

**DEFENSA INTRAESPECÍFICA POR SOLDADOS EN
COLONIAS DE LA TERMITA *NEOTERMES
CHILENSIS*, VINCULADO A SU PROPORCIÓN EN
DISTINTOS CONTEXTOS ECOLÓGICOS**

Tesis

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Valeria Danae Palma Onetto

Noviembre, 2015

**Director de Tesis:
Dr. Hermann Niemeyer Marich**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

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

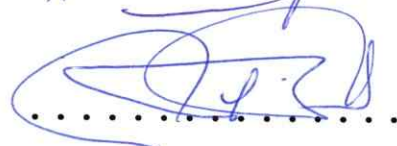
VALERIA DANAE PALMA ONETTO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 17 de Noviembre de 2015.

Director de Tesis:
Dr. Hermann Niemeyer Marich



Co-Director de Tesis
Dr. Luis Flores Prado



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Rodrigo Vásquez



Dr. Hugo Torres



Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis padres por su apoyo emocional y económico a lo largo de mi vida, permitiéndome llegar a este momento.

A mi hermana Carolina por su paciencia durante los dos años en que me cobijó bajo su techo.

A mi compañero de trabajo y gran amigo José Rizo, quien hizo de estos dos años unos de los mejores dentro de mi experiencia académica, por las invitaciones a comer y las veces que me abrió las puertas de su casa.

A esos compañeros de laboratorio, quienes sin darse cuenta hicieron posible que una niña tímida y antisocial se preocupase de tener un horario sagrado de almuerzo para compartir con ellos. En forma especial destaco dentro de este grupo a Daniel Torrico, Carolina Mendoza y Benjamín Thielemann quienes me dieron confianza y me hicieron disfrutar de su compañía gracias al sentido de justicia y ética que poseen.

También dedico este trabajo a un grupo de personas que me hizo disfrutar este año académico de una forma muy distinta a todos los anteriores, a mis compañeros de salsa y bachata, les agradezco por todos los momentos divertidos de este año, por todas las experiencias y por haber formado parte de un gran número de cambios (para bien) en mi persona.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Nacida en Santiago, Chile, en 1991. Desde pequeña muestra interés y capacidades hacia la ciencia y la investigación, y en el año 2009 comienza su Licenciatura en Ciencias con mención en Biología en la Universidad de Valparaíso, lugar que le otorga la oportunidad de realizar diversas pasantías y ayudantías en el área de las ciencias biológicas a partir de su segundo año de estudio. En esta misma línea, en 2014 ingresa a la Universidad de Chile para integrarse al programa de Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Ecología y Biología Evolutiva.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado financieramente por el proyecto FONDECYT 1120210 cuyo investigador principal es Hermann M. Niemeyer, el proyecto CONICYT 79100013 a Luis Flores-Prado, y la beca CONICYT para estudiantes de doctorado y programas de práctica MECESUP a Daniel Aguilera-Olivares.

ÍNDICE DE MATERIAS

RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	7
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Materiales	9
Sitio de estudio y recolección y estudio de escapos.....	9
Métodos.....	10
Desarrollo de un método eficaz y sencillo para determinar el número de individuos, colonias y soldados en un escape.....	10
Determinación de la proporción entre soldados y no-soldados en escapos uni- y multicoloniales.....	13
Determinación de la proporción entre soldados y no-soldados en épocas de enjambrazón y no enjambrazón.....	13

Análisis de los datos	16
RESULTADOS.....	17
Método de conteo.	17
Proporción entre soldados y no-soldados.....	20
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES	25
REFERENCIAS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alados en relación a la temperatura y fecha de emergencia.....	15
Figura 2. Imágenes 2D y 3D de las distintas secciones de un escapo.....	17
Figura 3. Comparación entre conteo directo y conteo vía CT.....	19
Figura 4. Proporción de soldados sobre no-soldados en colonias durante la temporada de enjambrazón y no-enjambrazón y en escapos con una o más colonias de <i>N. chilensis</i>	20

RESUMEN

Las termitas son insectos eusociales que viven en colonias compuestas usualmente por tres castas principales: reproductores primarios, cuya función es la reproducción, pseudo-obreras, que mantienen y amplían el nido, y soldados producidos a partir de las pseudo-obreras, que lo defienden. Según su ecología de nidificación se pueden clasificar en: nidificadoras de una pieza (NUP), que nidifican y forrajean en un mismo sustrato (madera) el que al agotarse provoca la desaparición de la colonia como tal, nidificadoras de piezas intermedias, que nidifican y forrajean en un sustrato que cambian por otro una vez que el primero se ha agotado, y nidificadoras de piezas separadas (NPS), que nidifican y forrajean en distintos sustratos. Diversos estudios han demostrado que el nido sería el mayor mecanismo de defensa contra depredadores externos y que los soldados en una colonia otorgarían una defensa principalmente contra otras termitas. Es así que los soldados de termitas NPS estarían encargados, entre otras funciones, de evitar la entrada de individuos de otras colonias durante el regreso de las actividades de forrajeo externo. En termitas NUP, los soldados protegerían a las colonias contra la invasión de ellas por termitas durante la temporada de enjambrazón, cuando existe el riesgo de invasión en la colonia por de-alados en búsqueda de un sitio para fundar una nueva colonia, y en colonias con colonias vecinas, cuando

existe el riesgo de invasión en la colonia por individuos de las otras colonias en el mismo sustrato. En este trabajo se desarrolló un método basado en la tomografía computarizada (CT) que permitió estudiar las colonias de la termita NUP *Neotermes chilensis* y el sustrato que estas ocupan. La CT fue efectiva para distinguir termitas del sustrato y soldados de reproductores y pseudo-obreras, y también permitió la reconstrucción digital de las galerías dentro del sustrato, incluso cuando estas pertenecen a diferentes colonias. Usando CT, la proporción entre soldados y no-soldados dentro de una colonia fue superior previo a la temporada de enjambrazón que en la temporada de no-enjambrazón, y mayor en colonias con colonias vecinas que en colonias aisladas, demostrando que las colonias de esta termita responden al riesgo de invasión a través de la diferenciación de la casta pseudo-obrera a soldado. Estos resultados se presentan como el primer reporte de que la determinación de castas en termitas se ve afectado por factores externos intraespecíficos y constituye un ejemplo único en termitas de cómo las interacciones intraespecíficas inducen reacciones defensivas.

Palabras clave: termitas, tomografía computarizada, defensa colonial, formación de soldados, defensas inducidas.

