.* (2018). Las trampas fueron dispuestas el 29 de septiembre 2020, desde las 10:00 am hasta las 17:00 h.

Finalmente se comparó la diversidad total de familias de insectos encontrada en las colectas entomológicas de *C. espinosae* (tanto estroma cerrado como abierto) con lo obtenido a través de las trampas semioquímicas (tanto COVs de estroma cerrado como estroma cerrado). Para esto se empleó el índice de similitud de Jaccard (Duff *et al.*, 2016). Esto para estimar la similitud de familias presentes en ambos grupos de datos con valores de 0 para una baja similitud y cercano a 1 para una alta similitud entre estos.



Figura 4. Trampa semioquímica dispuesta en bosque de *Nothofagus*, El Escudo, Región de la Araucanía para determinación de capacidad atractante de extractos de *C. espinosae* con apotecios abiertos, apotecios cerrados y control sin extracto.

VI. RESULTADOS

Insectos capturados en *C. espinosae* en suma de ambos estados de desarrollo

Sumando los insectos colectados en las muestras de *C. espinosae* en los tres sitios muestreados del sector El Escudo, se obtuvo un total de 246 insectos (Tabla 1 A y B). El 82% (N= 285) de éstos correspondieron al orden Diptera de las familias Ceratopogonidae, Phoridae, Carnidae y Heleomyzidae, 13,6% (N= 47) a Coleoptera de las familias Carabidae y Staphylinidae y 4,1% (N= 14) a Hymenoptera de la familia Formicidae. Esta dominancia de Diptera resultó estadísticamente significativa (Chi cuadrado, N= 346; df=6, $X^2= 1255$, $p<0,001$).

Insectos capturados en *C. espinosae* en estado inmaduro

En los estromas con apotecios cerrados solo se encontraron 29 individuos (8,4%) de las familias Carabidae (24,1%; N=7), Formicidae (37,9%; N=11), Phoridae (10,3%; N=3) y Staphylinidae (27,6%; N=8) sobre estas estructuras y no había larvas en su interior. En estromas cerrados la familia predominante fue Formicidae con un total de 11 individuos, representado un 37,9% del total, no se encontraron tendencias estadísticamente significativas en la distribución de las proporciones de individuos pertenecientes a distintos grupos taxonómicos (Chi cuadrado, N=29; df=3, $X^2= 4,52$, $p=0,211$). De la misma forma, se obtuvo un bajo índice de dominancia (D=0,289) y alta “Evenness” ($e^H/S= 0,918$), mientras que el índice de Shannon correspondió a H=1,301. Cabe señalar que de los insectos colectados en este estado de desarrollo de las estructuras reproductivas de *C. espinosae* solamente en los especímenes de Staphylinidae se observó la presencia de estos en una aparente rasgadura de uno de los apotecios, mientras que los demás especímenes fueron hallados superficialmente sobre estas estructuras.

Insectos capturados en *C. espinosae* en estado maduro

De los 317 individuos (91,6%) obtenidos en los estromas con apotecios abiertos, 279 correspondieron a larvas de dípteros de *Anastomyza* Malloch (Diptera: Heleomyzidae). Estos dípteros representaron al 88% del total de las familias de insectos presentes en estroma maduro (apotecios abiertos) (Chi cuadrado, N= 317; df=6, $X^2=1413,68$; $p<0,001$). Correspondiendo además al 98,94% del total de dípteros encontrados al interior de los estromas, destacando la estrecha relación con la asociación *C. espinosae*-*N. alpina*. Respecto a los índices de biodiversidad, el marcado sesgo por el aumento de especímenes por la colonización de los digüeños por *Anastomyza* sp., se vio reflejado en estos valores con un índice de dominancia, D=

0,7799, y la reducción de la “Evenness” ($e^H/S= 0,544$) e índice de Shannon, $H= 0,5073$. Comparando este último índice, entre los dos estados reproductivos del digüeño, se confirmó que esta diferencia es estadísticamente significativa (Test de t, $t=-10,02$; $df= 74,608$; $p=0,001$).

Tabla 1. A. Porcentajes y cantidades de Insectos según familias en estromas de apotecios cerrados de *C. espinosae*. **B.** Porcentajes y cantidades de hexápodos según familias en estromas de apotecios abiertos de *C. espinosae*

| A Estroma cerrado | | | |
|--------------------------|---------------|----|---------|
| Orden | Familia | N | % Total |
| Hymenoptera | Formicidae | 11 | 37,93 |
| Coleoptera | Carabidae | 7 | 24,14 |
| Coleoptera | Staphylinidae | 8 | 27,59 |
| Diptera | Phoridae | 3 | 10,34 |
| | Total | 29 | |

| B Estroma abierto | | | |
|--------------------------|-----------------|-----|---------|
| Orden | Familia | N | % Total |
| Hymenoptera | Formicidae | 3 | 0,95 |
| Coleoptera | Carabidae | 14 | 4,42 |
| Coleoptera | Staphylinidae | 18 | 5,68 |
| Diptera | Carnidae | 2 | 0,63 |
| | Ceratopogonidae | 1 | 0,32 |
| | Heleomyzidae | 279 | 88,01 |
| | Total | 317 | |

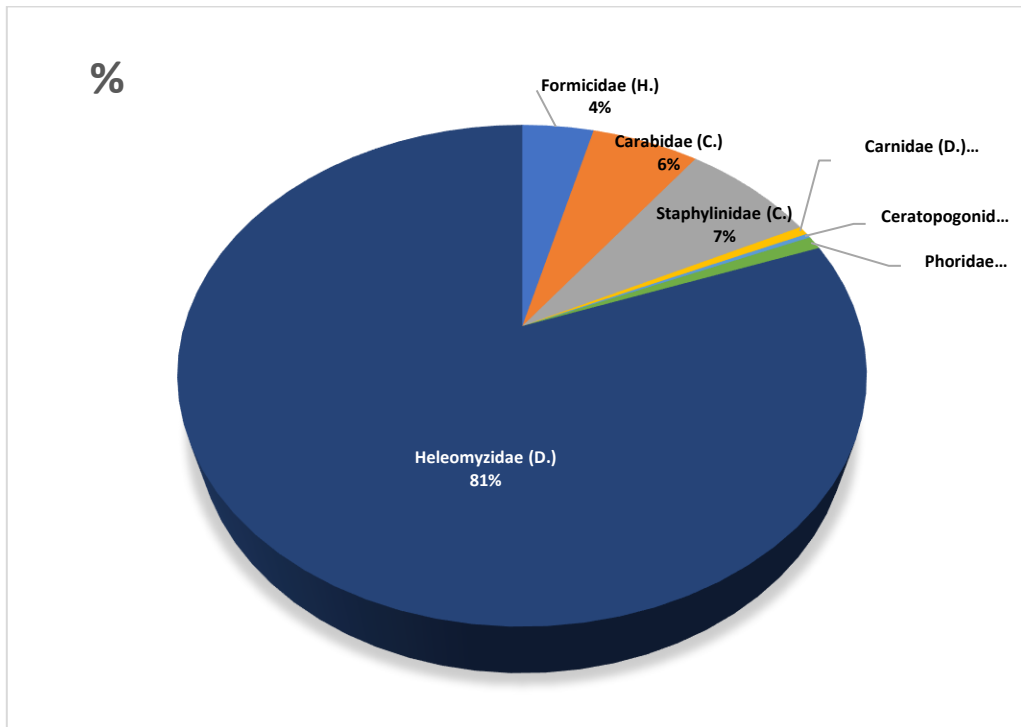


Figura 5. Porcentaje total de familias de insectos encontrados en estromas cerrados y abiertos de *C. espinosae*. (“C” = Coleoptera, “D” = Diptera e “H” = Hymenoptera).

Finalmente, se criaron 279 larvas (Figura 6a), logrando llegar a estadio de pupa en octubre (Figura 6b) y a estadio adulto durante Noviembre (Figura 6c). Del total de 31 adultos obtenidos en la cámara de crianza, se logró determinar que estas larvas correspondían a la familia Heleomyzidae, coincidiendo sus caracteres diagnósticos morfológicos de esta familia como la presencia de vibrisas bien desarrolladas, setas postverteales convergentes, vena costal espinosa y antenas pequeñas (McAlpine, 1985). Por otro lado, también se logró determinar que el género perteneciente de estos dípteros corresponde a *Anastomyza* Malloch. Siendo algunas de las principales características de este género la presencia de tres setas dorsocentrales y una venas costales engrosadas en la parte proximal del quiebre subcostal (Figura 7).

