



**MECANISMOS DE EVITACIÓN DE LA ENDOGAMIA EN LA TERMITA DE  
MADERA SECA *NEOTERMES CHILENSIS* (TERMITOIDEA: KALOTERMITIDAE)**

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

**Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva**

Facultad de Ciencias

**Daniel Alejandro Aguilera Olivares**

Director de Tesis:

**Dr. Hermann M. Niemeyer**

Co-director de Tesis:

**Dr. Luis Flores-Prado**

Santiago, Noviembre 2015



## INFORME DE APROBACIÓN

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**Daniel Alejandro Aguilera Olivares**

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de Enero de 2015.

Director de Tesis:

**Dr. Hermann M. Niemeyer**

Co-director de Tesis:

**Dr. Luis Flores-Prado**

Comisión de Evaluación:

**Dr. Claudio Veloso**

**Dr. Elie Poulin**

**Dr. Claudio Ramírez**

**Dr. Rodrigo Vásquez**

*A mis saurios, cuyos cuidados parentales  
aumentaron mi fitness inclusivo...*

## AGRADECIMIENTOS

Sin duda esto es lo más importante de mi tesis, ya que sin las personas que serán nombradas acá, las siguientes páginas no existirían o bien no tendrían sentido alguno.

Para comenzar quiero agradecer a mi madre, María Teresa, quien me enseñó que las cosas se hacen bien o no se hacen, a ser perfeccionista y por ser estricta conmigo; a mi padre, Víctor, quien se encargó de mostrarme el mundo, a ser ingenioso y enseñarme que se puede ser feliz a pesar de la adversidad y a la Ñaña, por acompañarme y estimular mis locuras por muy arriesgadas que estás fuesen y reírnos de cosas que nadie más entendería.

A mis compañeros de la vida Pame y Michael, con quienes hemos estado juntos hace casi 20 años, por ser parte de este proceso y tratar de comprender que hago cosas raras con sus impuestos. A Ivonne, quién me acompañó en los primeros pasos de este doctorado, aguantando mi estrés del examen de calificación y ser parte de mis primeros terrenos de la tesis.

A mis compañeras del doc Angiruli, Gri y Jose con quienes sufrimos juntos el examen de calificación y salimos airosos. En especial a la Gri por mostrarme el mundo de la cueca chora; y a la Jose por su humor diferente y por esas conversaciones eternas acerca de la vida. A Elie Poulin por recibirme en su laboratorio durante todo un semestre, a Claudia Maturana por ser mi mentora en técnicas moleculares y a David Véliz, por su gran disposición y esas largas discusiones de ciencia.

Al LQE que por muchos años ha sido mi segundo hogar, un lab multidisciplinario donde he conocido a grandes personas en lo íntimo y lo académico. A Carolina Mendoza por ser mi amiga y acompañarme en los ataques de chanchería, prestar la casa en la playa y su casa de Santiago para terminar la extracción de ADN cuando en la U se cortó la luz y aguantar todo mi bullying. Al Dany Benitez y Cristian Acevedo por su ingenio y disponibilidad. La Claudita por sus comentarios “inocentes” que tanto alegraban nuestros almuerzos (te debo unas albóndigas). A Diego y Andrea por atreverse a acompañarme a terreno cuando solo tenía 5 horas con la licencia de conducir. A todos

los choferes de turno cuando aún no sabía manejar y quienes me han acompañado a terreno: Claudia “Barbie” Tapia, Lisa Villarroel, David Ulloa, Dany Torrico, Kathy, Mariolais, Benja y Javier; a Chio Lops-Barrales por darme tres abrazos al año, a Mar Cordero por enseñarme a dosificar el jabón, a rallar la zanahoria para cocinar el pollo, contagiarme con su eterna alegría y sacarme de quicio.

A nuestro grupo de termitólogos “TermiTeam” que ha sido muy dinámico en cuanto a su composición durante el tiempo. Un grupo con el cual discutir temas de ciencia y termitas, levantarnos a las 5am, muestrear todo el día a más de 35°C en verano para almorzar a las 7 de la tarde en “El Rinconcito” y llegar de noche al lab. En especial quiero agradecer a Belén Ulecia y Camy Burgos (esos cerros nunca estuvieron al lado del camino) quienes fueron las primeras en acompañarme a terreno, cuando íbamos en bus y caminábamos kilómetros para encontrar los nidos, pero nunca faltó nuestro huevo duro con sal, los sándwich de triple queso y triple jamón y lo que encontramos en el camino que pareciese rico y comestible.

A Hermann por recibirme en el lab hace ya varios años atrás, por enseñarme a ser estricto y claro en lo que se escribe, a cuestionármelo todo y por confiar en el proyecto termitas. Al Dr. Ed Vargo por recibirme en su laboratorio en el Departamento de Entomología de la “North Carolina State University”, y que junto a Paul Labadie contribuyeron con sus consejos y ayuda en el análisis genético y diseño de trampas de luz. A Luis Flores por ser mi mentor en el mundo de los insectos sociales, por confiar en mí y en los proyectos en los que nos hemos embarcado, pero por sobre todas las cosas, por ser un gran amigo. A Carlos Pinto, por ser un gran amigo y estar siempre ahí cuando lo he necesitado y que junto a Luis Flores hemos filosofado de la ciencia y la vida en extremo detalle con cafés eternos en el kiosco de Ciencias.

Finalmente quiero agradecer a Evelyn Pena, una persona increíble con una hijita maravillosa. Una mezcla de ingeniera, bailarina, cantante, poeta, pintora y diseñadora. A ella le debo gran parte del diseño de las trampas de luz, los dibujos de esta tesis y ayuda computacional. Gracias por acompañarme a terreno, por compartir mis ñoñerías y por sobre todo por siempre estar ahí.

## FINANCIAMIENTO

Mis estudios de doctorado fueron financiados por la beca CONICYT D-21080582.

Realicé una pasantía por un período de 3 meses en el laboratorio del Dr. Edward L. Vargo en el Departamento de Entomología de la North Carolina State University, Estados Unidos de Norteamérica, financiada por una beca obtenida a través del proyecto MECESUP UCH 0803.

La tesis de doctorado fue financiada con el proyecto FONDECYT 1120210.

## TABLA DE CONTENIDOS

Informe de aprobación.....	ii
Dedicatoria .....	iii
Biografía.....	iv
Agradecimientos.....	v
Financiamiento .....	vii
Tabla de contenidos.....	viii
Índice de figuras .....	ix
Índice de tablas .....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumen .....	1
Abstract .....	3
Introducción.....	5
1. Endogamia .....	5
2. Termitas como modelo de estudio.....	7
3. Estudios de depresión endogámica en termitas .....	12
Problema de estudio .....	18
Hipótesis.....	19
Objetivo general .....	23
Objetivos específicos.....	23
Materiales y métodos generales .....	24
Resultados .....	38
Discusión general .....	47
Conclusiones .....	53
Referencias .....	55
Anexo artículo publicado: Mechanisms of inbreeding avoidance in the one-piece drywood termite <i>Neotermes chilensis</i> .....	62
Electronic supplementary material .....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida general de una colonia de termitas .....	11
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de evitación de la endogamia en termitas .....	15
<b>Figura 3.</b> Individuos en distintos estados de desarrollo de <i>N. chilensis</i> .....	17
<b>Figura 4.</b> <i>Puya berteroniana</i> con escapos secos en la cuesta Las Chilcas .....	25
<b>Figura 5.</b> Grupos experimentales para estudio de prevalencia de endogamia y de los mecanismos involucrados en su evitación en <i>Neotermes chilensis</i> .....	26
<b>Figura 6.</b> Distribución de simulaciones de parentesco entre individuos de <i>N. chilensis</i> pertenecientes a diferentes castas .....	28
<b>Figura 7.</b> Distribución de trampas de luz en la cuesta Las Chilcas .....	29
<b>Figura 8.</b> Trampa de luz .....	31
<b>Figura 9.</b> Parentesco promedio entre pares de compañeros de nido .....	39
<b>Figura 10.</b> Aislamiento por distancia entre alados de siete trampas en un evento de enjambrazón .....	41
<b>Figura 11.</b> Espectros de masas para compuestos cuticulares no identificados en alados de <i>N. chilensis</i> .....	46



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de parejas de hermanos completos y parejas no emparentadas en tres grupos experimentales, calculadas con dos aproximaciones diferentes .....	39
<b>Tabla 2.</b> Datos de producción sesgada al sexo y emergencia sesgada al sexo en termitas provenientes de siete escapos recolectados en terreno y mantenidos en Santiago .....	40
<b>Tabla 3:</b> Indicadores de dispersión sesgada al sexo .....	42
<b>Tabla 4:</b> Bioensayos conductuales entre un de-alado focal (macho y hembra) confrontado simultáneamente con un de-alado compañero de nido y un no-compañero de nido .....	44
<b>Tabla 5:</b> Compuestos cuticulares presentes en de-alados de <i>N. chilensis</i> .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>PO</b>	=	pseudo-obreros
<b>J</b>	=	juvenil
<b>NON</b>	=	ninfas ojos negros
<b>ASQ</b>	=	alados sin quitinizar
<b>AQ</b>	=	alados quitinizados
<b>S</b>	=	soldado
<b>PRP</b>	=	pareja de reproductores primarios
<b>m</b>	=	metro
<b>km</b>	=	kilómetro
<b>12V</b>	=	12 voltios
<b>UV</b>	=	luz ultravioleta
<b>mL</b>	=	mililitro
<b>μL</b>	=	microlitro
<b>% v/v</b>	=	porcentaje volumen/volumen
<b><i>F<sub>ST</sub></i></b>	=	diferenciación genética
<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	=	índice de endogamia
<b>r</b>	=	grado de parentesco
<b>AI</b>	=	índice de asignamiento
<b>Aic</b>	=	índice de asignamiento corregido
<b>GC-MS</b>	=	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)
<b>ADN</b>	=	ácido desoxirribonucleico
<b>min</b>	=	minuto
<b>eV</b>	=	electrovolts
<b>mA</b>	=	miliampere
<b>PCR</b>	=	reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
<b>EE</b>	=	error estándar
<b>μM</b>	=	micromolar
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	=	cloruro de magnesio

<b><math>\mu\text{L}</math></b>	=	microlitro
<b>ng</b>	=	nanogramo
<b><math>H_E</math></b>	=	heterocigosidad esperada
<b><math>H_O</math></b>	=	heterocigosidad observada
<b>HWE</b>	=	Equilibrio de Hardy-Weinberg (por sus siglas en inglés)
<b><math>N_A</math></b>	=	número de alelos
<b>N</b>	=	número de individuos
<b>EM</b>	=	espectro de masas
<b>IR</b>	=	índice de retención
<b>CE</b>	=	compuesto estándar

## RESUMEN

La depresión endogámica se refiere a una disminución en algún componente de la adecuación biológica de una pareja sexual estrechamente emparentada y de su descendencia. Dadas las desventajas de la depresión endogámica, es de interés estudiar los mecanismos involucrados en su evitación, particularmente en insectos sociales. Las termitas muestran un repertorio conductual reproductivo consistente en la producción de alados dentro de la colonia, su emergencia durante el evento de enjambrazón, su aterrizaje y pérdida de alas (formación de de-alados), el encuentro de ambos sexos en una conducta de tándem (el macho camina detrás de la hembra palpando su abdomen), la construcción de una cámara nupcial y finalmente su apareamiento para fundar una nueva colonia (pareja de reproductores primarios). Dos tipos de mecanismos han sido propuestos para la evitación de la endogamia: mecanismos indirectos que ocurren antes de la formación de de-alados (producción sesgada del sexo a nivel de colonia, tiempo de emergencia sesgada al sexo, dispersión, y dispersión sesgada al sexo) y un mecanismo activo (reconocimiento de parentesco) que ocurriría cuando de-alados toman contacto luego del aterrizaje. Se estudió los mecanismos de evitación de endogamia en la especie endémica *Neotermes chilensis* a través de: i) análisis genético de hermanos dentro de una colonia, alados en enjambrazón y parejas de reproductores primarios; ii) observación de la emergencia de alados desde colonias individuales; iii) dispersión y dispersión sesgada al sexo de alados en enjambrazón; iv) bioensayos conductuales que involucraron de-alados de la misma o diferentes colonias, y análisis de compuestos semioquímicos y genéticos de los individuos utilizados en los bioensayos; y v) apareamiento y producción de huevos en colonias

artificiales iniciadas con un macho y una hembra de-aladas proveniente de la misma o de diferentes colonias. Esta es la primera investigación que abarca los mecanismos indirectos y el activo de evitación de la endogamia, en el mismo estudio, en la misma especie de termita y a través del período reproductivo completo. Los resultados muestran que la dispersión es el principal mecanismo indirecto de evitación de la endogamia y que el reconocimiento de parentesco puede ser descartado como un mecanismo activo. La razón por la cual el reconocimiento de parentesco no está involucrado en la evitación de endogamia en termitas es discutido en términos del grado de parentesco resultante de que ambos sexos sean diploides; esta situación es contrastada con lo que ocurre en especies de himenópteros eusociales haplo-diploides.

## ABSTRACT

Inbreeding depression refers to a decrease in fitness components of a closely related sexual pair and their offspring. Given the disadvantages of inbreeding depression, it is of interest to study the mechanisms involved in its avoidance, particularly in social insects. Termites show a reproductive behavioral repertoire consisting in the production of alates inside the colony, their emergence during a swarming event, their landing and loss of wings (formation of de-alates), the encounter of both sexes in a tandem behavior (the male walks behind the female touching her abdomen), the construction of a nuptial chamber and finally, mating and founding of a new colony (carried out by the primary reproductive pair). Two types of mechanisms have been proposed for inbreeding avoidance: indirect mechanisms that occur before the formation of de-alates (sex-biased production at colony level, sex-biased emergence timing, dispersal, and sex-biased dispersal), and an active mechanism (kin recognition) that occurs when de-alates come into contact after landing. We studied the mechanisms of inbreeding avoidance in the endemic species *Neotermes chilensis* through: i) genetic analysis of siblings within a colony, swarming alates and primary reproductive pairs; ii) observation of the emergence of alates from individual colonies; iii) dispersal and sex-biased dispersal of swarming alates; iv) behavioral bioassays involving de-alates from the same or different colonies and semiochemical and genetic analyses of bioassayed individuals; and v) mating and egg production in artificial colonies started with one male de-alate and one female de-alates from the same or different colonies. This is the first report addressing both indirect and active mechanisms of inbreeding avoidance in the same study, in the same termite species, and through the complete reproductive period. The results show that dispersal is the main indirect mechanism of

inbreeding avoidance and that kin recognition is discarded as an active mechanism of inbreeding avoidance. The reason why kin recognition is not involved in inbreeding avoidance in termites is discussed in terms of their degree of relatedness resulting from both sexes being diploid; this situation is contrasted with that occurring in haplo-diploid eusocial hymenopterans.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. ENDOGAMIA

La endogamia se define como el apareamiento entre individuos emparentados (Kristensen *et al.*, 2010). Esta puede tener efectos positivos o negativos tanto en los individuos que participan en una elección endogámica como en la descendencia resultante (Pusey & Wolf, 1996; Kokko & Ots, 2006). Los efectos positivos se relacionan con la adecuación biológica inclusiva de los progenitores, quienes adicionalmente a la adecuación biológica directa (número de hijos  $n$ ), ganan adecuación biológica indirecta  $rn$  (siendo  $r$  el grado de parentesco) al aumentar la representación de los genes de cada uno de ellos en la población. En otras palabras, la elección endogámica conduce a una adecuación biológica inclusiva equivalente a  $(1+r)n$ , mientras que si la reproducción ocurre entre individuos no emparentados ( $r \approx 0$ ), la adecuación biológica sería solo  $n$  (Kokko & Ots, 2006). En especies sociales, la teoría de selección por parentesco predice que los individuos que conforman un grupo se ven beneficiados con la endogamia al aumentar el grado de parentesco entre ellos y su descendencia, y entre los individuos de la descendencia, fomentándose así las conductas cooperativas entre todos ellos (Bartz, 1979; Bartz 1980; Wade & Breden, 1981). Por otra parte, de acuerdo a la teoría de selección sexual, el apareamiento entre individuos no cercanamente emparentados es favorecido por sobre el apareamiento entre individuos cercanamente emparentados (Bartz, 1979; Bartz, 1980) debido a los efectos negativos de la elección de parejas sexuales estrechamente emparentadas (Paul, 2002; Penn, 2002). Estos efectos negativos, conocidos como depresión endogámica (Pusey & Wolf, 1996; Charlesworth & Willis, 2009), son causados por un



aumento de la homocigosidad de alelos recesivos deletéreos (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Charlesworth & Willis, 2009), y se traducen en una reducción en la descendencia resultante en comparación con la descendencia exogámica, y de los valores promedio de rasgos correlacionados con componentes de la adecuación biológica, es decir, sobrevivencia, tasa de crecimiento y reproducción (Charlesworth & Willis, 2009).

La depresión endogámica es bastante común y ha sido extensamente documentada tanto en plantas como en animales desde los tiempos de Darwin (Charlesworth & Willis, 2009). Ella se puede expresar de diversas formas, por ejemplo, en muerte pre-nacimiento, pre-eclosión o pre-germinación, o muerte en estados juveniles del individuo (Evans *et al.*, 2004, Gerloff & Schmid-Hempel, 2005), en efectividad disminuida del sistema inmune (Calleri *et al.*, 2007), baja fertilidad o esterilidad por producción de espermatozoides deformes (Inhorn *et al.*, 2009), o disminución en el éxito de fundación de colonias en el caso de especies sociales (Gerloff & Schmid-Hempel, 2005).

A pesar de los efectos negativos de la endogamia, la exogamia extrema también puede producir reducción en los componentes de la adecuación biológica (depresión exogámica), cuyos costos surgen del quiebre de complejos de genes coadaptados y la pérdida de adaptación local (Pusey & Wolf, 1996; Kokko & Ots, 2006). El hecho que tanto la endogamia como la exogamia puedan tener tanto efectos positivos como negativos sugiere que debería existir un “óptimo exogámico”; éste podría darse si los parientes más cercanos (por ejemplo, padres y hermanos completos) son evitados como pareja y son aceptados parientes más o menos lejanos o individuos de una población distante sometida a presiones ecológicas equivalentes (Kokko & Ots, 2006). En general, la depresión exogámica ha sido menos estudiada que la depresión endogámica (Pusey & Wolf, 1996).

Por los efectos que tiene sobre la adecuación biológica de los individuos, la depresión endogámica es considerada una fuerza selectiva en la evolución de mecanismos que la evitan (Pusey & Wolf, 1996), en tanto que la depresión exogámica no produce efectos de magnitud suficiente como para constituir una fuerza selectiva (Pusey & Wolf, 1996). En animales sociales, la evitación de la endogamia en los individuos que forman parte de la progenie es de particular importancia, ya que los individuos descendientes de los fundadores del grupo social están altamente emparentados (Ciszek, 2000) y, dado que las colonias de insectos sociales pueden llegar a tener millones de individuos, la probabilidad de endogamia es particularmente alta (Whitehorn *et al.*, 2009).

## **2. TERMITAS COMO MODELO DE ESTUDIO**

Las termitas comprenden unas 2600 especies que están distribuidas en siete familias: Mastotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae y Termitidae (Eggleton, 2011). Todas las termitas son altamente esusociales, es decir, existe división de la labor reproductiva, cooperación en el cuidado de las crías y solapamiento de generaciones adultas además de una diferenciación morfológica de castas (Thorne, 1997); viven en colonias que dependiendo de la especie, van desde unos cientos hasta millones de individuos (Eggleton, 2011). Construyen sus nidos bajo o sobre la tierra, dentro de madera o sobre ramas de árboles (Eggleton, 2011). Tradicionalmente, las termitas han sido filogenéticamente clasificadas como un orden completo (Isoptera) dentro del superorden Dictioptera (que además incluye a las mantis y las cucarachas), siendo su grupo hermano el orden Blattaria (cucarachas) y como grupo hermano de ambos el orden Mantodea (mantis) (Kambhampati, 1995). Esta clasificación ha hecho que el estudio de la

evolución de la eusocialidad en termitas sea una tarea difícil de abordar, debido a que según este ordenamiento sistemático, ellas son un orden completamente eusocial, no existiendo niveles de organización menos complejos con los cuales se puedan realizar estudios comparativos (Thorne, 1997), al contrario de lo que sucede en Vespidae y Apidae.

