



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Variación morfológica asociada al desempeño metabólico
de vuelo de *Heliconius charithonia*

TESIS

Que presenta:

Biol. Velia Iris Ramos Pérez

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de tesis: Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca

Morelia, Michoacán, mayo de 2018



ÍNDICE

Resumen general.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	10
Materiales y métodos.....	11
Resultados.....	18
Discusión.....	28
Conclusiones.....	33
Literatura citada.....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables medidas en individuos de <i>H. charithonia</i> durante 2016 y 2017 (Media \pm DS).	21
Tabla 2. Desempeño energético en individuos de <i>H. charithonia</i> durante 2016 y 2017 (Media \pm DS).	23
Tabla 3a. Relación entre la carga alar con las tasas metabólicas y las reservas energéticas en hembras de <i>H. charithonia</i> .	25
Tabla 3b. Relación entre la carga alar con las tasas metabólicas y las reservas energéticas en machos de <i>H. charithonia</i> .	25
Tabla 4. Resultados de las regresiones múltiples por mínimos cuadrados parciales (PLS) de <i>H. charithonia</i> .	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posición de las marcas en el ala anterior derecha de todos los individuos de <i>H. charithonia</i> .	12
Figura 2. Análisis de variables canónicas de todos los individuos de <i>H. charithonia</i> colectados en 2016 y 2017. Hembras colectadas durante 2016 (puntos negros), hembras colectadas durante 2017 (cruces azules), machos colectados durante 2016 (estrellas rojas) y machos colectados durante 2017 (cuadros rosas). Se muestran las rejillas de deformación para hembras (c y d) y machos (a y b).	28
Figura 3. Efectos significativos del año (3a), tasas metabólicas (3b) y la interacción entre ellos (3c), en hembras y machos de <i>H. charithonia</i> , colectados en 2016 y 2017.	20
Figura 4. Estimación de energía disponible en la musculatura torácica de individuos de <i>H. charithonia</i> .	22
Figura 5. Relación entre la edad y la tasa metabólica de vuelo de machos de <i>H. charithonia</i> , colectados durante 2017.	24
Figura 6. Relación entre la forma del ala de hembras de <i>H. charithonia</i> con variables aerodinámicas. Hembras muestreadas durante 2016 (puntos negros) y 2017 (cuadros azules).	25
Figura 7. Relación entre la forma del ala de machos de <i>H. charithonia</i> con variables metabólicas. Machos muestreados durante 2016 (puntos negros) y 2017 (cuadros azules).	26

RESUMEN GENERAL

La gran diversidad de morfologías alares en mariposas está asociada a distintos comportamientos de vuelo. El gran costo de las conductas de vuelo en insectos, requieren de la disponibilidad de combustible y el transporte de oxígeno a los músculos de vuelo, como de ajustes aerodinámicos dependientes de la morfología de las alas. Por lo que la alimentación debe cubrir los requerimientos energéticos de carbohidratos, lípidos y proteínas, que serán degradados y sintetizados para generar la energía suficiente que se gasta en el vuelo y se refleja en la respiración a través de tasas diferenciales de consumo de O_2 y producción de CO_2 . En la mariposa *Heliconius charithonia* se han descrito al menos tres fenotipos: hembras y machos con dos distintos tipos de apareamiento asociadas a diferencias en los patrones de forrajeo y de aerodinámica de vuelo; lo que se ha sugerido que debe estar asociado a diferencias en los presupuestos energéticos, desempeño locomotor, y niveles de gasto energético y metabólico de vuelo entre los 3 fenotipos. En este trabajo, se analiza la relación entre la variación morfológica alar y el desempeño metabólico en hembras y machos en una población de *Heliconius charithonia* donde se han descrito estos 3 fenotipos. Se evaluaron las diferencias en la morfología alar, la aerodinámica de vuelo (i.e. masa corporal, carga alar, proporción de músculo de vuelo y la proporción de aspecto), gasto metabólico de vuelo (i.e. tasas metabólicas en reposo, en esfuerzo de vuelo y el pico máximo de producción de CO_2 durante el esfuerzo de vuelo), así como el contenido energético (i.e. carbohidratos, lípidos y proteínas) como estimador de condición de cada individuo. Los resultados confirman el dimorfismo sexual por forma de alas, aunque no están asociadas a diferencias en la aerodinámica de vuelo, excepto por un incremento de contenido energético cuando la carga alar aumenta. No se encontró relación entre la carga alar y la tasa metabólica basal, la tasa de esfuerzo de vuelo y el pico máximo de producción de CO_2 durante el esfuerzo de vuelo, a excepción de los machos colectados en el segundo año de muestreo, sugiriendo un mayor gasto metabólico en reposo y en esfuerzo de vuelo, al incrementar la carga alar del individuo. Tampoco se observaron diferencias intersexuales en los presupuestos energéticos (i.e. cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas), pero si entre la proporción de lípidos en los

músculos torácicos de los machos de ambas temporadas siendo mayor en los machos del primer año de muestreo y es consistente con los resultados de la tasa metabólica de esfuerzo de vuelo, donde los machos del primer año de muestreo realizan un mayor gasto metabólico, y sugiere un costo de vuelo diferencial entre años . En contraste, la tasa metabólica basal no presenta diferencias significativas entre sexos. Estos resultados sugieren una plasticidad en la forma alar en *H. charithonia*, la cual podría estar asociada a la optimización de la morfología sobre otros rasgos, que pudiera permitir un vuelo energéticamente menos costoso.

Palabras clave: *Heliconius*, morfología alar, Aerodinámica, Tasas metabólicas, contenido energético.

ABSTRACT

Butterfly's wing morphology variation is associated to several flying behaviors. To insects, flying represents a constant need for fuel availability and oxygen transportation to the flying muscles as well as aerodynamic adjustments that depends on wings morphology. Nutrition must cover all the energetic requirements of carbohydrates, lipids and protein that will be broken down during metabolism to generate enough power for flying, which will be reflected in respiration, through the O₂ consumption and CO₂ production. In *Heliconius charithonia* butterfly, at least 3 morphological phenotypes have been described: females and males with two different mating tactics, which are associated with differences in foraging patterns and flying aerodynamics; and it has been proposed that this affects the availability of energy supply, locomotor performance and the metabolic spend levels among the 3 phenotypes. We focus in the relation among wing's morphologic variation and metabolic performance between females and males in *Heliconius charithonia* population where these 3 phenotypes were described. Comparisons of the wing's morphology, flying aerodynamics (i.e. body mass, wing loading, flying muscle ratio and appearance ratio), flying metabolic spend (i.e. resting metabolic rate, flying metabolic rate and maximum peak in the CO₂ production while flying), and finally the energetic reserves composition (i.e. carbohydrates, lipids and proteins) as appraiser for everyone. Results confirm sexual dimorphism in wing's shape, even while these are not associated with the differences with flying aerodynamics but for the increase in the energetic reserves by increasing wing loading. No relationship between wing loading with resting metabolic rate, flying metabolic rate and the maximum peak in the CO₂ production while flying were found except for males collected during the 2nd year of sampling. These suggest an upper metabolic expenditure while resting and flying determined by wing loading. No intersexual differences were found in the energetic/fuel reserves (i.e. carbohydrates, lipids and proteins), such differences were found again among males from both collecting seasons being higher in the males from the first sampling year. Finally, resting metabolic rates do not differ between

sexes this points to a similar body condition and coincides with the results of flying metabolic rate, with the exception in the males from the first sampling year that do a higher metabolic spend suggesting different flying cost between years. Our results suggest a wide wing's shape plasticity in *H. charithonia* that might be associated with the morphology optimization in other aspects that are able to allow a lower flying energetic cost.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La cinemática de vuelo de los insectos los distingue de otros grupos de animales capaces de volar (Ansari *et al.* 2006), caracterizado por su habilidad para alterar de inmediato las estructuras anatómicas necesarias para el vuelo, tales como la deformación alar y el cambio de la conformación torácica mediante el movimiento de los músculos (Dudley, 2000; Klowden, 2008); y que, aunado a las características altamente flexibles de su membrana alar, hace que el vuelo en este grupo de animales sea altamente eficiente (Combes y Daniel, 2003). Sin embargo, durante el vuelo las alas ultraligeras de los insectos deben generar la fuerza necesaria para soportar el peso del cuerpo y maniobrar, lo que involucra resistir tanto las fuerzas impuestas por el aire circundante, como las fuerzas de inercia asociadas a la continua aceleración y desaceleración de su propia masa corporal, incluso varias veces por minuto (Combes y Daniel, 2003; Nation, 2015).

Volar es una actividad costosa para los insectos, en la que tanto el oxígeno como la disponibilidad de combustible (Chapman, 1998) son factores importantes para realizar tal esfuerzo locomotor (Dudley, 2000; Klowden, 2008). Los músculos de vuelo en insectos requieren de grandes tasas de gasto metabólico y energético (Dudley, 2000; Arrese y Soulages, 2010), por lo que dependen del transporte de oxígeno a través de la hemolinfa y el almacenaje de energía en forma de carbohidratos, lípidos y algunas proteínas. Estos combustibles son obtenidos mediante la alimentación, y son degradados y sintetizados por diferentes procesos a nivel celular, donde se obtiene energía, pero también se libera CO₂. En ese sentido la capacidad casi inmediata de los insectos de volar a partir de un estado de reposo está limitada tanto por suministro de oxígeno, como por las reservas energéticas presentes en los músculos de vuelo, lo que deriva en un incremento de las tasas metabólicas de hasta 100 veces a partir del reposo (Chapman, 1998; Dudley, 2000; Klowden, 2008; Nation, 2015). Por lo que el vuelo en estos grupos emplea gran cantidad de recursos que de otra manera podrían ser asignados al mantenimiento somático o a la reproducción.