ABSTRACT

Termites are eusocial insects that live in colonies composed generally of three main castes: primary reproducers, whose function is reproduction, pseudo-workers, who maintain and expand the nest, and soldiers produced from the pseudo-workers, who defend the colony. According to their nesting ecology, termites can be classified into: one-piece nesters (OPN), which nest and forage in the same substrate (wood) which upon depletion causes the extinction of the colony; intermediate piece nesters who nest and forage on a substrate but they change to another once the first has run out; and separate pieces nesters (SPN), which nest and forage on different substrates. Many studies have shown that the nest is the major mechanism of defense against external predators and soldiers in a colony would grant a defense mainly against other termites. SPN soldiers would be in charge, among other functions, of preventing the entry of non-members of the colony among individuals returning from external foraging activities. In OPN, soldiers would provide defense against the risk of invasion by de-alates searching for a place to found a new colony during the swarming period and by individuals from other colonies sharing the same piece of wood. In this work, a method based on computed tomography (CT) was developed which allowed the study of colonies of the OPN *Neotermes chilensis* and the substrate they occupy. CT was effective in distinguishing termites from substrate and soldiers from reproducers and pseudo-workers, and also allowed the digital

reconstruction of the galleries within the substrate, even when they belonged to different colonies. Using CT, the ratio of soldiers to non-soldiers within a colony was found to be higher prior to the swarming period than in the non-swarming period, and higher in colonies with neighboring than in isolated colonies. Thus, termite colonies responded to the risk of invasion by caste differentiation of pseudo-workers into soldiers. To the best of our knowledge, this is the first report on external intraspecific factors affecting caste determination in termites and constitutes a unique example in termites of induced defenses arising from intraspecific interactions.

Key words: termites, computed tomography, colony defense, soldier differentiation, induced defenses.

INTRODUCCIÓN

Las termitas (Isoptera; Blattodea: Termitoidea, de acuerdo a **Lo et al., 2007**) representan un grupo de insectos eusociales con alrededor de 3000 especies descritas que viven en colonias compuestas por cientos a millones de individuos según la especie (**Thorne, 1997**). Para efectos prácticos, una "colonia" de termitas será definido como un grupo de termitas que comparten lugares de forrajeo interconectados (**Su y Scheffrahn, 2000**). Esta colonia está compuesta generalmente por tres castas: reproductores (rey y reina), obreras (o pseudo-obreras) y soldados (**Eggleton, op cit**). En la época de enjambrazón, las colonias producen alados (**Martius et al., 1996**), que aterrizan en el suelo o en un pedazo de madera, se desprenden de las alas (de-alados) y forman parejas: un macho con una hembra. El par encuentra un sustrato de nidificación al que ingresan, se aparean y producen huevos de los que nacerán obreras (o pseudo-obreras); estas cuidarán de los juveniles, construirán las estructuras de la colonia y alimentarán y acicalarán a las otras castas. La pareja fundadora de la colonia son llamados reproductores primarios. Un poco más tarde en el desarrollo de la colonia se producen los soldados, cuya única función es defensa de la colonia. Una vez que la colonia ha alcanzado la madurez (un número adecuado de pseudo-obreras y soldados que aseguren la mantención y protección del nido) se producen los alados y el ciclo continúa (**Eggleton, 2011**).

Esta simple descripción del ciclo de vida y estructura de castas puede ser más compleja. Por ejemplo, algunas especies de termitas no poseen soldados y otras no tienen obreras, pero todas las termitas poseen al menos una casta estéril que esta pre-determinada durante etapas inmaduras (**Boomsma, 2009**). Un ejemplo de esto es la ausencia de la casta "obrero" propiamente tal en algunas familias; ellas son morfológicamente y funcionalmente reemplazadas por "pseudo-obreras" (**Thorne, 1997**), las que desarrollan la función de las obreras pero poseen ontogenia abierta, pudiendo dar origen a otras castas o estados de desarrollo (a diferencia de las obreras), como soldados o alados (**Ripa y Luppichini, 2004**). Otra parte, la reproducción, que ocurre normalmente entre reproductores primarios, podría también involucrar reproductores neoténicos (reproductor secundario que se desarrolla directamente a partir de pseudo-obreras, sin pasar por el estado alado) dentro de una colonia madura (**Roisin y Korb, 2011**).

Teniendo en cuenta la ecología de forrajeo de las termitas se las clasifica en tres grupos: nidificadoras de una pieza, que nidifican y forrajean en un trozo de madera, nidificadoras de piezas separadas que nidifican y forrajean en distintos sustratos, y nidificadoras de piezas intermedias que nidifican y forrajean en un mismo sustrato, pero una vez que éste se agota, la colonia se mueve a uno nuevo (**Higashi et al. 2000; Eggleton & Tayasu, 2001**).

Las termitas pueden mostrar grandes abundancias, llegando a superar los mil individuos por metro cuadrado en zonas tropicales (**Eggleton et al., 1996**). Producto de esta alta abundancia, las termitas son una fuente importante

En Chile se han descrito cinco especies de termitas, dos de las cuales son cosmopolitas y tres nativas (Ripa & Luppichini, 2004). Dentro de las especies nativas se encuentra la especie endémica *Neotermes chilensis*. Esta es una termita nidificadora de una pieza en madera seca, cuyas colonias no superan algunos cientos de individuos (Camousseight, 1999). Se encuentra distribuida entre las Regiones IV y VI y, aunque usa diversas especies nativas como hospedero, constituye un importante problema en construcciones de maderas exóticas en esta zona (Artigas, 1994; Ripa y Luppichini, 2004). Su ciclo de vida es conocido y se caracteriza por la presencia de pseudo-obreras (Artigas, 1994; Camousseight, 1999). Durante el verano y hasta comienzos del otoño es posible observar al atardecer individuos alados de ambos sexos en enjambrazón (González, 1989; Ripa y Luppichini, 2004).

Neotermes chilensis se alimenta de madera seca en la que excava una trama de galerías irregulares que en algunos puntos se ensanchan, sin que se consiga distinguir entre todas ellas ningún recinto especializado para albergar la pareja real o como lugar de crianza (Camousseight, 1999). Los excrementos los aglutinan y acumulan en galerías que abandonan a medida que construyen unas nuevas (Camousseight, 1999). Observaciones nuestras han mostrado que cuando *N. chilensis* utiliza escapos secos de chagual (*Puya berteroniana*) como hospedero es posible encontrar una o más colonias compartiendo un escape. Además, no se han observado competidores de esta termita que ocupen el mismo sustrato, por lo que las variaciones en la proporción de

soldados dependerían solo de la interacción intraespecífica con miembros de otras colonias.

En el presente trabajo, se estudió el efecto de diferentes escenarios sobre la producción de soldados en la termita de una pieza *N. chilensis* usando tomografía computarizada (CT) para examinar la arquitectura de los nidos y la ocupación de los sustratos.

HIPÓTESIS

1. Si los soldados de *N. chilensis* cumplen el papel de defender a la colonia de enemigos intraespecíficos, **la proporción entre soldados y no-soldados en una colonia variará dependiendo de la presencia o ausencia de otras colonias en el mismo escapo**, ya que las colonias vecinas representan un riesgo de invasión.