Sin embargo, desde las últimas dos décadas (Bell *et al.*, 2007) y con el aumento del conocimiento de los rasgos biológicos, morfológicos, ecológicos y conductuales en cada uno de los grupos del superorden Dictioptera, se ha propuesto a las termitas como cucarachas eusociales (Eggleton, 2001). Esta hipótesis ha tomado fuerza en los últimos años con el creciente desarrollo de filogenias moleculares y mayores tamaños de muestra, hasta que Inward *et al.* (2007) realizaron el trabajo filogenético más completo conocido a la fecha, en el cual proponen que las termitas son efectivamente cucarachas eusociales teniendo como grupo hermano a la familia Cryptocercidae, representada por la única especie *Cryptocercus punctulatus*. De este modo, las termitas han pasado de ser un orden a una superfamilia (Termitoidea) dentro del nuevo orden Blattodea (*sensu* Klass *et al.*, 2008) que agruparía a las termitas y las cucarachas (Inward *et al.*, 2007; Lo, 2007; Eggleton, 2007).

Sobre la base de aspectos ecológicos, se han reconocido tres categorías de termitas según sus hábitos de nidificación y forrajeo (Abe, 1987): i) las termitas nidificadoras de una pieza, que incluye a las familias Termopsidae, Kalotermitidae y al género *Protermites* de la familia Rhinotermitidae (Evans, 2011), se caracterizan por usar un trozo de madera como sustrato de nidificación y forrajeo. Por esta razón, los miembros de la colonia jamás abandonan el nido, excepto en los períodos de enjambrazón en los cuales los individuos de colonias maduras, cuyo sustrato de nidificación se vuelve escaso, desarrollan alas y abandonan el nido buscando una oportunidad de fundar una nueva colonia. En las especies

clasificadas en esta categoría, la vida de la colonia está limitada por la disponibilidad del sustrato de nidificación, y el desarrollo individual es altamente flexible o totipotencial. Todos los individuos de la colonia (excepto los soldados y reproductores primarios que son castas terminales) permanecen en un estado inmaduro en el cual desarrollan funciones de obreros, estado que no es terminal, por lo cual se les llaman falsos obreros; sin embargo, bajo ciertas circunstancias, estos falsos obreros pueden llegar a convertirse en individuos de estados terminales como lo son los individuos alados y los soldados; ii) las nidificadoras de piezas separadas, que incluye a las familias Hodotermitidae, Serritermitidae y algunas especies de las familias Rhinotermitidae y Termitidae (Evans, 2011), se caracterizan por construir su sitio de nidificación en un lugar y forrajear en otros lugares fuera de la colonia; los obreros deben salir del nido, en algunos casos acompañadas de soldados (Traniello, 1981), en búsqueda de alimento, de modo que la vida de la colonia no está limitada por la reducción progresiva del nido por consumo del mismo. Poseen una baja flexibilidad del desarrollo, ya que todas sus castas son terminales, existiendo los llamados obreros verdaderos, que tienen un potencial reproductivo reducido; y finalmente iii) las nidificadores de piezas intermedias, incluye a las termitas de las familias Mastotermitidae y algunas especies de las familias Rhinotermitidae y Termitidae, se caracterizan por anidar y alimentarse del mismo sustrato, pero una vez que el sustrato se agota se pueden mover a otro sustrato; además, sus colonias están conformadas por obreros verdaderos (Evans, 2011).

La reproducción puede ocurrir a través de la fundación de una nueva colonia o entre individuos dentro de una misma colonia con alto grado de madurez. El repertorio conductual reproductivo previo a la fundación de una nueva colonia es similar para todas las termitas (Fig 1; Eggleton, 2011): las colonias maduras producen individuos alados que

abandonan el nido en un evento de enjambrazón al inicio de la temporada calurosa en hábitats estacionales (Ripa & Luppichini, 2004) y en cualquier período del año en hábitats no estacionales (Martius *et al.*, 1996); estos futuros reproductores (macho y hembra), se posan sobre un sustrato para nidificar, que dependiendo de la especie puede ser tierra o un trozo de madera; pierden las alas, realizan una conducta en tándem (el macho sitúa sus patas protorácicas sobre las membranas pleurales abdominales de la hembra; empieza así el paseo nupcial con la hembra por delante, mientras que el macho lame las secreciones tergaes (Costa-Leonardo *et al.*, 2009), buscan un sustrato donde construyen una cámara nupcial, se aparean y luego la hembra oviposita los primeros huevos fundando así una nueva colonia; desde ese momento, ambos individuos conforman la pareja real (rey y reina), siendo ellos los primeros en encargarse de alimentar a la primera progenie que dará origen a obreros. Por otro lado, cuando las colonias de ciertas especies alcanzan un alto grado de madurez o cuando alguno de los reproductores primarios muere, ocurre la formación de neoténicos (reproductores secundarios) a partir de pseudo-obreros, los cuales pueden aparearse con los reproductores primarios o entre ellos. En tres especies de *Reticulitermes* - *R. speratus* (Matsuura *et al.*, 2009), *R. virginicus* (Vargo *et al.*, 2012) y *R. lucifugus* (Lucchetti *et al.*, 2013) - se ha demostrado que la reina produce hembras neoténicas a través de partenogénesis, estas hembras se reproducen con el rey, con el cual no están cercanamente emparentadas como en el caso de la descendencia que obtuvo con la reina, evitando de esta forma la endogamia (Matsuura *et al.*, 2009).

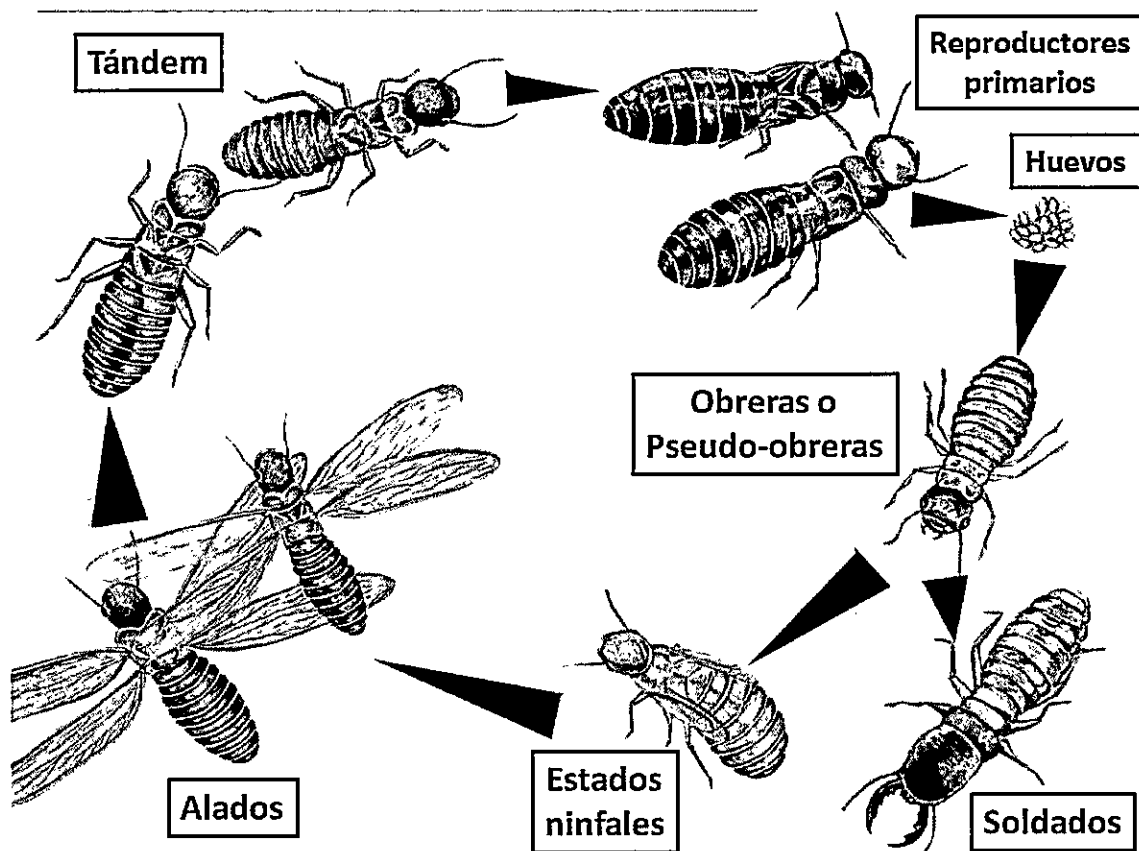


Figura 1: Ciclo de vida general de una colonia de termitas.

Las termitas están compuestas por diferentes castas (Korb & Hartfelder, 2008). En algunas familias, los obreros están encargados de alimentar al resto de la colonia, construir y reparar el nido y solo salen del nido para forrajear. En otras familias, estas funciones son cumplidas por los **pseudo-obreros**; estos, a diferencia de los **obreros**, nunca salen del nido para forrajear y además son totipotenciales, manteniendo la capacidad de transformarse en soldados estériles o en alados. La transformación en soldados ocurre a través de un estadio intermedio (pre-soldado), mientras que la transformación en alados ocurre a través de unos cinco estadios intermedios dependiendo de la especie e incluye tres mudas que llevan al desarrollo inicial de primordios alares en los segmentos proto y metatorácicos, una muda que lleva al desarrollo de los ojos compuestos, una muda que produce un alado sin

quitinizar que finalmente, luego que su exoesqueleto se quitiniza, se convierte en un alado color marrón. Alternativamente, los pseudo-obreros pueden permanecer como tales durante el resto de su vida y experimentando “mudas progresivas” que conducirán a un aumento de su tamaño corporal, “mudas estacionarias” que mantendrán su tamaño corporal pero renovarán sus piezas bucales, y “mudas regresivas” que disminuirán su tamaño corporal (Roisin & Korb, 2011). Cuando la colonia ha alcanzado cierta densidad poblacional, se produce el desarrollo de soldados (Costa-Leonardo *et al.*, 2009). Estos sólo tienen como tarea defender la colonia y en particular a la reina y el rey; para ello, tienen diferentes mecanismos de defensa: mecánicas (mandíbulas modificadas con dientes para morder, aplastar o perforar – Prestwich, 1984), químicas (sustancias líquidas producidas por las glándulas labiales, la glándula del *labrum* o la glándula frontal en algunas especies - Šobotník *et al.*, 2010) y mixtas, donde hay una mezcla de los dos mecanismos anteriores descritos (Prestwich, 1984). Los individuos incapaces de alimentarse por sí solos, como los soldados (por tener sus mandíbulas modificadas o atrofiadas), los reproductores primarios (por tener mandíbulas desgastadas) y los recién nacidos (por tenerlas poco desarrolladas), son alimentados mediante trofalaxis proctodeal (alimentación ano-boca) o estomodeal (alimentación boca-boca), produciéndose así el intercambio de una diversa fauna intestinal simbiótica que ayuda a digerir la celulosa y otras materias orgánicas (Eggleton, 2011).

### 3. ESTUDIOS DE DEPRESIÓN ENDOGÁMICA EN TERMITAS

Los efectos deletéreos de la endogamia han sido mostrados en colonias naturales de termitas a través de la comparación de colonias con y sin neoténicos (Husseneder *et al.*,

2005; Husseneder *et al.*, 2007), en colonias artificiales de termitas a través de la comparación de colonias producidas desde parejas de de-alados (Fei & Henderson, 2003; Calleri *et al.*, 2007), y a través de la determinación de la sobrevivencia de miembros de colonia formados a partir de reproductores con diferentes grados de parentesco (DeHeer & Vargo, 2006).

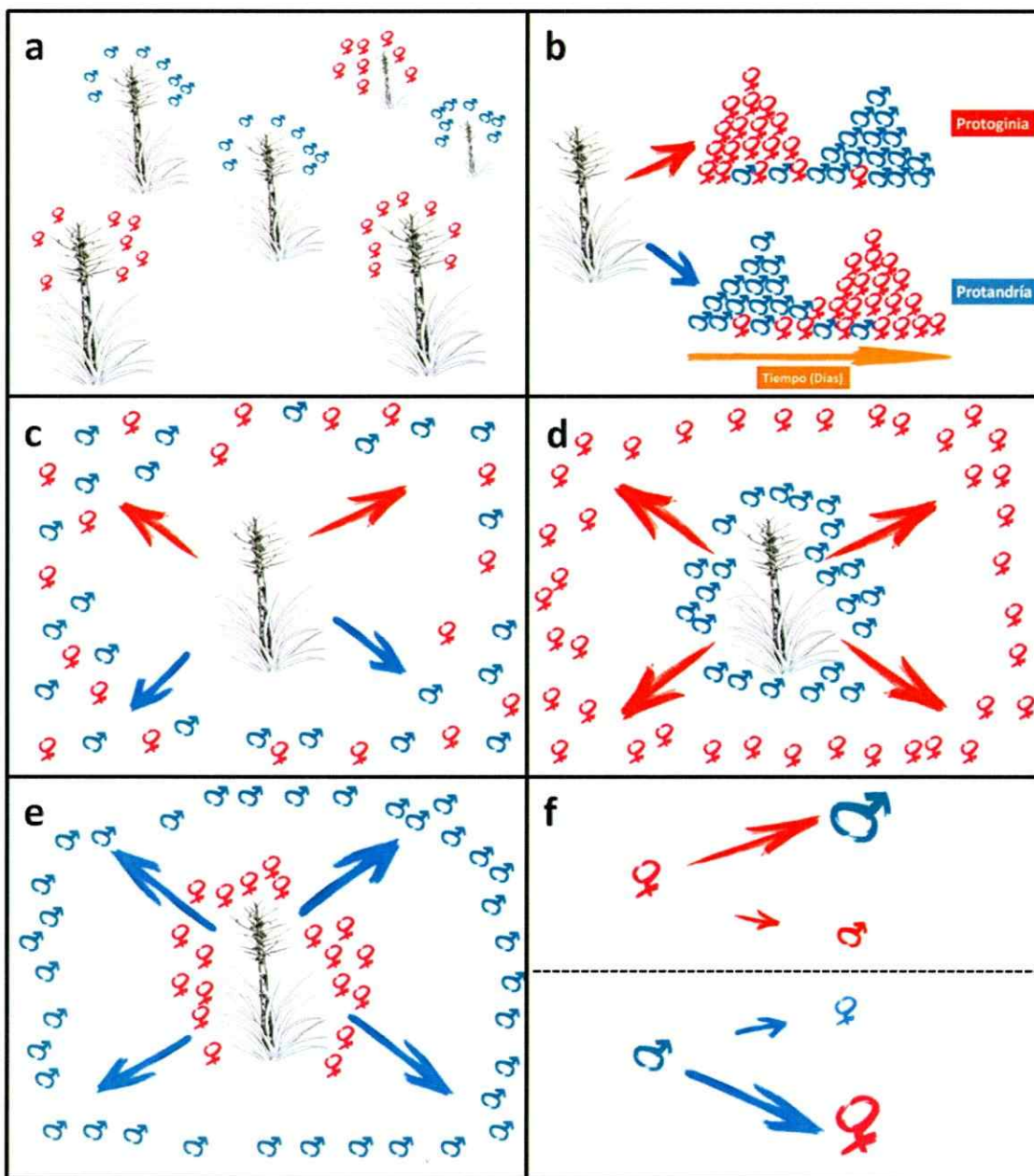
Sin embargo, estudios moleculares en colonias naturales han mostrado, en un amplio rango de especies, que los individuos fundadores de colonias no están cercanamente emparentados (revisado en Vargo & Husseneder, 2011). Esto implica la existencia de mecanismos de evitación de la endogamia en el proceso previo a la fundación de una nueva colonia. Los mecanismos de evitación de la endogamia en este proceso han sido clasificados en dos categorías: indirectos y activo (Tabadkani *et al.*, 2012; Vargo & Husseneder, 2011). Los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia se refieren a aquellos exhibidos desde la producción de alados dentro de la colonia hasta la formación de de-alados, y sus efectos se traducen en una disminución en la probabilidad de encuentro entre individuos de distinto sexo provenientes de la misma colonia. Estos mecanismos son: producción de alados sesgada al sexo al nivel de colonia (Fig. 2a), es decir, algunas colonias podrían producir un sexo en preferencia del otro (Lenz & Runko, 1993; Roisin & Lenz, 2002; Husseneder *et al.*, 2006); tiempo de emergencia sesgada al sexo (Fig. 2b), es decir, un sexo podría emerger desde una colonia más temprano que el otro (Morbey & Ydenberg, 2001); dispersión (Fig. 2c), es decir, si los alados vuelan lejos de sus colonias durante la enjambrazón, la probabilidad de encontrar a un compañero de nido disminuye en tanto la distancia de vuelo aumenta (Husseneder *et al.*, 2006; Messenger & Mullins, 2005; Vargo *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007); y dispersión sesgada al sexo (Figs. 2d y 2e), es decir, un sexo podría desplazarse mayores distancias que el otro (Shellman-Reeve, 1996). Por



otro lado, dos posibles mecanismos activos para la evitación de la endogamia son el reconocimiento de parentesco y el reconocimiento entre compañeros de nido (Fig. 2f), que podrían ocurrir durante la elección de pareja ya sea antes o después que el macho y la hembra de-alados entran en contacto físico (Vargo & Husseneder, 2011). El reconocimiento de parentesco corresponde a la capacidad de un individuo enfrentado a conespecíficos con distintos grados de parentesco, de identificarlos y efectuar una discriminación conductual de acuerdo con su grado de parentesco (revisado en Michener & Smith, 1987 y Smith & Breed, 1995). A diferencia del reconocimiento de parentesco, el reconocimiento de compañeros de nido está mediado por la pertenencia a un grupo de desarrollo (por ejemplo, una colonia) y no se basa en el grado de parentesco que existe entre los individuos.

El reconocimiento de compañeros de nido ha sido objeto frecuente de estudios en termitas, de los cuales la gran mayoría relacionan las variaciones en los perfiles de compuestos cuticulares colonia-específicos con la intensidad en el comportamiento agresivo desplegado entre individuos no reproductivos de distintas colonias (Howard & Blomquist, 1982; Adams, 1991; Bagnères *et al.*, 1991; Takahashi & Gassa, 1995; Vauchot *et al.*, 1996; Haverty *et al.*, 1999; Kaib *et al.*, 2002; Florane *et al.*, 2004; Kaib *et al.*, 2004; Costa-Leonardo *et al.*, 2009; Zweden & d'Ettorre, 2010).

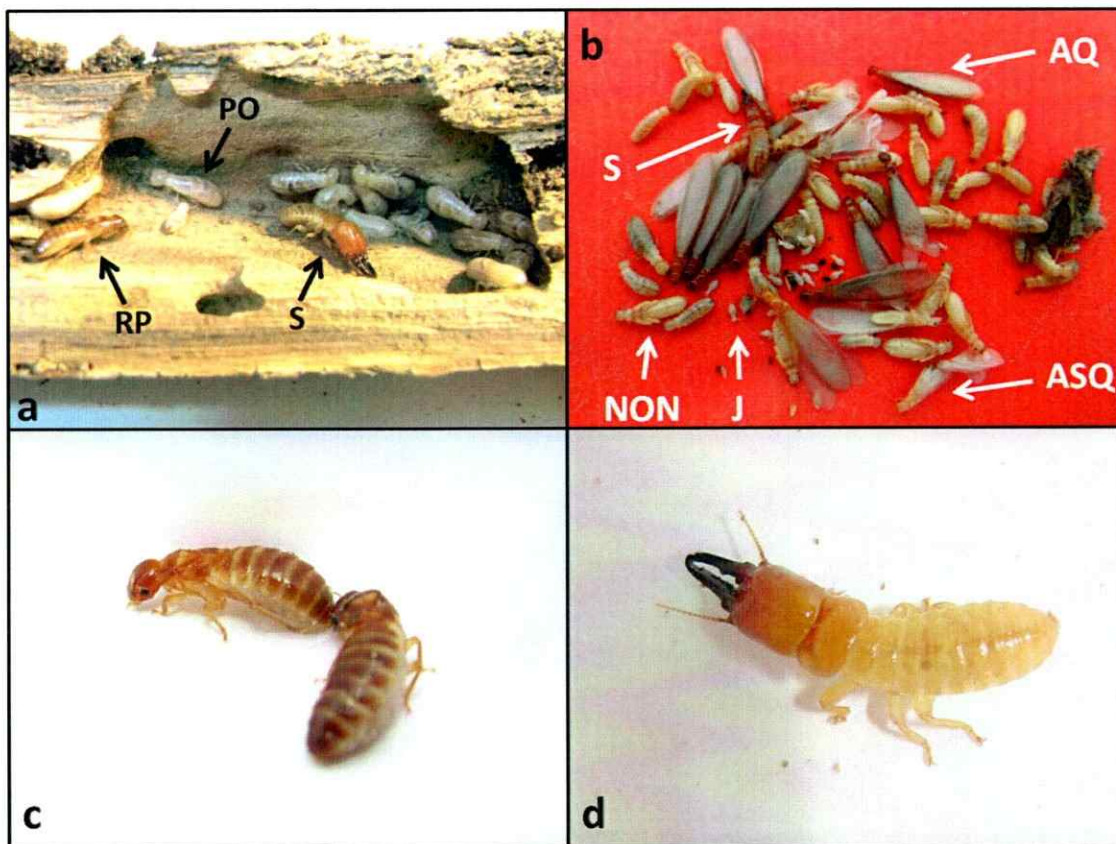
Adicionalmente, pocos trabajos han evaluado los mecanismos de evitación de la endogamia en la pareja fundadora de colonias en termitas (Vargo & Husseneder, 2011; Husseneder *et al.*, 2006; Shellman-Reeve, 2001; Husseneder & Simms, 2008) y ningún estudio ha evaluado el proceso completo de elección de pareja, desde la producción de alados hasta la formación de colonias en una misma especie de termita.