La alta eficiencia de vuelo se debe principalmente a la forma del movimiento de sus alas y la habilidad para maniobrar. En mariposas, es necesario generar suficiente fuerza para mantener el movimiento constante de las alas que requiere el vuelo, por lo que los estudios de **aerodinámica de vuelo** se enfocan en evaluar parámetros como:

- a) La *carga alar* como descriptor de la capacidad que tiene un individuo para cargar el peso de su cuerpo y las alas, y la producción de fuerza para volar (Betts y Wootton, 1988; Corbet, 2000; Dudley y Srygley, 1994; Dudley, 2000).
- b) La *proporción de músculo de vuelo* que determina la musculatura necesaria para soportar el peso del individuo y su capacidad de aceleración (Betts y Wootton, 1988; Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005).
- c) La *proporción de aspecto* como descriptor de la forma del ala (Dudley, 2000; Sane, 2003; Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005).

La energía que necesitan los músculos de vuelo es obtenida de las **reservas energéticas** (i.e. *carbohidratos, lípidos y proteínas*) que serán convertidas a energía a través de la metabolización celular (Chapman, 1998; Klowden, 2008; Arrese y Soulages, 2010; Nation, 2015) por lo que son un buen estimador tanto de la condición energética de cada individuo, como de la inversión en músculos y el poder de vuelo (i. e. *proporción de lípidos presentes en los músculos torácicos*) (Vande Velde, y Van Dyck, 2013). De igual forma, medir el **gasto metabólico** de un individuo mediante *tasas metabólicas*, permite estimar la velocidad a la que un individuo utiliza la energía disponible (i.e. reservas energéticas) en un estado de reposo absoluto (tasa metabólica basal) como estimador de condición corporal, o durante alguna actividad (tasa metabólica de esfuerzo de vuelo) para estimar el costo del vuelo, y esto se verá reflejado durante la respiración en el consumo de oxígeno o en la producción de dióxido de carbono (Chapman, 1998; Dudley 2000; Klowden, 2008; Nation, 2015).

Diversos estudios se han enfocado a evaluar el desempeño metabólico y energético en insectos (Davis *et al.*, 2000; Mueller y Diamond, 2001; Canzano *et al.*, 2006; Nespolo *et al.*, 2008; Snelling *et al.*, 2012; Fountain *et al.*, 2016) y su relación con

factores como la edad, la fecundidad (Kemp, 2001; Gibbs y van Dyck, 2010; Woods *et al.*, 2010; Niitepõld *et al.*, 2014; Niitepõld y Boggs, 2015) y la senescencia metabólica (Niitepõld y Hanski, 2013). Sin embargo, aún son escasos los trabajos que abordan la relación entre la variación morfológica y los gastos metabólicos y energéticos durante el vuelo (Berwaerts *et al.*, 2002; Takeuchi, 2006; Martínez-Lendech *et al.*, 2007; Vande Velde y Van Dyck, 2013; Niitepõld y Boggs, 2015). Esto es particularmente relevante en grupos de insectos voladores como las mariposas, en que el vuelo se involucra prácticamente en todas sus actividades (i.e. alimentación, búsqueda de pareja, dispersión, oviposición) y en que existe una gran diversidad intra e interespecifica en morfologías alares asociadas a diferentes comportamientos de vuelo (Berwaerts *et al.*, 2002; Dudley, 2000; Chazot *et al.*, 2016).

Las mariposas del género *Heliconius* presentan gran diversidad de morfologías adaptativas en las alas resultado de diferentes presiones de selección natural, lo cual, asociado a sus elevados presupuestos energéticos resultado de su alimentación a partir de polen y néctar y su gran longevidad (i.e. 3 a 6 meses) (Boggs *et al.*, 1981; Penz y Krenn, 2000; Millán *et al.*, 2010; Gilbert, 1972; Harpel *et al.*, 2015), las convierte en un grupo modelo para el estudio de la relación entre la morfología alar, el desempeño morfológico de vuelo y su efecto en metabolismo de los individuos. En este contexto, se ha descrito en algunas especies de *Heliconius* una relación estrecha entre las variaciones en la morfología de las alas y el comportamiento reproductivo (Deinert *et al.*, 1994; Hernández y Benson, 1998). En particular en los machos de *Heliconius charithonia* se han descrito dos fenotipos reproductivos, los machos que realizan apareamiento pupal y que presentan alas alargadas y anchas que mejoran su capacidad de excluir a otros machos en la competencia de apareamiento por hembras en estadio pupal; mientras que los machos con alas cortas y esbeltas que mejoran su maniobrabilidad realizan una estrategia reproductiva de persecución de hembras voladoras adultas. En el caso de las hembras, presentan dimensiones alares similares a los machos pupales, pero son más robustas, por lo tanto, más pesadas, lo que incrementa la carga alar y les

permite cargar el peso adicional que representan los óvulos en las ovarias (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005 y 2010).

En ese contexto, se ha sugerido que en *H. charithonia* las diferencias en la biomecánica y esfuerzo de vuelo, así como en conducta de vuelo (i.e. cortejo, persecución de hembras), y en los patrones de forrajeo de los machos de ambas estrategias de apareamiento, así como de las hembras, deben resultar en diferencias en sus costos metabólicos y energéticos del vuelo (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005). En este trabajo se evalúa la relación entre la variación morfológica de hembras y machos de *H. charithonia* y su relación con los patrones de gasto metabólico (i.e. costo energético) y capacidad de vuelo. En particular, se predice que las hembras, al tener mayor ingesta de polen y volar diariamente menores distancias (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005) presentarán un menor gasto metabólico y altas cantidades de reservas de energía para cubrir el elevado costo de producir y cargar huevos. Los machos, al presentar una menor tasa de forrajeo y desplazarse mayores distancias realizando costosos vuelos reproductivos (e.g. hovering), presentarán elevadas tasas metabólicas, así como bajas cantidades de reservas de energía (i.e. carbohidratos, lípidos y proteínas).

HIPÓTESIS

La mariposa *Heliconius charithonia* presenta dimorfismo sexual por tamaño y forma de alas, así como diferencias intersexuales e intrasexuales en su aerodinámica, costos de vuelo y su gasto energético.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la condición corporal de hembras y machos de *H. charithonia* y su relación con la morfología alar.

Objetivos particulares

- Determinar si existen diferencias en la morfología alar de hembras y machos de *H. charithonia*.
- Evaluar el desempeño metabólico de los individuos de ambos sexos de *H. charithonia*.
- Estimar el presupuesto energético de vuelo (i.e. carbohidratos, lípidos y proteínas) presente en los individuos de ambos sexos de *H. charithonia*.
- Determinar la relación que presenta el desempeño metabólico y energético con la morfología alar de los individuos de ambos sexos de *H. charithonia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudió una población de *H. charithonia* que se encuentra en un remanente de bosque de niebla (Santuario del Bosque de Niebla) y en el Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero en la ciudad de Xalapa, Veracruz, México (19° 30'N, 96° 56'O; altitud media de 1400 msnm). Se realizaron 2 muestreos, uno durante el mes de octubre de 2016 y el segundo en septiembre de 2017. El sitio de estudio fue visitado diariamente por 30 días en un horario de 9:00 a 14:00 h CDT (GMT-5), colectando todos los individuos jóvenes de edades similares (i.e. alas completas, alas con coloraciones brillantes) que fueron observados volando en el área, los cuales fueron marcados con un plumón permanente de punta extrafina, color blanco, numerados consecutivamente (ala anterior izquierda para hembras y ala derecha para machos), sexados y se tomaron fotografías digitales con las alas extendidas en posición de vuelo y posteriormente liberados. Los individuos marcados fueron liberados y seguidos diariamente, al menos durante 10 días previos a las mediciones de condición metabólica.

Morfología alar

Las fotografías digitales de cada espécimen se capturaron con una cámara de 13 megapíxeles (MotoG3), colocada en una base fija, con escala milimétrica, a fin de mantener idéntica distancia focal para todos los individuos. Los individuos fueron inmovilizados cuidadosamente y colocados con las dos alas extendidas en posición de vuelo (Figura 1). Las fotografías fueron analizadas por medio de técnicas de morfometría geométrica a fin de comparar la forma del ala de machos y hembras. Se colocaron nueve marcas anatómicas (i.e. landmarks) en el contorno del ala anterior

derecha y en la intersección con las líneas de la coloración amarilla, las que se han propuesto como marcas homólogas en todos los individuos de ambos sexos (Mendoza, 2005). También fueron colocados dos puntos en la escala milimétrica, como referencia de tamaño, (Figura 1), utilizando el programa TPSdig (Rohlf, 2004). Se realizó una superposición tipo Procrustes para generar las coordenadas que se utilizarán como variable de forma, mediante el programa CoordGen8 (Sheets, 2014). Se realizó un análisis de variables canónicas utilizando las variables para comparar la forma de hembras y machos de ambas temporadas de muestreo mediante el programa CVAGen8 (Sheets, 2014). Los estimadores fueron analizados por separado, entre sexos y años, para evitar el efecto de la temporada en que se realizaron las colectas.