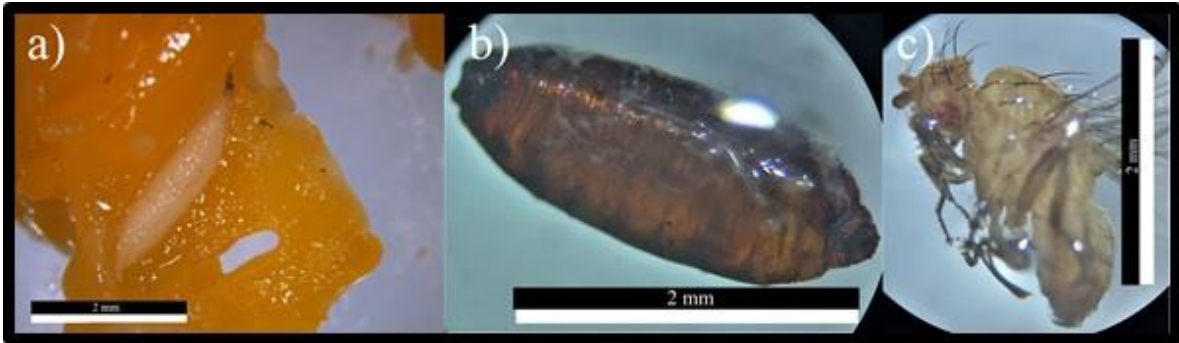


Figura 6. *Anastomyza* en sus tres diferentes estadios. a) larva en el digüene de *C. espinosae-Notofagus alpina*. b) pupa. c) adulto.

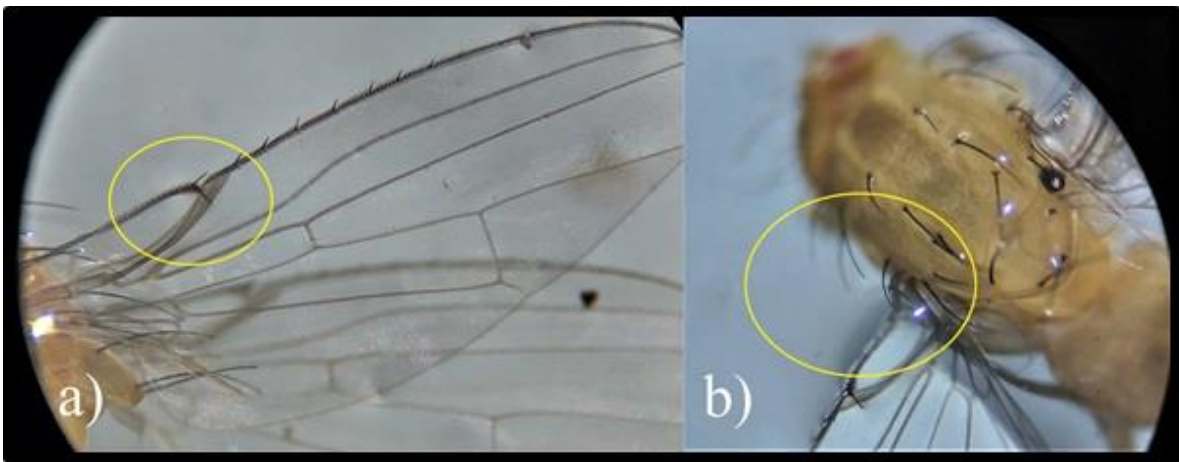


Figura 7. Algunos caracteres morfológicos diagnósticos para identificación de género *Anastomyza* a) vena costal engrosada en la parte proximal del quiebre subcostal. b) tres setas dorsocentrales del tórax.

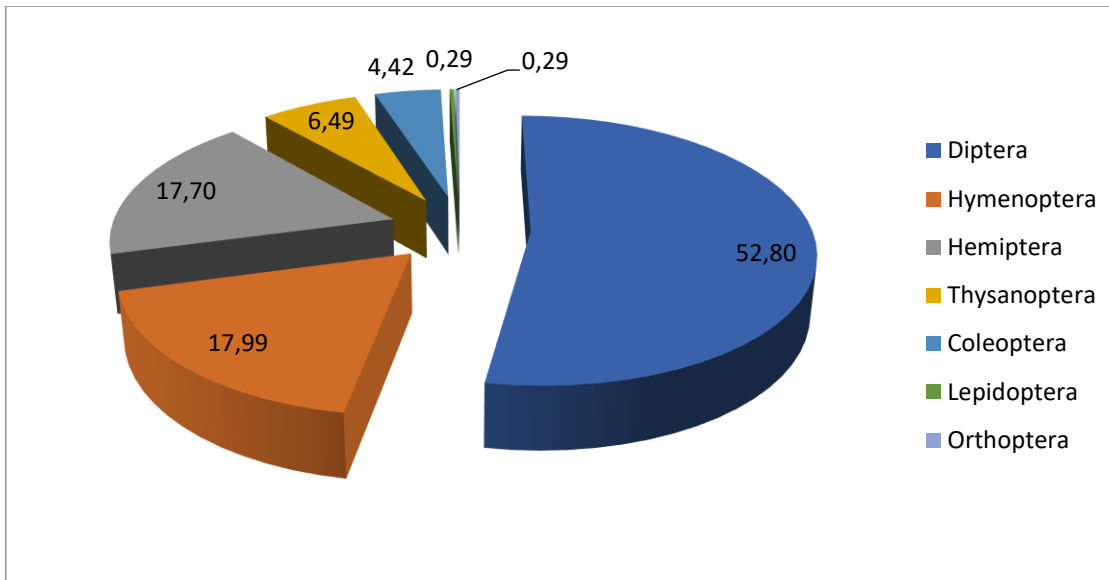


Figura 8. Presencia de órdenes (en distintos colores) de insectos encontrados en trampas semioquímicas.

Insectos capturados en trampas semioquímicas

En cuanto a los resultados obtenidos en las trampas semioquímicas se colectaron un total de 339 individuos, dentro de los cuales, el tratamiento con mayor presencia de insectos fue el de COVs de apotecios abiertos, los que corresponden a un 65,19% (N= 221) de la totalidad de insectos recolectados, mientras que el tratamiento de COVs de apotecios cerrados representó el 21,83% (N= 74) del total; mientras que el tratamiento control representó el 12,98% (N= 44) del total. Los órdenes más abundantes fueron Coleoptera (4,42%), Diptera (52,80%), Hymenoptera (17,99%), Hemiptera (17,70%), Thysanoptera (6,49%), Lepidoptera (0,29%) y Ortoptera (0,29%)(Figura 8), los órdenes con más diversidad familiar fueron Diptera e Hymenoptera, con 25 y 11 familias respectivamente. En cuanto a los índices analizados del total de familias en estas trampas(Tabla 2), se obtuvo un bajo índice de dominancia ($D= 0,065$) y baja “Evenness” ($e^H/S= 0,496$), mientras que el índice de Shannon correspondió a $H= 3,171$ (Tabla 2). En extractos con estromas abiertos se obtuvo un bajo índice de dominancia ($D= 0,061$) y “Evenness” ($e^H/S= 0,580$) más alta que el total, mientras que el índice de Shannon correspondió a $H= 2,870$ (Tabla 3). Por otro lado, en trampas con apotecios cerrados se obtuvo un índice de dominancia más alto, ($D= 0,134$) y más baja “Evenness” ($e^H/S= 0,544$), mientras que el índice de Shannon correspondió a $H= 2,57$ (Tabla 4). Finalmente en trampas control los

índices encontrados fueron dominancia ($D= 0,113$) y baja “Evenness” ($e^H/S= 0,697$), mientras que Shannon correspondió a $H= 2,473$ (Tabla 5)

Tabla 2. Índices de biodiversidad total de trampas semioquímicas

| | Total | Inferior | Superior |
|----------------|---------|----------|----------|
| Taxa | 48 | 47 | 48 |
| Individuos | 339 | 339 | 339 |
| Dominancia_D | 0,06571 | 0,05378 | 0,07561 |
| Shannon_H | 3,171 | 3,104 | 3,299 |
| Evenness_e^H/S | 0,4965 | 0,4695 | 0,5697 |

Tabla 3. Índices de biodiversidad de trampas semioquímicas de estroma abierto

| | COV's de Estroma abierto | Inferior | Superior |
|----------------|--------------------------------|----------|----------|
| Taxa | 40 | 39 | 41 |
| Individuos | 220 | 220 | 220 |
| Dominancia_D | 0.06169 | 0.05174 | 0.07165 |
| Shannon_H | 3.145 | 3.037 | 3.252 |
| Evenness_e^H/S | 0.5803 | 0.5187 | 0.642 |