**Figura 2:** Mecanismos de evitación de la endogamia en termitas: a) monoginia; b) emergencia sesgada al sexo; c) dispersión; d) dispersión sesgada a hembras; e) dispersión sesgada a machos y f) reconocimiento de parentesco o de compañeros de nido, donde la magnitud de la flecha indica la preferencia por un individuo de distinto grado de parentesco o de distinto nido.

En Chile, se han descrito cinco especies de termitas, dos de las cuales son cosmopólitas y tres nativas (Rippa & Luppichini, 2004). Las especies introducidas son *Cryptotermes brevis* y *Reticulitermes flavipes*. La primera de ellas pertenece a la familia Kalotermitidae, es denominada la “termita de los muebles” y habita desde la Región de Arica y Parinacota hasta la Región de Valparaíso (Rippa & Luppichini, 2004), mientras que la segunda pertenece a la familia Rhinotermitidae y es la única representante de esta familia en nuestro país, con un rango de distribución entre las Regiones de Valparaíso y del Libertador Bernardo O’Higgins (Rippa & Luppichini, 2004). Las especies nativas son *Kalotermes gracilignathus* (Kalotermitidae), distribuida en el Archipiélago de Juan Fernandez e Isla de Pascua (Rippa & Luppichini, 2004) y *Neotermes chilensis* (Kalotermitidae), descrita entre las Regiones de Atacama y de Valparaíso (Villán, 1972; Artigas, 1994; Rippa & Luppichini, 2004), ambas llamadas termitas de madera seca pues su sustrato de nidificación es la madera con bajo contenido de agua, y *Porotermes quadricollis* (Termopsidae), descrita entre la Región de Valparaíso y la Región de Aysén y llamada termita de madera húmeda por nidificar en madera con un alto contenido de humedad o en estado de descomposición. Tanto *K. gracilignathus* como *N. chilensis* son especies endémicas de Chile.

*Neotermes chilensis* (Fig. 3) construye sus nidos en ramas secas de espino (*Acacia caven*), molle (*Schinus latifolius*), quillay (*Quillaja saponaria*), romerillo (*Baccharis linearis*), ñipa (*Escallonia spp.*), quisco (*Echinopsis chilensis*) y tallos florales secos de chagual (*Puya chilensis*) (Ripa & Luppichini, 2004). Se ha observado también habitando el tallo floral seco de *Puya berteroniana* (Bromeliaceae), especie hasta el presente estudio no descrita como hospedera de esta termita. Además, constituye un importante problema en construcciones de madera (Artigas, 1994; Ripa & Smith, 2000; Ripa & Luppichini, 2004).



**Figura 3:** Individuos de *N. chilensis*. a) Soldado, reproductor primario y pseudo-obreras dentro de una galería en un escape floral seco de *P. berteriana*; b) Individuos en distintos estados de desarrollo; c) De-alados en tándem y d) Soldado. PO = pseudo-obreros, J = juvenil, NON = ninfas ojos negros, ASQ = alados sin quitinizar, AQ = alados quitinizados y S = soldado.

El repertorio conductual reproductivo de *N. chilensis* es similar al de otras termitas (Rippa & Luppichini, 2004; Eggleton, 2011). Esta especie posee características que la hacen un muy buen modelo para estudios de mecanismos evitación de la endogamia: la gran mayoría de los individuos dentro de una colonia son totipotenciales, viven confinadas a su sustrato de nidificación, siendo el período de apareamiento (enjambrazón entre Enero y Abril) el único momento en el cual las termitas que desarrollaron alas abandonan el nido y la emergencia de alados de una colonia puede ser controlada en el laboratorio, y se puede acceder fácilmente a las parejas de reproductores primarios. Casi todos los individuos de la colonia son completamente ciegos (a excepción de los reproductores primarios) y además

anidan en sustratos de fácil manipulación y mantención en el laboratorio, útil para la realización de estudios controlados. En la zona de estudio (cuesta Las Chilcas, 75 km al norte de Santiago), *N. chilensis* anida en escapos (tallo floral) de chagual (*Puya berteroneana*). Allí se encuentran escapos con una colonia única y también escapos con hasta 10 colonias (Aguilera-Olivares *et al.*, manuscrito en preparación).

## II. PROBLEMA DE ESTUDIO

El problema general de estudio está vinculado con la elección de pareja y evitación de la endogamia en *N. chilensis*, y se enfoca en determinar si las colonias son o no fundadas por la unión de dos individuos lejanamente emparentados y, si ocurre la primera de estas alternativas, qué mecanismos indirectos y activos de evitación de endogamia pueden estar ocurriendo y cuál es la importancia relativa entre ellos.

En esta tesis se estudiarán individuos pertenecientes a cuatro estados: i) pseudo-obreros compañeros de nido antes de que la enjambrazón comience, ii) alados en enjambrazón pero antes del aterrizaje, iii) de-alados y iv) parejas de reproductores primarios (PRP), utilizando aproximaciones ecológicas, conductuales, químicas y genéticas, lo que permitirá explorar por primera vez en una misma especie de termita el espectro completo de mecanismos de evitación de la endogamia durante la fundación de la nueva colonia.

### III. HIPÓTESIS

**Hipótesis 1**, sobre el grado de parentesco entre la pareja de individuos fundadores de colonias:

La fundación de las colonias de *N. chilensis* se realiza por la unión de dos individuos de-alados lejanamente emparentados. De esta forma, el grado de parentesco promedio entre la pareja fundadora de colonias es menor que el grado de parentesco promedio entre compañeros (pseudo-obreros y soldados) de un mismo nido.

**Predicción:** Los individuos fundadores de colonias comparten menor proporción de alelos microsatelitales entre sí que lo esperado en la población para dos individuos compañeros de nido (pseudo-obreros y soldados).

**Hipótesis 2**, sobre los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia:

Dado que tanto la emergencia y dispersión de individuos sesgada al sexo como la monoginia y la dispersión de individuos lejos de su sitio natal pueden contribuir a disminuir la probabilidad de encuentro entre individuos pertenecientes a una misma colonia, ninguno, uno o algunos de estos mecanismos indirectos de evitación de la endogamia estarán representados en *N. chilensis*.

**Predicción 1:** Cada colonia se especializará en producir alados de un mismo sexo; esta especialización diferirá entre las colonias de una misma población.

**Predicción 2:** Los alados de un sexo emergerán temporalmente antes que los alados del sexo opuesto desde una misma colonia.

**Predicción 3:** Los alados de un sexo dispersarán distancias mayores que los individuos del sexo opuesto, existiendo así un sexo filopátrico y un sexo dispersante.

**Predicción 4:** Los individuos alados pertenecientes a una colonia dispersarán lejos de su colonia natal, aumentando la probabilidad de encontrarse con alados del sexo opuesto pertenecientes a otras colonias.

**Hipótesis 3**, sobre el mecanismo activo de evitación de la endogamia:

Dado que tanto el reconocimiento de parentesco como el de compañeros de nido permiten a un individuo identificar y discriminar entre conespecíficos con distintos grados de parentesco o distinta procedencia, la presencia de estas capacidades en *N. chilensis* permitirá que los de-alados prefieran como pareja reproductiva a un pariente lejano y eviten a un individuo cercanamente emparentado, o a un no-compañero de nido por sobre un compañero de nido, constituyendo así un mecanismo activo de evitación de la endogamia.

**Predicción 1:** Los de-alados de *N. chilensis* invertirán mayor tiempo en exhibir conductas de apareamiento hacia aquellos individuos que no están cercanamente emparentados que hacia individuos cercanamente emparentados.

**Predicción 2:** Los de-alados de *N. chilensis* mostrarán una mayor frecuencia de conductas de apareamiento hacia aquellos individuos que no están cercanamente emparentados que hacia individuos cercanamente emparentados.



**Hipótesis 4**, sobre el rol de los compuestos cuticulares en el mecanismo activo de evitación de la endogamia:

A semejanza con otros casos de reconocimiento en especies sociales, el reconocimiento de parentesco o de compañeros de nido en *N. chilensis* estará mediado por compuestos químicos cuticulares.

**Predicción 1:** Los perfiles químicos entre parejas de individuos alados provenientes de una misma colonia serán más similares entre sí que entre aquellas parejas provenientes de distintas colonias.

**Predicción 2:** Las preferencias de apareamiento serán eliminadas o invertidas al extraer o intercambiar en interacciones intra e internido, respectivamente, los compuestos cuticulares de los individuos sometidos a elección.

## IV. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Determinar si existe evitación de la endogamia en *N. chilensis* y, en caso de existir, explorar sus posibles mecanismos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la existencia de evitación de la endogamia en *N. chilensis* mediante la comparación entre el grado de parentesco de las parejas fundadoras de colonias y de los compañeros de nido (pseudo-obreros y soldados), por medio del uso de marcadores microsatelitales.

2. Estudiar y evaluar la importancia relativa de los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia en *N. chilensis*.

3. Estudiar y evaluar el reconocimiento de parentesco y de colonia entre de-alados como mecanismo activo de evitación de la endogamia en *N. chilensis*.

4. Describir, estudiar y evaluar el rol de compuestos químicos cuticulares en el mecanismo activo de evitación de la endogamia.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

### Espece y sitio de estudio

El estudio fue llevado a cabo en una población de *N. chilensis* ubicada en la cuesta Las Chilcas (32°52'S; 70°52'W) dentro de escapos secos (tallos florales) de *Puya berteroniana* Mez (Bromeliaceae) (Fig.4). Aproximadamente la mitad de los escapos encontrados en terreno contienen más de una colonia (se han observado hasta doce colonias - escapos multicoloniales), mientras que la otra mitad contiene solo una colonia (escapos unicoloniales); en estos últimos, la colonia se ubica principalmente en la base del tallo floral y a medida que aumenta el número de colonias, las zonas más distales del escapo son utilizadas. Esta planta se encuentra en laderas de cerros de exposición norte, principalmente en afloramientos rocosos, generando una distribución discreta en parches de aproximadamente 300 m de diámetro, separados por distancias que van desde 500 m hasta aproximadamente 3 km. La vegetación presente es del tipo matorral y bosque espinoso, cuyas especies representativas son el espino (*Acacia caven*), el algarrobo (*Prosopis chilensis*), el chagual (*Puya berteroniana*), el palhuén (*Adesmia arborea*) y especies acompañantes como el colliguay (*Colliguaja odorifera*) y el quisco (*Echinopsis chilensis*) (Gajardo, 1994).

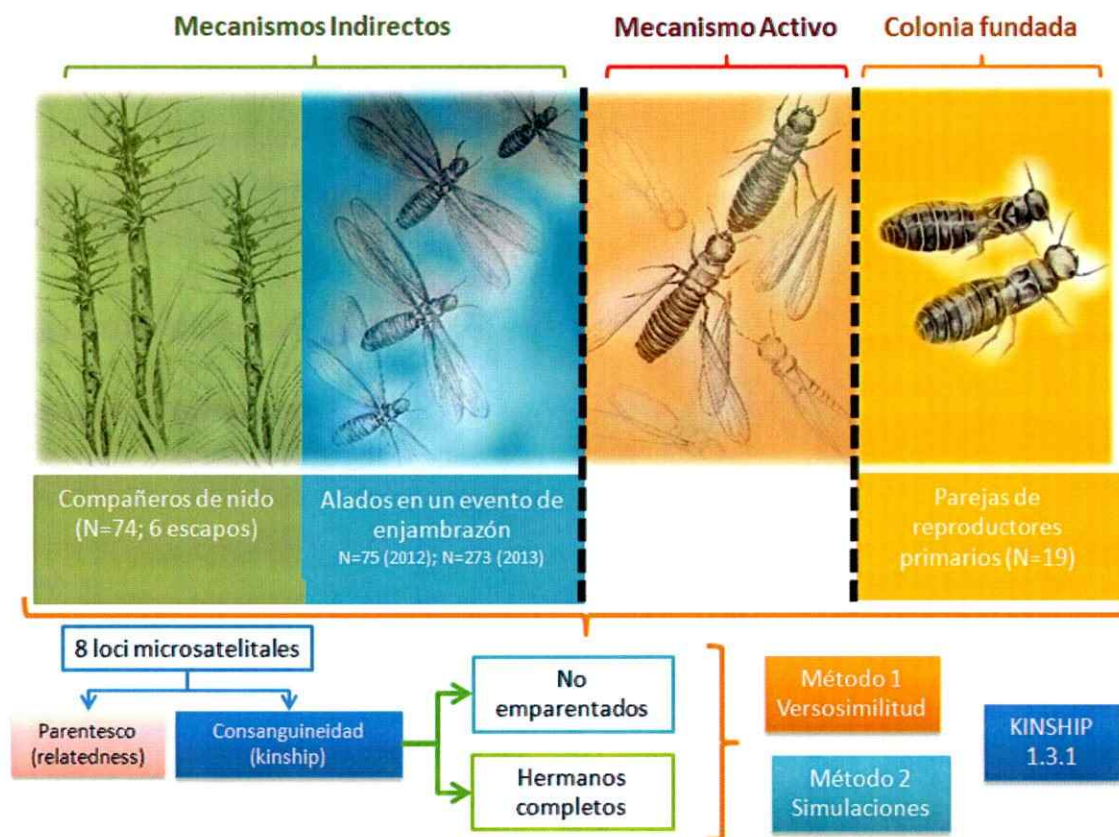


**Figura 4:** *Puya berteroniana* con escapos secos en la cuesta Las Chilcas.

## Evitación de la endogamia

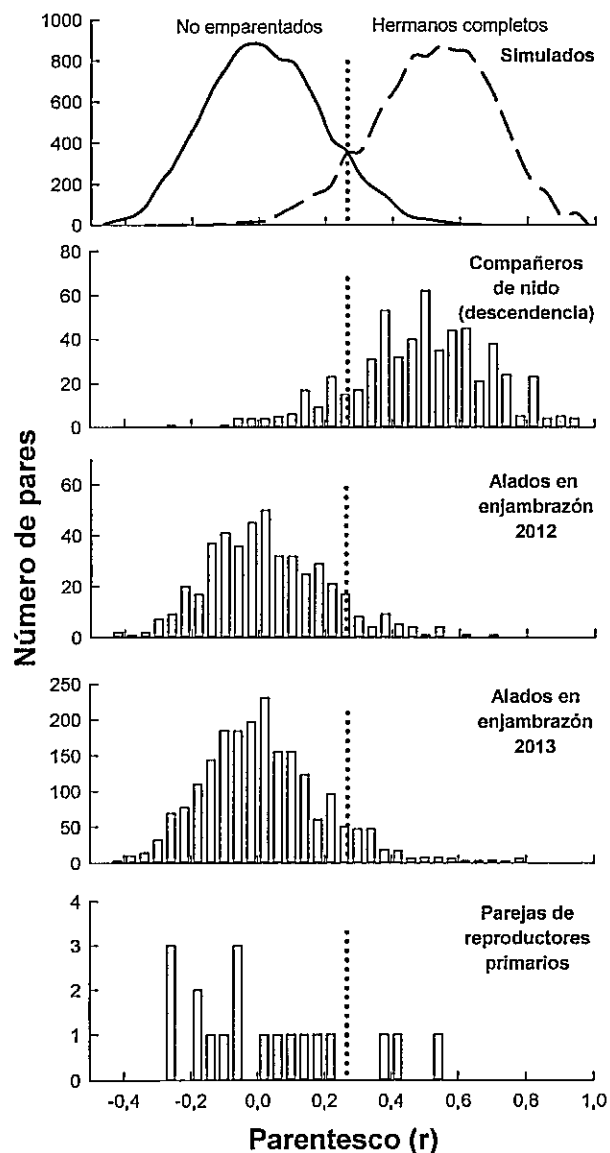
Para documentar la no prevalencia de endogamia en *N. chilensis* y explorar la importancia relativa de los mecanismos indirectos y activo en su evitación, se calculó el parentesco promedio utilizando ocho marcadores microsatelitales en los siguientes tres grupos experimentales (Fig. 5): a) setenta y cuatro compañeros de nido provenientes de 6 colonias; b) alados colectados durante un evento de enjambrazón utilizando trampas de luz durante los eventos de 2012 (N = 75) y 2013 (N = 273) y c) parejas de reproductores primarios (N = 19 parejas). De esta forma, la comparación entre el grupo de compañeros de nido y las

parejas de reproductores primarios mostrará si existe o no evitación de la endogamia. Por otro lado, la comparación entre el grupo de compañeros de nido y alados en enjambrazón evidenciará si los mecanismos indirectos están operando. Finalmente, la comparación entre alados en enjambrazón y parejas de reproductores primarios mostrará si el mecanismo activo de evitación de la endogamia está operando.



**Figura 5:** Grupos experimentales para estudio de prevalencia de endogamia y de los mecanismos involucrados en su evitación en *N. chilensis*. Tres grupos fueron recolectados: compañeros de nido, alados en enjambrazón y parejas de reproductores primarios. Ellos fueron genotipificados con 8 marcadores microsatelitales y se calculó parentesco y consanguineidad entre parejas utilizando el programa KINSHIP 1.3.1 (Goodnight & Queller, 1999). Cada una de estas parejas fueron clasificadas como no-emparentados o como hermanos completos utilizando dos métodos: “Verosimilitud” y “Simulaciones”.

Adicionalmente, pares de individuos en cada uno de estos tres grupos experimentales fueron clasificados dentro de dos categorías: hermanos completos o no-emparentados; solo estas categorías fueron usadas debido a que las parejas de reproductores primarios son monógamas (Thorne, 1997; Vargo & Husseneder, 2011). Para llevar a cabo esta clasificación, se usaron dos aproximaciones independientes. La primera fue un análisis de máxima verosimilitud con la función “likelihood” implementada en el programa KINSHIP 1.3.1 (Goodnight & Queller, 1999). En la segunda aproximación, se realizó una comparación directa entre valores experimentales y valores simulados de parentesco; así, diez mil pares de individuos no-emparentados y diez mil pares de individuos hermanos completos fueron simulados usando el programa KINSHIP, generando de esta forma dos curvas de distribución, siendo el punto de intersección entre ambas curvas ( $r = 0,26$ ) el que marcó el umbral para asignar los pares de individuos experimentales a las dos categorías de consanguinidad (Fig. 6). Finalmente, una prueba exacta de Fisher fue usada para comparar los tres grupos experimentales en relación a las asignaciones a grupos de consanguinidad hechas por las aproximaciones de máxima verosimilitud y simulación.



**Figura 6:** Distribución de 10.000 pares no-emparentados y 10.000 pares de hermanos completos simulados, generados con el software KINSHIP 1.3.1 (curva superior) y los tres grupos experimentales (barras): 1) compañeros de nido ( $N = 572$ ), 2) alados en enjambrazón durante la temporada de 2012 ( $N = 460$ ) y durante la temporada 2013 ( $N = 2074$ ), y 3) parejas de reproductores primarios ( $N = 19$ ). Las frecuencias fueron determinadas usando un intervalo de parentesco de 0,04 unidades. Por simplicidad visual, se trazaron líneas que unen los valores de frecuencia para los pares simulados. La intersección entre las curvas ( $r = 0,26$ ) es denotada por una línea vertical punteada en las cinco distribuciones.