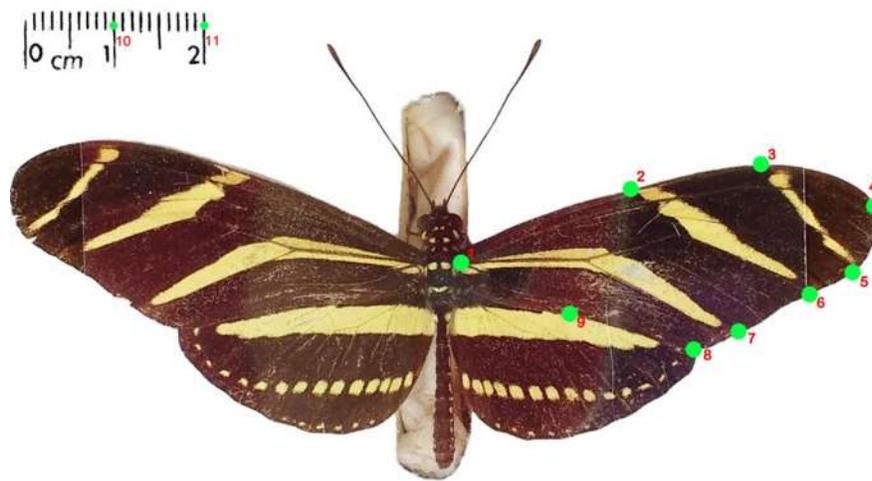


Figura 1. Posición de las marcas en el ala anterior derecha de todos los individuos de *H. charithonia*.

Aerodinámica de vuelo

Se utilizó el procesador de imagen ImageJ 1.50i para obtener la longitud alar (base del ala anterior derecha a la punta del ala), longitud corporal (punta de la cabeza a la punta del abdomen), área de las alas, masa seca total, así como la masa del tórax y abdomen sin patas y sin alas, todos como estimadores de tamaño de cada individuo. Los rasgos corporales relacionados con el vuelo fueron analizados por separado

mediante análisis de varianza, tomando cada estimador como variable dependiente, y el sexo y año como factores, mediante el programa estadístico JMP 8.0 (SAS, Institute Inc).

Se utilizó la masa corporal total y el área alar para calcular la carga alar de cada individuo como estimador de la capacidad de carga de las membranas alares:

$$\text{Carga alar} = \frac{9.81 * \text{masa seca total}}{\text{área alar}} \quad (1)$$

la proporción de músculos de vuelo como estimador de la cantidad de músculos necesarios para soportar peso y acelerar:

$$\text{Proporción de músculos de vuelo} = \frac{\text{masa torácica}}{\text{masa corporal}} \quad (2)$$

y la proporción de aspecto para describir la forma alar (Dudley, 2000; Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005):

$$\text{Proporción de aspecto} = \frac{4(\text{longitud alar})^2}{\text{área alar}} \quad (3)$$

Las diferencias en las capacidades aerodinámicas de vuelo entre sexos y temporadas de muestreo se analizaron mediante análisis de varianza factorial utilizando estos estimadores como variables dependientes, y el sexo y el año como factores fijos en el programa JMP 8.0.

Condición metabólica

La condición metabólica de cada individuo se evaluó utilizando un respirómetro de flujo continuo (Q-Box RP1LP Low Range Respirometry Package, Qubit Systems Inc., Kingston ON, Canadá), el cual se ajustó a un flujo de aire constante de 300 ml/min. El aire que entró en la cámara fue depurado de CO₂ con “soda lime” (CaHNaO₂),

para asegurar que todo el dióxido de carbono detectado fuera el producido por la respiración de los individuos (Lighton, 2008).

Para cada individuo se realizaron 2 mediciones de condición: la primera para evaluar la tasa metabólica basal como estimador de la condición metabólica del individuo y la segunda para medir la tasa metabólica de vuelo como estimador del esfuerzo metabólico que representa el vuelo sostenido para los individuos de ambos sexos de *H. charithonia*.

Tasa metabólica basal (TMB). En la última semana de cada temporada de muestreo, se colectaron todos los individuos previamente marcados en grupos de máximo 5 individuos por día (mínimo 2 individuos), los cuales fueron colocados en una jaula de transporte y colocados en un cuarto oscuro a temperatura ambiente para inducir un estado de reposo y reducir el estrés. Aleatoriamente se colocaron individualmente a los especímenes dentro de la cámara del respirómetro, que también fue cubierta con una tela oscura para evitar que algún factor externo (e.g. luz) influyera en la medición provocando respuestas de actividad en el individuo. Se hicieron pruebas con lecturas iniciales de 20 minutos; sin embargo, ya que la tasa metabólica basal se mantuvo constante desde los primeros 2 minutos, para reducir cualquier efecto colateral de la medición (e.g. estrés, daño de las alas) se redujo el tiempo de medida a 7 minutos, de los cuales se seleccionó la lectura de producción de CO₂ del minuto 5 de cada individuo (periodo de menor actividad y mayor estabilidad en la emisión de CO₂) como estimador de metabolismo basal (Niitepõld y Boggs, 2015). El experimento fue llevado a cabo en horario de baja o nula actividad de la especie en la zona de estudio (18:00 a 20:00 h). Los individuos fueron alimentados al terminar la medición.

Tasa metabólica de vuelo (TMV). Al día siguiente de la medición de la tasa metabólica basal, cada individuo fue tomado de manera aleatoria y colocado en una jaula cilíndrica de malla de poliéster, de 100 cm de altura y 38 centímetros de diámetro, en la que fue forzado a volar continuamente durante 90 segundos (i.e. impidiendo que se posara). Inmediatamente fue extraído de la red y colocado en la cámara del respirómetro para medir la tasa metabólica de vuelo durante 7 minutos.

Se seleccionó la lectura de producción de CO₂ a partir del segundo 110, para evitar una lectura errónea en el primer minuto, ya que al abrir la cámara del respirómetro para introducir al individuo puede entrar CO₂ de la respiración del observador. Como estimador de la tasa metabólica de vuelo, se utilizó la integral del esfuerzo (i.e. producción total de CO₂ a partir del segundo 110 de actividad dentro de la cámara del respirómetro) (Mattila y Hanski, 2014), así como la tasa metabólica máxima de vuelo (pico máximo de producción de CO₂) (Niitepõld y Boggs, 2015). Debido a que la tasa metabólica de vuelo fue medida en los mismos individuos en los que se midieron las tasas metabólicas basales, para comparar las diferencias de las tasas metabólicas entre sexos en ambas temporadas, se utilizó un Modelo Lineal Mixto (MLM) considerando el año, el sexo y la tasa metabólica (i.e. TMB y TMV) como factores fijos, la producción de CO₂ como variable respuesta y los individuos como factor aleatorio anidado en el sexo, en el programa estadístico JMP 8.0.

El esfuerzo de vuelo se registró en horario de actividad de los individuos (10:00 a 14:00 horas). Todos los datos metabólicos se obtuvieron mediante el software Logger Pro3.8.4 (Vernier Software & Technology). Al finalizar los experimentos, los individuos fueron sacrificados para la cuantificación del contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos como medida del gasto energético que presentaron los individuos después del esfuerzo de vuelo.

Reservas energéticas

El tórax y abdomen de cada individuo fueron triturados por separado, se tomaron 5 mg de músculo y exoesqueleto del tórax y 5 mg de abdomen, incluyendo exoesqueleto. Las muestras fueron preparadas independientemente. Se siguieron los métodos propuestos por Mokrasch (1954) para extracción de carbohidratos, el método de Goldsworth *et al.* (1972) para extracción de lípidos y, para extracción de proteínas los métodos de Le Bras y Echaubard (1977) y azul de Comassie, tomados de Isarraráz (2015). Las cuantificaciones de carbohidratos, lípidos y proteínas se realizaron en un espectrofotómetro (Spectronic 20 genesys) a 625nm, 530 nm y

595nm, respectivamente. Se utilizaron trehalosa, colesterol y albúmina bovina como estándares y así construir las curvas de calibración que permitieron estimar las concentraciones de los tres compuestos, contenidos en los individuos analizados. Los resultados fueron expresados como μg del compuesto por miligramo de tejido.

Se estimó la proporción de lípidos presentes en los músculos torácicos de todos los individuos (i.e. masa torácica seca/masa corporal seca restante al extraer lípidos), como estimador de la inversión en musculatura y poder de vuelo de los individuos (Vande Velde y Van Dyck, 2013).

Las diferencias de las reservas energéticas fueron analizadas mediante un análisis de varianza factorial en el programa estadístico JMP 8.0, usando estos estimadores como variables dependientes y el sexo y el año como factores fijos.

Relación de la carga alar con el gasto metabólico y energético.

Se usaron regresiones lineales para determinar si existe relación entre los gastos metabólicos y energéticos con la biomecánica de vuelo de los individuos, utilizando la tasa metabólica basal, la producción total de CO_2 y el pico máximo de CO_2 como variables independientes y las variables energéticas como variables dependientes. De igual forma, como variables energéticas independientes se usaron cuantificaciones de carbohidratos, lípidos, proteínas y la proporción de lípidos en los músculos torácicos. Como variable dependiente fue utilizada la carga alar. Los datos fueron separados por sexos y por años de colecta, para evitar el efecto de la temporada de los muestreos y analizados mediante JMP 8.0.

Relación de la forma alar con el gasto metabólico y energético.

Utilizando las coordenadas procrustes como una matriz de forma, se analizó la relación entre la forma de las alas de hembras y machos (variables dependientes) mediante regresiones múltiples por mínimos cuadrados parciales (PLS), utilizando

los programas PLSMaker8 (IMP Software), y R (3.3.1) con la librería Geomorph (Adams *et al.*, 2017), con las variables aerodinámicas (masa corporal seca, longitud alar, carga alar, proporción de músculo de vuelo y proporción de aspecto), metabólicas (tasa metabólica en reposo, tasa metabólica del esfuerzo de vuelo y el pico máximo) y energéticas (carbohidratos, lípidos, proteínas y la proporción de lípidos presentes en los músculos torácicos) ya obtenidas.