Tabla 4. Índices de biodiversidad de trampas semioquímicas de estroma cerrado

| | COV's de estroma cerrado | Inferior | Superior |
|----------------|--------------------------------|----------|----------|
| Taxa | 24 | 24 | 24 |
| Individuos | 75 | 75 | 75 |
| Dominancia_D | 0,1342 | 0,07556 | 0,1577 |
| Shannon_H | 2,57 | 2,506 | 2,87 |
| Evenness_e^H/S | 0,5442 | 0,5106 | 0,7347 |

Tabla 5. Índices de biodiversidad de trampas semioquímicas control

| | Control | Inferior | Superior |
|----------------|---------|----------|----------|
| Taxa | 17 | 15 | 17 |
| Individuos | 44 | 44 | 44 |
| Dominancia_D | 0,1136 | 0,08161 | 0,1581 |
| Shannon_H | 2,473 | 2,262 | 2,654 |
| Evenness_e^H/S | 0,6975 | 0,6055 | 0,8375 |

Tabla 6. Comparación de test de t con índice de Shannon de COV's de estroma cerrado vs estroma abierto. Asterisco representa comparaciones estadísticamente significativas a p=0.05

| COV's de Estroma cerrado | | VS | COV's de Estroma abierto | |
|--------------------------|---|------------|--------------------------|-----------|
| Índice de Shannon | | | | |
| H | I | | H: | 3,1447 |
| H: | | 2,5697 | H: | |
| Varianza: | | 0,019774 | Varianza: | 0,0047042 |
| t: | | -3,6755 | | |
| df: | | 112,75 | | |
| p(same): | | 0,00036502 | * | |
| t: | | 2,4832 | | |
| df: | | 81,437 | | |
| p(same): | | 0,015074 | * | |

Tabla 7. Comparación de test de t con índice de Shannon de COV's de estroma cerrado vs control. No presenta comparaciones estadísticamente significativas

| COV's de Estroma cerrado | | VS | Control | |
|--------------------------|--|----|---------|--|
| Índice de Shannon | | | | |
| L | | M | | |

| | | | |
|-----------|----------|-----------|----------|
| H: | 2,5697 | H: | 2,473 |
| Varianza: | 0,019774 | Varianza: | 0,020153 |
| <hr/> | | | |
| t: | 0,48413 | | |
| df: | 110,37 | | |
| p(same): | 0,62925 | | |
| <hr/> | | | |
| t: | 0,54291 | | |
| df: | 117,13 | | |
| p(same): | 0,58822 | | |
| <hr/> | | | |

Tabla 8. Comparación de test de t con índice de Shannon de COV's de estroma abierto vs control. Asterisco representa comparaciones estadísticamente significativas a $p=0.05$

| COV's de Estroma abierto | | VS | Control | |
|-----------------------------|---|----------|-----------|-----------|
| Índice de Shannon | | | | |
| M | N | | | |
| H: | | 2,473 | H: | 3,1447 |
| Varianza: | | 0,020153 | Varianza: | 0,0047042 |
| <hr/> | | | | |
| t: | | -4,2609 | | |
| df: | | 66,217 | | |
| p(same): | | 6,59E-05 | * | |
| <hr/> | | | | |
| t: | | 2,0311 | | |
| df: | | 49,032 | | |
| p(same): | | 0,047683 | * | |
| <hr/> | | | | |

Con estos datos se realizó una prueba de t comparando los índices de Shannon (H) entre los diferentes tratamientos, obteniéndose, en la comparación entre COVs de estromas de apotecios abiertos y cerrados (Tabla 6), una diferencia significativa entre ambos tratamientos ($t: 2,483$; $df= 81,437$; $p=0,015$). Por otra parte, comparando los resultados del COVs con estroma cerrado vs control (Tabla 7), no hubo diferencias significativas ($t: 2,483$; $df= 81,437$; $p=0,588$). En la

comparación entre tratamiento de COVs con estromas abiertos vs control (Tabla 8) si se presentaron diferencias significativas ($t: 2,031$; $df= 49,032$; $p=0,047$). Por otra parte, en cuanto a los dípteros presentes en las trampas, destacó la presencia de las familias Fanniidae, Mycetophilidae y Dolichopodidae representando un 15,64%, 13,41% y 12,85% respectivamente, del total de dípteros. Además, otro de los órdenes con más presencia en trampas semioquímicas fue Hymenoptera, destacando la presencia de las familias Formicidae y Halictidae, representando el 36,07% y 18,03 del total de este orden respectivamente. Por último, en los órdenes Hemiptera y Thysanoptera las familias más presentes fueron Cicadellidae y Thripidae, representando un 98,33 y 95,45 respectivamente.

Por último, en el cálculo de índice de Jaccard se obtuvo un grado de similitud entre familias encontradas en trampas semioquímicas vs familias presentes en estromas de (II): 0,145 lo que indica que la presencia de algunos representantes de familias de dípteros en trampas semioquímicas vs dípteros al interior de estromas varió considerablemente entre ambos casos.

VII. DISCUSIÓN.

Descripción de la biodiversidad de la asociación *C. espinosae*-*Nothofagus alpina*.

En cuanto a los índices de biodiversidad aquí aplicados se puede establecer que la diversidad específica, en el caso de los estromas cerrados, según la dominancia es relativamente baja en comparación con las muestras de apotecios abiertos, esto nos indica que la probabilidad de encontrar 2 insectos de la misma familia en estas muestras es mayor en las muestras de estromas abiertos, siendo en este caso los dípteros del género *Anastomyza* los causantes del aumento de este índice, mientras que en estromas cerrados hubo menor predominancia a nivel de familias de los insectos en general. Esto demuestra la dominancia en cuanto a presencia de este díptero en este sistema, lo que podría posicionar a *Anastomyza* como parte importante de esta interacción hongo-insecto.

La presencia de representantes del género *Anastomyza* en Chile se ha descrito previamente algunos estudios de diversidad de Diptera en algunas zonas de Chile, un ejemplo de esto es el trabajo de Gonzales & Coscarón, 2005, donde se describe la presencia de *Anastomyza* (*Anastomyza specularis* Malloch) en la Cordillera de la Costa, Depresión Intermedia y Cordillera de los Andes, además en otro trabajo de González & Llanos, 2019 también se registró la presencia de *Anastomyza* en la Cordillera de la Costa (González & Llanos, 2019) sin embargo en este último trabajo en una cantidad reducida de individuos de este género. Esto en comparación al presente estudio, donde registró una cantidad de individuos del género *Anastomyza* mayor, podría deberse a algunas diferencias que involucran la ausencia de los árboles hospederos de *C. espinosae* en las zonas muestreadas de la cordillera de la costa en los estudios anteriores o variaciones ambientales, por lo que se requieren estudios que abarquen otras zonas de muestreo en las regiones del Maule, Biobío, Araucanía, Los Ríos y Los Lagos donde el árbol hospedero *N. alpina* se distribuye en Chile (Chilebosques, 2016), asegurándose de la presencia de *C. espinosae* para determinar si la presencia de *Anastomyza* es predominante de manera similar en esas zonas.

Por otro lado, considerando los resultados obtenidos a partir de los índices de biodiversidad es posible observar que los valores “Evenness” fueron mucho más altos en muestras de *C. espinosae* con apotecios cerrados ($e^H/S = 0,918$), esto indicaría que en este caso la abundancia

relativa de las familias totales, fue mucho más equitativa en comparación a familias presentes en estromas con apotecios abiertos ($e^H/S = 0,544$), esto ocurre cuando la abundancia de los datos se concentran en una sola especie (o familia) (Moreno *et al.*, 2011), siendo en este caso la familia Heleomyzidae donde se concentraron la mayoría de datos, representando un 88% de la entomofauna de estromas abiertos. Esta falta de proporcionalidad a nivel de familias demuestra una evidente predominancia a nivel de familia por Heleomyzidae en el hongo hospedero. Sin embargo, para determinar que exista esta tendencia en este sistema multitrófico, hacen falta estudios en otras zonas con presencia de estas interacciones *Nothofagus*-*Cyttaria*, como zonas andino-patagónicas. Este sistema a su vez, es tan complejo que las asociaciones *Cyttaria* sp. y *Nothofagus* sp., comúnmente no corresponden a una simple relación uno es a uno. Generalmente, una especie de *Cyttaria* se asocia con más de una (hasta cinco) especies de *Nothofagus* (Peterson et al., 2010). En el caso de *C. espinosae* se asocia a cuatro especies, por lo que sería interesante determinar si en la asociación de *C. espinosae* con otras especies de *Nothofagus* existirían las mismas tendencias de composición comunitaria, para establecer, por ejemplo si se mantiene la predominancia de la familia Heleomyzidae en otras especies del género *Cyttaria* o incluso determinar si esto puede variar según el árbol que *C. espinosae* esté parasitando.