Predicción: La proporción entre soldados y no-soldados será menor en escapos unicoloniales que en multicoloniales.

2. Si los soldados de *N. chilensis* poseen el papel de defender a la colonia de enemigos intraespecíficos, **la proporción entre soldados y no-soldados en la colonia se verá modificada durante el período previo a la enjambrazón con respecto al resto del año**, ya que durante la enjambrazón pueden existir parejas de de-alados conespecíficos que buscan un lugar de nidificación.

Predicción: La proporción entre soldados y no-soldados aumentará previo a la temporada de enjambrazón con respecto a la temporada de no enjambrazón.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la proporción entre soldados y no-soldados en colonias de *Neotermes chilensis* presentes en escapos de *Puya berteroniana* (Bromeliaceae), en condiciones que muestren si cumplen un papel de defensa intraespecífica en la colonia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir un método eficaz y sencillo para determinar el número de individuos, colonias y soldados en un escapo.
2. Determinar la proporción entre soldados y no-soldados en colonias de escapos uni- y multicoloniales.
3. Determinar y relacionar cambios en la proporción entre soldados y no-soldados presentes en épocas de pre-enjambrazón y no enjambrazón.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Química Ecológica de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y en el Centro de Imagenología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile José Joaquín Aguirre.

MATERIALES

Se contó con acceso a un laboratorio con infraestructura para hacer trabajo entomológico y a un escáner médico de última generación con los programas computacionales asociados, y con fondos para realizar trabajo de campo.

Sitio de estudio y recolección y estudio de escapos

Poblaciones de *N. chilensis* encontradas al interior de escapos secos de *Puya berteroniana* (Bromeliaceae) en Las Chilcas (32°52'S; 70°52'W) fueron usadas en el estudio. Los escapos secos fueron separados del resto de las plantas y llevados al laboratorio. Ellos fueron escaneados dentro de los 3 días siguientes de su extracción, y luego fueron mantenidos en una sala de bioensayos a una temperatura de 15°C hasta realizarse su disección dentro de la semana posterior al escaneo.

MÉTODOS

Desarrollo de un método eficaz y sencillo para determinar el número de individuos, colonias y soldados en un escapeo

Utilizar disección directa para evaluar un nido de termitas resulta riesgoso ya que la manipulación puede dañar las galerías y/o las termitas (Himmi et al., 2014). Una técnica que ha comenzado a ser utilizada en ecología como un eficaz método para la observación de lo que ocurre dentro de la madera sin dañar ni su estructura ni los organismos que en ella se encuentran es la tomografía computarizada (TC) (Fuchs et al., 2004; Perna et al., 2008a; Viana et al., 2013; Himmi et al. 2014).

La TC es una técnica imagenológica de uso común en el ambiente médico. Los datos provenientes de un equipo de rayos X son procesados computacionalmente para producir imágenes tomográficas tridimensionales (secciones o cortes virtuales) de áreas específicas de un objeto o cuerpo escaneado, permitiendo al usuario ver su interior sin necesidad de intervenirlo (Herman, 2009). Fuchs et al. (2004) demostraron que la TC es un método aplicable para obtener imágenes tridimensionales (3D) reconstruidas de las galerías formadas en nidos de la termita de la madera seca *Cryptotermes secundus*. Perna et al. (2008a, 2008b) utilizaron la técnica para revelar el complejo sistema de conectividad dentro de nidos de *Cubitermes* sp., mientras que Himmi et al. (2014) utilizaron TC para caracterizar las cámaras nupciales de *Incisitermes minor*, conduciendo estos estudios a un mejor entendimiento de la

eficiencia en las construcciones y mecanismos de defensa dentro de los nidos de esa termita.

En un sistema de CT multicorte, el tubo de rayos X gira continuamente alrededor del objeto (plano XY) y simultáneamente se mueve ortonormalmente (dirección Z) produciendo información volumétrica susceptible a ser analizada con algoritmos de reconstrucción. Los datos consisten en una matriz de pixeles 2D que representan la absorción de rayos X de la estructura; estos son los números CT medidos en unidades Hounsfield (una escala basada en aplicaciones médicas que considera el aire= -1000, el agua= 0 y el hueso= 1000), y matrices 3D donde el elemento de volumen, llamado voxel, incluye el pixel y la tercera dimensión dada por el espesor del corte. Los números CT se relacionan linealmente con la densidad de los voxeles correspondientes y por lo tanto proporcionan un medio para identificar zonas con diferentes densidades dentro del objeto.

Se utilizó un escáner médico *Siemens Somaton Sensation* multi-corte de 64 canales para estudiar los tallos florales secos de *P. berteroniana*. Se optimizaron los parámetros de adquisición instrumental para la observación de termitas y galerías de termitas, lo que se logró con los siguientes valores de adquisición: B70 (tipo de filtro), 120 kV (voltaje del tubo), 160 mA (intensidad de corriente), 1.4 (pitch), 0.6 mm (ancho de barrido) y 0.3 mm (superposición entre los cortes sucesivos). La reconstrucción de la imagen escaneada se realizó utilizando una matriz de 512x512 mm, 16 bit de profundidad y un tamaño del voxel de 0,35 x 0,35 x 0,6 mm. Los cortes con el colimador fueron de 0,6 mm y

se obtuvieron reconstrucciones de 0,6 mm cada 0,3 mm con el filtro B70 y usando la ventana osteoarticular en el programa para aplicaciones médicas. Los datos brutos fueron procesados a través de distintas técnicas de reconstrucción volumétricas tales como MPR (reconstrucción multiplanar), SSD (pantalla de sombreado de superficie), VRT (reconstrucción de volumen de superficie), MIP (máxima intensidad de proyección), MINIP (mínima intensidad de proyección), utilizando el programa Syngo Viewer de SIEMENS y el programa Osirix. MPR fue utilizado para evaluar las secciones planares en diferentes orientaciones y para determinar la relación espacial entre los objetos e individuos observados, en particular las termitas y las conexiones entre las galerías. VRT fue usado para obtener las representaciones 3D de las diferentes densidades; estas técnicas permiten la selección de diferentes áreas o volúmenes del objeto analizado y también la exclusión de algunas porciones en función de sus densidades, expresadas en unidades Hounsfield. La media de las densidades encontradas para la madera, termitas y galerías fue determinada en primer lugar; a partir de entonces, el histograma de CT para cada escape fue analizado, volúmenes trapezoidales fueron creados abarcando diferentes y discretos valores de CT, y a cada uno de esos volúmenes se les asignó un color RGB, brillo y opacidad para obtener representaciones 3D coloreadas del escape.