Se revisó la normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos de todas las secciones descritas anteriormente y en el caso que no se cumplieran estos supuestos se utilizaron métodos no paramétricos. Todos los datos cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianzas En los casos de no cumplirse el supuesto normalidad, se utilizó la transformación a valores ordinales (Conover e Iman, 1981).

RESULTADOS

Se marcaron y fotografiaron un total de 129 individuos en las dos colectas: octubre de 2016 (18 hembras y 35 machos) y septiembre de 2017 (37 hembras y 39 machos).

Morfología alar

El análisis de variables canónicas realizado para determinar la forma alar de los individuos de *H. charithonia*, no se encontraron diferencias en forma entre las hembras de ambos muestreos, pero si entre hembras y machos y entre los machos de ambos años de muestreos que se separan en dos grupos bien delimitados (Eje 1: $\Lambda=0.06$, $\chi^2=338.87$, g.l.=42, $p<0.001$; Eje 2: $\Lambda=0.29$, $\chi^2=148.48$, g.l.=26, $p<0.001$) (Figura 2).

Dado que se encontraron diferencias morfométricas entre los dos años de muestreo, los estimadores fueron analizados entre sexos y años.

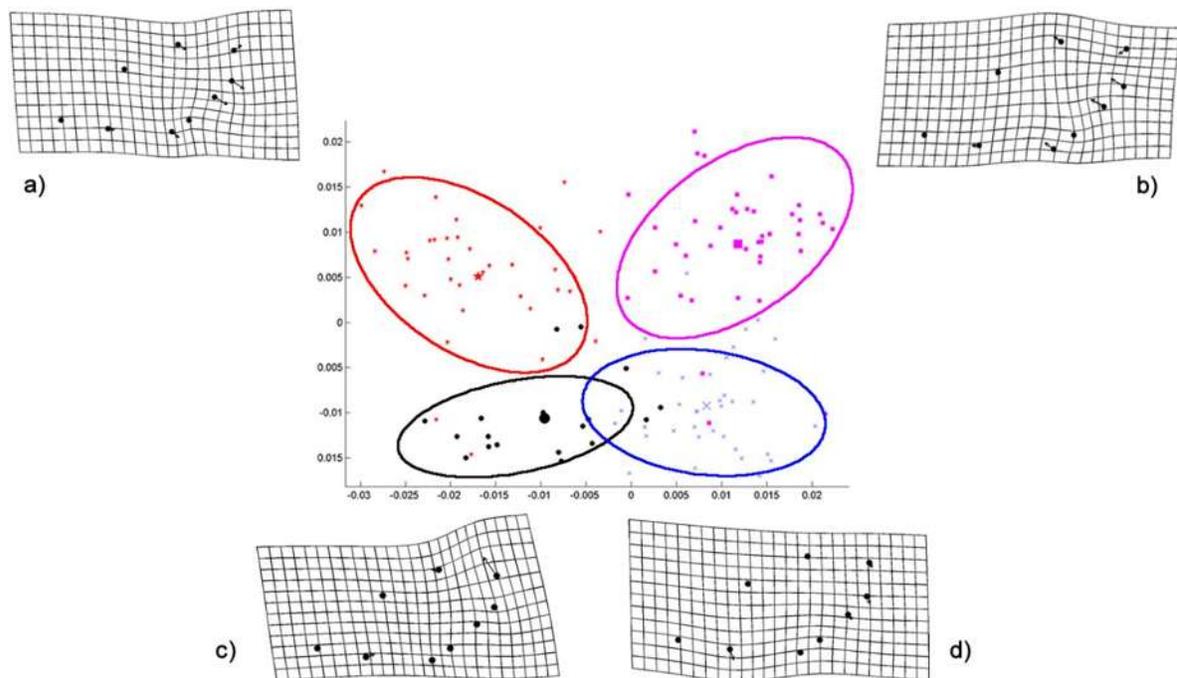


Figura 2. Análisis de variables canónicas de todos los individuos de *H. charithonia* colectados en 2016 y 2017. Hembras colectadas durante 2016 (puntos negros), hembras colectadas durante 2017 (cruces azules), machos colectados durante 2016 (estrellas rojas) y machos colectados durante 2017 (cuadros rosas). Se muestran las rejillas de deformación para hembras (c y d) y machos (a y b).

Aerodinámica de vuelo

Las pruebas de ANOVA factorial con los tamaños de las alas de los individuos mostraron también diferencias significativas en la longitud de las alas entre sexos, pero no entre años ni en la interacción entre factores (Tabla 1). La prueba de Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$) mostró que en ambos años de colecta las hembras tuvieron las alas más largas que los machos, mientras que el tamaño corporal únicamente presentó diferencias significativas entre hembras colectadas en el 2017 y machos del 2016 (Tabla 1).

Los análisis de varianza no mostraron diferencias significativas en la masa corporal seca, ni en la carga alar entre sexos, años ni en la interacción entre factores. De igual forma, no se encuentran diferencias significativas en la proporción de los músculos de vuelo. En la proporción de aspecto tampoco se encontraron diferencias significativas entre sexos ni años (Tabla 1).

Tabla 1. Variables medidas en individuos de *H. charithonia* durante 2016 y 2017 (Media \pm DS). Letras distintas muestran diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey-Kramer.

	Hembras 2016 N=18	Hembras 2017 N=37	Machos 2016 N=35	Machos 2017 N=39	F	p	g.l
Morfología							
Longitud alar (mm)	44.97 \pm 2.87a	44.72 \pm 3.09a	41.77 \pm 2.42b	41.84 \pm 2.77b	12.26	<0.001	3
Longitud corporal (mm)	24.82 \pm 1.63ab	25.44 \pm 1.78a	24.29 \pm 1.53b	24.82 \pm 1.78ab	2.73	0.045	3
Aerodinámica							
	N=7	N=14	N=11	N=19			
Masa corporal seca (mg)	92.84 \pm 29.60a	89.38 \pm 23.60a	67.87 \pm 12.74a	79.81 \pm 19.1a	2.74	0.053	3
Masa torácica (mg)	42.62 \pm 17.96a	43.39 \pm 12.23a	32.22 \pm 10.61a	37.97 \pm 9.97a	2.04	0.12	3
Carga alar (Nm⁻²)	0.79 \pm 0.16a	0.74 \pm 0.12a	0.65 \pm 0.12a	0.74 \pm 0.13a	1.9	0.14	3
Proporción músculos de vuelo	0.45 \pm .04a	0.48 \pm .05a	0.46 \pm .06a	0.47 \pm .04a	2.34	0.56	3
Proporción de aspecto	6.35 \pm 3.50a	5.64 \pm 2.14a	3.73 \pm 1.43a	4.71 \pm 1.66a	2.34	0.08	3

Condición metabólica

Se midió el metabolismo basal y de esfuerzo de vuelo mediante la producción de CO₂ (ppm) en 21 hembras y 30 machos (Tabla 2).

Los resultados del Modelo Lineal Mixto muestran efectos significativos solo de los factores año (F=11.0904, p=.0014) y tasas metabólicas (F=112.0891, p<.0001), así como de la interacción año x tasa metabólica (F=11.2589, p=.0016). La prueba de Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$) muestra que las tasas metabólicas son mayores en 2016 (Figura 3a), y las tasas metabólicas basales (TMB) de hembras y machos son también más altas (Figura 3b) y la interacción muestra que son las tasas metabólicas de vuelo (TMV) del 2016 son las más altas, seguidas de las TMV del 2017 y ambas mayores que las TMB 2016 y 2017 que no difieren entre ellas (Figura 3c).

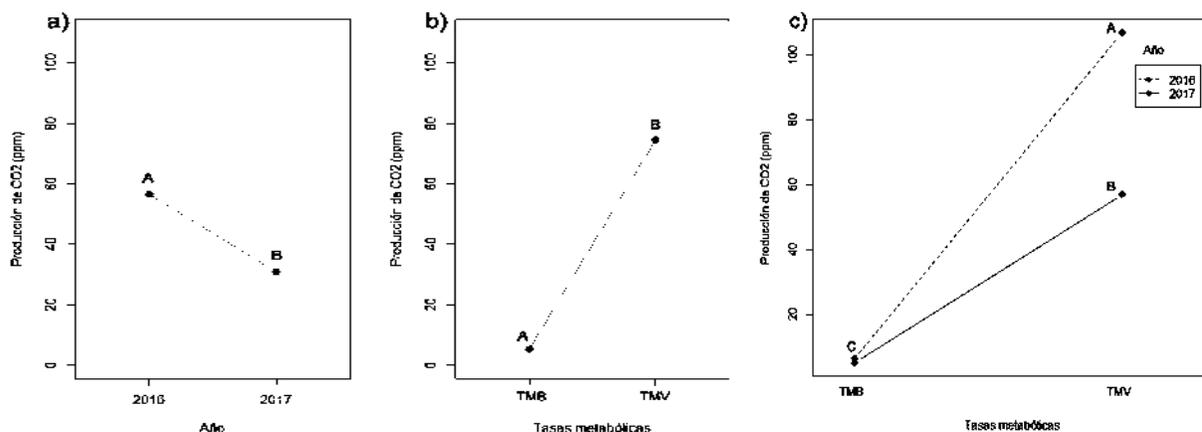


Figura 3. Efectos significativos del año (3a), tasas metabólicas (3b) y la interacción entre ellos (3c), en hembras y machos de *H. charithonia*, colectados en 2016 y 2017.

Tabla 2. Desempeño energético en individuos de *H. charithonia* durante 2016 y 2017 (Media \pm DS). Letras distintas muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey-Kramer.