En cuanto al índice de Shannon, se determinó que los valores fueron más altos en estromas con apotecios cerrados ($H=1,301$) y esto debido a que las familias se encuentran en los muestreos de manera más equitativa, lo que indica que la incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo de la comunidad y que este sea de una familia predominante es mayor. En el caso de los estromas abiertos ocurre lo contrario, siendo menor este índice ($H= 0,5073$) ya que los datos se concentran principalmente en la familia Heleomyzidae por lo que la incertidumbre en este caso resulta ser menor y hay más probabilidad de encontrar un díptero de la familia Heleomyzidae en una prueba aleatoria (Pla, 2006).

Con relación a la comparación de datos de trampas semioquímicas con prueba de t se puede establecer que las trampas de COV's de estromas abiertos tienen una mayor influencia en la atracción de insectos tanto frente a COV's de estromas cerrados como frente a los controles. A su vez los COV's de estromas cerrados tienen una capacidad atractante que no difiere significativamente de los controles, por lo que la presencia de estromas cerrados en este sistema no tendría mayor relevancia, por lo menos desde el punto de vista semioquímico, lo que

demuestra que los COV's presentes en el volatinoma de estromas ya abiertos tienen capacidad de atracción frente a insectos y principalmente frente a dípteros, como se ha observado en otros estudios donde se han analizado COV's de organismos fúngicos, determinándose que compuestos como el 1-octen-3-ol presentes en algunos extractos de hongos comestibles es capaz de atraer dípteros (Chaiphongpachara *et al.* 2018), También se conoce que el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo tienen una capacidad similar de atraer dípteros en otras especies de hongos (Borg-Karlson *et al.*, 1994) e isoamil acetato con etil acetato en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Christiaens *et al.*, 2014), género de levaduras identificadas en los estromas del género *Cyttaria* por lo que podría existir una relación con estos compuestos. Además los VOCs probablemente sean parte fundamental del entendimiento de la predominancia de especímenes de la familia Heleomyzidae en los estromas. Este tipo de estudios a futuro, en este modelo multitrófico, sería muy relevante, ya que se conoce muy poco sobre la evolución de compuestos odoríferos en las interacciones hongo-insecto a nivel general (Steinebrunner *et al.*, 2008) y sería una evidencia importante para determinar los compuestos que producen efectos atractantes y si estos se mantienen constante en la especie de *C. espinosae* o tienen variaciones en sus perfiles volátiles como se vio en los estudios de Steinebrunner *et al.* 2008 con el hongo *Epichloë* (Clavicipitaceae, Ascomycota) y dípteros del género *Botanophila* (Anthomyiidae) que suelen ser vectores de este hongo.

Según lo observado en todos los índices obtenidos en este trabajo se puede establecer que la diversidad de insectos en estromas con apotecios abiertos es bastante reducida y que se limita a la presencia de unas pocas familias, predominando la presencia de individuos de Heleomyzidae, familia nunca antes descrita en estromas de hongos del género *Cyttaria* lo que da paso a una serie de nuevas posibles investigaciones para dilucidar el rol que podrían tener estos dípteros en estos sistemas de interacción hongo-insecto.

Por último, con respecto a los valores obtenidos en los índices de trampas semioquímicas en estos no hubo diferencias significativas entre sí, esto básicamente porque en la mayoría de los tratamientos de estas trampas hubo una variabilidad de familias alta, con un total de 48 individuos, en comparación a los datos obtenidos en las recolecciones de cuerpos fructíferos. Esto se aprecia en la suma total de estos datos donde se alcanza, por ejemplo, un bajo índice de dominancia debido a que no hay familias tan marcadamente predominantes, mientras que el índice de Shannon ($H= 3,171$) lo que indica es una alta igualdad en cuanto a la cantidad presente

de cada familia en las muestras obtenidas. En este caso se observó que las familias Fanniidae, Dolichopodidae y Mycetophilidae predominaron por sobre las demás, las que han sido previamente registradas por otros autores con una abundante presencia de representantes de estas familias en bosques de *Nothofagus* (Dominguez, 2007; Elgueta, 1993; Oliveira & Amorim, 2014).

Química ecología del sistema

En este trabajo se caracterizó, por primera vez, la comunidad de insectos que habitan los cuerpos fructíferos de la asociación *C. espinosae-N. alpina*, en la Región de la Araucanía, Chile. Se observan diferencias significativas respecto a la diversidad de insectos encontrados en el cuerpo fructífero de *C. espinosae*, en sus diferentes estados de desarrollo (estroma con apotecios cerrados y apotecios abiertos). Dentro de éstos se destaca una predominancia de individuos del género *Anastomyza* dípteros encontrados desarrollándose principalmente dentro de los estromas con apotecios abiertos, en la fase de maduración, correspondiendo al 88% de los especímenes encontrados en dicha fase. Considerando que esta etapa es cuando ocurre la maduración y dispersión de las esporas de digüeñe (Gamundi, 1971), es posible hipotetizar que los individuos de *Anastomyza* puedan tener una interacción de alta dependencia con el digüeñe, esta suposición basándose netamente en la cantidad de especímenes de esta familia presentes en estromas, sin embargo para validar esto, hacen falta estudios posteriores que determinen si los dípteros del género *Anastomyza* tienen una preferencia por hongos de *C. espinosae* por sobre otros hongos. Esto en un futuro se podría llevar a cabo por medio de pruebas de túnel de viento con extractos de *C. espinosae* vs extractos de otros hongos de la misma temporada que se desarrollen en la zona de muestreo.

Con respecto a esto, los pocos registros que hay sobre estas interacciones Diptera-Cyttaria han sido descritos principalmente por micólogos como Gamundi & Horak (1993) quienes describieron la presencia de larvas de dípteros “micetofílicos” (Mycetophilidae) en estromas de *C. hariatii* en bosques andino-patagónicos. Por otro lado, Espinosa (1926) también describió la presencia de otro órdenes como Lepidóptera presentes en los estromas de *C. darwinii*, lo que podría sugerir que las larvas anteriormente registradas por estos autores, así como las descritas en el presente estudio podrían ser diferentes y variar dependiendo de la especie de *Cyttaria* en cuestión, considerando que ambas descripciones previas corresponden a especies diferentes.

Esto se condice con recientes estudios comparativos de parámetros químico-nutricionales donde se demostró que *C. espinosae* contiene un mayor contenido proteico y lipídico frente a *C. hariatii* que contiene un mayor contenido de carbohidratos (Inzunza, 2016; Salazar, 2019; Schmeda-Hirshmann *et al.*, 1999; Toledo *et al.*, 2016), lo que podría marcar ciertas preferencias de algunos hospederos a diferentes especies de *Cyttaria*. Esto último es interesante, desde el punto de vista de la asociación obligatoria entre especies del género *Cyttaria* y *Nothofagus* que a menudo se citan como un ejemplo clásico de cofilogenia en la que la biogeografía de un hongo es incluida (Peterson *et al.*, 2010), por lo que no resultaría extraño que existan otros organismos que aún no se hayan identificado que puedan formar parte de estas asociaciones coevolutivas y que también dependan de estos sistemas *Cyttaria-Nothofagus*. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender, de manera más integral, estos sistemas biológicos.

Tanto a través de las observaciones de campo como a través de la crianza en laboratorio, se puede inferir que los especímenes de *Anastomyza* sp en su etapa larval consumen los cuerpos fructíferos de la asociación *C. espinosae-Nothofagus alpina* lo que coincide con lo señalado por Birkemoe (2018) donde señala que las interacciones entre los organismos fúngicos e insectos se agrupan en 4 principales grupos, siendo una de estas la necesidad de nutrientes del insecto. De esta forma, están fuertemente vinculados a las características fenotípicas de los mismos, incluyendo los COVs de los hongos. Esto último señalado podría ser un sustrato ideal para el establecimiento de fidelidad al hospedero mediado por aprendizaje preimaginal o temprano (Barron & Corbet, 1999; Gandolfi *et al.*, 2003; Villagra *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2016; Sasakawa & Kon, 2018), documentado en varios linajes holometábolos. Esto podría generar una impronta en los adultos que emerjan del hongo, como ocurre en otros dípteros como *Drosophila melanogaster* Meigen que presentan este tipo de desarrollo de la conducta (Barron & Corbet., 1999). Estos adultos en vida libre tenderían a preferir, en sus búsquedas olfativas (de alimento, refugio o reproductiva), COVs similares a los experimentados como larva. Si se establece esta dependencia y los especímenes de *Anastomyza* sp son asociadas estrechas del digüeño, estas podrían contribuir también a la reproducción de este sistema y a la dispersión de otros elementos como microorganismos (Ulloa *et al.*, 2009; Christiaens *et al.*, 2014). Esto a la luz de su alta dominancia en el sistema durante el estado de estroma abierto, cuando ocurre esta dispersión (Tabla 1A). Adicionalmente, una idea plausible para explicar la diferencia en la riqueza y abundancia de dípteros entre las fases de maduración del cuerpo fructífero puede estar

relacionada a señales de COVs liberadas por el hongo, esto debido a que los microorganismos presentes al interior de los cuerpos fructíferos (Libkind *et al.*, 2007; Libkind *et al.*, 2011; Ulloa *et al.*, 2009) podrían liberar COVs más fácilmente al ambiente una vez que los estromas se encuentren en su estado maduro con los apotecios abiertos.