### Recolección de alados durante un evento de enjambrazón

Los alados en un evento de enjambrazón fueron recolectados utilizando dos trampas de luz en el año 2012 y siete trampas de luz en el año 2013; la distancia entre las trampas de 2012 fue de 1,45 km y desde 75 metros hasta 2,35 km en las de 2013 (Fig. 7). Las trampas fueron instaladas en lugares cercanos a parches de *P. berteroniana*, durante el período de enjambrazón de *N. chilensis*, que en el sector Cuesta Las Chilcas ocurre entre fines de febrero y fines de marzo. Debido a que no se sabía con certeza los días en los cuales *N. chilensis* enjambraría, se realizó una colecta continua durante treinta días entre las 21:00 y las 23:00 horas hasta observar un evento de enjambrazón (seis noches durante 2012 y ocho noches durante 2013).



**Figura 7:** Distribución de trampas de luz en la cuesta Las Chilcas. Las marcas verdes con letras indican la posición de las dos trampas de 2012, mientras que las marcas rojas con números indican la posición de las siete trampas en 2013.

La trampa utilizada para coleccionar alados en un evento de enjambrazón se muestra en la Fig. 8. Esta trampa tiene la capacidad de coleccionar automáticamente insectos voladores nocturnos



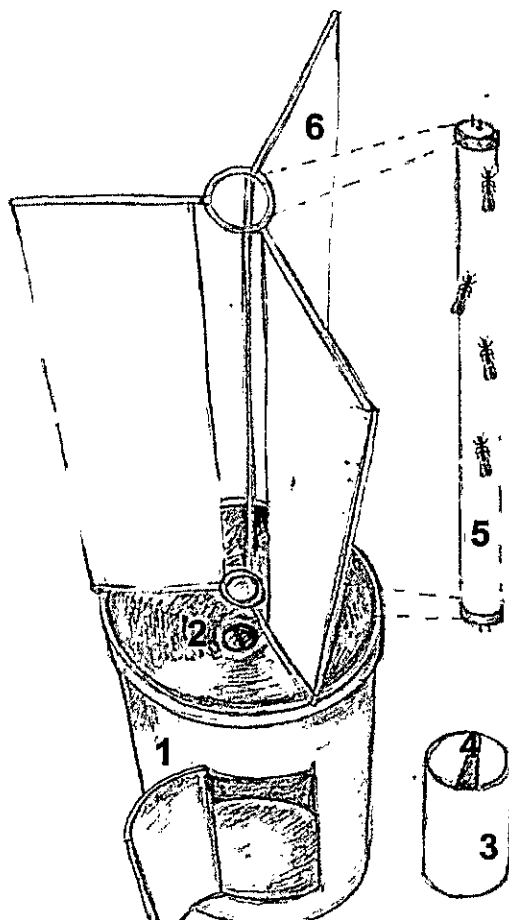
durante dos noches consecutivas debido al control de dos temporizadores digitales y a la utilización de una batería de 12V. La trampa consistió en un tubo fluorescente UV con tres aletas blancas dispuestas radialmente y separadas entre sí por un ángulo de 120°, las cuales potenciaban tanto el efecto de la luz UV como la colecta de insectos al dirigirlos hacia la base de la trampa. En esta base se encontraba un embudo que encausaba a los insectos hacia un recipiente que contenía 100 mL de una solución de agua con jabón. Este recipiente estaba internamente dividido en dos mitades, cada una de ellas destinada a la recolección independiente de insectos alados en cada uno de dos días consecutivos.

Los dos temporizadores que controlaban la trampa fueron configurados de la siguiente forma: el primer temporizador controlaba el encendido y apagado de la luz UV el cual fue configurado para iluminar entre las 21:00 y las 23:00 horas de cada jornada; mientras que el segundo temporizador fue configurado para activar a la 01:00 de la madrugada de la primera noche, un mecanismo que permitió que los insectos que se recolectarán durante la jornada siguiente queden en la segunda mitad del recipiente de recolección. En la mañana después de la segunda jornada de recolección, los individuos fueron extraídos de la solución de jabón e inmersos en alcohol 70% v/v para su posterior análisis genético, y la trampa fue reconfigurada para iniciar un nuevo ciclo de colecta de otras dos noches consecutivas.

### **Recolección de colonias**

Para determinar cuál (o cuáles) de los cinco mecanismos indirectos de evitación de la endogamia es (son) el (los) más importante(s), se recolectaron escapos de *P. berteroniana* que contenían en su interior colonias de *N. chilensis*. Debido a que las colonias se ubican

preferentemente en la base de los escapos secos, estos fueron extraídos con la ayuda de una motosierra que permitió alcanzar la base del escapo con un corte parejo y sin romper las galerías. Los escapos extraídos fueron georreferenciados y envueltos en tul blanco, evitando de esta forma tanto la pérdida de individuos durante el traslado al laboratorio como la pérdida de alados durante el desarrollo de los experimentos.



**Figura 8:** Trampa de luz. 1.- Recipiente principal. 2.- Embudo de colecta, en cuyo centro está el mecanismo que permite coleccionar durante dos noches consecutivas. 3.- Recipiente colector con 100mL de una solución de agua y jabón (se posiciona dentro del recipiente principal). 4.- Separación que divide el recipiente colector en dos mitades y permite el muestreo independiente durante dos noches consecutivas. 5.- Tubo fluorescente de luz UV. 6.- Estructura metálica blanca que sirve de soporte para el tubo fluorescente; posee tres aletas metálicas blancas cuyas funciones son potenciar la luminosidad y hacer que las termitas choquen y caigan al embudo de recolección.

## **Mecanismos indirectos de evitación de la endogamia**

### **Producción y emergencia de alados sesgada al sexo**

Cincuenta escapos secos de *P. berteroniana* fueron recolectados durante el mes de Diciembre de 2013, antes de que comenzara el período de enjambrazón, en bolsa de tul y llevados al laboratorio en Santiago. Los escapos fueron dispuestos en forma vertical sobre un techo dentro de la Facultad de Ciencias bajo las condiciones climáticas imperantes. Cada noche a las 23:00 hrs., los escapos fueron revisados y los alados atrapados en la bolsa de tul fueron recolectados; el nido de procedencia, el día de la recolección y el sexo de cada alado fue registrado. El experimento se consideró iniciado con la emergencia del primer alado, y se consideró finalizado cuando no se encontraron más alados en las bolsas de tul durante tres semanas. Sólo 14 escapos contuvieron colonias que dieron lugar a enjambrazón; todos ellos fueron disecados y sólo aquellos que resultaron ser unicloniales y que no tenían alados en su interior ( $N = 7$ ), fueron considerados para el análisis final.

La producción sesgada al sexo al nivel de colonia fue evaluada comparando el número de machos y hembras a través de una prueba binomial (<http://vassarstats.net/>). La emergencia sesgada al sexo fue evaluada comparando el día promedio de emergencia de cada sexo por colonia con una prueba U de Mann-Whitney.

### **Dispersión y dispersión sesgada al sexo durante un evento de enjambrazón**

Los alados capturados en las trampas durante el período de enjambrazón de 2013 fueron utilizados para ambos análisis. Estos individuos fueron sexados y genotipificados con 8

marcadores microsatelitales; el día de la recolección y la identidad de las trampas en la cual fueron capturados fueron registrados, y la distancia entre las trampas fue determinada.

Para evaluar dispersión como un mecanismo indirecto de evitación de la endogamia, se realizó un análisis de aislamiento por distancia donde se correlacionó la matriz de distancia genética ( $F_{ST}$ ) entre las trampas con la matriz de distancia geográfica entre ellas. Si los alados pertenecientes a una misma colonia (hermanos completos) dispersan una distancia suficiente como para alcanzar distintas trampas durante el período de enjambrazón, entonces existirá una homogenización genética entre las trampas y no existirá una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica entre ellas; mientras que si los alados pertenecientes a una misma colonia dispersan distancias insuficientes como para alcanzar distintas trampas, cada trampa se diferenciará genéticamente de la otra y por lo tanto una correlación significativa existirá entre la distancia genética y la distancia geográfica entre ellas.

Para evaluar la dispersión sesgada al sexo, se determinaron cuatro parámetros para machos y hembras independientemente en cada trampa: **(1) Diferenciación genética ( $F_{ST}$ )**, donde se espera que la frecuencia alélica para individuos del sexo dispersante será más similar entre las distintas trampas que para el sexo filopátrico, lo cual se verá reflejado en un mayor valor de  $F_{ST}$  para el sexo filopátrico en comparación con el sexo dispersante (Goudet *et al.*, 2002); **(2) Índice de endogamia ( $F_{IS}$ )**, donde el sexo dispersante recolectado desde las trampas será una mezcla de individuos provenientes de distintas colonias y, debido al efecto Wahlund, la muestra mostrará un déficit de heterocigotos, es decir, un valor positivo de  $F_{IS}$  y significativamente mayor que el sexo filopátrico (Goudet *et al.*, 2002); **(3) Grado de parentesco promedio ( $r$ )**, donde individuos cercanamente emparentados estarán menos representados en una trampa si son del sexo dispersante, lo

que se verá reflejado en un grado de parentesco significativamente menor que el sexo filopátrico (Goudet *et al.*, 2002); y (4) *Índice de asignamiento* (AI), que se refiere a la probabilidad que el genotipo de un alado  $k$  muestreado en la trampa  $t$  se encuentre por azar en esa trampa dadas las frecuencias alélicas de esa trampa (calculadas incluyendo al individuo focal); este valor es corregido ( $AI_C$ ) al restar la diversidad genética encontrada en cada trampa para así hacer comparables las probabilidades entre trampas, independientemente del tamaño de muestra; así  $AI_C$  será negativo cuando un sexo sea dispersante y será positivo cuando un sexo sea filopátrico (Favre *et al.*, 1997). Los resultados de  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$ ,  $r$  y  $AI_C$  fueron comparados entre machos y hembras a través de una prueba de permutaciones implementada en el programa R (R Development Core Team 2013).

#### **Evaluación de la eficiencia de los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia**

Se utilizaron los alados recolectados y genotificados en las trampas de 2013. Los alados fueron asignados a grupos familiares con la utilización del programa COLONY 2.0.4.0 (Jones and Wang 2010). Posteriormente se calculó el número de todas las posibles parejas endogámicas y exogámicas por día y por trampa, para finalmente calcular la razón total de parejas endogámicas y exogámicas.

## **Evaluación del mecanismo activo de evitación de la endogamia**

Se realizó un bioensayo conductual de selección de pareja, en el que se enfrentó a un individuo focal con dos individuos del sexo opuesto, uno de los cuales provenía de su misma colonia y el otro de otra colonia. El bioensayo fue llevado a cabo en una placa de Petri cuyo fondo se encontraba cubierto con papel filtro para facilitar el movimiento de las termitas. Dado que tanto el macho como la hembra pueden elegir pareja, el individuo focal fue de ambos sexos ( $N = 15$  para cada sexo). Cada bioensayo fue registrado con una Videocámara Sony ® y las conductas fueron posteriormente analizadas con el programa JWatcher v.1.0 (Blumstein *et al.*, 2006).

Una vez finalizados los bioensayos, los compuestos químicos cuticulares fueron extraídos, separados e identificados con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) con el fin de evaluar la similitud química entre los individuos interactuantes. Posteriormente, los individuos fueron almacenados en alcohol al 70% v/v para luego extraer su ADN y calcular el grado de parentesco entre ellos.

### **Extracción y análisis de compuestos cuticulares**

Los diecinueve individuos usados en los bioensayos anteriores fueron sumergidos individualmente en frascos de vidrio que contenían 250  $\mu$ L de *n*-pentano durante 10 min. Cada individuo fue posteriormente almacenado en etanol al 70% v/v para análisis genético.

Cinco microlitros de cada extracto fueron combinados en un frasco de vidrio para producir un extracto maestro. El objetivo de este extracto maestro fue aumentar las

posibilidades de identificar compuestos cuticulares presentes en baja concentración en extractos individuales al obtener un cromatograma que contiene todos los posibles compuestos cuticulares en la población estudiada.

Cuatro microlitros de cada extracto individual y del extracto maestro fueron inyectados en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS por sus siglas en inglés) Shimadzu modelo QP 2010 Ultra gas (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado con una columna capilar Rtx-5MS Crossbond 5% difenilo - 95% dimetil polisiloxano (Restek, Bellefonte, PA, USA: 30m longitud, 0.25 mm I.D., 0.25  $\mu$ m de espesor de película). El GC fue operado en el modo de inyección "splitless". La temperatura de la columna fue mantenida a 146°C por 5 min, aumentada a una tasa de 3°C/min hasta 280°C, y mantenida a esta temperatura por 5 min. El gas transportador fue helio a un flujo de 0.78 mL/min. El espectrómetro de masa fue usado en el modo de ionización por impacto de electrones (70 eV) con una corriente de emisión de 250 mA. Las temperaturas del puerto de inyección, fuente de iones y la línea de interfase fueron 250°C, 205°C y 280°C, respectivamente. El instrumento fue operado en el modo "scan".

Treinta y tres picos fueron detectados en el cromatograma maestro (Tabla 4), treinta de los cuales fueron identificados por análisis de sus espectros de masa y al comparar su índice de retención con los de compuestos estándares – cuando se encontraron disponibles -- o con datos de la literatura. La presencia o ausencia de un compuesto dado en el perfil cromatográfico de cada extracto individual fue determinado comparando el espectro de masas y los índices de retención con aquellos del cromatograma maestro.

Los perfiles cromatográficos individuales fueron comparados entre parejas de hermanos (compañeros de nido) y parejas de individuos no emparentados (no-compañeros de nido) de cada réplica, usando el índice de similitud simple (Krebs, 1989), calculado

como el número de coincidencias positivas y negativas (en términos de la presencia o ausencia de un compuesto dado) entre parejas dividido por 33, el número total de compuestos identificados. Así, el índice de similitud simple para cada compuesto varió entre 0 y 1. Los índices de similitud simple para parejas intra e intercolonia fueron comparadas utilizando una prueba de t-Student de dos colas.

### **Apareamiento en colonias artificiales**

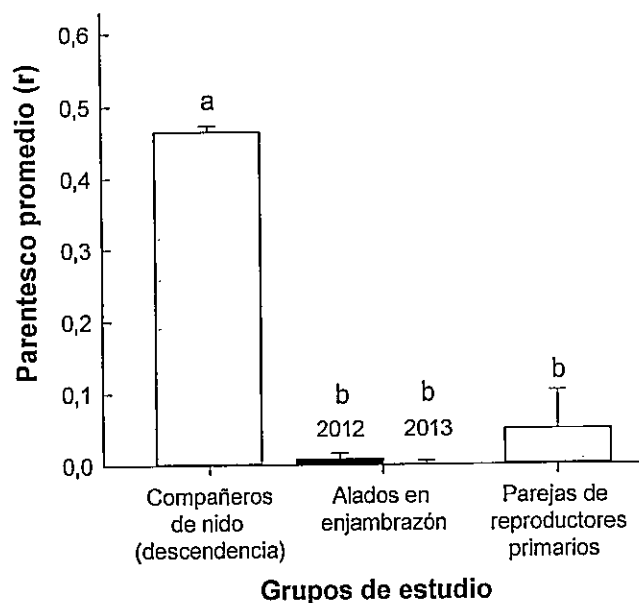
Con el fin de evadir los mecanismos indirectos y activo de evitación de la endogamia, se diseñó una arena compuesta de una placa Petri que contenía aserrín de *P. berteroniana* (80%) y celulosa (20%) mantenidas en oscuridad. En ella se colocó un par de de-alados vírgenes que provenían de la misma (par endogámico, N = 15) o de distintas colonias (par exogámico, N = 15). El número de parejas formadas, determinado como los pares que colocaron huevos, así como el número de huevos colocados por cada una fue registrado. Los promedios de huevos colocados por las parejas endogámicas y exogámicas fueron comparados con una prueba de t-Student de dos colas.



## VI. RESULTADOS

### Evitación de la endogamia

El parentesco promedio entre parejas de compañeros de nido (descendencia), parejas de machos y hembras aladas en las temporadas de enjambrazón 2012 y 2013, y parejas de reproductores primarios son mostrados en la Figura 9. El parentesco promedio de parejas de compañeros de nido ( $0,465 \pm 0,0085$ ; media  $\pm$  EE) es muy cercano al esperado para organismos diploides hermanos completos ( $r = 0,5$ ). El parentesco promedio de parejas de compañeros de nido (excluyendo a parejas de reproductores primarios) fue significativamente mayor que el de parejas de reproductores primarios ( $p < 0,001$ ) y de parejas entre alados de distinto sexo en un evento de enjambrazón ( $p < 0,001$  para ambos años). El parentesco promedio entre alados de distinto sexo no difirieron entre las temporadas de enjambrazón 2012 y 2013 ( $p < 0,834$ ). Además, el parentesco promedio entre machos y hembras alados durante las temporadas de enjambrazón 2012 y 2013 no fueron estadísticamente diferentes de las parejas de reproductores primarios ( $p = 0,196$  y  $p = 0,289$ , respectivamente). Estos mismos resultados fueron obtenidos al comparar la distribución de categorías de parentesco entre los diferentes grupos experimentales (Tabla 1).



**Figura 9:** Parentesco promedio entre parejas de compañeros de nido, entre machos y hembras alados en un mismo día durante un evento de enjambrazón (temporadas 2012 y 2013), y entre parejas de reproductores primarios. Se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $H_3 = 1109,3$ ;  $p < 0,001$ ). Diferentes letras indican diferencias significativas en análisis *a posteriori* ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 1:** Asignación a las categorías de hermanos completos y no-emparentados de todas las posibles parejas de compañeros de nido, parejas de alados de distinto sexo colectados en un mismo día durante un evento de enjambrazón (temporadas 2012 y 2013), y parejas de reproductores primarios. La asignación se basó en dos aproximaciones: análisis de máxima verosimilitud y comparación directa entre valores de parentesco experimentales y simulados. Las proporciones significativamente diferentes en filas son mostradas con diferentes letras (prueba exacta de Fisher,  $p < 0,05$ ).

Aproximación	Cosanguinidad de parejas formadas	Grupos experimentales			
		Compañeros de nido	Alados en enjambrazón		Parejas de reproductores primarios
			2012	2013	
Máxima verosimilitud	Hermanos completos / No-emparentados	489/ 83 a	34 / 426 b	189/ 2518 b	3 / 16 b
Simulación	Hermanos completos / No-emparentados	483/ 89 a	37 / 423 b	210 / 2497b	3 / 16 b

## Mecanismos indirectos de evitación de la endogamia

### Producción y emergencia de alados sesgada al sexo

La duración del período de emergencia de los alados en escapos traídos desde el campo fue de  $33,9 \pm 3,2$  días (media  $\pm$  EE; rango: 22 a 48 días);  $82,7 \pm 9,4$  alados de ambos sexos emergieron desde cada escapo (media  $\pm$  EE; rango: 41 a 105 alados). La proporción de sexos entre machos y hembras no se desvió significativamente de la razón de sexos 1:1 y solo un escapo mostró protandria significativa (Tabla 2).

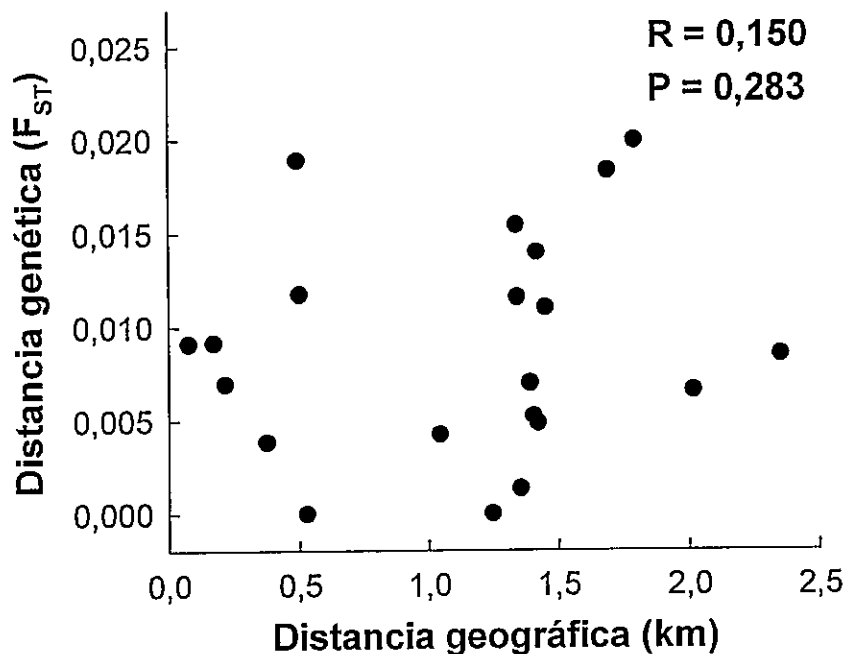
**Tabla 2:** Resumen de los análisis para la producción de alados sesgada al sexo (es decir, desviación de la razón de sexos 1:1) y emergencia de alados sesgada al sexo (es decir, diferencias en el día promedio de emergencia de machos y hembras) en 7 escapos colectados en el campo y mantenidos sobre un techo en Santiago. La desviación de la razón de sexos 1:1 fue determinada con una prueba binomial y el tiempo de emergencia de machos y hembras fue comparado con una prueba U de Mann-Whitney (excepto para escapo 3, el cual fue analizado con una prueba t-Student de dos colas).