	Hembras	Hembras	Machos	Machos			
	2016	2017	2016	2017	F	p	g.l.
	N=7	N=14	N=11	N=19			
Metabolismo							
Tasa							
metabólica	7.45 \pm 3.49a	5.43 \pm 2.36a	5.55 \pm 1.60a	4.65 \pm 1.39a	2.82	0.048	3
Basal (ppm)							
Tasa							
metabólica de	107.32 \pm 77.62ab	58.67 \pm 36.62ab	106.85 \pm 52.89a	55.76 \pm 43.33b	4.3	0.009	3
vuelo (ppm)							
Pico máximo							
de producción	33.57 \pm 31.87a	25.98 \pm 16.09a	39.22 \pm 27.10a	21.56 \pm 14.01a	1.2	0.31	3
de CO₂							
Energética							
Carbohidratos							
totales (μg/mg)	440.21 \pm 331.52a	365.89 \pm 291.57a	194.89 \pm 137.51a	200.52 \pm 147.54a	1.5	0.22	3
Lípidos totales							
(μg/mg)	375.83 \pm 275.78a	370.75 \pm 260.32a	177.56 \pm 123.74a	263.06 \pm 226.24a	2.12	0.11	3
Proteínas							
totales (μg/mg)	45.92 \pm 31.07a	35.33 \pm 21.67a	24.37 \pm 11.49a	22.91 \pm 18.32a	2.46	0.07	3
Proporción de							
lípidos en							
músculos							
torácicos (%)	52.79 \pm 5.61ab	48.80 \pm 5.91ab	54.27 \pm 9.23a	47.46 \pm 4.89b	3.23	0.03	3

Reservas de energía

Se cuantificaron los carbohidratos, lípidos y proteínas del tórax y abdomen de todos los individuos a los que se les midió condición metabólica (21 hembras y 30 machos). No se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de carbohidratos, lípidos, o proteínas, entre sexos, ni entre años (Tabla 2).

Sin embargo, el análisis de la proporción de lípidos presentes en los músculos torácicos sí mostró diferencias significativas; la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$)

mostró que las hembras presentan una proporción similar de lípidos en ambos años, mientras los machos colectados en el 2017 tienen una menor proporción de lípidos en los músculos del tórax ($47.46 \pm 4.89\%$), en comparación con los machos colectados en 2016 ($52.79 \pm 5.61\%$; Figura 4).

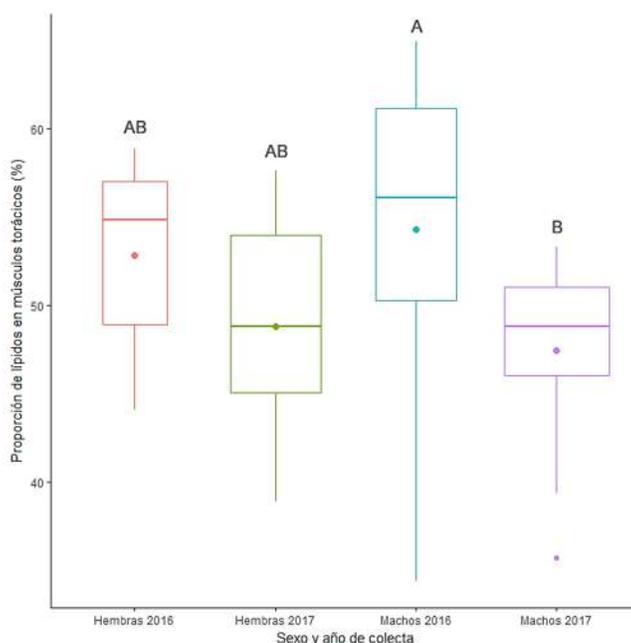


Figura 4. Estimación de energía disponible en la musculatura torácica de individuos de *H. charithonia*.

Relación de la carga alar con el gasto metabólico y energético.

Se evaluó la relación entre la carga alar (Nm^{-2}) con las variables metabólicas y energéticas. En el caso de las hembras, la carga alar se encuentra relacionada significativamente con los carbohidratos, lípidos y proteínas, pero no con la proporción de lípidos de músculos torácicos. De igual forma, no se encuentra relacionada con la producción de CO_2 durante el reposo o el esfuerzo de vuelo. (Tabla 3a).

Los machos del 2016 se comportan de manera similar a las hembras, su carga alar muestra una relación significativa con las variables energéticas, así como con la proporción de lípidos en los músculos del tórax; sin embargo, se encontró que la

carga alar de los machos del 2017 se encuentra relacionada tanto con el gasto metabólico como el energético, excepto con la proporción de lípidos (Tabla 3b).

Tabla 3a. Relación entre la carga alar con las tasas metabólicas y las reservas energéticas en hembras de *H. charithonia*.

	Hembras 2016			Hembras 2017		
	Carga alar (Nm ⁻²)			Carga alar (Nm ⁻²)		
	R ²	F	p	R ²	F	p
Metabolismo Basal	0.32	2.41	0.1813	0.03	0.43	0.5241
Metabolismo de vuelo	0.00	0.00	0.9321	0.03	0.49	0.4939
Pico máximo de vuelo	0.16	1.01	0.3607	0.11	1.50	0.2442
Carbohidratos	0.68	11.04	0.0209	0.44	9.50	0.0095
Lípidos	0.77	17.56	0.0086	0.39	7.87	0.0159
Proteínas	0.82	23.82	0.0045	0.49	11.57	0.0052
Proporción de lípidos en músculos de vuelo	0.21	1.38	0.2920	0.14	2.05	0.1771

Tabla 3b Relación entre la carga alar con las tasas metabólicas y las reservas energéticas en machos de *H. charithonia*.

	Machos 2016			Machos 2017		
	Carga alar (Nm ⁻²)			Carga alar (Nm ⁻²)		
	R ²	F	p	R ²	F	p
Metabolismo Basal	0.00	0.04	0.8356	0.56	21.95	0.0002
Metabolismo de vuelo	0.00	0.06	0.8079	0.27	6.51	0.0206
Pico máximo de vuelo	0.00	0.04	0.8355	0.44	13.88	0.0017
Carbohidratos	0.54	10.64	0.0098	0.69	38.28	<.0001
Lípidos	0.60	14.10	0.0046	0.28	6.76	0.0187
Proteínas	0.41	6.44	0.0318	0.55	21.15	0.0003
Proporción de lípidos en músculos de vuelo	0.59	12.95	0.0058	0.00	0.03	0.8509

Por el resultado anterior, se analizó el efecto de la edad en el metabolismo de vuelo de todos los individuos, realizando regresiones lineales usando como variable dependiente la edad, la cual fue estimada mediante los días de diferencia entre marcaje y captura para el experimento de condición metabólica, y como variable independiente la TMV. Todos los datos fueron analizados separando el sexo y el año de colecta.

No se encuentra relación entre la edad de las hembras de ambas colectas y la tasa metabólica de vuelo (2016: $R^2=0.02$, $F= 0.10$, $p=0.76$, y 2017: $R^2=0.01$, $F= 0.16$, $p=0.69$), ni en los machos muestreados en el 2016 ($R^2=0.21$, $F= 2.50$, $p=0.14$). Sin embargo, encontramos una relación positiva y significativa en los machos colectados durante el 2017 ($R^2=0.41$, $F= 12.09$, $p=0.002$; Fig. 5).

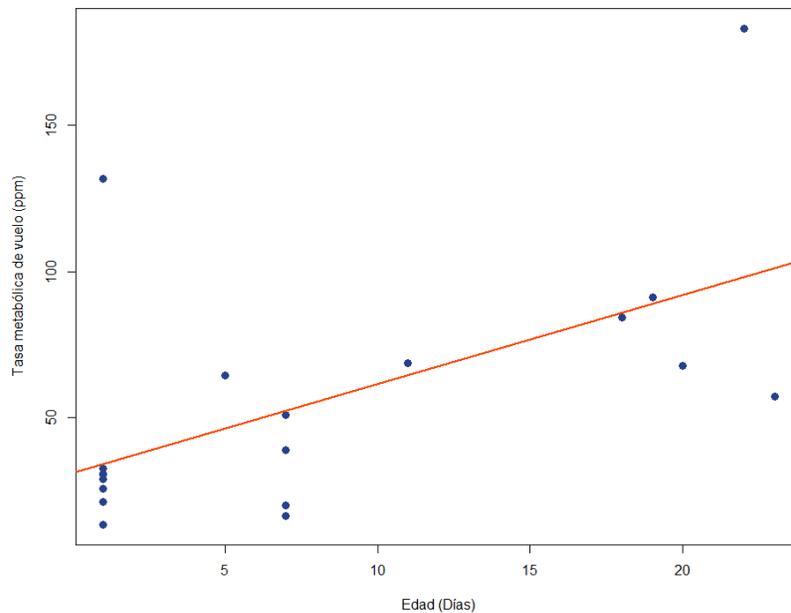


Figura 5. Relación entre la edad y la tasa metabólica de vuelo de machos de *H. charithonia*, colectados durante 2017.

Relación de la forma alar con el gasto metabólico y energético

Los resultados muestran que la forma del ala de las hembras está relacionada positivamente con las variables aerodinámicas: Masa corporal seca, longitud alar, carga alar, proporción de músculo de vuelo y proporción de aspecto (Figura 5). No se observó relación entre la forma alar con las tasas metabólicas ni con las variables energéticas (Tabla 4).

Los machos no mostraron relación con las variables morfológicas, pero se observan dos formas alares diferentes. Se encontró que la forma del ala está relacionada positiva y significativamente con las variables metabólicas (tasa metabólica basal, producción total de CO₂ y el pico máximo de CO₂ producido) (Figura 6), mientras que la forma alar no presenta ninguna relación con las variables energéticas (Tabla 4).