Sobre la base de estos antecedentes se realizó una comparación entre las termitas, colonias y soldados determinados por CT con los contados vía conteo directo, para determinar la confiabilidad de los conteos por CT. El conteo

directo consistió en la apertura de los escapos, extracción de las termitas y conteo de estas por castas. Dado que al abrir un escapo las galerías se rompen, se determinó el número de colonias basado en el número de reproductores primarios encontrados en el escapo (cada pareja de reproductores indicó una colonia).

Determinación de la proporción entre soldados y no-soldados en escapos uni- y multicoloniales

Se utilizaron las imágenes de 116 escapos escaneados y se determinó la existencia de conexiones entre galerías a través de imágenes en 2D axiales y sagitales y las representaciones en 3D de ellas. Cada sistema de galerías que no se encontró conectada con otro y que poseía un grupo de termitas en su interior, fue considerado preliminarmente una colonia independiente. Después de analizar los escapos con CT, se determinó que 69 de estos escapos eran unicoloniales y 47 multicoloniales. Finalmente, se determinó el número de soldados y de no-soldados para cada colonia.

Determinación de la proporción entre soldados y no-soldados en épocas de enjambrazón y no enjambrazón

Para determinar el periodo de enjambrazón para *N. chilensis* se colectaron escapos secos de *P. berteroniana*, los que se cubrían con una bolsa de tul blanco para luego ser transportados al laboratorio en Santiago en Enero del 2014, y montados verticalmente sobre un techo; los alados que emergían de los escapos eran extraídos desde las bolsas de tul y contados cada día hasta el

final de Abril de 2014. Los datos obtenidos fueron contrastados con datos obtenidos previamente en una colecta en campo que utilizó siete trampas luminosas que colectaban alados durante dos noches consecutivas; ellas fueron montadas en el sitio de estudio entre las 21:00 y 23:00 horas entre el 17 de Febrero y el 21 de Abril del 2013, con una distancia entre ellas de entre 0,075 y 2,35 km; posteriormente se realizó el conteo de los alados capturados. La Figura 1 resume los datos de las dos temporadas. La enjambrazón de *N. chilensis* comienza alrededor de la mitad de Febrero y tiene apogeo durante la segunda semana de Marzo. Adicionalmente, los resultados de la temporada 2014 (Fig. 1B) muestra que un incremento en la cantidad de alados emergentes durante la temporada de enjambrazón es producida cuando la temperatura aumenta; esta relación es menos clara en la temporada 2013 (Fig. 1A), en parte dado el hecho de que la estación meteorológica más cercana al sitio de estudio (Estación meteorológica de Quillota; <http://snia.dga.cl/BNAConsultas/reportes>) se encuentra a 31 km de distancia y probablemente no refleja adecuadamente las condiciones climáticas del sitio de estudio, mientras que la estación meteorológica Tobalaba (<http://164.77.222.61/climatologia/>) se encuentra a tan solo 4,7 km del laboratorio en Santiago (33°28'S; 70°35'W).

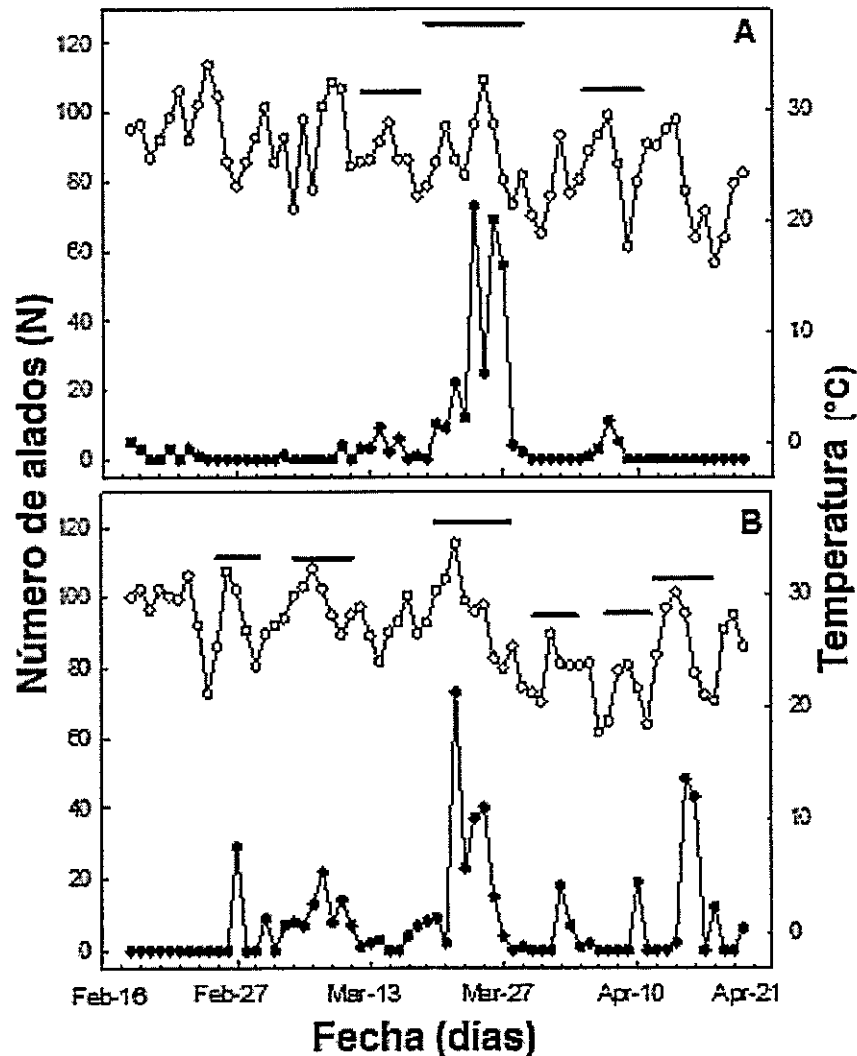


Fig. 1. Alados en relación a la temperatura y fecha de emergencia. Emergencia de alados de *N. chilensis* antes, durante y después de la temporada de enjambrazón en dos temporadas consecutivas (círculos oscuros), y sus temperaturas máximas diarias correspondientes (círculos blancos). **A.** Datos obtenidos en campo en 2013; **B.** Escapos colectados en el campo en 2014 y llevados al techo del laboratorio en Santiago. Las líneas continuas horizontales y gruesas representan periodos prolongados de altas temperaturas los que coinciden con un incremento en el número de alados recolectados.

Una vez obtenidos estos datos se determinó coleccionar escapos durante la temporada de no-enjambrazón (1 de Julio, 2014; 11 de Diciembre, 2014; y 26 de Junio, 2015; N=50) y previo al apogeo de la temporada de enjambrazón (15 de Enero, 2014; 12,19 y 27 de Febrero, 2014; y 9, 10,18 y 20 de Febrero, 2015; N=66) tomando en cuenta que el proceso de desarrollo para la formación de un soldado toma aproximadamente dos meses (**Ogino et al. 1993**). Estos escapos fueron escaneados y se determinó la proporción entre soldados y no-soldados para cada colonia.