Escapo	Producción de alados sesgada al sexo		Emergencia de alados sesgada al sexo		
	Razón m/h (N)	Desviación de 1:1	Machos (media $\pm$ EE)	Hembras (media $\pm$ EE)	P
1	1,10 (105)	n.s.	$5,5 \pm 0,44$	$5,4 \pm 0,66$	0,207
2	0,76 (104)	n.s.	$17,9 \pm 0,88$	$16,85 \pm 0,76$	0,352
3	1,34 (61)	n.s.	$15,2 \pm 1,36$	$16,3 \pm 1,68$	0,607
4	1,14 (77)	n.s.	$10,6 \pm 1,44$	$10,8 \pm 1,97$	0,756
5	1,39 (86)	n.s.	$18,1 \pm 1,46$	$17,4 \pm 1,72$	0,498
6	0,95 (41)	n.s.	$5,7 \pm 1,16$	$13,8 \pm 2,83$	0,027
7	0,81 (105)	n.s.	$11,8 \pm 1,25$	$13,5 \pm 1,12$	0,408

### Dispersión y dispersión sesgada al sexo durante un evento de enjambrazón

En el análisis de dispersión, se encontraron hermanos completos en trampas tan distantes como 2,35 km, una distancia comparable a la recorrida por alados de otras especies de termitas (Vargo & Husseneder, 2011). Diferencias en la distancia genética entre pares de trampas no estuvieron significativamente correlacionadas con su distancia geográfica (prueba de Mantel:  $R = 0,150$ ;  $p = 0,283$ ; Fig.10).

Por otro lado, ninguno de los cuatro parámetros utilizados para evaluar la dispersión sesgada al sexo (diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), índice de endogamia ( $F_{IS}$ ), grado de parentesco ( $r$ ) e índice de asignación corregido (AIC)) mostraron diferencias significativas entre sexos (Tabla 3).



**Figura 10:** Análisis de aislamiento por distancia entre alados de siete trampas durante el evento de enjambrazón de 2013 para machos y hembras en conjunto. No se encontró aislamiento por distancia. Los valores de P y R fueron obtenidos a través de una prueba de Mantel.

**Tabla 3:** Evaluación de la incidencia de dispersión sesgada al sexo a través de cuatro parámetros: diferenciación genética promedio ( $F_{ST}$ ) entre trampas, índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) y grado de parentesco ( $r$ ) dentro de trampas, e índice de asignación corregido ( $A_{IC}$ ) entre trampas son mostrados como los valores esperados para los sexos filopátricos y dispersantes (columnas 2 y 3), y los valores observados para hembras y machos (columnas 4 y 5). Los valores de  $p$  fueron obtenidos usando una prueba de permutaciones (5000 permutaciones) codificadas en el programa R.

	Sexo filopátrico	Sexo dispersante	Hembras (media $\pm$ EE)	Machos (media $\pm$ EE)	P
$F_{ST}$	mayor	menor	0,009 $\pm$ 0,001	0,011 $\pm$ 0,003	0,543
$r$	mayor	menor	0,010 $\pm$ 0,016	-0,002 $\pm$ 0,012	0,545
$F_{IS}$	menor	mayor	0,033 $\pm$ 0,025	0,045 $\pm$ 0,022	0,724
$A_{IC}$	positivo	negativo	0,129 $\pm$ 0,147	-0,094 $\pm$ 0,126	0,236

### Evaluación de la eficiencia de los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia

La razón endogamia/exogamia total esperada fue de 0,057, es decir, de cada cien posibles encuentros entre parejas de de-alados, solo cinco de ellos se espera que sean encuentros endogámicos. Además, utilizando las frecuencias alélicas de los 8 marcadores microsatelitales, se infirió con el programa COLONY que los alados recolectados durante la enjambrazón de 2013 (270 individuos) provienen de 105 colonias.

## Mecanismo activo de evitación de la endogamia

### Evaluación de reconocimiento de parentesco como mecanismo de evitación de la endogamia

Los análisis de los bioensayos no mostraron diferencias significativas en la conducta de un de-alado hacia un compañero o no compañero de nido en todas las variables conductuales evaluadas, ya sea cuando el de-alado focal fue un macho o una hembra (Tabla 4). Además, el parentesco genético de parejas que se aparearon no fue significativamente distinto de las parejas que no se aparearon (media  $\pm$  EE: pares apareados =  $0,203 \pm 0,052$ , pares no apareados =  $0,302 \pm 0,49$ ;  $t_{58} = 1,401$ ;  $p = 0,167$ )

### Rol de los compuestos cuticulares en el mecanismo activo de evitación de la endogamia

En cuanto a la caracterización de los perfiles cromatográficos de *N. chilensis*, la Tabla 6 muestra que los compuestos cuticulares extraídos a de-alados consistieron principalmente de alcanos metil-ramificados (57,6%), seguidos en menor proporción por *n*-alcanos (27,3%) y alquenos (6,06%). La comparación de los perfiles cuticulares usando el índice de similitud simple no mostró diferencias significativas ( $t_{54} = -0.309$ ;  $P = 0.379$ ) entre parejas de compañeros de nido ( $0,750 \pm 0,025$ ; media  $\pm$  EE) y entre parejas no compañeros de nido ( $0,762 \pm 0,029$ ; media  $\pm$  EE) usados en los bioensayos.

**Tabla 4:** Bioensayo conductual involucrando a un de-alado focal (macho o hembra) confrontado simultáneamente con un de-alado compañero de nido y no-compañero de nido. Tiempos en min, frecuencias en min<sup>-1</sup>. Los valores de p son dados para la comparación entre conductas involucrando el compañero y no-compañeros de nido.

De-alado focal	Parámetro conductual	Compañero	No-compañero	Parámetros estadísticos	P
Macho	Tiempo a la primera palpación proctodeal	11,0 ± 3,46	17,9 ± 1	t=1,18	0,291
Macho	Frecuencia de palpaciones proctodeales	2,57 ± 0,95	1,67 ± 0,67	U=8,5	0,667
Macho	Tiempo invertido en palpación proctodeal	0,30 ± 0,13	0,066 ± 0,052	U=4	0,183
Macho	Tiempo al primer acicalamiento	5,93 ± 2,41	3,32 ± 2,10	t=-0,83	0,425
Macho	Frecuencia de acicalamiento	3 ± 0,93	4 ± 1,11	U=21	0,463
Macho	Tiempo invertido en acicalamiento	1,12 ± 0,59	1,04 ± 0,50	U=24	0,694
Hembra	Tiempo a la primera palpación proctodeal	7,96 ± 4,23	7,44 ± 3,84	t=-0,091	0,931
Hembra	Frecuencia de palpaciones proctodeales	1 ± 0	1,5 ± 0,29	U=2	0,533
Hembra	Tiempo invertido en palpaciones proctodeales	0,14 ± 0,12	0,24 ± 0,092	t=0,64	0,560
Hembra	Tiempo al primer acicalamiento	4,14 ± 1,36	3,39 ± 1,47	U=20	0,662
Hembra	Frecuencia de acicalamiento	4,8 ± 1,50	3,86 ± 1,60	U=12,5	0,432
Hembra	Tiempo invertido acicalando	1,96 ± 0,9	1,26 ± 0,34	t=0,63	0,543

#### Apareamiento en colonias artificiales

Parejas de machos y hembras, compañeros y no compañeros de nido de *N. chilensis* fueron introducidos en una arena artificial simulando su hospedero. Todos ellos se aparearon y colocaron huevos. Tres meses después que el experimento fue montado, no se encontraron diferencias significativas en el número de huevos colocados entre parejas de compañeros

( $4,5 \pm 0,96$ ; media  $\pm$  EE) y no compañeros de nido ( $4,6 \pm 0,81$ ; media  $\pm$  EE) ( $t_9 = - 0,078$ ;  $P = 0,94$ ).

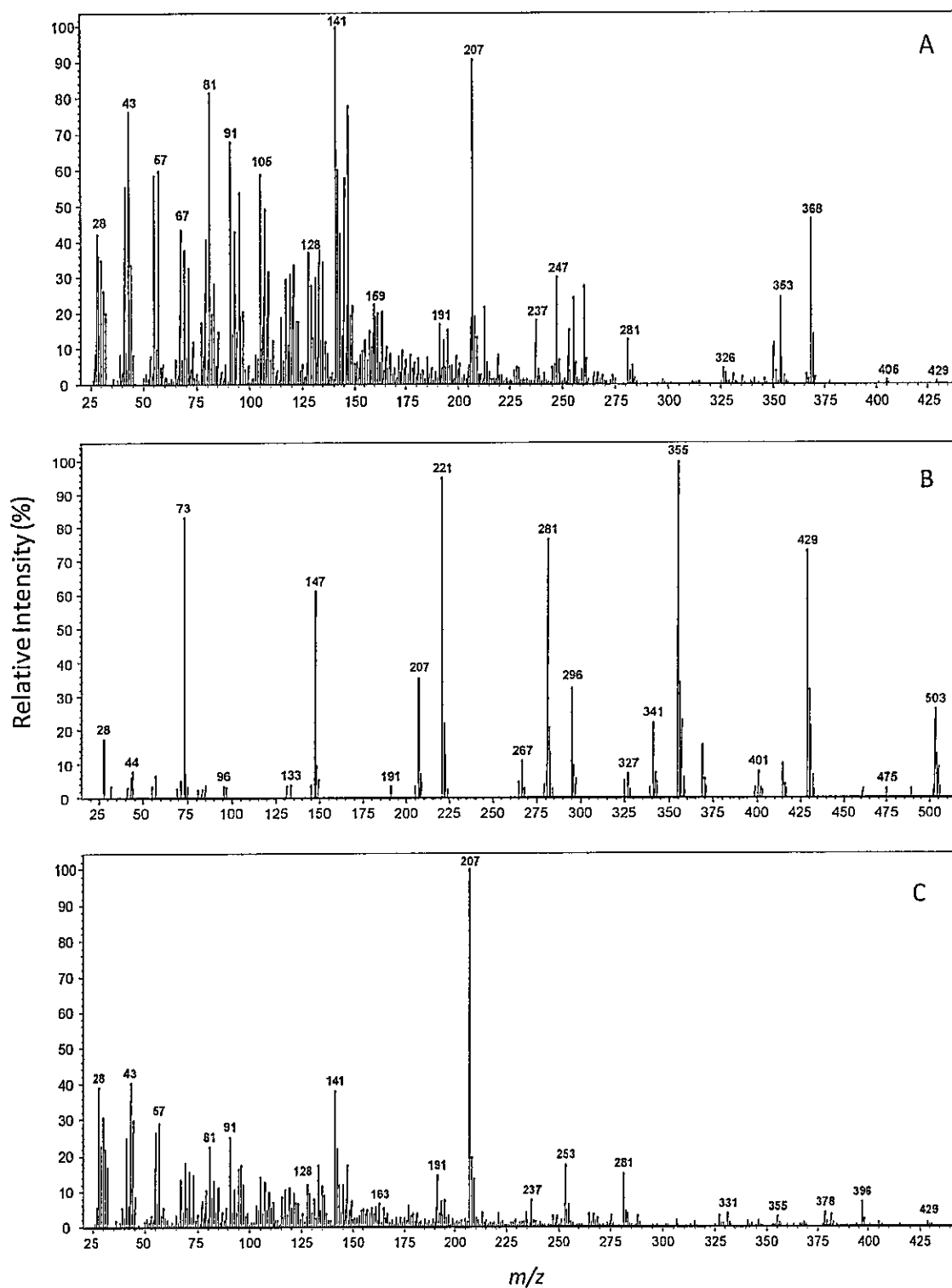
**Tabla 5:** Compuestos cuticulares presentes en individuos de-alados de *N. chilensis*.

Nº pico	IR	Compuesto cuticular	Método de identificación <sup>a</sup>
1	2104	Heneicosano	EM, IR, CE
2	2365	2-Metiltricosano	EM, IR
3	2375	3-Metiltricosano	EM, IR
4	2401	Tetracosano	EM, IR, CE
5	2440	11-Metiltetracosano	EM, IR
6	2462	2-Metiltetereacosano	EM, IR
7	2499	Pentacosano	EM, IR, CE
8	2534	11-Metilpentacosano	EM, IR
9	2558	4-Metilpentacosano	EM, IR
10	2562	2-Metilpentacosano	EM, IR
11	2573	3-Metilpentacosano	EM, IR
12	2599	Hexacosano	EM, IR, CE
13	2633	11-Metilhexacosano	EM, IR
14	2699	Heptacosano	EM, IR, CE
15	2731	11-Metilheptacosano	EM, IR
16	2774	3-Metilheptacosano	EM, IR
17	2799	Octacosano	EM, IR, CE
18	2825	13-Metiloctacosano	EM, IR
19	2833	11-Metiloctacosano	EM, IR
20	2887	(Z)-7-Nonacoseno	EM, IR
21	2900	Nonacosano	EM, IR, CE
22	2908	No identificado <sup>b</sup>	
23	2933	11-Metilnonacosano	EM, IR
24	2953	5-Metilnonacosano	EM, IR
25	2973	3-Metilnonacosano	EM, IR
26	3018	No identificado <sup>b</sup>	
27	3076	3-Metiltriacontano	EM, IR
28	3088	(Z)-7-Hentriaconteno	EM, IR
29	3099	Hentriacontano	EM, IR, CE
30	3108	No identificado <sup>b</sup>	
31	3135	11-Metilhentriacontano	EM, IR
32	3169	3-Metilhentriacontano	EM, IR
33	3199	Dotriacontano	EM, IR, CE

<sup>a</sup> **EM:** espectro de masas; **IR:** índice de retención en relación a los *n*-alcanos; **CE:** compuesto estándar.

<sup>b</sup> Los espectros de masas de los compuestos no identificados se entregan en la figura 11.





**Fig. 11.** Espectros de masas para compuestos cuticulares no identificados en de-alados de *N. chilensis* mostrados en tabla 5. Los índices de retención son: A= 2908; B = 3018 y C = 3108.

## VII. DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se evaluó la evitación de la endogamia y los mecanismos involucrados en esta evitación en la termita chilena de madera seca *Neotermes chilensis*. En los análisis de evitación de la endogamia, el nivel de parentesco en parejas de reproductores primarios fue significativamente más bajo que el de individuos compañeros de nido, lo que muestra que los mecanismos de evitación de la endogamia están operando en *N. chilensis*, concordante con los resultados en la mayoría de las especies de termitas estudiadas (Vargo & Husseneder 2011). Por otro lado, se encontró que el parentesco de compañeros de nido fue significativamente mayor que el de alados en ambas temporadas de enjambrazón, lo que muestra que los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia están operando; además, no se encontraron diferencias significativas en el grado de parentesco promedio entre ambos eventos de enjambrazón y las parejas de reproductores primarios, lo que muestra que el mecanismo activo de evitación de la endogamia no estaría operando. La diferencia no significativa encontrada entre ambos eventos de enjambrazón sugiere que el parentesco promedio en una enjambrazón es un fenómeno que ocurre independiente del año, número de trampas utilizadas y el número de alados capturados en ellas.

Dadas estas conclusiones preliminares, se indagó con mayor profundidad cada uno de los cinco mecanismos de evitación de endogamia descritos, así como su importancia relativa. En el estudio de emergencia diferencial de alados se observó emergencia sesgada a los machos (protandría) en sólo una de las siete colonias analizadas. Estos resultados no concuerdan con los encontrados por Matsuura (2006) para la termita *Reticulitermes speratus* que presentó protandría; sin embargo, ésta está relacionada con el dimorfismo sexual y no como un posible mecanismo de

evitación de la endogamia. Adicionalmente, el análisis de aislamiento por distancia para ambos sexos en conjunto mostró que los alados fueron capaces de dispersar distancias equivalentes a la distancia máxima entre trampas (aproximadamente 2,3 km), distancias similares a las que vuelan otras especies de termitas (Vargo & Husseneder, 2011). Los análisis de diferenciación genética, grado de parentesco, índices de endogamia y de asignación corregido para cada sexo por separado muestra que la dispersión sesgada al sexo de alados no fue significativa o al menos no lo suficiente como para ser detectada por estos análisis (Favre *et al.*, 1997). Al evaluar el mecanismo activo de evitación de la endogamia, los análisis químicos y conductuales de los bioensayos mostraron que el reconocimiento de compañero de nido no es un mecanismo activo de evitación de la endogamia debido a que no se encontraron diferencias químicas ni de elección de pareja; por otro lado, el análisis genético de los individuos involucrados en los bioensayos mostró diferencias significativas en los niveles de parentesco entre las parejas interactuantes, lo cual mostró que a pesar de existir estas diferencias, el reconocimiento de parentesco no es un mecanismo de evitación de la endogamia. Además, el apareamiento fue llevado a cabo entre todas las parejas de de-alados formados artificialmente tanto de compañeros como no-compañeros de nido, y no se encontraron diferencias significativas entre el número de huevos colocados en ambos grupos. En estos casos, los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia y la selección de pareja han sido deliberadamente excluidos, demostrando así que el proceso completo de evitación de la endogamia está basado principalmente en la dispersión no sesgada al sexo. Este resultado está avalado por la razón de potenciales parejas endogámicas/exogámicas igual a 0,057, que muestra que la probabilidad de encuentro entre parejas de alados cercanamente emparentados es considerablemente menor que la de parejas exogámicas. De manera similar, DeHeer & Vargo (2006) mostraron que la probabilidad que las

termitas *Reticulitermes flavipes* y *R. virginicus* se aparearan con hermanos es inversa a sus habilidades de dispersión.

Los resultados encontrados en la presente tesis concuerdan con los encontrados por Husseneder *et al.* (2006), quienes encontraron un bajo parentesco promedio en parejas de reproductores primarios en la termita de piezas separadas *Coptotermes formosanus*, sugiriendo así evitación de la endogamia; además, no encontraron diferencias significativas entre el parentesco promedio de alados y de parejas de reproductores primarios, concluyendo que los mecanismos indirectos son suficientes para explicar la evitación de la endogamia observada y que no es necesario postular ningún mecanismo activo para explicarla. Por otro lado, Shellman-Reeve (2001), sobre la base de bioensayos que utilizaron grupos de de-alados de ambos sexos provenientes del mismo nido y de distintos nidos, sugirió que el mecanismo activo explica la evitación de la endogamia en la termita de una pieza, *Zootermopsis nevadensis*. Para cada bioensayo, Shellman-Reeve (2001) calculó la probabilidad de endogamia esperada como la razón entre el número de parejas endogámicas esperadas y el total de parejas esperadas (endogámicas + exogámicas). Esta probabilidad de endogamia esperada las comparó con las probabilidades de endogamia observadas, calculadas de dos formas diferentes: la primera fue calculada como el número observado de parejas endogámicas formadas divididas por el número total de parejas esperadas, y la segunda como el número observado de parejas endogámicas dividida por el número total de parejas (endogámicas y exogámicas) observadas. Mientras la primera comparación arrojó un valor de  $P = 0,013$ , la segunda arrojó un valor de  $P = 0,999$ . Según nuestro parecer, la vía correcta para probar si el reconocimiento de parentesco es o no un mecanismo activo de evitación de la endogamia es a través de la segunda comparación, es decir, las parejas observadas *versus* las parejas totales (endogámicas + exogámicas) observadas, debido a que los

sesgos experimentales son cancelados tanto en el numerador como en el denominador. Además, debido a que ningún análisis genético fue llevado a cabo en ese trabajo, el reconocimiento de parentesco – que se refiere a la capacidad de discriminar entre diferentes grados de parentesco – no podría haber sido evaluado. Así, los resultados descritos por Shellman-Reeve (2001) pueden ser interpretados en términos de reconocimiento de compañeros de nido debido a que el patrón observado podría corresponder a reconocimiento mediado por señales adquiridas desde el material del nido, y no como una señal endógena; este efecto debería haber sido controlado al sugerir reconocimiento de parentesco (Flores-Prado & Niemeyer, 2010). En resumen, nuestro parecer es que Shellman-Reeve (2001) demostró que *Zootermopsis nevadensis* elige a su pareja de forma azarosa.