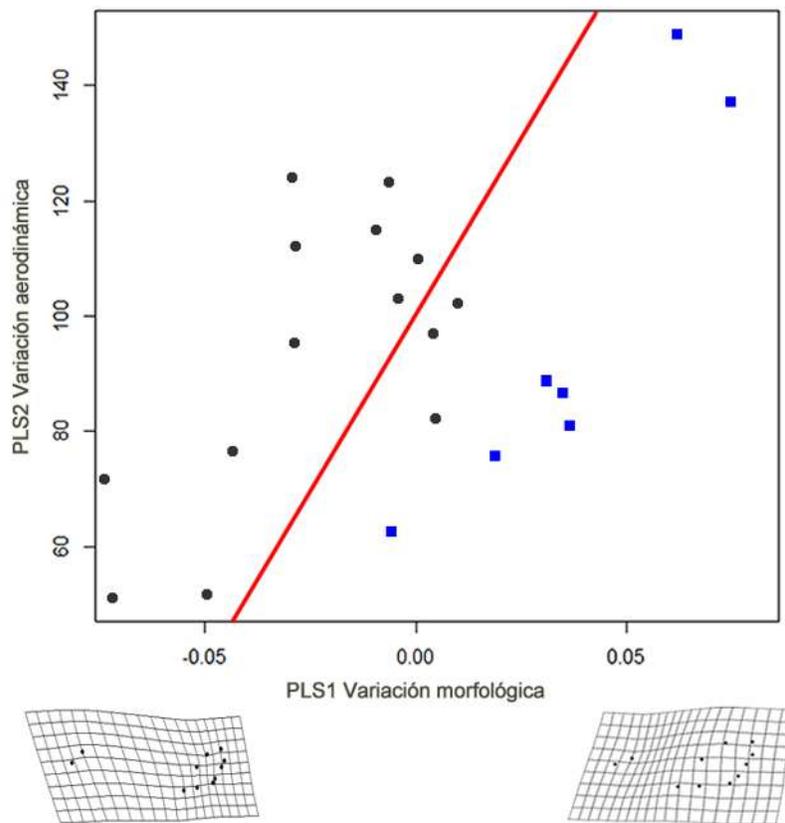


Figura 6. Relación entre la forma del ala de hembras de *H. charithonia* con variables aerodinámicas. Hembras muestreadas durante 2016 (puntos negros) y 2017 (cuadros azules).

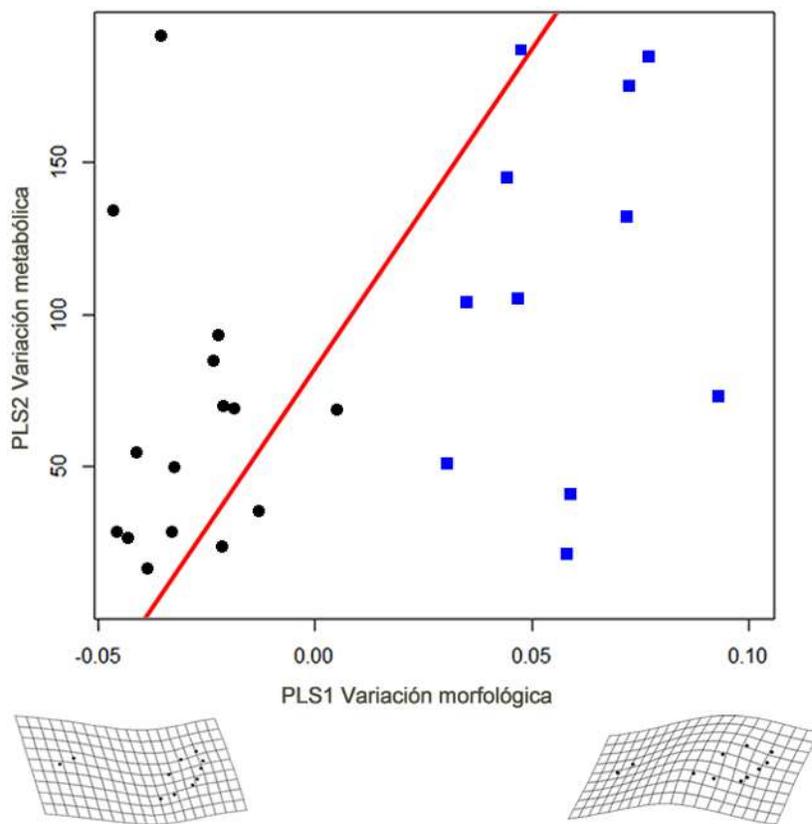


Figura 7. Relación entre la forma del ala de machos de *H. charithonia* con variables metabólicas. Machos muestreados durante 2016 (puntos negros) y 2017 (cuadros azules).

Tabla 4. Tabla de resultados de las regresiones múltiples por mínimos cuadrados parciales (PLS) de *H. charithonia*.

		Hembras		Machos		
		N=21		N=30		
Variables aerodinámicas		PLS	0.5537	0.0254	0.1609	0.7833
Componente	Variable		PLS 1		PLS 1	
1	Masa corporal seca		0.7175		0.5515	
2	Longitud alar		0.4583		0.4523	
3	Carga alar		0.4342		0.462	
4	Proporción de músculo de vuelo		0.4181		0.3664	
5	Proporción de aspecto		0.3863		0.3305	
Variables metabólicas		PLS	0.4707	0.0916	0.5318	0.0112
Componente	Variable		PLS 1		PLS 1	
1	Tasa metabólica basal		0.5148		0.296	
2	Producción total de CO ₂		0.4855		0.4167	
3	Pico máximo de CO ₂		0.4526		0.1857	
Variables energéticas		PLS	0.5289	0.062	0.2389	0.5791
Componente	Variable		PLS 1		PLS 1	
1	Carbohidratos Tórax		0.7225		0.4132	
2	Carbohidratos Abdomen		0.4386		0.3629	
3	Lípidos Tórax		0.3761		0.3898	
4	Lípidos Abdomen		0.272		0.2037	
5	Proteínas Tórax		0.4295		0.3392	
6	Proteínas Abdomen		0.4992		0.3355	
7	Carbohidratos totales		0.4636		0.3168	
8	Lípidos totales		0.3256		0.2192	
9	Proteínas totales		0.2455		0.1459	
10	Proporción de lípidos en músculos torácicos		0.2092		0.0777	

DISCUSIÓN

Organismos que difieren en morfología de vuelo pueden tener diferentes repertorios conductuales o diferir en su desempeño durante conductas particulares. En estudios de ecología evolutiva de insectos voladores como mariposas y libélulas se ha asumido que las diferencias en diseño (i.e. morfología alar) afectan la adecuación de los individuos, asumiendo desempeño diferencial. En el caso de *H. charithonia*, se ha sugerido que las diferencias en la morfología de vuelo que se presentan entre los sexos y entre machos con diferente estrategia de apareamiento tienen implicaciones en el desempeño locomotor y en los patrones de gasto metabólico y asignación de recursos (i.e. reservas energéticas) (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2010).

En este trabajo se evaluó el supuesto de la relación entre la variación morfológica alar y el desempeño metabólico de hembras y machos en *H. charithonia* en la misma población en que se documentaron las diferencias biomecánicas inter e intrasexuales (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005). Los resultados confirman el dimorfismo sexual por forma de alas en ambos años de trabajo, lo que podría estar asociado a las diferencias en requerimientos de vuelo asociados a las preferencias de forrajeo, la producción de huevos y las conductas de búsqueda de apareamientos entre ambos sexos (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2010). Cuando se comparó entre temporadas, se encontraron patrones intrasexuales contrastantes, mientras las hembras no difieren entre años en la forma de sus alas, los machos presentan diferencias anuales en la forma de las alas, lo cual concuerda con lo reportado en múltiples especies del género *Heliconius* (incluyendo *H. charithonia*) en el sentido que la forma de las alas puede ser moldeada por diferentes presiones de selección sexual (Deinert *et al.*, 1994; Hernández y Benson, 1998; Berwaerts *et al.*, 2002; Mendoza 2005; Takeuchi, 2005; Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2010; Niitepold *et al.*, 2011; Vande Velde y Van Dyck, 2013), y selección natural (Srygley, 1999; Srygley y Ellington, 1999; Céspedes *et al.*, 2015).

En el caso del tamaño también se encontró que las hembras tienen una mayor longitud alar que los machos en ambos años, probablemente porque el peso

adicional de las ovariolas requiere mayor carga alar para poder desplazarse. Sin embargo, un patrón muy interesante es que la longitud de las alas de las hembras ha disminuido considerablemente (ca. 5 mm) respecto a lo reportado por Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez (2005, 2010) pasando de un tamaño promedio de 44.84 ± 2.36 mm durante el periodo 2000-2004, a 39.95 ± 1.15 mm para el 2016-2017. Mientras que los machos presentaron una longitud alar similar a los individuos muestreados en el periodo 2000-2004. Esta plasticidad diferencial en los patrones de tamaño de alas entre los sexos podría estar relacionado con una disminución en la disponibilidad de recursos para el desarrollo (Boggs, 2009), asociado a un mayor efecto de la escasez de recursos sobre la morfología de las hembras. Sin embargo, las otras 2 especies de *Heliconius* que se encuentran en la zona de estudio (*H. ismenius* y *H. hortense*) tienen una menor disponibilidad de recursos para alimentación de las larvas (L. Mendoza datos no publicados), y no se ha encontrado una variación en el tamaño, como en el caso de *H. charithonia* (V. Ramos-Pérez datos no publicados). Esto sugiere que la ocurrencia de hembras más pequeñas podría también ser resultado de un mayor éxito de apareamiento de los machos de menor tamaño y que pueda estar asociado a una alta heredabilidad en el tamaño de las alas (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2010), o a un incremento en sobrevivencia de las hembras de rangos de tamaño menor. Respecto a los rasgos aerodinámicos (carga alar, proporción de músculos de vuelo y proporción de aspecto) no se encontraron diferencias ni entre sexos ni entre años de colecta aun cuando las hembras siguen siendo más pesadas que los machos, independientemente del año de muestreo.