Análisis de los datos

Para determinar la exactitud del conteo vía CT, se abrieron 16 escapos, los que fueron previamente escaneados, y se determinó el número de colonias por escapo, y el número de soldados y no-soldados por colonia. La concordancia entre CT y conteo directo fueron evaluadas usando el método de Bland-Altman (**Bland y Altman, 1986**).

El número de soldados y el número de no-soldados en una colonia fueron comparados usando una regresión logística realizada usando el Modelo Lineal Generalizado con una distribución binomial (**Agresti, 2002**). El análisis incluyó dos factores, el periodo (enjambrazón y no-enjambrazón) y la ocupación del escapo (unicolonial y multicolonial). El análisis fue llevado en R (**R Development Core Team, 2013**).

RESULTADOS

Método de conteo

Las densidades encontradas en CT para la corteza (media \pm SD: -300 ± 48 Unidades Hounsfield), madera interna (-598 ± 52 UH), galerías (-1020 ± 7 UH), y termitas (368 ± 62 UH) no mostraron solapamiento entre las categorías, lo que permite la distinción clara entre los diferentes componentes del escapo. Cada colonia consistió en un sistema continuo de galerías de diferentes formas, grosor y conectividad (Fig. 2 A-C). La gran cabeza esclerotizada de los soldados permitió su clara distinción con pseudo-obreras y reproductores primarios; sin embargo, estas dos últimas castas no pueden distinguirse una de otra (Fig. 2 D-E).

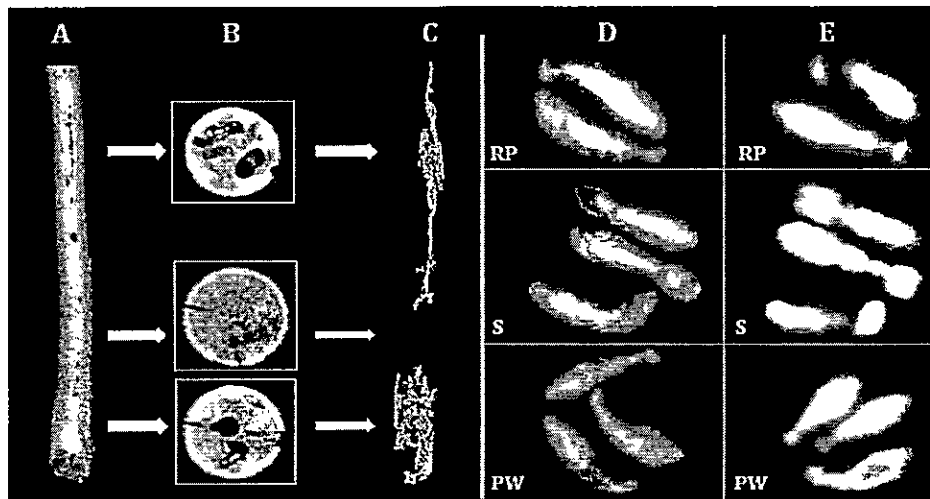


Fig. 2. Imágenes 2D y 3D de las distintas secciones de un escapo. **A.** Representación tridimensional de un escapo; **B.** Cortes axiales de un escapo obtenidos con CT (las secciones negras corresponden a galerías y las blancas a individuos de *N. chilensis*); **C.** Representaciones tridimensionales de dos galerías al interior del escapo; **D.** Imágenes 3D de termitas obtenidas a través

de CT de alta resolución y E. Imágenes en 2D de reproductores primarios (RP), soldados (S) y pseudo-obreras (PW) de *N. chilensis*.

El análisis de concordancia de Bland-Altman entre las mediciones hechas por el escáner (CT) y directamente a través de la disección de los escapos, mostró que el conteo vía CT subestimó tanto el número de soldados (Fig. 3A) como el número de no-soldados (Fig. 3B) por escapo en 0,50 (Intervalo de confianza al 95%: -1,29 a 2,29) y 1,94 (IC 95%: -32,08 a 35,95), respectivamente; y sobreestimó el número de colonias por escapo (Fig. 3C) en 0,06 (IC 95%: -0,56 a 0,44). Dada la concordancia entre ambos métodos de conteo, se utilizó el conteo vía CT en análisis posteriores ya que es más sencillo, permite observar las galerías y otorga la posibilidad de revisar nuevamente los escapos.

La observación a través de CT mostró que los escapos colectados contenían un total de 232 colonias. Dos tipos de colonias fueron descartadas del análisis: i) aquellas que contuviesen cuatro o menos individuos, el número mínimo encontrado como viable para sustentar la producción del primer soldado en una colonia (N=52), y ii) valores atípicos que por razones indeterminadas contuvieron una cantidad inusualmente baja (N=27) o alta (N=5) de soldados.