El reconocimiento de parentesco y de compañero de nido son dos habilidades que permiten la discriminación entre individuos que exhiben diferentes grados de parentesco genético, y entre compañeros y no-compañeros de nido, respectivamente. Tanto el reconocimiento de parentesco como el de compañeros de nido son comunes en insectos eusociales; ellos juegan un rol clave en la mantención y evolución de las conductas cooperativas y la estructura social. Desde un punto de vista evolutivo, el reconocimiento de parentesco es importante para maximizar la adecuación biológica inclusiva (Hamilton 1964a) a través del proceso llamado “selección de parentesco” (Maynard-Smith 1964), un mecanismo propuesto para explicar la evolución de las sociedades de insectos (Hamilton 1964b), mientras que el reconocimiento de compañeros de nido es necesario para mantener la estructura social de una colonia (Hölldobler & Wilson 1990).

La hipótesis de reconocimiento de parentesco asociada a la adecuación biológica inclusiva (Hamilton 1964a) ha sido utilizada para explicar la evolución de las especies eusociales de

Hymenoptera (Hamilton 1964b). Así, las obreras de Hymenoptera dentro de una colonia cuidan a sus hermanas completas en vez de a su propia progenie; debido a que las obreras comparten tres cuartos de sus genes entre ellas y solo la mitad con su potencial descendencia, su comportamiento resulta en un aumento de la contribución de su genotipo a la siguiente generación y consecuentemente un aumento en su adecuación biológica inclusiva (Hamilton 1964a,b). Sin embargo, la eusociabilidad en termitas no puede evolucionar por selección de parentesco como fue propuesta por Hamilton (1964a, b) para especies haplo-diploides debido a que ambos sexos son diploides y por lo tanto los hermanos completos comparten la mitad de sus genes entre ellos y también con su progenie. De hecho, se ha sugerido que el parentesco en termitas entre miembros de la colonia podría aumentar por endogamia (es decir, apareamiento entre neoténicos y reproductores primarios o entre neoténicos dentro de la colonia), facilitando así la eusociabilidad por medio de adecuación biológica inclusiva (ver Andersson 1984; Thorne 1997). Sin embargo, en colonias constituidas por la progenie de una pareja de reproductores monógamos, como es el caso de *N. chilensis*, la colonia resultante muestra un único nivel de parentesco entre hermanos implicando que la habilidad para reconocer diferentes niveles de parentesco (es decir, reconocimiento de parentesco) es innecesaria. Por otra parte, la habilidad de reconocer diferentes niveles de parentesco como ocurre en especies haplo-diploides que forman colonias con dos niveles de parentesco entre hembras, como se discutió anteriormente, podría haber sido potenciada en especies que muestran un modo de reproducción en la cual la hembra se aparea con más de un macho, como es el caso de varios himenópteros eusociales (Crozier & Fjerdingstad 2001), dando lugar así al surgimiento de una colonia con múltiples niveles de parentesco.

El estudio de las habilidades de reconocimiento de parentesco en insectos sociales es fundamental para el entendimiento de dos fenómenos: evitación de la endogamia y sociabilidad.

Para inferir capacidad de reconocimiento de compañeros de nido, es necesaria la estimación del grado de parentesco entre individuos interactuantes bajo un contexto social o reproductivo. El estudio actual exploró por primera vez la ocurrencia de mecanismos indirectos y activo de evitación de la endogamia en la fundación de una nueva colonia en una misma especie de termita usando una variedad de aproximaciones. Se mostró que la dispersión de alados como mecanismo indirecto es suficiente como para explicar los bajos niveles de endogamia encontrados entre las parejas de reproductores primarios de *N. chilensis* y demostró por primera vez en termitas que el reconocimiento de parentesco no está involucrado en la evitación de la endogamia durante la fundación de una nueva colonia. Estudios posteriores focalizados en reconocimiento de parentesco probablemente mostrarán la ausencia de tal fenómeno como un patrón general de especies diploides eusociales.

## VIII. CONCLUSIONES

A continuación se presentan las principales conclusiones vinculadas con las respectivas hipótesis y sus predicciones.

En relación con la Hipótesis 1, se demostró que el parentesco promedio de la pareja fundadora de colonias fue significativamente menor al parentesco promedio de compañeros de nido (pseudo-obreros y soldados), reflejando la ausencia de endogamia entre la pareja de reproductores al momento de fundar una nueva colonia. Adicionalmente, se encontró que el parentesco promedio entre compañeros de nido fue de  $0,46 \pm 0,008$  (media  $\pm$  EE), consistente con hermanos completos descendientes de una pareja de individuos diploides.

En relación con la Hipótesis 2, se encontró que el parentesco promedio entre parejas de alados en un evento de enjambrazón fue significativamente menor que el parentesco promedio de compañeros de nido, es decir, los mecanismos indirectos estarían actuando al reducir la probabilidad de encuentro entre parejas de alados cercanamente emparentados. Al estudiar los mecanismos indirectos de evitación de la endogamia en detalle, se evidenció que las colonias no se especializan en producir alados de un mismo sexo, pues en cada colonia existe producción simultánea de alados machos y hembras, y que no hay un sesgo sexual en la emergencia de estos alados desde sus colonias. Tampoco se obtuvo evidencia que indique la existencia de un sexo filopátrico y otro dispersante, pues no existe diferencia en las distancias de dispersión entre ambos sexos. Finalmente, se demostró que los alados de ambos sexos son capaces de dispersar lejos de su colonia natal, generando un efecto de dilución y disminuyendo así la probabilidad de encuentro con individuos del sexo opuesto perteneciente a su misma colonia, siendo este último



mecanismo suficiente para explicar el significativo menor grado de parentesco promedio entre alados en enjambrazón respecto al parentesco promedio de compañeros de nido.

Respecto de la Hipótesis 3, se encontró que no existen diferencias significativas en el grado de parentesco promedio entre las parejas de individuos en un evento de enjambrazón y las parejas de individuos fundadores de colonias, lo que sugiere que el mecanismo activo de evitación de la endogamia no estaría operando. Para poner a prueba esto, se realizaron bioensayos conductuales de preferencia en donde se encontró que tanto machos como hembras de-alados no discriminaron entre individuos del sexo opuesto cuando estos provenían del mismo o de distinto nido, lo cual muestra que el reconocimiento de compañeros de nido no estaría operando; además, las diferencias significativas encontradas en el grado de parentesco de ambos grupos sugieren fuertemente que el reconocimiento de parentesco tampoco estaría operando.

Respecto a la hipótesis 4, al evaluar el rol de los compuestos químicos cuticulares, no se encontraron diferencias significativas en los perfiles químicos cuticulares entre individuos del mismo o distinto nido.

Finalmente, en esta tesis se demostró la no existencia de reconocimiento de compañero de nido ni de parentesco como mecanismo activo de evitación de la endogamia y que la dispersión de alados es un mecanismo suficiente para explicar esta evitación en la termita chilena nidificadora de una pieza *N. chilensis*.

## IX. REFERENCIAS

- Abe T. 1987. Evolution of life types in termites. In: Kawano S. Connell J H, Hidaka T (eds) *Evolution and Coadaptation in Biotic Communities*. University of Tokyo Press pp 126–148.
- Adams E. S. 1991. Nest-mate recognition based on heritable odors in the termite *Microcerotermes arboreus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2031-2034.
- Andersson M. 1984. The evolution of eusociality. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 165–189.
- Artigas J. N. 1994. Entomología Económica. Insectos de interés Agrícola, Forestal, Médico y Veterinaria, Vol. I. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 1126p.
- Bagnères A. G., Killian A., Clement J. L., Lange C. 1991. Interspecific recognition among termites of the genus *Reticulitermes*: evidence for a role for the cuticular hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.* 17: 2397-2420.
- Bartz S. H. 1979. Evolution of eusociality in termites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5764-5768.
- Bartz S. H. 1980. Correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3070.
- Bell W. J., Roth L. M., Nalepa C. A. 2007. *Cockroaches: Ecology, Behavior and Natural History*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. xiii+230p.
- Blumstein D. T., Daniel J. C., Evans C. S. 2006. JWatcher v1.0. <http://www.jwatcher.ucla.edu>.  
Revisado el 12 de junio de 2013.
- Calleri D. V., Reid E. M., Rosengaus R. B., Vargo E. L., Traniello J. F. A.. 2007. Inbreeding and disease resistance in a social insect: effects of heterozygosity on immunocompetence in the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Proc. R. Soc. B* 273: 2633-2640.
- Charlesworth D. Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 237-268.
- Charlesworth D., Willis J. H. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Rev. Genet.* 10: 783-796.
- Ciszek D. 2000. New colony formation in the “highly inbred” eusocial naked mole-rat: outbreeding is preferred. *Behav. Ecol.* 11: 1-6.
- Costa-Leonardo, A. M., Casarin, F. E., Lima, J. T. 2009. Chemical communication in Isoptera. *Neotrop. Entomol.*, 38: 1-6.

- Crozier, R.H., Fjerdingstad, E.J. 2001. Polyandry in social Hymenoptera – disunity in diversity? *Ann. Zool. Fenn.* 38: 267–285.
- DeHeer C. H., Vargo E. L. 2006. An indirect test of inbreeding depression in the termites *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 753–761.
- Eggleton P. 2001. Termites and trees: a review of recent advances in termite phylogenetics. *Insect. Soc.* 48: 187–193.
- Eggleton P., Beccaloni G., Inward D. 2007. Response to Lo *et al.* *Biol. Lett.* 3: 564–565.
- 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*. Springer Science+Business Media p: 1-26.
- Evans F., Matson S., Brake J., Langdon C. 2004. The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 230: 89–98.
- Evans T. A. 2011. Invasive termites. En: Bignell D. E., Roisin Y., Lo N. (eds) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer Science+Business Media p: 519-562.
- Favre L., Balloux F., Goudet J., Perrin N. 1997. Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodyrus russula*: Evidence from field data and microsatellite patterns. *Proc. R. Soc. B* 264: 127–132.
- Fei H. X., Henderson G. 2003. Comparative study of incipient colony development in the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insect. Soc.* 50: 226–233.
- Florane C. B., Bland J. M., Husseneder C., Raina A. K. 2004. Diet-mediated inter-colonial aggression in the formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. *J. Chem. Ecol.* 30: 2559-2574.
- Flores-Prado L., Niemeyer H. M. 2010. Kin Recognition in the largely solitary bee, *Manuelia postica* (Apidae: Xylocopinae). *Ethology* 116: 466–471.
- Gajardo R. 1994. La Vegetación Natural de Chile. Clasificación y Distribución. Editorial Universitaria, Santiago, pp 165.
- Gerloff C. U., Schmid-Hempel P. 2005. Inbreeding depression and family variation in a social insect, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Oikos* 111: 67-/80.

- Goodnight K. F., Queller D. C. 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Mol. Ecol.* 8:1231–1234.
- Goudet J., Perrin N., Waser P. 2002. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Mol. Ecol.* 11: 1103-1114.
- Hamilton, W. D. 1964a. The genetical theory of social behavior, I. *J. Theor. Biol.* 7:1–16.
- Hamilton, W. D. 1964b. The genetical theory of social behavior, II. *J. Theor. Biol.* 7:17–52.
- Haverty M. I., Copren K. A., Getty G. M., Lewis V. R. 1999. Agonistic behavior and cuticular hydrocarbon phenotypes of colonies of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) from Northern California. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 269-277.
- Hölldobler, B., Wilson, E. O. 1990. *The Ants*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Howard R. W., Blomquist G. J. 1982. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 27: 149-172.
- Hu J., Zhong J-H., Guo M-F. 2007. Alate dispersal distances of the black-winged subterranean termite *Odontotermes formosanus* (Isoptera: Termitidae) in southern China. *Sociobiology* 50: 1-8.
- Husseneder C., Messenger M. T., Su N-Y., Grace J. K., Vargo E. L. 2005. Colony social organization and population genetic structure of an introduced population of Formosan subterranean termite from New Orleans, Louisiana. *J. Econ. Entomol.* 98:1421–1434.
- Husseneder C., Simms D. M., Ring D. R. 2006. Genetic diversity and genotypic differentiation between the sexes in swarm aggregations decrease inbreeding in the Formosan subterranean termite. *Insect. Soc.* 53: 212–219.
- Husseneder C., Simms D. M., Riegel C. 2007. Evaluation of treatment success and patterns of reinfestation of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 100:1370–1380.
- Husseneder C., Simms D. M. 2008. Size and heterozygosity influence partner selection in the Formosan subterranean termite. *Behav. Ecol.* 19: 764-773.
- Inward D., Beccaloni G., Eggleton P. 2007. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biol. Lett.* 3: 331–335.
- Inhorn M. C., Kobeissi L., Nassar Z., Lakkis D., Fakih M. H. 2009. Consanguinity and family clustering of male factor infertility in Lebanon. *Fertil. Steril.* 91: 1104-1109.

- Jones O.R., Wang J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 551-555.
- Kaib M., Franke S., Francke W., Brandl R. 2002. Cuticular hydrocarbons in a termite: phenotypes and a neighbour-stranger effect. *Physiol. Entomol.* 27: 189-198.
- Kaib M., Jmhasly P., Wilfert L., Durka W., Franke S., Francke W., Leuthold R. H., Brandl R. 2004. Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*. *J. Chem. Ecol.* 30: 365-385.
- Kambhampati S. 1995. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2017-2020.
- Klass K.-D., Nalepa C. A., Lo N.. 2008. Wood-feeding cockroaches as models for termite evolution (Insecta: Dictyoptera): *Cryptocercus* vs. *Parasphaeria boleiriana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46 809–817.
- Kokko H., Ots I. 2006. When not to avoid inbreeding. *Evolution* 60: 467–475.
- Korb J. & Hartfelder K. 2008. Life history and development - a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. *Biol. Rev.* 83: 295–313.
- Krebs C. J. 1989. Ecological methodology. New York, NY: Harper Collins Publishers.
- Kristensen T. N., Pedersen K. S., Vermeulen C. J., Loeschcke V. 2010. Research on inbreeding in the 'omic' era. *Trends Ecol. Evol.* 25: 44-52.
- Lenz M., Runko S. 1993. Long-term impact of orphaning on field colonies of *Coptotermes lacteus* (Froggatt) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insect. Soc.* 40: 439–456.
- Lo N., Engel M. S., Cameron S., Nalepa C. A., Tokuda G., Grimaldi D., Kitade O., Krishna K., Klass K.-D., Maekawa K., Miura T., Thompson G. J. 2007. Save Isoptera: A comment on Inward et al. *Biol. Lett.* 3: 562–563.
- Luchetti A., Velona A., Mueller M., Mantovani B. 2013. Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insect. Soc.* 60: 203–211.
- Martius C., Bandeira A. G., da Silva Medeiros L. G. 1996. Variation in termite alate swarming in rain forests of central Amazonia. *Ecotropica* 2:1–11.

- Matsuura K. 2006. Early emergence of males in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae): Protandry as a side effect of sexual size dimorphism. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 625-628.
- Matsuura K., Vargo E. L., Kawatsu K., Labadie P. E., Nakano H., Yashiro T., Tsuji K. 2009. Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science* 323:1687.
- Maynard-Smith, J. 1964. Group selection and kin selection. *Nature* 4924: 1145-1147.
- Messenger M. T., Mullins A. J. 2005. New flight distance recorded for *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Fla. Entomol.* 88:99-100.
- Michener, C. D., Smith, B. H. 1987. Kin recognition in primitively eusocial insects. En: Kin recognition in animals. (eds. D. J. C. Fletcher & C. D. Michener), pp. 209-242. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Morbeck Y. E., Ydenberg R. C. 2001. Protandrous arrival timing to breeding areas: a review. *Ecol. Letters* 4: 663-673.
- Paul A. 2002. Sexual Selection and Mate Choice. *Int. J. Primatol.* 23: 877-904.
- Penn D. J. 2002. The Scent of Genetic Compatibility: Sexual Selection and the Major Histocompatibility Complex. *Ethology* 108: 1-21.
- Prestwich, G. D. 1984. Defense mechanisms of termites. *Annu. Rev. Ent.*, 29, 201-32.
- Pusey A., Wolf. M. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol. Evol.* 11: 201-206.
- 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. & Smith, J. 2000. Termites as structural pests in Chile. Report of the UNEP/FAO/GLOBAL IMP Facility Biology and Management workshop. Feb. 2000, Geneva Switzerland. p.59.
- Rippa R., Luppichini P. 2004. Especies de termites de importancia económica en presentes en Chile. En *Termitas y otros insectos xilófagos en Chile: Especies, Biología y Manejo* (ed. R. Rippa & P. Luppichini). p. 73-105. Colección libros INIA. Santiago, Chile.
- Roisin Y., Lenz M. 2002. Origin of male-biased sex allocation in orphaned colonies of the termite, *Coptotermes lacteus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51: 472-479.

- Roisin, Y. & Korb, K. 2011. Social Organisation and the Status of Workers in Termites. En: Bignell D. E., Roisin Y., Lo N. (eds) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer Science+Business Media p: 133-164.
- Shellman-Reeve J.S. 1996. Operational sex ratios and lipid reserves in the dampwood termite *Zootermopsis nevadensis* (Hagen) (Isoptera: Termopsidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 69: 139–146.
- Shellman-Reeve, J. S. 2001. Genetic relatedness and partner preference in a monogamous, wood-dwelling termite. *Anim. Behav.* 61: 869–876.
- Smith, B. H., Breed, M. D. 1995. The chemical basis for nestmate recognition and mate discrimination in social insect. In *Chemical ecology of insects 2* (ed. R. T. Carde & W. J. Bell), pp. 387-317. New York, NY: Chapman & Hall.
- Šobotník, J., Jirosova, A. & Hanus, R. 2010. Chemical warfare in termites. *J. Insect Physiol.* 56: 1012-1021.
- Tabadkani S. M., Nozari J., Lihoreau M. 2012. Inbreeding and the evolution of sociality in arthropods. *Naturwissenschaften* 99:779–788.
- Takahashi S., Gassa A. 1995. Roles of cuticular hydrocarbons in intra- and interspecific recognition behavior of two Rhinotermitidae species. *J. Chem. Ecol.* 21: 1837-1845.
- Thorne B. L. 1997. Evolution of eusociality in termites. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 27–54.
- Traniello J. F. A. 1981. Enemy deterrence in the recruitment strategy of a termite: Soldier-organized foraging in *Nasutitermes costalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1976-1979.
- Van Zweden J. S., d’Ettorre P. (2010) Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. En: Blonquist G. J., Barnères A-G. (eds) *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology*. Cambridge University Press. pp:222-243.
- Vargo E. L., Husseneder C., Woodson D. Waldvogel M. G., Grace J. K. 2006. Genetic analysis of colony and population genetic structure of three introduced populations of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Continental United States. *Environ. Entomol.* 35: 151–166.
- Vargo E. L., Husseneder C. 2011. Genetic Structure of Termite Colonies and Populations. En: Bignell D. E., Roisin Y., Lo N. (eds) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer Science+Business Media pp: 321-247.

- Vargo E. L., Labadie P. E., Matsuura K. 2012. Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proc. R. Soc. B* 279: 813–819.
- Vauchot B., Provost E., Bagnères A. G., Clement J. L. 1996. Regulation of the chemical signatures of two termites species, *Reticulitermes santonensis* and *Reticulitermes lucifugus grassei*, living in mixed experimental colonies. *J. Insect Physiol.* 42: 309-321.
- Villán L. 1972. Estudio sistemático y biológico de *Porotermes quadricollis* (Rambur, 1842) (Insecta, Isoptera, Termopsidae, Porotermitinae) y métodos para determinar la resistencia térmica de la madera. Tesis para optar al título de Licenciado en Biología. Universidad de Concepción. Departamento de Zoología. XVII+182p.
- Wade M. J., Breden F. 1981. Effect of inbreeding on the evolution of altruistic behavior by kin selection. *Evolution* 35: 844-858.
- Whitehorn P. R., Tinsley M. C., Goulson D. 2009. Kin recognition and inbreeding reluctance in bumblebees. *Apidologie* 40: 627–633.