En relación a esto, estudios previos como los de Libkind *et al.*, 2007 y Ulloa *et al.*, 2009 han demostrado que los estromas maduros de *C. hariatii*, al presentar una mayor carga biológica de microorganismos como levaduras, siendo el género *Saccharomyces* predominante en estromas, estas tendrían efecto en los procesos fermentativos, influyendo a su vez en la producción de metabolitos secundarios, incrementando la atracción de dípteros como *D. melanogaster* en sustratos naturales (Becher *et al.*, 2012). En relación a esto, Christiaens *et al.* (2014) en un ensayo llevado a cabo también con dípteros del género *Drosophila* Fallén demostraron que éstas eran atraídas por compuestos volátiles de ésteres de acetato liberados por levaduras del género *Saccharomyces*, donde a su vez *Drosophila* actuaba como vector de estas levaduras. Estos mecanismos basados en semioquímicos, son comunes en levaduras, debido a sus limitadas capacidades de colonizar nuevos sustratos por sí solas, por lo que dependen de vectores animales, especialmente insectos de los órdenes Diptera e Hymenoptera para llevar a cabo su colonización a nuevos lugares (Francesca *et al.*, 2012; Ganter *et al.*, 1986; Goddard *et al.*, 2010).

Con respecto a la predominancia de dípteros en las trampas semioquímicas es interesante la concordancia con los datos obtenidos en las recolecciones de estromas en ambos estados, lo que como se ha señalado antes podría tener relación con los COV's presentes en estos cuerpos fructíferos según sus diferentes estados de desarrollo. Sin embargo, la presencia de algunos representantes de familias de dípteros en trampas semioquímicas vs dípteros al interior de estromas varió considerablemente como se pudo demostrar con el índice de Jaccard (IJ: 0,145) y fue mucho más diversa en trampas semioquímicas, esto podría deberse al fenómeno conocido como “eavesdropping” o “espionaje” de señal química (Hsueh *et al.*, 2013), en donde estos organismos receptores de señales químicas podrían lograr detectar algunos COVs de este sistema fúngico y verse atraídos a este, interactuando con estromas de manera parcial, sin embargo no se tiene mucha evidencia al respecto con dípteros, por lo que se requieren estudios

posteriores enfocados en determinar el rol de los dípteros encontrados en trampas semioquímicas para determinar si esto es correcto.

Dentro de las familias encontradas en estas trampas semioquímicas destaca la familia Fanniidae, lo que tiene sentido considerando que algunas especies habitan bosques (Rozkosny *et al.* 1997). Con especies de géneros como *Fannia* Robineau-Desvoidy en distribuciones relacionadas con los bosques de *Nothofagus* endémicos de Chile y Argentina (Domínguez 2007). Esto mismo ocurre con la familia Mycetophilidae que fue la segunda más abundante en estas trampas. Lo que coincide con lo expuesto por Oliveira & Amorim (2014) donde señalan que, los elementos templados de la fauna de Mycetophilidae en América del Sur, están fuertemente conectados a los bosques templados, especialmente aquellos con gimnospermas (por ejemplo, *Araucaria* en Chile y el sur de Brasil) y de *Nothofagus* spp. Además, en estudios de Elgueta (1993), en bosques de *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.), esta familia fue una de las más representada, con una abundancia relativa del 80%. Sin embargo, a pesar de que esta familia si tiene estrecha relación con organismos fúngicos (Ševčík, 2010), a pesar de estar presente en trampas semioquímicas no se encontró en estromas de *C. espinosae*. En este contexto, se requieren estudios con otras especies de *Cyttaria* para determinar si estos dípteros tienen o no preferencia por los cuerpos fructíferos de este género, ya que ha sido demostrado que los estromas de *C. hariotii* y, probablemente del resto de las especies del género, tienen una composición de pared celular distinta a la de la mayoría de hongos que consiste en β -(1–3)-glucanos y carecen de quitina (Oliva *et al.*, 1986), lo que podría influir en la preferencia de *Anastomyza* por estos cuerpos fructíferos.

En el caso de la presencia de la familia Dolichopodidae algo similar podría ocurrir sin embargo en este caso al ser una familia caracterizada por adultos depredadores (Grichanov, 2007), esto podría ser un mecanismo de defensa propio de *C. espinosae* para lograr atraer depredadores que ataquen a las larvas de *Anastomyza* que se alimentan de sus tejidos, esto, por medio de señales químicas, como ocurre en el caso de algunos organismos vegetales que utilizan sus metabolitos secundarios para atraer a especies de insectos que ataquen a insectos herbívoros (Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013) o microorganismos que puedan incluso alterar los COVs liberados por *Cyttaria* para utilizar a dípteros atraídos al estroma como vectores, similar a lo que sucede en

algunas interacciones planta-microorganismo-insecto (Martini *et al.*, 2014). Por último la presencia de las familias Formicidae y Halictidae del orden Hymenoptera presentes en trampas semioquímicas podrían relacionarse con la presencia de COV's de las levaduras que aloja *C. espinosae* en su interior, esto debido a que en estudios anteriores se ha demostrado que algunas familias de este orden pueden ser vectores de levaduras (Aquino *et al.*, 2013; Goddard *et al.*, 2010). Además, tanto en integrantes de Formicidae como Halictidae se ha demostrado la presencia de levaduras de forma externa o interna (Ba & Phillips, 1996; Batra *et al.*, 1973). Sin embargo hace falta un estudio más enfocado en este orden y específicamente en el rol de los COVs de las levaduras presentes en *C. espinosae* para determinar si integrantes de Hymenoptera actúan como vectores de levaduras.

VIII. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos aportan información directa para caracterizar las interacciones tróficas que existen entre el género *Anastomyza* y *C. espinosae-N. alpina* en el Sector El Escudo.

Además, se logra demostrar el valor de la mezcla de compuestos volátiles que compone su volatinoma en al menos dos estados de desarrollo contrastantes del hongo como señal semioquímica capaz de atraer insectos de los órdenes Diptera (Fanniidae, Dolichopodidae y Mycetophilidae) e Hymenoptera (Formicidae y Halictidae) que podrían componer una comunidad relacionada a este hongo, sin embargo cabe destacar que según las predicciones de esta tesis solo se destacó la predominancia de una sola familia micofaga en estas trampas, siendo esta Mycetophilidae y obteniéndose una diversidad significativamente distinta de familias en cuanto a los resultados obtenidos en la recolección de estromas de *C. espinosae*. Además en particular, representantes de la familia *Anastomyza* evidenciaron una presencia abundante en las recolecciones de *C. espinosae* con apotecios abiertos de acuerdo a la cuantificación obtenida de insectos presentes en estromas y debido a esto la diversidad de dípteros fue reducida. Por otra parte y según lo observado en el trabajo de campo y en la crianza de larvas de *Anastomyza* este hongo podría ser una importante fuente de alimento para el estado larval de este díptero, sin embargo se requieren más estudios que permitan determinar la importancia de este hongo como fuente de alimento para *Anastomyza*.

Por otro lado, con los resultados obtenidos tanto en las trampas semioquímicas como en la recolección de estromas, se puede determinar que existe influencia en la presencia de dípteros según el estado en el que se encuentre el cuerpo fructífero de este hongo, destacando una mayor presencia y atracción de Diptera cuando los estromas se encuentran con sus ascas expuestas al ambiente. Sin embargo, Aún hacen falta estudios que abarquen otras zonas, considerando que el árbol hospedero de esta relación planta-hongo, *N. alpina* se distribuye en Chile entre las regiones del Maule, Biobío, Araucanía, Los Ríos y Los Lagos (Chilebosques, 2016) para así estimar si esta relación con dípteros del género *Anastomyza* también se repite en otras zonas o si correspondería a una interacción local o poco frecuente.