Estos resultados sugieren la presencia de gran plasticidad en la forma de las alas en *H. charithonia*, posiblemente asociada a una optimización de la morfología ante efectos del ambiente sobre otros rasgos fenotípicos (i.e. longitud alar y corporal) que podría permitir un vuelo más rápido y energéticamente menos costoso. En este contexto, se ha sugerido que rasgos aerodinámicos como la carga alar están estrechamente relacionados con la energía necesaria para volar, y la disponibilidad de los nutrientes depende enteramente de la alimentación del individuo. En un estudio realizado por Niitepõld y colaboradores (2014) donde midieron los efectos

que tiene la restricción de la dieta en tasas metabólicas de las mariposas *Speyeria mormonia* y *Colias eurytheme*, encontraron que la disponibilidad de alimento afecta la masa corporal, que, de manera directa afecta la carga alar. Sin embargo, no encuentran un efecto de la alimentación sobre las capacidades de vuelo, por lo que sugieren que los individuos son igualmente eficientes para obtener la energía suficiente para mantener su capacidad de vuelo, o utilizan estrategias metabólicas para limitar el uso de los nutrientes destinados a otros fines, como la reducción en la inversión en reproducción o en una menor actividad fisiológica. Contrario a lo esperado, en el caso de *H. charithonia*, los resultados de las tasas metabólicas basales muestran un patrón similar a los resultados de Niitepõld *et al.* (2014) resaltando la importancia de la alimentación de pólen (Gilbert, 1972; O'Brien *et al.*, 2003; Harpel *et al.*, 2015) en mantener una alta eficiencia de hembras y machos para obtener la energía necesaria para mantener la capacidad metabólica (Boggs, 2009) y cubrir los requerimientos impuestos por la forma de su aparato de vuelo, tipo y patrones diarios de vuelo, así como los requerimientos reproductivos de cada sexo (e.g. producción de huevos y búsqueda de apareamientos). Aunque no se puede descartar el que, a fin de mantener un óptimo metabolismo basal, los individuos estén restringiendo el gasto energético en reproducción, evidencia previa muestra que en el género *Heliconius*, las hembras producen huevos a una tasa constante durante toda su vida (Gilbert, 1991) y en el caso de los machos, en esta misma población las observaciones conductuales muestran que los machos son observados diariamente en las áreas de reproducción buscando hembras receptivas (Mendoza-Cuenca, datos no publicados). De igual forma, contrario a lo encontrado en múltiples especies de mariposas donde la tasa metabólica basal disminuye con la edad y con el incremento de vuelo (Ahman y Karlsson, 2009; Niitepõld y Hanski, 2013; Vande Velde y Van Dyck, 2013; Niitepõld *et al.*, 2014; Niitepõld y Boggs, 2015), los resultados de este trabajo sugieren que en *H. charithonia* no ocurre senescencia metabólica, y aunque no se puede establecer con precisión la edad de los individuos en los que se midió la condición metabólica, varía entre 5-23 días (desde que fueron marcados) y el efecto de la edad no se refleja en la tasas metabólicas basales.

Respecto a las tasas metabólicas de vuelo, los resultados muestran un patrón complejo, siendo los individuos del 2016 (hembras y machos) los que realizan mayor gasto.

Aunque en el diseño experimental no estaba planeado analizar el efecto de la edad en las tasas metabólicas de vuelo, se encuentra que entre temporadas sí hay un efecto de senescencia, solamente en el caso de los machos, siendo los individuos del 2017 los que más gasto hacen, por lo que se podría estar observando a individuos viejos que han volado por más tiempo y que se encuentren realizando vuelos numerosos y más cortos debido al incremento de energía necesaria para el mantenimiento.

En el caso de *Pieris napi*, Ahman y Karlsson (2009), las mariposas viejas presentan una reducción en el tiempo de vuelo, en comparación con los individuos jóvenes o de edad media, lo que se ve reflejado en una tasa metabólica de vuelo baja. Los autores atribuyen sus resultados a la senescencia de los músculos de vuelo y la disminución de peso con la edad, al igual que lo reportado en especies como *Pararge aegeria* y *Speyeria mormonia* (Karlsson, 1994) y en algunas otras especies de las familias Nymphalidae y Pieridae (Stjernholm *et al.*, 2005). Sin embargo, es interesante el patrón que muestra *Heliconius hecale*, ya que mantiene o aumenta la masa corporal con la edad (Karlsson, 1994), sugiriendo así la contribución del tipo de alimentación mediante néctar y polen para el mantenimiento del desempeño de vuelo en toda su vida. En *Heliconius charithonia* no se encuentran datos que indiquen senescencia en los rasgos aerodinámicos, lo que sugiere una senescencia en la tasa metabólica de vuelo.

Los resultados muestran, en efecto, que la carga alar de las hembras se encuentra relacionada con la cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas presentes, lo que sugiere que los individuos optimizan la asignación de “combustibles” para el vuelo, posiblemente gracias a su consumo de néctar y polen. Las hembras presentan un mayor consumo de polen respecto a los machos (Mendoza-Cuenca y Macías-Ordóñez, 2005), por lo que obtienen una mayor cantidad de proteínas, de las cuales, algunas participan en la metabolización de carbohidratos (Harpel *et al.*, 2015).

Contrario a lo que se esperaba, ambos sexos presentan un metabolismo basal similar durante ambas temporadas de muestreo, reflejándose en una óptima alimentación para compensar el gasto de mantener la capacidad metabólica (Boggs, 2009). Sin embargo, es posible también que se estuviera observando hembras más jóvenes en el caso del 2016.

Contrario a las hembras, los machos colectados en el 2016 presentan un mayor gasto metabólico respecto a los del 2017, de igual forma se observa una mayor proporción de lípidos en los músculos de vuelo, así como una carga alar relacionada estrechamente con las tasas metabólicas y el gasto energético. Esto sugiere que la modificación en la forma de las alas les permite optimizar el gasto energético requerido por la maquinaria de vuelo y cubrir las demandas conductuales. Los machos consumen néctar en su mayoría, por lo que su fuente de carbohidratos es mayor, en comparación con las hembras. Dado que los carbohidratos son el primer combustible que se oxida metabólicamente y es utilizado por los músculos de vuelo, la energía no gastada en el vuelo se almacena como lípidos y proteínas. Los machos colectados en el segundo año de muestreo podrían estar ajustando la morfología alar y la asignación de los recursos energéticos, para producir suficiente energía para volar y permitir mayores reservas de energía, como en el caso de los lípidos.

Los resultados sugieren la presencia de diferencias intersexuales en el diseño biomecánico de vuelo a través del tiempo, que podrían apuntar a que la forma del ala se encuentre condicionando el gasto metabólico y energético de los individuos, así como la optimización de tales rasgos por presiones de selección natural y sexual. Por lo que necesitamos conocer el efecto de la edad sobre la capacidad metabólica y energética durante todo el tiempo de vida de los individuos, así como análisis que permitan estimar la heredabilidad de rasgos aerodinámicos, metabólicos y energéticos.

CONCLUSIONES

Aunque las mariposas de *H. charithonia* presentan dimorfismo sexual por tamaño y en la forma de las alas, no hay diferencias intersexuales en los rasgos aerodinámicos, en la tasa metabólica basal y en las reservas energéticas.

Esto sugiere, que la modificación de las alas ayuda a optimizar el gasto energético requerido por los músculos de vuelo para mantener sus reservas energéticas, así como la capacidad metabólica a lo largo de su vida, lo que sugiere que no hay senescencia en la tasa metabólica basal.

LITERATURA CITADA

- Adams, D. C., M. L. Collyer, A. Kaliontzopoulou y E. Sherratt. 2017. **Geomorph: Software for geometric morphometric analyses**. R package version 3.0.5.
- Ahman, M. y B. Karlsson. 2009. **Flight endurance in relation to adult age in the green-veined white butterfly *Pieris napi***. *Ecological Entomology* 34:783-787.
- Ansari, S. A., R. Żbikowski y K. Knowles. 2006. **Non-linear unsteady aerodynamic model for insect-like flapping wings in the hover: Part I. Methodology and analysis**. *Journal of Aerospace Engineering* 220:61-83.
- Arrese E. L. y J. L. Soulages. 2010. **Insect fat body: energy, metabolism, and regulation**. *Annual review of entomology* 55:207-225.
- Berwaerts, K., H. Van Dyck y P. Aerts. 2002. **Does flight morphology relate to flight performance? An experimental test with the butterfly *Pararge aegeria***. *Functional Ecology* 16:484–491.
- Betts. C. R. y R. J. Wooton. 1988. **Wing shape and flight behaviour in butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea): a preliminary analysis**. *J. exp. Biol.* 138:271-288.
- Boggs, C. L., J. T. Smiley, y L. E. Gilbert. 1981. **Patterns of Pollen Exploitation by *Heliconius* Butterflies**. *Oecologia* 48:284-289.
- Boggs C. L. 2009. **Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens**. *Functional Ecology* 23:27-37.