## X. ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO

Insectes Sociaux (2015) 67: 237-245

MECHANISMS OF INBREEDING AVOIDANCE IN THE ONE-PIECE

DRYWOOD TERMITE *NEOTERMES CHILENSIS*

### Abstract

Inbreeding depression refers to a decrease in fitness components in the offspring of closely related sexual pairs. Given the disadvantages of inbreeding depression, it is of interest to study the mechanisms involved in its avoidance, particularly in social insects. In termites, colonies are founded by dispersing individuals. Two types of mechanisms may account for inbreeding avoidance: indirect mechanisms that occur before the dispersing individuals come into contact (sex-biased production at colony level, sex-biased emergence timing, dispersal, and sex-biased dispersal), and an active mechanism (kin recognition) that occurs when dispersing individuals come into contact. We have used ecological, behavioral and genetic approaches to study the mechanisms of inbreeding avoidance along the complete process of colony foundation by *Neotermes chilensis*, i.e. from the production of dispersing individuals in the colony to the production of siblings by the newly formed reproductive pair. This is the first report to address both indirect and active mechanisms of inbreeding avoidance in the same study, in the same termite species, and through the complete process of colony foundation. The results show that dispersal is the main indirect mechanism of inbreeding avoidance and that kin recognition is unlikely as an active mechanism of inbreeding avoidance

Termites | inbreeding avoidance | kin recognition | microsatellites

## Introduction

Inbreeding refers to the mating between closely related individuals (Kristensen et al. 2010); ensuing increased homozygosity of deleterious recessive alleles in the offspring, known as inbreeding depression (Pusey and Wolf 1996; Charlesworth and Willis 2009), may lead to the decrease in one or more components of fitness such as reproduction, survival and growth (Pusey and Wolf 1996). In social species, the study of mechanisms of inbreeding avoidance is particularly important because close relatives live in frequent contact (Tabadkani et al. 2012).

Termites are eusocial insects. Reproduction normally occurs between primary reproducers but may also involve secondary reproducers within a mature colony. A reproductive behavioral repertoire is displayed by the newly formed couple outside the colony prior to the founding of a new colony; this repertoire is similar in all termites (Eggleton 2011). During the reproductive period, the dispersal of alate individuals of both sexes produced inside the colony occurs as swarms; upon landing, alates lose their wings and give rise to de-alates. Once de-alates of different sexes meet, they engage in a nuptial promenade (the male walks behind the female in a tandem behavior) after which the couple searches for a nesting substrate. When such substrate is found, the couple builds a copularium and mates; shortly after mating, the female starts oviposition. The founding couple is referred to as the primary reproducer pair (PRP).

Reproduction within a mature colony involves the formation of neotenic (secondary reproducers) from pseudoworkers; they can mate with the primary reproducers or among themselves. Additionally, in three *Reticulitermes* species, *R. speratus* (Matsuura et al. 2009), *R. virginicus* (Vargo et al. 2012) and *R. lucifugus* (Luchetti et al. 2013), the queen has been shown

to reproduce parthenogenetically to produce female neotenics which can mate with the king (Matsuura et al. 2009).

Deleterious effects of inbreeding in termites have been shown through the comparisons of worker bodyweight (Husseneder et al. 2005) and colony size (Husseneder et al. 2007) between natural colonies with or without neotenics; through comparison of fecundity (Fei and Henderson 2003) and immunocompetence (Calleri et al. 2007) of colonies produced artificially in the laboratory from inbred and outbred de-alate pairs, and through determining the survival of members of colonies formed from reproductors with different degrees of relatedness (DeHeer and Vargo 2006).

Molecular studies in natural colonies have shown that the colony-founding individuals in a broad range of species are not closely related genetically (review: Vargo and Husseneder 2011). This implies the occurrence of inbreeding avoidance in the establishment of new colonies, i.e. in the part of the reproductive cycle occurring outside the colony. Both indirect and active mechanisms of inbreeding avoidance have been described for that part of the reproductive cycle (Tabadkani et al. 2012; Vargo and Husseneder 2011). Indirect mechanisms refer to those exhibited up to the formation of de-alates with the overall effect of decreasing the probability of encounter of individuals of different sex from the same colony; they are: sex-biased production of alates at the colony level, i.e., some colonies may produce one sex in preference to the other (Lemz and Runko 1993; Roisin and Lenz 2002; Husseneder et al. 2006), sex-biased emergence timing, i.e., one sex may emerge from a given colony earlier than the other (Morbey and Ydenberg 2001), dispersal, i.e., as alates fly away from their colony during swarming the chance of encountering a nestmate decreases as the distance flown increases (Messenger and Mullins 2005; Husseneder et al. 2006; Vargo et al. 2006; Hu et al. 2007), and sex-biased dispersal, i.e.,

one sex may disperse to longer distances than the other (Shellman-Reeve 1996). On the other hand, an active mechanism which may take place during mate choice by de-alates is kin recognition, i.e., the capacity of an individual to discriminate between conspecifics differing in genetic relatedness (reviews: Michener and Smith 1987; Smith and Breed 1995).

Few reports have addressed in termites the mechanisms of inbreeding avoidance in the colony founding pair (Shellman-Reeve 2001; Husseneder et al. 2006; Husseneder and Simms 2008; Vargo and Husseneder 2011) and no studies have evaluated the mating choice process from dispersal of alates to formation of a colony in any one termite species. We have undertaken such studies with *Neotermes chilensis* (Blanchard, 1851) (Kalotermitidae), a monogamous one-piece termite (i.e., individuals nest and forage in a single piece of wood) endemic to Chile between ca. 26 – 33°S whose reproductive behavioral repertoire is similar to that of other termites (Rippa and Luppichini 2004). Mature colonies usually contain fewer than 400 individuals; no neotenic have been described for this species. *N. chilensis* represents a good model for inbreeding avoidance studies because complete colonies can be conveniently followed, emergence of alates from the colony can be controlled in the laboratory, and PRP are easily accessible. Using ecological, behavioral and genetic approaches, we have explored for the first time in a single species of termite the complete spectrum of inbreeding avoidance mechanisms during the founding of a new colony; additionally, we have studied the mating of de-alates and subsequent oviposition in an artificial arena. Our results show that dispersal is the main mechanism of avoiding inbreeding and that kin recognition is most likely not involved in the process.

## Materials and Methods

### Species and study area

Studies were carried out in a population of *N. chilensis* found at Las Chilcas (32°52'S; 70°52'W) inside dry scapes (floral stems) of *Puya berteroniana* Mez (Bromeliaceae). The site is within the sclerophyllous shrub community of central Chile (Gajardo 1994) where the predominant species are *P. berteroniana*, *Adesmia arborea* Bert. ex Savi (Fabaceae), *Colliguaya odorifera* Mol. (Euphorbiaceae) and *Echinopsis chiloensis* (Colla) H. Friedrich & G.D. Rowley (Cactaceae).

### Inbreeding avoidance

The degree of relatedness was compared between: a) nestmates (before swarming), b) alates caught during a swarm (i.e., after eventual indirect mechanisms of inbreeding avoidance had taken place), and c) PRP (i.e., after the eventual active mechanism of inbreeding avoidance had taken place). Correspondingly, three experimental groups of individuals were conformed as follows: a) nestmates (pseudo-workers and soldiers) contained in six dry scapes of *P. berteroniana* (between six and twenty-seven individuals were found inside each colony; total N = 74); b) swarming alates collected using light traps between 21:00 and 23:00 h during February and March (two traps during six nights in 2012 and seven traps during eight nights in 2013), the distance between them being 1.45 km in 2012 and ranging from 0.075 to 2.35 km in 2013. The

alates collected (75 in 2012 and 270 in 2013) were brought to the laboratory, sexed and separated by trap and collection event; and c) PRP extracted from different colonies ( $N = 19$ ).

The mean relatedness within the three experimental groups of individuals was determined using microsatellite markers. Ten microsatellites were designed, eight of which were successfully amplified in all individuals studied (for details on PCR conditions, see *Electronic Supplementary material*); they were used to determine the relatedness between all possible pairs of nestmates, between pairs of alates of different sex collected in a given day and a given trap within a swarm, and between members of each PRP, using the Queller and Goodnight index (Queller and Goodnight 1989) in the KINSHIP 1.3.1 software (Goodnight and Queller 1999). Mean values for nestmates, alates and PRP (Fig. 1) were compared using a Kruskal-Wallis test followed by Newman-Keuls *a posteriori* tests (Siegel and Castellan 1988).

Additionally, within each experimental group two different approaches (likelihood analysis and direct comparison of experimental and simulated relatedness values) were independently used to assign the pairs described in the preceding paragraph to either the full sibling or the unrelated categories; only these categories were used because the PRP are monogamous (Thorne 1997; Vargo and Husseneder 2011). In the first approach, the likelihood function implemented in the KINSHIP software was used. In the second approach, ten thousand unrelated and ten thousand full sibling pairs were simulated using the KINSHIP software; two distribution curves were generated with the simulated relatedness values and the point of intersection of these curves projected to the x-axis (relatedness equal to 0.26) was used to assign individuals in the experimental groups to the two kinship groups (Fig. 2). Finally, a Fisher exact test was used to compare the three experimental groups in terms of assignments to kinship groups made by the likelihood and simulation approaches.

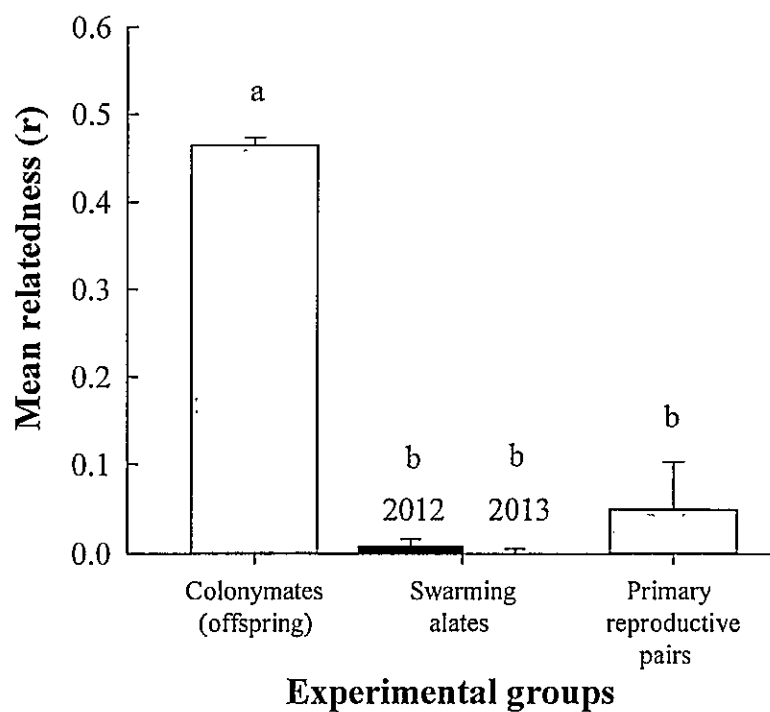


Fig. 1. Mean relatedness between nestmate pairs, male-female alate pairs from any given day in a swarming event (bars for 2012 and 2013 seasons), and primary reproductive pairs. Significant differences were found among groups ( $H_3 = 1109.3$ ;  $p < 0.001$ ). Different letters show significant differences at  $P = 0.05$ .

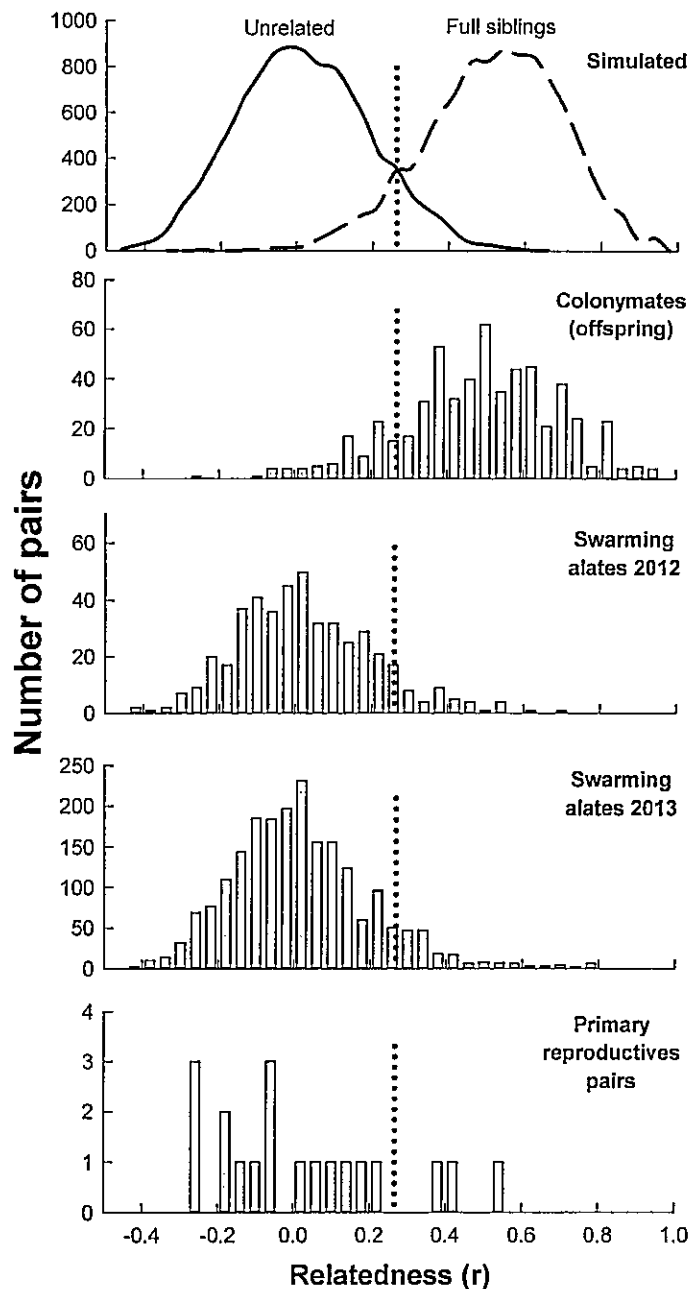


Fig. 2. Distribution of 10,000 simulated pairs of unrelated and 10,000 pairs of full siblings generated with the KINSHIP 1.3.1 software (upper curves) and of three experimental groups (bars): nestmates ( $N = 572$ ), swarming alates during the 2012 season ( $N = 460$ ), swarming alates during the 2013 season ( $N = 2,074$ ), and primary reproductive pairs ( $N = 19$ ). Frequencies were determined using a relatedness interval of 0.04 units. For visual simplicity, lines linking frequency values are shown for the simulated pairs. The intersection between the curves is denoted by a vertical dotted line in the five distributions shown.



Testing for sex-biased emergence of alates and for sex-biased production as mechanisms of inbreeding avoidance

Fifty dry scapes of *P. berteroniana* were surrounded by a mesh, brought to the laboratory in Santiago and maintained exposed to natural environmental conditions on top of a roof. Only fourteen colonies gave rise to swarms. The sex of individuals which emerged and were caught in the surrounding mesh was registered daily at midnight during two months. The count started when the first alate emerged. In order to ensure that scapes studied contained a single nest and that all alates had emerged, the scapes were dissected after the period of observation; if scapes were multinest or alates remained in them, such scapes were not taken into consideration in further analyses. Consequently, the final number of scapes used in this experiment was seven.

The mean emergence day was calculated for each sex within each scape and the statistical difference between these parameters was tested with a Mann-Whitney U-test. Sex-biased production of alates at the colony level was tested by comparing with a binomial test (<http://vassarstats.net/>) the total number of male and female alates which emerged from each colony.

Testing for dispersal and for sex-biased dispersal during a swarming event as mechanisms of inbreeding avoidance

The genotyped alates caught in seven traps during the 2013 swarm were used in these analyses on account of the larger number of traps set that year and the larger number of individuals collected.

To test for dispersal, individuals from both sexes were used together in an isolation by distance analysis, i.e., the correlation of the among-traps genetic distance ( $F_{ST}$ ) matrix with the among-traps geographical distance matrix; a Mantel test was performed using the GenAlEx v.6.5 software (Peakall and Smouse 2012). The genetic distance ( $F_{ST}$ ) was calculated between pairs of traps as described by Weir and Cockerham (1984) using the Genetix software (Belkhir et al. 1996).

To test for sex-biased dispersal, four different parameters were determined independently for males and for females in each trap and then compared between sexes: 1) genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) (Goudet et al. 2002), performed with the GenAlEx v.6.5 software; 2) inbreeding index  $F_{IS}$  (Goudet et al. 2002), calculated with the Genetix software; 3) mean relatedness degree ( $r$ ) (Goudet et al. 2002), calculated with the KINSHIP software, and 4) assignment index correction (Favre et al. 1997) obtained with the GenAlEx v.6.5 software. To test for significant differences between males and females,  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$ ,  $r$  and assignment index correction values were compared using a permutation test (5000 permutations) coded in R software (R Development Core Team 2013). When sex-biased dispersal occurs, the sex showing the least dispersal (philopatric sex) is expected to show a significantly higher  $F_{ST}$  and  $r$  values but a lower  $F_{IS}$  value compared with the sex showing the most dispersal (dispersing sex). Furthermore, the dispersing sex will show negative mean assignment index correction.

#### Testing for overall efficiency of mechanisms of inbreeding avoidance

In order to determine the overall consequences of indirect mechanisms of inbreeding avoidance, alates were allocated separately into colony groups (fullsibs) in the 2013 swarm using the

COLONY 2.0.4.0 software (Jones and Wang 2010). The number of all possible inbreeding (from the same colony) and outbreeding (from different colonies) intersexual pairs was determined in each trap for each day. The results were added up for all traps and days and an overall expected inbreeding/outbreeding ratio was calculated.

#### Testing for an active mechanism of inbreeding avoidance in the laboratory

In order to test the occurrence of an active mechanism of inbreeding avoidance in the laboratory, 60 scapes of *P. berteroniana* were brought to the laboratory, surrounded by a mesh and kept in the darkness at 16°C. Alate emergence was stimulated and synchronized by raising the temperature to 30°C and providing light with a 14L:10D photoperiod. Alates emerged from 19 scapes and became trapped in the mesh; they were separated by sex and scape of origin, and were individually placed in Petri dishes lined with filter paper to facilitate movement and wing shedding, thus giving rise to virgin de-alates. A preference bioassay was performed in which a virgin focal de-alate was enclosed in a Petri dish lined with filter paper, with two virgin de-alates of the opposite sex, one from the same scape as the focal individual (sibling) and the other from a different scape (unrelated). The bioassay arena was video-recorded during 20 min. The behaviors registered were: time to first proctodeal palpation, time to first allogrooming, time spend and frequency of occurrence of giving (males as focal individual) or receiving (females as focal individual) proctodeal palpation and allogrooming. Data was analyzed with JWatcher v1.0 (Blumstein et al. 2006); times spent in different behaviors and frequencies of occurrence of behaviors were compared between non-nestmate and nestmate pairs using the t-test or the Mann-Whitney U-test, depending on data following or not normality and homoscedasticity conditions,

respectively. Once the bioassay was finished, each individual was used for genetic analyses. Additionally, at the end of the experiment the scapes were dissected and only data from those which proved to be monocolonial (a single PRP was found in them) were used in the analyses. Fifteen replicates were finally retained with the focal de-alate being a male and another fifteen with the focal de-alate being a female. Males and females were used as focal individuals because previous studies have shown that both males and females are involved in mate choice (Shellman-Reeve 1999; Husseneder and Simms 2008).

#### Genetic analysis

In order to study the relatedness and kinship relationships among the 90 individuals used in the behavioral bioassays, their DNA was extracted and amplified with eight microsatellite markers. The relatedness and kinship relationships between individuals from each bioassay replicate were determined using the KINSHIP 1.3.1 software. Values for pairs that mated was compared with values of pairs which did not mate using a one-tailed *t*-test (Siegel and Castellan 1988).

#### Mating in artificial colonies

A virgin male and a virgin female de-alate from the same or different nests were obtained as explained above and were introduced in a Petri dish containing sawdust of *P. berteriana* (80%) and cellulose (20%) and kept in the dark. Six pairs of nestmates and seven of non-nestmates were formed. They were observed to check for the occurrence of mating; subsequently, the number of eggs laid by each pair was registered and compared with a two-tailed *t*-test.

## Results

### Inbreeding avoidance

The mean relatedness between nestmate pairs (offspring), female-male alate pairs in the 2012 and 2013 swarms, and PRP are shown in Figure 1. Mean relatedness of nestmate pairs ( $0.465 \pm 0.0085$ , mean  $\pm$  standard error) closely corresponded to that expected for full siblings (0.50). The statistical analysis showed that the mean relatedness of nestmate pairs (excluding PRP) was significantly higher than that of PRP ( $P < 0.001$ ) and of pairs of different sex among alates from a swarming event ( $P < 0.001$  for both years). The mean relatedness of female-male alate pairs did not differ between the 2012 and 2013 swarms ( $P = 0.834$ ). Moreover, the mean relatedness of female-male alate pairs in the 2012 and 2013 swarms were not statistically different from that of PRP ( $P = 0.196$  and  $P = 0.289$ , respectively). The above comparisons are supported by the distribution of kinship groups between the different experimental groups (Table 1).