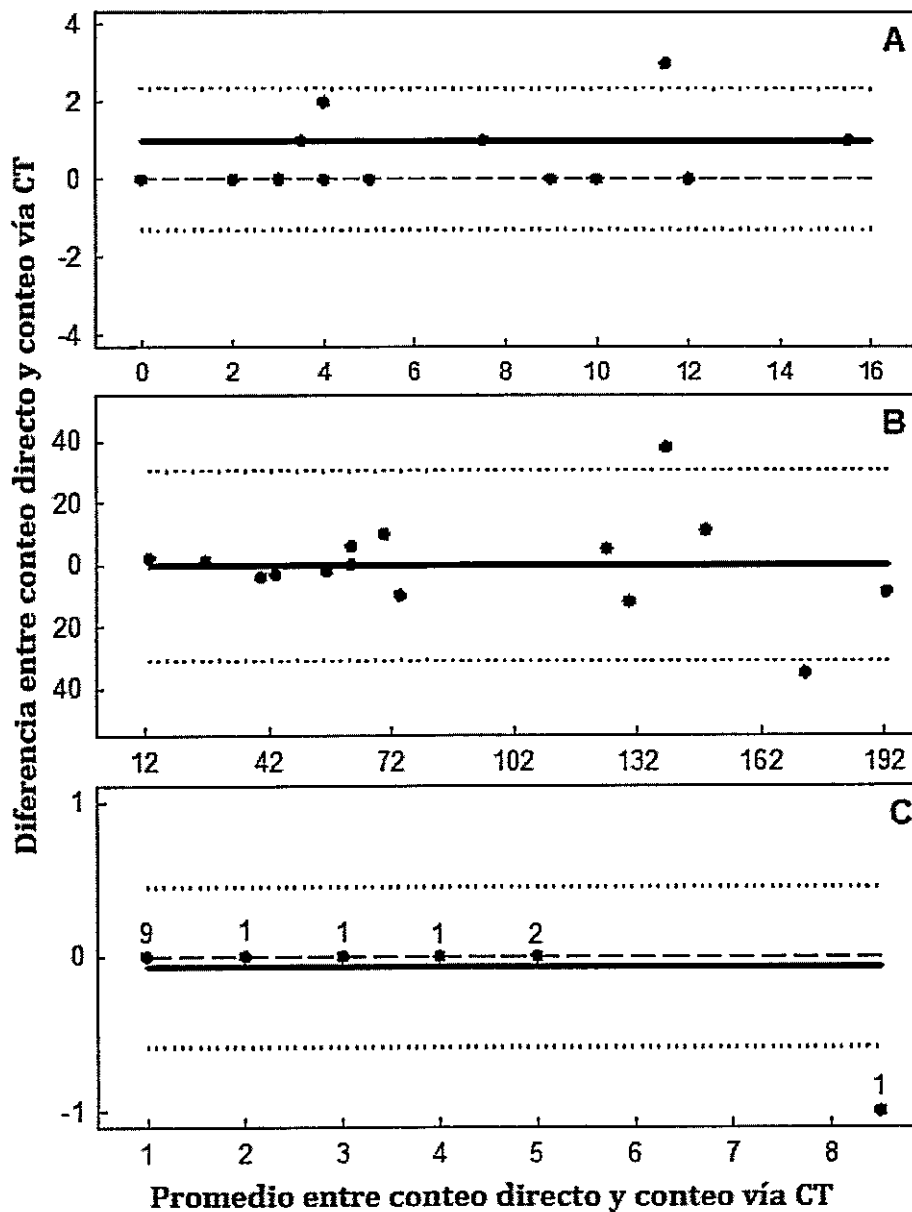


Fig. 3. Comparación entre conteo directo y conteo vía CT. Diagramas de Bland-Altman que comparan el conteo directo con el conteo a través de CT para: número de soldados por colonia (A), número de no-soldados por colonia (B) y número de colonias por escape (C). La línea central y gruesa indica el promedio en las diferencias entre los dos métodos de conteo, las líneas punteadas arriba y abajo indican el 95% de los intervalos de confianza y la línea discontinua indica cero diferencias entre ambos métodos de conteo. En el caso del conteo de colonias, algunos puntos representan más que un par de mediciones (esos números se representan sobre cada punto en el gráfico).

Proporción entre soldados y no-soldados

Las colonias de escapos unicoloniales mostraron presencia de soldados solo cuando el número de individuos fue igual o mayor a 8 y la proporción máxima de soldados a no-soldados fue 0,17, mientras que para colonias pertenecientes a escapos multicoloniales estos valores fueron 5 y 0,33, respectivamente. Tanto las colonias en período de enjambrazón como las en no-enjambrazón contuvieron soldados cuando había a lo menos 5 individuos, mientras que la máxima proporción entre soldados y no-soldados fue 0,33 y 0,29, respectivamente. El análisis a través de Modelo Lineal Generalizado con distribución binomial mostró efectos significativos de la ocupación en el escapo ($z = -3,35$; $P < 0,001$), temporada ($z = -2,12$; $P = 0,034$) y su interacción ($z = 2,31$; $P = 0,021$) (Fig. 4).

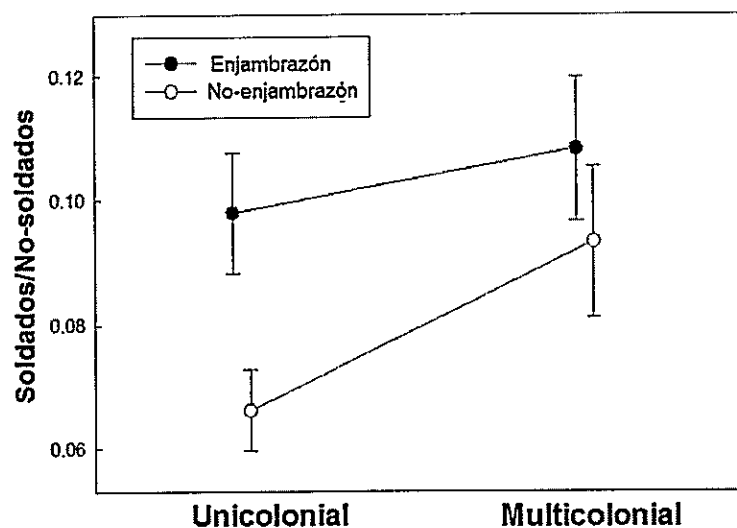


Fig. 4. Proporción de soldados sobre no-soldados en colonias durante la temporada de enjambrazón y no-enjambrazón y en escapos con una o más colonias de *N. chilensis*. Los valores en el eje x se desplazaron ligeramente para mayor claridad.

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que la proporción entre soldados y no-soldados fue significativamente mayor en escapos con múltiples colonias que en aquellos que solo poseían una. Estos resultados validan nuestra primera hipótesis y son concordantes con un estudio realizado por Thorne *et al.* (2003) que muestra que cuando más de una colonia de la termita nidificadora de una pieza *Zootermes nevansis* interactúan, la proporción de soldados reproductores (una casta particular de esta especie) incrementa, y estos son más agresivos ante interacciones intercoloniales que los soldados corrientes; como en *N.chilensis* no hay presencia de soldados reproductores la única manera de incrementar la agresividad de la colonia sería a través del aumento en el número de soldados.

Nuestros resultados también muestran que la proporción entre soldados y no-soldados previo a la temporada de enjambrazón es significativamente superior que durante la temporada de no-enjambrazón. Esto comprueba nuestra segunda hipótesis y muestra que las termitas reconocerían la proximidad de la temporada de enjambrazón y lo interpretarían como un periodo de riesgo para la colonia, aumentando consecuentemente la producción de soldados. Estos resultados podrían encontrar una causa fisiológica/bioquímica en estudios previos que muestran que la generación de distintas castas es regulada a través factores endógenos y exógenos (Simpson *et al.*, 2011),

siendo la hormona juvenil (HJ) el factor endógeno más estudiado para la diferenciación de castas en termitas. Diversos estudios han demostrado que altos niveles de HJ en pseudo-obreras promueven su diferenciación a la casta soldado (Park y Raina, 2005; Liu et al., 2005; Cornette et al., 2008); otros estudios han mostrado que la presencia de soldados inhibe la diferenciación de pseudo-obreras a soldados a través de una disminución en las concentraciones de HJ de estas (Watanabe et al., 2011). El factor exógeno mejor estudiado es la regulación por las interacciones sociales entre castas al interior de la colonia, en donde la presencia de soldados posee un efecto inhibitorio sobre la formación de otros soldados y estimula el desarrollo de reproductores. Al mismo tiempo, los reproductores primarios poseen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de reproductores secundarios pero un efecto estimulante sobre la producción de soldados (Watanabe et al., 2014). Por otra parte, pese a los avances en el estudio de la regulación social de la determinación de castas (principalmente soldados), el papel en la modulación de castas de factores exógenos como la temperatura, estado nutricional y densidad colonial no ha sido apropiadamente realizados (Simpson et al., 2011). Un incremento en las concentraciones de HJ ha sido relacionado con el periodo de enjambrazón tanto en termitas de múltiples piezas (Liu et al., 2011) como en termitas de una pieza (Cornette et al., 2008), mientras que otros estudios han mostrado un incremento en la proporción de soldados con un incremento en la temperatura (Waller and La Fage, 1988; Fei & Henderson, 2002; Liu et al., 2005), aunque no se han proporcionado razones para explicar este efecto. La pregunta que surge es el