Por otro lado, gracias a las investigaciones previas de *Cyttaria* y lo expuesto en este estudio, resultaría interesante en un futuro llevar a cabo estudios de microbiología y de determinación COV's enfocados en esta capacidad atractante frente a dípteros para llevar este sistema a un mayor grado de entendimiento que incluya el rol de los microorganismos involucrados en esta interacción multitrófica (Ulloa *et al.*, 2009; Libkind *et al.*, 2011).

Las interacciones entre plantas, hongos e insectos aún están en desarrollo. El enfoque que considera varios niveles tróficos en este tipo de estudios es sumamente enriquecedor ya que

permite dilucidar las condiciones que favorecen la mantención y diversificación de estas dinámicas. Además, en estos últimos años se ha destacado la importancia de la simbiosis en el contexto de la conservación y mantención de los ecosistemas (Blackwell *et al.* 2018; Howard *et al.*, 2019; Schapheer *et al.*, 2021) y, por lo tanto, conocer estas asociaciones con insectos que podrían contribuir a la estabilidad de estos procesos resultan clave para estos fines.

También cabe destacar la importancia de este tipo de estudios sobre todo en bosques nativos de *Nothofagus*, los que cada día se ven más reducidos por plantaciones forestales que a su vez desestabilizan estos ecosistema tan ricos en diversidad y que al ser sistemas tan complejos, queda mucho por dilucidar sobre fenómenos que aún son inciertos y de los que se tiene poca información hasta el día de hoy. Por lo que resulta vital proteger estos ecosistemas llenos de biodiversidad e interacciones de las que queda mucho por investigar.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcolado, P. (1998). Conceptos e índices relacionados con la diversidad. *Avicennia*, 8 (9): 7-21.

Aquino, R., Silveira, S., Pessoa, W., Rodrigues, A., Andrioli, J., Delabie, J., & Fontana, R. (2013). Filamentous fungi vectored by ants (Hymenoptera: Formicidae) in a public hospital in north-eastern Brazil. *Journal of Hospital Journal of Hospital Infection*, 83(3), 200-204.

Ba, A. & Phillips Jr, S. (1996). Yeast biota of the red imported fire ant. *Mycological Research*, 100(6), 740-746.

Barron, A. & Corbet, S. (1999). Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. *Animal behaviour*, 58(3), 621-628.

Batra, L., Batra, S., & Bohart, G. (1973). The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 49(1), 13–44.

Becher, P., Flick, G., Rozpędowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., ... & Bengtsson, M. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, 26(4), 822-828.

Benucci, G. & Bonito, G. (2016). The Truffle Microbiome: Species and Geography Effects on Bacteria Associated with Fruiting Bodies of Hypogeous Pezizales. *Microbial Ecology*, 72(1), 4–8.

Biedermann, P., & Vega, F. (2020). Ecology and evolution of insect–fungus mutualisms. *Annual Review of Entomology*, 65, 431-455.

Birkemoe T., Jacobsen R., Sverdrup-Thygeson A., Biedermann P. (2018) Insect-Fungus Interactions in Dead Wood Systems. In: Ulyshen M. (eds) *Saproxyllic insects: Diversity, ecology and conservation*. (Vol. 1, pp. 377-427). Springer.

Blackwell, M., & Vega, F. (2018). Lives within lives: hidden fungal biodiversity and the importance of conservation. *Fungal Ecology*, 35, 127-134.

Boch, R., Shearer, D., & Stone, B. (1962). Identification of isoamyl acetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. *Nature* 195, 1018–1020.

Borg-Karlson, A., Englund, F. & Unelius, C. (1994). Dimethyl oligosulphides, major volatiles released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus*. *Phytochemistry* 35, 321–323.

Boucias D.G., Lietze VU., Teal P. (2012) Chemical Signals That Mediate Insect-Fungal Interactions. In: Witzany G. (eds) *Biocommunication of Fungi*. (pp. 305–336). Springer.

Čadež, N., Bellora, N., Ulloa, R., Hittinger, C. T., & Libkind, D. (2019). Genomic content of a novel yeast species *Hanseniaspora gamundiae* sp. nov. from fungal stromata (Cyttaria) associated with a unique fermented beverage in Andean Patagonia, Argentina. *PLoS one*, 14(1), e0210792.

Chaiphongpachara, T., Padidpoo, O., Chansukh, K. K., & Sumruayphol, S. (2018). Efficacies of five edible mushroom extracts as odor baits for resting boxes to attract mosquito vectors: A field study in Samut Songkhram Province, Thailand. *Tropical Biomedicine*, 35(3), 653-663.

Chiappa, E., Rojas, M., & Toro, H. (1990). Clave para los géneros de abejas de Chile (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Chilena de Entomología*, 18, 67-81.

Chilebosque. 2016. Ficha de descripción de *Nothofagus alpina*. Acceso en línea <http://www.chilebosque.cl>

Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., & Dijksterhuis, J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2823-2829.

Christiaens, J. F., Franco, L. M., Cools, T. L., De Meester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., ... & Verstrepen, K. J. (2014). The fungal aroma gene ATF1 promotes dispersal of yeast cells through insect vectors. *Cell reports*, 9(2), 425-432.

Clift, A. D., & Larsson, S. F. (1987). Phoretic dispersal of *Brennandania lambi* (Kczal)(Acari: Tarsonemida: Pygmephoridae) by mushroom flies (Diptera: Sciaridae and Phoridae) in New South Wales, Australia. *Experimental & applied acarology*, 3(1), 11-20.

Cottier, F., & Mühlischlegel, F. A. (2012). Communication in Fungi. *International Journal of Microbiology*, 2012, 1–9.

Courtney, G. W., Pape, T., Skevington, J. H., & Sinclair, B. J. (2009). Biodiversity of diptera. En Footitt, R. G. Adler, P. H. (eds.). *Insect Biodiversity: Science and Society* (pp.185-222). Wiley-Blackwell.

Duff, T. J., Chong, D. M., & Tolhurst, K. G. (2016). Indices for the evaluation of wildfire spread simulations using contemporaneous predictions and observations of burnt area. *Environmental Modelling & Software*, 83, 276-285.

De Lederkremer, R. M. & Cirelli, A. (1988). Hidratos de carbono en hongos del género *Cyttaria*. Su importancia. *Anales de Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. Buenos Aires, Argentina 4: 153-161.

Dominguez, M. C. (2007). A taxonomic revision of the southern South American species of the genus *Fannia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Fanniidae). *Papeis Avulsos de Zoología*, 47(24), 289-347.

Elgueta, D. (1993). Invertebrates associated with *Nothofagus pumilio*(Poepp. et Endl.) Krasser forest soil, XII Region, Chile, with special reference to Insecta.]. *Revista Chilena de Entomología*, 20, 49-60.

Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J.R., and Smith, D.P. (2003). Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *Journal of Neuroscience*. 23, 9906–9912.

Espinosa, M. (1926). Los hongos chilenos del género *Cyttaria*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 30, 206-256.

Fäldt, J., Jonsell, M., Nordlander, G., & Borg-Karlson, A.-K. (1999). Volatiles of Bracket Fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and Their Functions as Insect Attractants. *Journal of Chemical Ecology*, 25(3), 567–590.

Field, L. M., Pickett, J. A., & Wadhams, L. J. (2000). Molecular studies in insect olfaction. *Insect Molecular Biology*, 9(6), 545–551.

Finley, R. J., Wuest, P. J., Royse, D.J., Snetsinger, R., Tetrault, R., & Rinker, D. L. (1984). Mushroom flies. *Mushroom Journal*, 139, 240-247.

Francesca, N., Canale, D. E., Settanni, L., & Moschetti, G. (2012). Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environmental microbiology reports*, 4(1), 105-112.

Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 10242-10297.

Galizia, C.G., Sachse, S., Rappert, A., and Menzel, R. (1999). The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Neuroscience*. 2, 473–478.

Gamundi, I. J. (1971). Las Cyttariales sudamericanas (Fungi-Ascomycetes). *Darwiniana*, 461-510.

Gamundí, I. J. & De Lederkremer R. M. (1989). Los Hongos Andino-Patagónicos del género *Cyttaria*. Sus hidratos de carbono. *Ciencia e Investigación*, 43: 4-13.

Gamundí, I. J. (1991). Review of recent advances in the knowledge of the Cyttariales. *Systema Ascomycetum*, 10: 69- 77.

Gamundí, I. J., & Horak, E. (1993). Hongos de los bosques andino-patagónicos. (pp.1-144). Vazquez Mazzini.