- Canzano, A. A., A. A. Krockenberger, R. E. Jones y J. E. Seymour. 2006. **Rates of metabolism in diapausing and reproductively active tropical butterflies, *Euploea core* and *Euploea sylvester* (Lepidoptera:Nymphalidae).** *Physiological Entomology* 31(2):184–189.
- Cespedes, A., C. M. Penz y P. J. DeVries. 2015. **Cruising the rain forest floor: butterfly wing shape evolution and gliding in ground effect.** *Journal of Animal Ecology* 84(3):808–816.
- Chapman R.F. 1998. **The insects: Structure and Function.** 4 ed. Cambridge University Press. 770pp.
- Chazot, N., S. Panara, N. Zilbermann, P. Blandin, Y. Le Poul, R. Cornette, M. Elias, y V. Debat. 2016. **Morpho morphometrics: Shared ancestry and selection drive the evolution of wing size and shape in *Morpho* butterflies.** *Evolution* 70:181–194.
- Combes S. A. y T. L. Daniel. 2003. **Flexural stiffness in insect wings II. Spatial distribution and dynamic wing bending.** *Journal of Experimental Biology* 206(17):2989-2997.
- Conover, W. J y R. L. Iman. 1981. **Rank Transformations as a Bridge Parametric and Nonparametric Statistic.** *The American Statistician* 35:124-129.
- Corbet S. A. 2000. **Butterfly nectaring flowers: butterfly morphology and flower form.** *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96:289-298.
- Davis, A. L. V, S. L. Chown, M. A. McGeoch y C. H. Scholtz. 2000. **A comparative analysis of metabolic rate in six *Scarabaeus* species (Coleoptera: Scarabaeidae) from southern Africa: Further caveats when inferring adaptation.** *Journal of Insect Physiology* 46(4):553–562.
- Deinert, E. I., J. T. Longino, y L. E. Gilbert. 1994. **Mate competition in butterflies.** *Nature* 370:23-24.
- Dudley R. 2000. **The biomechanics of insect flight: Form, function, evolution.** Princeton University Press. 496 pp.

- Dudley R. y R. B. Srygley. 1994. **Flight physiology of neotropical butterflies: Allometry of airspeeds during natural free flight.** *J. Exp. Biol.* 191:125-139.
- Fountain, T., R. G. Melvin, S. Ikonen, A. Ruokolainen, L. Woestmann, V. Hietakangas y I. Hanski. 2016. **Oxygen and energy availability interact to determine flight performance in the Glanville fritillary butterfly.** *Journal of Experimental Biology* 219:1488–1494.
- Gibbs M. y H. Van Dyck. 2010. **Butterfly flight activity affects reproductive performance and longevity relative to landscape structure.** *Oecologia* 163:341–350.
- Gilbert L. E. 1972. **Pollen feeding and reproductive biology of *Heliconius* butterflies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(6):1403–1407.
- Gilbert, L.E. 1991. **Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: Patterns, Process, and Problems.** En: Plant-Animal Interactions. Price, P.W., T.M. Lewinsohn, G.W. Fernandes y W.W. Benson (eds). John Wiley & Sons, Inc. New York. 639 pp.
- Harpel, D., D. A. Cullen, S. R. Ott, C. D. Jiggins y J. R. Walters. 2015. **Pollen feeding proteomics: Salivary proteins of the passion flower butterfly, *Heliconius melpomene*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 63:7–13.
- Hernandez, M. I. M. y W. W. Benson. 1998. **Small-male advantage in the territorial tropical butterfly *Heliconius sara* (Nymphalidae): a paradoxical strategy?** *Animal Behaviour* 56:533–540.
- Isarraráz L. 2015. **Estimadores de condición corporal que determinan las estrategias de apareamiento en *Hetaerina vulnerata* (Odonata: Calopterygidae).** Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 55pp.
- Karlsson B. 1994. **Habits and change of body composition with age in three Nymphalid Butterfly species.** *Oikos* 69(2):224-230.

- Kemp D. J. 2001. **Butterfly contests and flight physiology: why do older males flight harder?** *Behavioral Ecology* 13(4):456–461.
- Klowden M. J. 2008. **Physiological Systems in Insects**. 2d. ed. Academic Press, Elsevier. 688pp.
- Lighton, J.R.B. 2008. **Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists**. Oxford University Press. 217 pp.
- Martínez-Lendeck, N., A. Córdoba-Aguilar y M. A. Serrano-Meneses. 2007. **Body size and fat reserves as possible predictors of male territorial status and contest outcome in the butterfly *Eumaeus toxea* Godart (Lepidoptera: Lycaenidae)**. *Journal of Ethology* 25:195–199.
- Mattila A. L. K. y I. Hanski. 2014. **Heritability of flight and resting metabolic rates in the Glanville fritillary butterfly**. *Journal of Evolutionary Biology* 27:1733–1743.
- Mendoza-Cuenca L. 2005. **Estrategias alternativas de apareamiento en la mariposa *Heliconius charithonia*: Factores involucrados en la evolución del apareamiento pupal**. Tesis de doctorado. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. 134 pp.
- Mendoza-Cuenca L. y R. Macías-Ordóñez. 2005. **Foraging polymorphism in *Heliconius charithonia* (Lepidoptera: Nymphalidae): morphological constraints and behavioural compensation**. *Journal of Tropical Ecology* 21(4):407–415.
- Mendoza-Cuenca L. y R. Macías-Ordóñez. 2010. **Female asynchrony may drive disruptive sexual selection on male mating phenotypes in a *Heliconius* butterfly**. *Behavioral Ecology* 21:144–152.
- Millán, C., C. Chacón y G. Corredor. 2010. **Desarrollo, longevidad y oviposición de *Heliconius charithonia* (Lepidoptera: Nymphalidae) en dos especies de *Passiflora***. *Revista Colombiana de Entomología* 36:158–164.

- Mueller P. y J. Diamond. 2001. **Metabolic rate and environmental productivity: Well-provisioned animals evolved to run and idle fast.** *PNAS* 98(22):12550–12554.
- Nation, J. 2015. **Insect Physiology and Biochemistry, Third Edition.** CRC Press. 690 pp.
- Nespolo, R. F., D. A. Roff y J. D. Fairbairn. 2008. **Energetic trade-off between maintenance costs and flight capacity in the sand cricket (*Gryllus firmus*).** *Functional Ecology* 22:624–631.
- Niitepõld K., Mattila A. L. K., Harrison P. J. y I. Hanski. 2011. **Flight metabolic rate has contrasting effects on dispersal in the two sexes of the Glaville fritillary butterfly.** *Oecologia* 165:847-854.
- Niitepõld K. y I. Hanski. 2013. **A long life in the fast lane: positive association between peak metabolic rate and lifespan in a butterfly.** *The Journal of Experimental Biology* 216:1388–1397.
- Niitepõld, K., A. Perez y C. L. Boggs. 2014. **Aging, Life Span, and Energetics under Adult Dietary Restriction in Lepidoptera.** *Physiological and Biochemical Zoology* 87(5):684–694.
- Niitepõld K. y C. L. Boggs. 2015. **Effects of Increased Flight on the Energetics and Life History of the Butterfly *Speyeria mormonia*.** *PLoS ONE* 10(10): 1–16.
- O'Brien, D. M., C. L. Boggs & M. L. Fogel. 2003. **Pollen feeding in the butterfly *Heliconius charitonia*: isotopic evidence for essential amino acid transfer from pollen to eggs.** *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 2631-2636.
- Penz C. M. y H. W. Krenn. 2000. **Behavioral Adaptations to Pollen-Feeding in *Heliconius* Butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae): An Experiment Using *Lantana* Flowers.** *Journal of Insect Behavior* 13(6):865–880.
- Rohlf F. J. 2004. **TpsDig, digitalize landmarks and outlines, version 2.0.** Department of Ecology and Evolution, State University of New York.

- Sane, S. P. 2003. **The aerodynamics of insect flight.** *The Journal of Experimental Biology* 206:4191-4208.
- Sheets H. D. 2014. **IMP8.** Canisius college, New York.
- Snelling, E. P., Seymour, R. S., Matthews, P. G. D., y C. R. White. 2012. **Maximum metabolic rate, relative lift, wingbeat frequency and stroke amplitude during tethered flight in the adult locust *Locusta migratoria*.** *J. Exp. Biol.* 215:3317–3323.
- Srygley, R. B. 1999. **Locomotor mimicry in *Heliconius* butterflies: contrast analyses of flight morphology and kinematics.** *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 354:203-214.
- Srygley R. B. y C. P. Ellington. 1999. **Estimating the relative fitness of local adaptative peaks: the aerodynamic costs of flight in mimetic passion-vine butterflies *Heliconius*.** *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266:2239-2245.
- Stjernholm F., Karlsson B. y C. L. Boggs. 2005. **Age-related changes in thoracic mass: possible reallocation of resources to reproduction in butterflies.** *Biological Journal of The Linnean Society* 86:363-380.
- Takeuchi, T. 2006. **The Effect of Morphology and Physiology on Butterfly Territoriality.** *Behaviour* 143(3):393–403.
- Vande Velde L. y H. Van Dyck. 2013. **Lipid economy, flight activity and reproductive behaviour in the speckled wood butterfly: on the energetic cost of territory holding.** *Oikos* 122:555–562.
- Woods Jr., W. A., C. A. L. Wood, J. Ebersole y R. D. Stevenson. 2010. **Metabolic Rate Variation over Adult Lifetime in the Butterfly *Vanessa cardui* (Nymphalidae:Nymphalinae): Aging, Feeding, and Repeatability.** *Physiological and Biochemical Zoology* 83(5):858–868.