destino de estos soldados adicionales que fueron producidos durante la temporada de enjambrazón una vez que las temperaturas decaen. La mantención de los soldados no es rentable bajo circunstancias que no requieren particularmente defensa, dado que ellos no pueden alimentarse por sí mismos y tampoco son capaces de expandir el sistema de galerías. Esto sugiere que probablemente tras la temporada de enjambrazón, los soldados dejan de ser alimentados y eventualmente mueren.

Una sociedad de insectos sociales es definida como “abierta” cuando los miembros aceptan a individuos conespecíficos ajenos a la colonia y “cerrada” cuando ellos actúan agresivamente hacia los miembros de colonias vecinas (Wallis, 1964). La sociobiología asume que las sociedades de insectos son siempre cerradas (Wilson, 1971) y esto ocurre en la mayoría de los casos. No obstante, en algunas termitas de múltiples piezas se ha encontrado tan solo agresión débil hacia con-específicos de otras colonias e incluso la fusión de colonias se observado bajo ciertas condiciones específicas (Bulmer et al., 2001; Clément et al., 2001; Matsuura and Nishida, 2001; Bulmer & Traniello, 2002; DeHeer and Vargo, 2004; Dronnet et al., 2006). Por otra parte, Aguilera-Olivares et al. (2015) mostraron que las colonias de la termita de una pieza *N. chilensis* poseen una composición genética que indica la presencia de individuos derivados a partir de una sola pareja reproductiva, indicando que las colonias evitan la mezcla. Además, estudios recientes demostraron la presencia de reconocimiento de con-específicos de la misma colonia entre soldados y otras castas, y una mayor agresión hacia individuos con-específicos de otras

colonias que hacia aquellos individuos que sí lo son (**Niemeyer et al., 2015**), demostrando así la importancia de la defensa en la composición de las colonias de *N. chilensis*.

Finalmente, un corolario de estos hallazgos es que las termitas nidificadoras de una pieza, miembros de una colonia deben ser capaces de reconocer miembros de otras colonias en el sustrato. Este reconocimiento podría estar dado por la distinción entre individuos con-específicos miembros y no miembros del mismo nido a través de compuestos cuticulares (**Costa-Leonardo et al., 2009; Van Zweden and D'Ettorre, 2010**), así como también podría ser producto de la comunicación vibroacústica a través del sustrato (**Evans et al. 2009; Hager and Kirchner 2014**).

CONCLUSIONES

La proporción entre soldados y no-soldados dentro de una colonia resultó mayor durante la temporada de enjambrazón que en la temporada de no-enjambrazón y mayor en colonias con colonias vecinas que en las que se encuentran aisladas, demostrando que una colonia responde al riesgo de invasión incrementando la producción de soldados.

Es importante destacar que este es el primer estudio que muestra el efecto de factores externos intraespecíficos en la formación de castas en termitas y constituye un ejemplo único de defensa inducida por agonismo en las interacciones intraespecíficas.

Finalmente, la tomografía computarizada ofrece nuevas perspectivas para entender la vida de una colonia de termitas, revelándose como una poderosa herramienta para estudios que requieren el conocimiento del número y la naturaleza de los individuos en las colonias y la detallada arquitectura de tales colonias, en cualquier momento de su desarrollo, y también para estudios de la ontogenia de cualquier colonia individual y, en general, para comprender la organización de la colonia en insectos crípticos sin necesidad de manipular el sustrato.

REFERENCIAS

- Aguilera-Olivares, D., Flores-Prado, L., Véliz, D. y Niemeyer, H.M. 2015. Mechanisms of inbreeding avoidance in the one-piece drywood termite *Neotermes chilensis*. *Insect. Soc.* 62: 237-245.
- Agresti A. 2002. Categorical data analysis. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. pp xv+710.
- Artigas, J. 1994. Entomología Económica, Insectos de Interés Agrícola, Forestal, Médico y Veterinario (Nativos, Introducidos y Susceptibles de ser Introducidos). Concepción, Chile. Ed. Universidad de Concepción, Vol. 1, 1126 p.
- Bland, J.M. y Altman, D.G. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*: 307-310.
- Boomsma J.J. 2009. Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philos Trans R Soc Lond. B Biol Sci* 364:3191–3207
- Camousseight, A. 1999. Las termitas y su presencia en Chile. Santiago, Chile. CONAF (Corporación Nacional Forestal). Nota Técnica (37), 8 pp.
- Cornette, R., Gotoh, H., Koshikawa, S. y Miura, T. 2008. Juvenile hormone titers and caste differentiation in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* (Isoptera, Termopsidae) *J. Insect Physiol.* 54:922–30.
- DeHeer, C.H. y Vargo, E.L. 2004. An indirect test of inbreeding depression in the termites *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59:753–761.
- Deligne J., Quennedey A. y Blum M.S. 1981. The enemies and defense mechanisms of termites, pp. 1-76. In H.R. Hermann (ed.), *Social Insects vol.2* Academic, New York.
- Dronnet, S., Lohou, C., Christides, J-P. y Bagnères, A-G. 2006. Cuticular hydrocarbon composition reflects genetic relationship among colonies of the introduced termite *Reticulitermes santonensis* Feytaud. *J. Chem. Ecol.* 32: 1027–1042.
- Eggleton, P., Bignell D.E., Sands W.A., Mawdsley N.A., Lawton J.H., Wood T.G. y Bignell N.C. 1996. The diversity, abundance and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, southern

Cameroon. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological sciences. 351: 51–68.

Eggleton, P. y Tayasu, I. 2001. Feeding groups, lifetypes and the global ecology of termites. *Ecol. Res.* 16: 941-960.

Eggleton, P. 2011. An introduction to termites: Biology, taxonomy and functional morphology. En: Bignell D.E., Roisin Y., Lo N. (eds.) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. 3-126 pp. Springer Science+Business Media, Dordrecht.

Evans, T.A., Inta, R., Lai, J.C.S., Prueger, S., Foo, N.W., Fu, E.W., Lenz, M. 2009. Termites eavesdrop to avoid competitors. *Prox. Biol. Sci.* 276:4035-4041.