Gandolfi, M., Mattiacci, L., & Dorn, S. (2003). Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1533), 2623-2629.

Ganter, P. F., Starmer, W. T., Lachance, M. A., & Phaff, H. J. (1986). Yeast communities from host plants and associated *Drosophila* in southern Arizona: new isolations and analysis of the relative importance of hosts and vectors on community composition. *Oecologia*, 70(3), 386-392.

Goddard, M. R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R. C., & Jun, C. (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental microbiology*, 12(1), 63-73.

Grove, J.F., & Blight, M.M. (1983). The oviposition attractant for the mushroom phorid *Megaselia halterata*: the identification of volatiles present in mushroom house air. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 34, 181–185.

González, C. R., & Llanos, L. O. R. E. N. A. (2019). Dípteros (Insecta: Diptera) en la Cordillera de la Costa centro-sur de Chile: una mirada a su diversidad. En Smith-Ramirez, C. & Squeo, F. (eds.). *Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile*. (pp. 101-124). Universidad de Los Lagos.

González, C. & Coscarón, S. (2005). Diversidad de dípteros en la cordillera de la Costa en Chile. En Smith-Ramírez, J. Armesto & C. Valdovinos (eds.). *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*. (pp. 352-368). Editorial Universitaria.

Grichanov, I. Y. (2007). A checklist and keys to Dolichopodidae (Diptera) of the Caucasus and East Mediterranean. *VIZR RAAS*. 160 p.

Halle, E.A., & Carlson, J.R. (2006). Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* 125, 143–160.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

Harrington, R., Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (1990). Insect-Fungus Interactions. *Journal of Animal Ecology*. 59(1), 382–383.

Heath, H. B., & Reineccius, G. (1986). Flavor and its study. En *Flavor chemistry and technology* (pp. 3-42). Springer.

Howard, D. R., & Hall, C. L. (2019). Examining the management of rare insects through the lens of biotic interactions: a comparative case study of *Nicrophorus americanus* (Coleoptera: Silphidae) and *Gryllotalpa major* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 112(3), 158-168.

Hsueh, Y. P., Mahanti, P., Schroeder, F. C., & Sternberg, P. W. (2013). Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Current Biology*, 23(1), 83-86.

Hussey, N. W., & Wyatt, I. J. (1962). The interaction between mushroom mycelium and insect pest populations. *Mushroom Science*, 5, 509-517.

Inzunza, K. 2016. Propiedades bioactivas de dos especies de Cyttaria (digüeños) (*C. espinosae* y *C. hariotii*) y su caracterización nutricional [Título profesional, Universidad de Concepción]. Repositorio Universidad de Concepción. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/2685>

Jakovlev, J. (2012). Fungal hosts of mycetophilids (Diptera: Sciaroidea excluding Sciaridae): a review. *Mycology*, 3(1), 11-23.

Jevgeni, J. (2012). Fungal hosts of mycetophilids (Diptera: Sciaroidea excluding Sciaridae): a review. *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*, 3(1), 11-23

Kakumyan, P., Suwannarach, N., Kumla, J., Saichana, N., Lumyong, S., & Matsui, K., (2020). Determination of volatile organic compounds in the stinkhorn fungus *Pseudocolus fusiformis* in different stages of fruiting body formation. *Mycoscience*, 61(2), 65–70.

Kohlmeyer, J., & Kohlmeyer, E. (1974). Distribution of *Epichloe typhina* (Ascomycetes) and its parasitic fly. *Mycologia* 66, 77-86.

Kües, U., Khonsuntia, W., Subba, S., & Dörnte, B. (2018). Volatiles in communication of Agaricomycetes. En Anke, T. & Schüffler, A. (eds.). *The mycota: Physiology and Genetics*. (vol. 15, pp.149-212). Springer.

Kiihnholz, S. (2004). Chemical ecology and mechanisms of reproductive isolation in ambrosia beetles. [Doctoral dissertation, Simon Fraser University]. Semantic Scholar. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:86162969>

Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 97-129.

Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L., & Sampaio, J. P. (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and environmental microbiology*, 73(4), 1120-1125.

Libkind, D., Tognetti, C., Ruffini, A., Sampaio, J. P., & Van Broock, M. (2011). *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) on stromata of *Cyttaria hariatii* in northwestern Patagonian *Nothofagus* forests. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(3), 226-232.

McAlpine, D. K. (1985). The Australian genera of Helcomyzidae (Diptera: Schizophora) and a reclassification of the family into tribes. *Records of the Australian Museum*, 36(5-6), 203-251.

Mansourian, S., & Stensmyr, M. C. (2015). The chemical ecology of the fly. *Current opinion in neurobiology*, 34, 95-102.

Martini, X., Pelz-Stelinski, K. S., & Stelinski, L. L. (2014). Plant pathogen-induced volatiles attract parasitoids to increase parasitism of an insect vector. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 8.

Michener, C.D., (2007). *The Bees the World*, Second. ed. The Johns Hopkins Univerty Press, Baltimore, Md, USA.

Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., et al. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346:763–67

Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73–83.

Moreno, C.E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza, España. M&T–Manuales y Tesis SEA. 84 p

Moreno, C. E., Barragán, F., Pineda, E., & Pavón, N. P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1249-1261.

Mound, L. A., & Kibby, G. (1998). *Thysanoptera: an identification guide*. CAB international.

Oliva, E., Fernández-Cirelli, A. & Lederkremer, R. (1986). Chemical composition of the cell Wall of the tree fungus *Cyttaria hariatii* Fischer. *Experimental Mycology*, 10: 150-156.

Oliveira, S. S., & Amorim, D. D. S. (2014). Catalogue of Neotropical Diptera. Mycetophilidae. *Neotropical Diptera*, 25.

Peterson, K. R., Pfister, D. H., & Bell, C. D. (2010). Cophylogeny and biogeography of the fungal parasite *Cyttaria* and its host *Nothofagus*, southern beech. *Mycologia*, 102(6), 1417-1425.

Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590

Quintana-Rodriguez, E., Rivera-Macias, L.E., Adame-Alvarez, R.M., Torres, J.M., Heil, M., (2018). Shared weapons in fungus-fungus and fungus-plant interactions? Volatile organic compounds of plant or fungal origin exert direct antifungal activity in vitro. *Fungal Ecology*, 33, 115–121.

Ramírez, G., Fagundez, C., Grosso, J.P., Argibay, P., Arenas, A., Farina, W.M., (2016). Odor experiences during preimaginal stages cause behavioral and neural plasticity in adult honeybees. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10.

Rebolleda-Gómez, M., & Wood, C. W. (2019). Unclear intentions: eavesdropping in microbial and plant systems. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 385.

Richardson, P. N., & Heshing, J. J., (1978). Laboratory rearing of the mushroom phorid *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae). *Annals of Applied Biology*, 88(2), 211-217.

Rinker, D. L., & Snetsinger, R. J. (1984). Damage threshold to a commercial mushroom by a mushroom-infesting phorid (Diptera: Phoridae). *Journal of economic entomology*, 77(2), 449-453.

Rosenthal, G. A., & Berenbaum, M. R. (2012). *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites: ecological and evolutionary processes* (Vol. 2). Academic Press.

Rozkosny, R., Frantisek, G. & Pont, A.C. (1997) The European Fanniidae (Diptera). *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae Brno* 31, 1-80.

Salazar, V. (2019). Comparación de parámetros químico-nutricionales de las especies del género *Cyttaria* más consumidas en Chile [Tesis de maestría, Universidad de Concepción]. Repositorio Bibliotecas UdeC. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/869>

Salazar, V., Figueroa, F., Soto, L., Pérez, C., Abdala-Díaz, R., Becerra, J., (2020). Nutritional characteristics and cytotoxic effect of polysaccharides extracted from the digüeñes *Cyttaria berteroi* and *Cyttaria hariotii* present in Chile. *Revista Chilena de Nutrición*. 47, 750–756.

Sampaio, J. P. & Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and environmental microbiology*, 74(7), 2144-2152.

Sasakawa, K., Kon, Y., (2018). Learning-induced host preference in male parasitoid wasps as a potential driver of ecological speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. 31, 1750–1755.

Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Reyes, S., Gutiérrez, M. & J. Loyola. (1999). Biological Activity and Food Analysis of *Cyttaria* spp. (Discomycetes). *Economic Botany*, 53 (1): 30-40.

Schmeda-Hirschmann, G., Villaseñor-García, M.M., Lozoya, X., Puebla-Pérez, A.M., (2001). Immunomodulatory activity of Chilean *Cyttaria* species in mice with L5178Y lymphoma. *Journal of Ethnopharmacology*. 77, 253–257.

Ševčík, J. (2010). (p. 4) *Czech and Slovak Diptera associated with fungi*. (2nd ed.). Slezské zemské muzeum.

Spiteller, P. (2008). Chemical defence strategies of higher Fungi. *Chemistry. A European Journal*, 14(30), 9100–9110.

Steinebrunner, F., Schiestl, F. P., & Leuchtman, A. (2008). Variation of Insect Attracting Odor in Endophytic *Epichloë* Fungi: Phylogenetic Constrains Versus Host Influence. *Journal of Chemical Ecology*, 34(6), 772–782.

Stork, N.E., McBroom, J., Gely, C., Hamilton, A. (2015). New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), 7519-7523.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., and Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of grape and wine research*, 11(2), 139-173.

Styger, G., Prior, B., and Bauer, F.F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(9), 1145.

Toledo, C., Barroetaveña, C., Fernandes, A., Barros, L. & I. Ferreira. 2016. Chemical and antioxidant properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* spp. forest, Argentina. *Molecules*, 21(9), 1201.

Triplehorn, C. A., Johnson, N. F., & Borror, D. J. (2005). *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*. (7th ed). Brooks/Cole.

Sandhu, G. S., y Bhattal, D. S. (1987). Biology of phorid fly, *Megaselia sandhui* Disney (Diptera: Phoridae) on temperate mushroom. En: *Cultivating Edible Fungi*. Wuest, P.J., Royse, D.J. y Beelman, R.B. (Eds.). Elsevier. Amsterdam, pp 395-404.

Sherwood-Pike, M.A. & Gray, J. (1985). Silurian fungal remains: probable records of the Class Ascomycetes. *Lethaia*, 18,1–20

Stork, N.E., McBroom, J., Gely, C., Hamilton, A.J. (2015). New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), 7519-7523.

Ulloa, J. & Libkind, D. & Fontenla, S. & van Broock, M. (2009). Levaduras fermentadoras aisladas de *Cyttaria* sp. (Fungi) en bosques Andino-Patagónicos (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 44, 239-248.

Villagra, C.A., Pennacchio, F., Niemeyer, H.M. (2007). The effect of larval and early adult experience on behavioural plasticity of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Naturwissenschaften*, 94(11), 903–910.

Wenke, K., Kai, M., & Piechulla, B. (2010). Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, 231(3), 499-506.

Werner, F. G. (1961). *The Beetles of the United States (A manual for identification)*. Section 1. (Ross H. Arnett, Jr. eds). Catholic University of America Press.

Werner, S., Polle, A., & Brinkmann, N. (2016). Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(20), 8651-8665.

White, P. R. (1981) Spread of the mushroom disease *Verticillium fungicola* by *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae). *Protection Ecology*, 3, 17-24.

Yang, F. Z., Li, Y. X., Tang, M., Zhu, G. L., Zhou, S. P., & Yang, B. (2020). Tenuazonic acid-induced change in volatile emission from rose plants and its chemometrical analysis. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(2), 129-140.

Yeates, D. K., & Wiegmann, B. M. (2005). Phylogeny and evolution of Diptera: recent insights and new perspectives. *The evolutionary biology of flies*, 14-44.

Yeates, D. K., Wiegmann, B. M., Courtney, G. W., Meier, R., Lambkin, C., & Pape, T. (2007). Phylogeny and systematics of Diptera: two decades of progress and prospects. *Zootaxa*, 1668(1), 565-590.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. (4th ed.). Prentice Hall.

X ANEXOS

Anexo 1. Glosario

Alomonas: Señales químicas que suelen mediar la interacción entre organismos de diferentes especies. Éstas suelen ser beneficiosas para el organismo que las emite, pero perjudiciales para los organismos receptores.

Apotecios: En hongos, corresponde al ascocarpo en forma de copa contenido en el estroma con el himenio expuesto a la madurez.

Cuerpo fructífero: En hongos, corresponde a la estructura pluricelular sobre la que se forman otras estructuras productoras de esporas, como los basidios o los ascas.

Estroma: En hongos, corresponde a la fructificación formada por hifas vegetativas que contienen de dos a varios apotecios

Feromonas: Señales químicas cuyos receptores son miembros de la misma especie que las emite y son ventajosas para ambos organismos entre los cuales se establece la comunicación e interacción ecológica.

Micelio: En hongos, corresponde al conjunto de cuerpos vegetativos compuestos por filamentos microscópicos ramificados.

Micofagia: Alimentación basada en el consumo de organismos fúngicos.

Quimiotipo: Grupo de individuos de una especie que se distingue en forma significativa del resto según su composición química

Volatinoma: Corresponde al conjunto de compuestos orgánicos volátiles emitido por un organismo que puede usarse como huella distintiva de su fenotipo químico en un determinado estado de desarrollo.

Anexo 2. Órdenes y familias capturados con las trampas de semioquímicos en los sectores de instalación de trampas, incluyendo el porcentaje de presencia de cada orden

| Orden | Familia | COV's de Estroma cerrado | COV's de Estroma abierto | Control | Total | N° Total de orden | % |
|----------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|---------|-------|-------------------|-------|
| Diptera | Anthomyiidae | 3 | 4 | 0 | 7 | 179 | 52,80 |
| | Asilidae | 1 | 0 | 0 | 1 | | |
| | Bibionidae | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| | Calliphoridae | 0 | 2 | 0 | 2 | | |
| | Carnidae | 1 | 13 | 0 | 14 | | |
| | Cecidomyiidae | 4 | 2 | 1 | 7 | | |
| | Ceratopogonidae | 3 | 2 | 1 | 6 | | |
| | Chironomidae | 1 | 0 | 1 | 2 | | |
| | Chloropidae | 0 | 2 | 0 | 2 | | |
| | C. no identificado | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| | Dolichopodidae | 4 | 19 | 0 | 23 | | |
| | Empididae | 1 | 7 | 1 | 9 | | |
| | Fanniidae | 4 | 24 | 0 | 28 | | |
| | Heleomyzidae | 0 | 2 | 0 | 2 | | |
| | Muscidae | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| | Mycetophilidae | 2 | 17 | 5 | 24 | | |
| | Phoridae | 3 | 6 | 2 | 11 | | |
| | C. no identificado | 0 | 3 | 0 | 3 | | |
| | Scathophagidae | 1 | 0 | 0 | 1 | | |
| | Scatopsidae | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| | Sciaridae | 1 | 4 | 3 | 8 | | |
| Sphaeroceridae | 0 | 1 | 0 | 1 | | | |
| Syrphidae | 1 | 5 | 0 | 6 | | | |
| Tachinidae | 1 | 16 | 0 | 17 | | | |
| Therevidae | 0 | 1 | 0 | 1 | | | |
| Hymenoptera | Ceraphronidae | 0 | 3 | 0 | 3 | 61 | 17,99 |
| | Cynipidae | 0 | 2 | 0 | 2 | | |
| | Diapriidae | 2 | 6 | 0 | 8 | | |

| | | | | | | | |
|-------------|--------------------|----|----|----|----|----|-------|
| | Figitidae | 0 | 2 | 2 | 4 | | |
| | Formicidae | 3 | 9 | 10 | 22 | | |
| | Halictidae | 0 | 10 | 1 | 11 | | |
| | Ichneumonidae | 1 | 2 | 0 | 3 | | |
| | Mymaridae | 1 | 0 | 0 | 1 | | |
| | Platygastridae | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| | Tenthredinidae | 0 | 4 | 0 | 4 | | |
| | Tiphiidae | 0 | 1 | 1 | 2 | | |
| Hemiptera | Cicadellidae | 23 | 29 | 7 | 59 | 60 | 17,70 |
| | Delphacidae | 0 | 0 | 1 | 1 | | |
| Coleoptera | Chrysomelidae | 0 | 3 | 1 | 4 | | |
| | Coccinellidae | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| | Lathridiidae | 0 | 0 | 1 | 1 | 15 | 4,42 |
| | Ptilidae | 0 | 3 | 0 | 3 | | |
| | Staphylinidae | 1 | 2 | 2 | 5 | | |
| | C. No identificado | 1 | 0 | 0 | 1 | | |
| Thysanopera | Aelothripidae | 1 | 0 | 0 | 1 | 22 | 6,49 |
| | Thripidae | 11 | 6 | 4 | 21 | | |
| Orthoptera | | | | | | 1 | 0,29 |
| | Romaleidae | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| Lepidoptera | | | | | | 1 | 0,29 |
| | Prodoxidae | 0 | 1 | 0 | 1 | | |

Anexo 3.
Abundancia

relativas de familias de insectos capturados en trampas semioquímicas en los tres sectores muestreados.