Fei, H.X. y Henderson, G. 2003. Comparative study of incipient colony development in the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insect. Soc.* 50:226–233.

Fuchs, A., Schreyer, A., Feuerbach, S. y Korb, J. 2004. A new technique for termite monitoring using computer tomography and endoscopy. *Int. J. Pest Manage.* 50: 63-66.

Hager, F. A. y Kirchner, W.H. 2014. Directional vibration sensing in the termite *Macrotermes natalensis*. *J. Exp. Biol.* 217: 2526-2530.

Haverty. 1977. The proportion of soldiers in termite colonies: a list and bibliography (Isoptera). *Sociobiology* 2:199-216.

Herman, G.T. 2009. *Fundamentals of Computerized Tomography: Image Reconstruction from Projections*. 28-100 pp. Editorial Springer, New York-London.

Higashi, M., Yamamura, N. y Abe, T. 2000. Theories on the sociality of termites. En: Abe, T., Bignell D.E. Y Higashi, M. (eds), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. pp 169-187. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.

Himmi, S.K., Yoshimura, T., Yanase, Y., Oya, M., Torigoe, T. y Imazu, S. 2014. X-ray tomographic analysis of the initial structure of the royal chamber and the nest-founding behavior of the drywood termite *Incisitermes minor*. *The Japan Wood Research Society.* 60: 453-460.

Howard, R. y Haverty, M.I. 1981. Seasonal variation in caste proportions of field colonies of *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *J. Environ. Entomol.* 10: 546-549.

Korb, J., y Salewski, V. 2000. Predation on swarming termites by birds. *African Journal of Ecology*, 38(2), 173-174.

Lenz, M. 1976. The dependence of hormone effects in termite caste determination on external factors. 73-89 p. En: Lüscher (ed.), Phase and Caste Determination in Insects. Endocrine aspects. Pp 73-89. Pergamon, Oxford.

Liu, Y., Henderson, G., Mao, L. y Laine, R.A. 2005. Seasonal variation of juvenile hormone titers of the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae). J. Environ. Entomol. 34, 557–562.

Liu, N., Yan, X., Zhang, M., Xie, L., Wang, Q., Huang, Y., Zhou, X., Wang, S. y Zhou, Z. 2011. Microbiome of fungus-growing termites: a new reservoir for lignocellulase genes. Appl. Environ. Microbiol. 77 48–56 10.1128/AEM.01521-10 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

Martius C., Bandeira A.G. Y da Silva Medeiros L.G. 1996. Variation in termite alate swarming in rain forests of central Amazonia. Ecotropica 2:1–11

Nakajima, S., Shimizu, K. y Nakajima, Y. 1964. Analytical studies of the vitality of colonies of the Formosan termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki: II. Seasonal fluctuations on the external characters of the workers, the ratio of caste number and carbon dioxide in the nest of a colony. Miyazaki Univ. Faculty Agric. Bull. 9: 222-227.

Niemeyer, H.M., Burgos-Lefimil, C., Melendez, W., Rizo, J., Aguilera-Olivares, D. y Flores-Prado, L. 2015. Role of cuticular compounds in defense by soldiers of the one-piece termite *Neotermes chilensis*. Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, Stockholm, Sweden.

Ogino, K., Hirono, Y., Matsumoto, T. y Ishikawa, H. 1993. Juvenile hormone analogue, S-31183, causes a high level induction of presoldier differentiation in the Japanese damp-wood termite. Zool. Sci. 10: 361–366.

Park, Y.I. y Raina, A.K. 2003. Factors regulating caste differentiation in the Formosan subterranean termite with emphasis on soldier formation. Sociobiology 41: 49-60.

Park, Y.I. y Raina, A.K. 2005. Regulation of juvenile hormone titers by soldiers in the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. J. Insect Physiol. 51: 385-391.

Perna, A., Jost, C., Couturier, E., Valverde, S., Douady, S. y Theraulaz, G. 2008a. The structure of gallery networks in the nests of termite *Cubitermes* spp. revealed by X-ray tomography. Naturwissenschaften 95: 877-884.

Perna, A., Jost, C., Valverde, S., Gautrais, J., Sole, R. y Kuntz P. 2008b. Topological efficiency in three-dimensional gallery networks of termite nests. *Phys. Stat. Mech. Appl.* 387: 6235-6244.

Prestwich, G.D. 1984. Defense mechanisms of termites. *Annu. Rev. Entomol.* 29: 201-232.

R Development Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. Accessed 5 April 2015.

Ripa, R. y Luppichini, P. 2004. Cómo reconocer las termitas. *Tierra Adentro* N° 59. Noviembre – diciembre. Pp. 44-48.

Roisin, Y. y Korb, J. 2011. Social organisation and the status of workers in termites. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (eds. DE Bignell, Y Roisin & N Lo), pp. 133-164. New York: Springer.

Scharf, M.E., Buckspan, C.E., Grzymala, T.L. y Zhou, X. 2007. Regulation of polyphenic caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes* by interaction of intrinsic and extrinsic factor. *J. Exp. Biol.* 210: 4390-4398.

Shelton, T.G. y Grace, J.K. 1996. Review of agonistic behaviors in the Isoptera. *Sociobiology* 28: 155-176.

Simpson, S.J., Sword, G.A. y Lo N. 2011. Polyphenism in Insects. *Curr. Biol.* 21: R738-R749.

Šobotník, J., Jirošová, A. Y Hanus R. 2010. Chemical warfare in termites. *J. Insect Physiol.* 56: 1012-1021.

Su N.Y. y Scheffrahn R.H. 2000. Termites as pests of buildings, Pp 437-453. In Abe T, Bignell DE and Higashi M (eds.), *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.

Thorne, B.L. 1997. Evolution of eusociality in termites. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 27-54.

Thorne, B.L., Breisch, N.L. y Muscedere, M.L. 2003. Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: influence of intraspecific competition and accelerated inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12808–12813.

Van Zweden, J.S. y D'Ettorre, P. 2010. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons, in *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry,*

and Chemical Ecology, eds G.J. Blomquist y A.-G. Bagnères (Cambridge UK, Cambridge University Press), pp 222–243.

Viana, M.P., Fourcassié, V., Perna, A., Da F.Costa, L. y Jost, C. 2013. Accessibility in networks: A useful measure for understanding social insect nest architecture. *Chaos, Solutions & Fractals*. 46: 38-45.

Waller, D.A. y La Fage, J.P. 1988. Environmental influence on soldier differentiation in *Coptotermes formosanus*. *Insect. Soc.* 35: 144-152.

Wallis, D.I., 1964. Aggression in social insects. In: *The Natural History of Aggression* (J.D. Carthy, and F.J. Ebeling, Eds.), Academic Press, New York. Pp 15–22.

Wilson, E.O. 1971. *The Insect Societies*. Cambridge, MA: Belknap Press. Pp 548.