Table 1. Assignment to full sibling and unrelated categories of all possible pairs of nestmates, pairs of alates of different sex collected in a given day and a given trap within a swarm (2012 and 2013 seasons), and members of each PRP, based on two different approximations: likelihood analysis and direct comparison of experimental and simulated relatedness values. Significantly different proportions in rows are depicted by different letters (Fisher exact test,  $P < 0.05$ ).

Approximation	Kinship relationship of pairs formed	Experimental groups			
		Siblings	Swarming alates		Primary reproductive pairs
			2012	2013	
Likelihood	Full siblings / Unrelated	489/ 83 a	34 / 426 b	189/ 2518 b	3 / 16 b
Simulation	Full siblings / Unrelated	483/ 89 a	37 / 423 b	210 / 2497b	3 / 16 b

## Testing for sex-biased emergence of alates and for sex-biased production as mechanisms of inbreeding avoidance

The duration of the emergence period of alates from escapes brought from the field was  $33.9 \pm 3.2$  days (mean  $\pm$  ES, range: 22 to 48 days);  $82.7 \pm 9.4$  alates of both sexes emerged from each scape (mean  $\pm$  ES, range: 41 to 105 alates). Sex proportion between males and females did not depart significantly from 1:1 and only one scape showed significant protandry (Table 2).

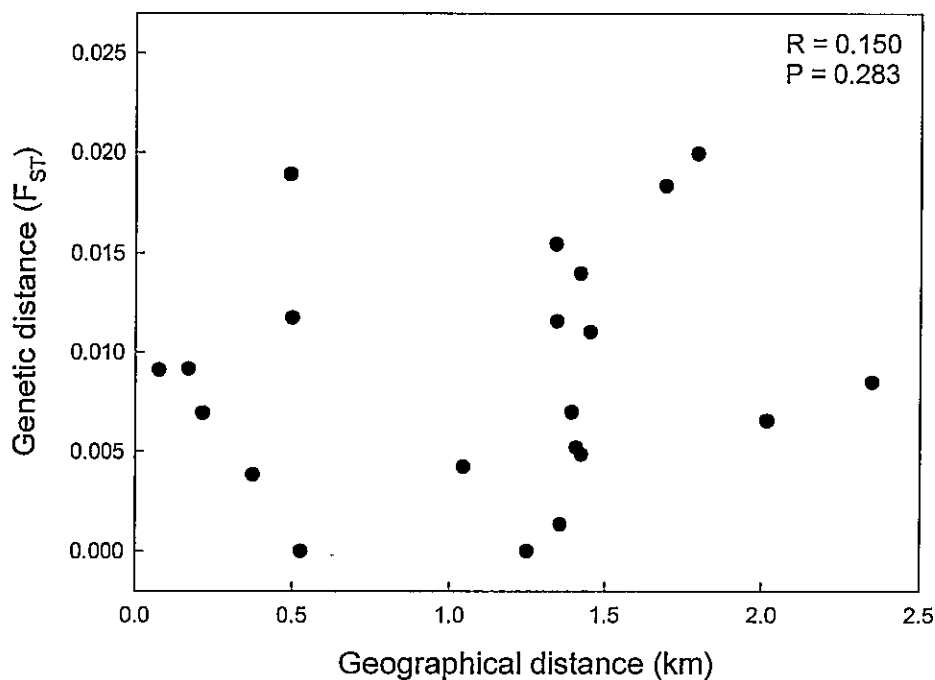
**Table 2.** Summary of tests for sex-biased production of alates (i.e., deviation from 1:1 sex ratio) and sex-biased emergence of alates (i.e., differences in the mean day of emergence of males and females) from 7 scapes collected in the field and kept on a roof in Santiago. The deviation from 1:1 sex ratio was determined with a binomial test and the emergence timing of males and females were compared with a Mann-Whitney U-test (except for scape 3, which could be analyzed with a *t*-test).

Scape	Sex-biased production of alates		Sex-biased emergence of alates		
	m/f ratio (N)	Deviation from 1:1	Males (mean $\pm$ SEM)	Females (mean $\pm$ SEM)	P value
1	1.10 (105)	n.s.	$5.5 \pm 0.44$	$5.4 \pm 0.66$	0.207
2	0.76 (104)	n.s.	$17.9 \pm 0.88$	$16.85 \pm 0.76$	0.352
3	1.34 (61)	n.s.	$15.2 \pm 1.36$	$16.3 \pm 1.68$	0.607
4	1.14 (77)	n.s.	$10.6 \pm 1.44$	$10.8 \pm 1.97$	0.756
5	1.39 (86)	n.s.	$18.1 \pm 1.46$	$17.4 \pm 1.72$	0.498
6	0.95 (41)	n.s.	$5.7 \pm 1.16$	$13.8 \pm 2.83$	0.027
7	0.81 (105)	n.s.	$11.8 \pm 1.25$	$13.5 \pm 1.12$	0.408

### Testing for dispersal and for sex-biased dispersal during a swarming event as mechanisms of inbreeding avoidance

Siblings were found in traps as distant as 2.35 km, a distance comparable to that flown by alates of other termite species (Vargo and Husseneder 2011). Differences in mean genetic distance between pairs of traps were found not to be significantly correlated with their geographical distance (Mantel test:  $R = 0.150$ ;  $P = 0.283$ ; Fig. 3).

Neither genetic differentiation ( $F_{ST}$ ), inbreeding index ( $F_{IS}$ ), relatedness degree ( $r$ ) nor assignment index correction (AIC) showed differences between sexes (Table 3).



**Fig. 3.** Isolation by distance among alates from seven traps in the 2013 swarming event for males and females together. Non-significant isolation by distance was found. The P and R values were obtained from a Mantel test.



**Table 3:** Assessment of occurrence of sex-biased dispersal through various parameters: mean genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) between traps, inbreeding index ( $F_{IS}$ ) and relatedness degree ( $r$ ) within traps, and corrected assignment index ( $A_{Ic}$ ) among traps are given as the expected values for the philopatric and dispersing sexes, and the observed for females and males. Statistical differences between sexes were established using a permutation test (5000 permutations) coded in R software.

	<b>Philopatric sex</b>	<b>Dispersing sex</b>	<b>Females (mean <math>\pm</math> SE)</b>	<b>Males (mean <math>\pm</math> SE)</b>	<b>P value</b>
<b><math>F_{ST}</math></b>	higher	lower	0.009 $\pm$ 0.001	0.011 $\pm$ 0.003	0.543
<b><math>r</math></b>	higher	lower	0.010 $\pm$ 0.016	-0.002 $\pm$ 0.012	0.545
<b><math>F_{IS}</math></b>	lower	higher	0.033 $\pm$ 0.025	0.045 $\pm$ 0.022	0.724
<b><math>A_{Ic}</math></b>	positive	negative	0.129 $\pm$ 0.147	-0.094 $\pm$ 0.126	0.236

### Testing for overall efficiency of indirect mechanisms of inbreeding avoidance

The overall expected inbreeding to outbreeding ratio was 0.057, i.e., for each one hundred putative encounters between de-alate pairs only five are expected to be inbreeding encounters. Additionally, alates collected during the 2013 swarm (270 individuals) were inferred from allele data to come from 105 different colonies.

### Active mechanism of inbreeding avoidance

The analysis of bioassays showed non-significant differences in the behavior of a de-alate towards a nestmate or a non-nestmate de-alate in all behavioral variables assessed, both when the focal de-alate was a male or a female (Table 4). Moreover, genetic relatedness of pairs which mated was not significantly different from that of pairs which did not mate (mean  $\pm$  SE: mating pairs =  $0.203 \pm 0.052$ , non-mating pairs =  $0.302 \pm 0.49$ ;  $t_{58} = 1.401$ ;  $P = 0.167$ ).

Nestmate or non-nestmate male and female pairs of *N. chilensis* de-alates were introduced into an artificial arena simulating their host. They all mated and laid eggs. Three months after the experiment was set up, non-significant differences were found in the number of eggs laid between nestmate ( $4.5 \pm 0.96$ ; mean  $\pm$  SE) and non-nestmate ( $4.6 \pm 0.81$ ; mean  $\pm$  SE) pairs ( $t_9 = -0.078$ ;  $P = 0.94$ ).

**Table 4** Behavioral bioassay involving a focal de-alate (male or female) confronted simultaneously with a nestmate de-alate and a non-nestmate de-alate. Times in min, frequencies in  $\text{min}^{-1}$ . P values are given for the comparison between behaviors involving the nestmate and the non-nestmate.

Focal de-alate	Behavioral parameter	Nestmate	Non-nestmate	Statistical parameter	P
Male	Time to first proctodeal palpation	11.0 $\pm$ 3.46	17.9 $\pm$ 1	t=1.18	0.291
Male	Frequency of proctodeal palpations	2.57 $\pm$ 0.95	1.67 $\pm$ 0.67	U=8.5	0.667
Male	Time spent in proctodeal palpations	0.30 $\pm$ 0.13	0.066 $\pm$ 0.052	U=4	0.183
Male	Time to first allogrooming	5.93 $\pm$ 2.41	3.32 $\pm$ 2.10	t=-0.83	0.425
Male	Frequency of allogrooming	3 $\pm$ 0.93	4 $\pm$ 1.11	U=21	0.463
Male	Time spent in allogrooming	1.12 $\pm$ 0.59	1.04 $\pm$ 0.50	U=24	0.694
Female	Time to first proctodeal palpation	7.96 $\pm$ 4.23	7.44 $\pm$ 3.84	t=-0.091	0.931
Female	Frequency of proctodeal palpations	1 $\pm$ 0	1.5 $\pm$ 0.29	U=2	0.533
Female	Time spent in proctodeal palpations	0.14 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.092	t=0.64	0.560
Female	Time to first allogrooming	4.14 $\pm$ 1.36	3.39 $\pm$ 1.47	U=20	0.662
Female	Frequency of allogrooming	4.8 $\pm$ 1.50	3.86 $\pm$ 1.60	U=12.5	0.432
Female	Time spent in allogrooming	1.96 $\pm$ 0.9	1.26 $\pm$ 0.34	t=0.63	0.543

## Discussion

In the inbreeding avoidance analyses, the significantly lower level of relatedness in PRP than in nestmate pairs shows that inbreeding avoidance mechanisms are operating in *N. chilensis*, consistent with findings on most termite species where inbreeding has been estimated through

genetic analysis (Vargo and Husseneder 2011). The significantly higher relatedness of nestmates with respect to alates from both swarming events shows that indirect mechanisms of inbreeding avoidance are taking place, consistent with the inbreeding/outbreeding ratio of 0.057 found in swarming individuals caught in traps; furthermore, the non-significant differences between alates from both swarming events and PRP show that active mechanisms of inbreeding avoidance are not taking place. The non-significant differences between both swarming events studied suggest that the mean relatedness in a swarm is a phenomenon which occurs independent of the year, number of traps set and number of alates caught in them.

These preliminary conclusions were further explored. Data on emerging alates showed the absence of sex-biased production at colony level and the occurrence of male-biased emergence (protandry) in only one of the seven colonies analyzed. Furthermore, the analyses of genetic differentiation, degree of relatedness, inbreeding index and assignment index correction performed for each sex separately showed that sex-biased dispersal of alates was non-significant or at least not strong enough to be detected by these analyses (Favre et al. 1997); thus, inbreeding avoidance cannot be achieved on the basis of males from a given colony being able to disperse differently in terms of distance from females of that colony, and viceversa. Finally, the lack of isolation by distance for both sexes together showed that alates were able to disperse for distances at least equal to the maximal distance between traps; in other words, swarming individuals within the study area were able to meet, independent of the distance between their colonies of origin. Hence, this dispersion capacity constitutes the main mechanism of inbreeding avoidance.

On the other hand, genetic and behavioral analyses of bioassays performed in the laboratory showed conclusively the absence of nestmate recognition because mate choice

differences were found despite the significantly different relatedness levels between the interacting pairs, and since genetic relatedness of pairs which mated was not significantly different from that of pairs which did not mate, absence of kin recognition during mating could also be concluded. Moreover, in colonies formed in the laboratory mating occurred between all pairs of de-alates, whether they corresponded to nestmates or non-nestmates, and non-significant differences were found between the number of eggs laid in the artificial colonies formed by nestmates and by non-nestmates. Thus, these laboratory experiments support the notion that recognition during swarms is not important for inbreeding avoidance.

The present results agree with those of DeHeer and Vargo (2006) who showed that the likelihood that the termites *R. flavipes* and *R. virginicus* paired with siblings was inversely related to their inferred dispersal abilities. Furthermore, Husseneder et al. (2006) found low mean relatedness of PRP of the separate-piece termite *Coptotermes formosanus*, thus suggesting inbreeding avoidance; in addition, they found that mean relatedness among alates was not different from that of PRP, and concluded that indirect mechanisms are sufficient to explain the inbreeding avoidance observed and that it is not necessary to postulate an active mechanism to explain it.

The present study explored for the first time the occurrence of all described indirect and active mechanisms of inbreeding avoidance in the founding of a new colony in a single species of termite using a variety of approaches. It showed that dispersal of alates as indirect mechanism is sufficient to explain the low levels of inbreeding found in PRP of *N. chilensis* and provided strong support to the idea that kin recognition is not involved in inbreeding avoidance during the founding of a new colony in a single-piece termite.

**Acknowledgments** This work was financially supported by FONDECYT Grant 1120210 to HMN, CONICYT Grant 79100013 to LF-P, CONICYT PFB-23 and ICM P05-002 Grants to DV, and CONICYT fellowship for PhD studies and MECESUP internship program to DA-O. The able technical assistance of Daniel Benítez, Carolina Mendoza and Evelyn Pena is gratefully acknowledged.

## References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 1996.** GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>. Accessed 13 May 2013
- Blanchard E. 1851.** I Termianos. In: Gay C (ed) *Historia Física y Política de Chile*, vol 6. Maulde y Renou, París, pp 87–91.
- Blumstein D. T., Daniel J. C., Evans C. S. 2006.** JWatcher v1.0. <http://www.jwatcher.ucla.edu>. Accessed 12 June 2013.
- Calleri D. V., Reid E. M., Rosengaus R. B., Vargo E. L., Traniello J. F. E. 2007.** Inbreeding and disease resistance in a social insect: effects of heterozygosity on immunocompetence in the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 273: 2633–2640. doi:10.1098/rspb.2006.3622.
- Charlesworth D., Willis J. H. 2009.** The genetics of inbreeding depression. *Nature Rev. Genet.* 10: 783–796. doi:10.1038/nrg2664.
- DeHeer C. H., Vargo E. L. 2006.** An indirect test of inbreeding depression in the termites *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 753–761. doi:10.1007/s00265-005-0105-9.
- Eggleton P. 2011.** An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology. In: Bignell D. E., Roisin Y., Lo N. (eds) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer Science+Business Media p: 1–26.
- Favre L., Balloux F., Goudet J., Perrin N. 1997.** Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocidura russula*: Evidence from field data and microsatellite patterns. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264: 127–132. doi:10.1098/rspb.1997.0019.
- Fei H. X., Henderson G. 2003.** Comparative study of incipient colony development in the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insect. Soc.* 50: 226–233. doi:10.1007/s00040-003-0666-4
- Gajardo R. 1994.** *La Vegetación Natural de Chile. Clasificación y Distribución*. Editorial Universitaria, Santiago, pp 165.

- Goodnight K. F., Queller D. C. 1999.** Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Mol. Ecol.* 8:1231–1234. doi:10.1046/j.1365-294x.1999.00664.x.
- Goudet J., Perrin N., Waser P. 2002.** Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Mol. Ecol.* 11: 1103-1114. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01496.x.
- Hu J., Zhong J-H., Guo M-F. 2007.** Alate dispersal distances of the black-winged subterranean termite *Odontotermes formosanus* (Isoptera: Termitidae) in southern China. *Sociobiology* 50: 1-8.
- Husseneder C., Simms D. M. 2008.** Size and heterozygosity influence partner selection in the Formosan subterranean termite. *Behav. Ecol.* 19: 764-773. doi:10.1093/beheco/arn041.
- Husseneder C., Messenger M. T., Su N-Y., Grace J. K., Vargo E. L. 2005.** Colony social organization and population genetic structure of an introduced population of Formosan subterranean termite from New Orleans, Louisiana. *J. Econ. Entomol.* 98:1421–1434. doi:10.1603/0022-0493-98.5.1421.
- Husseneder C., Simms D. M., Ring D. R. 2006.** Genetic diversity and genotypic differentiation between the sexes in swarm aggregations decrease inbreeding in the Formosan subterranean termite. *Insect. Soc.* 53: 212–219. doi:10.1007/s00040-005-0860-7.
- Husseneder C., Simms D. M., Riegel C. 2007.** Evaluation of treatment success and patterns of reinfestation of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 100:1370–1380. doi:10.1603/0022-0493(2007)100[1370:EOTSAP]2.0.CO;2.
- Jones O.R., Wang J. 2010.** COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 551-555. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x.
- Kristensen T. N., Pedersen K. S., Vermeulen C. J., Loeschke V. 2010.** Research on inbreeding in the ‘omic’ era. *Trends Ecol. Evol.* 25: 44-52. doi:10.1016/j.tree.2009.06.014.
- Lenz M., Runko S. 1993.** Long-term impact of orphaning on field colonies of *Coptotermes lacteus* (Froggatt) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insect. Soc.* 40: 439–456. doi:10.1007/BF01253906.



- Luchetti A., Velona A., Mueller M., Mantovani B. 2013.** Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insect. Soc* 60:203–211. doi:10.1007/s00040-013-0284-8.
- Matsuura K., Vargo E. L., Kawatsu K. Labadie P. E., Nakano H., Yashiro T., Tsuji K. 2009.** Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science* 323:1687. doi:10.1126/science.1169702.
- Messenger M. T., Mullins A. J. 2005.** New flight distance recorded for *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Fla. Entomol.* 88:99–100. doi:10.1653/0015-4040(2005)088[0099:NFDRFC]2.0.CO;2.
- Michener, C. D., Smith, B. H. 1987.** Kin recognition in primitively eusocial insects. In: Kin recognition in animals. Wiley, Chichester, pp 209–242.
- Morbey Y. E., Ydenberg R. C. 2001.** Protandrous arrival timing to breeding areas: a review. *Ecol. Letters* 4: 663-673. doi:10.1046/j.1461-0248.2001.00265.x.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pusey A., Wolf. M. 1996.** Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol. Evol.* 11: 201-206. doi:10.1016/0169-5347(96)10028-8.
- Queller D. C., Goodnight K. F. 1989.** Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43:258–275. doi:10.2307/2409206.
- 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.
- Rippa R., Luppichini P. 2004.** Especies de termites de importancia económica en presentes en Chile. In *Termitas y otros insectos xilófagos en Chile: Especies, Biología y Manejo* (ed. R. Rippa & P. Luppichini). Pp. 73-105. Colección libros INIA. Santiago, Chile.
- Roisin Y., Lenz M. 2002.** Origin of male-biased sex allocation in orphaned colonies of the termite, *Coptotermes lacteus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51: 472–479. doi:10.1007/s00265-002-0453-7.

- Shellman-Reeve J.S. 1996.** Operational sex ratios and lipid reserves in the dampwood termite *Zootermopsis nevadensis* (Hagen) (Isoptera: Termopsidae). *J. Kans. Entomol Soc.* 69: 139–146.
- Shellman-Reeve J. S. 1999.** Courting strategies and conflicts in a monogamous, biparental termite. *Proc R Soc Lond B* 266:137–144. doi:10.1098/rspb.1999.0613.
- Shellman-Reeve, J. S. 2001.** Genetic relatedness and partner preference in a monogamous, wood-dwelling termite. *Anim. Behav.* 61: 869–876. doi:10.1006/anbe.2000.1674.
- Siegel, S., Castellan Jr, N. J. 1988.** Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2nd edn. New York, NY: McGrawHill International Editions.
- Smith, B. H., Breed, M. D. 1995.** The chemical basis for nestmate recognition and mate discrimination in social insect. In *Chemical ecology of insects 2* (ed. R. T. Cardé & W. J. Bell), pp. 387-317. New York, NY: Chapman & Hall.
- Tabadkani S. M., Nozari J., Lihoreau M. 2012.** Inbreeding and the evolution of sociality in arthropods. *Naturwissenschaften* 99:779–788. doi:10.1007/s00114-012-0961-x.
- Thorne B. L. 1997.** Evolution of eusociality in termites. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 27–54. doi:10.1146/annurev.ecolsys.28.1.27.
- Vargo E. L., Husseneder C. 2011.** Genetic structure of termite colonies and populations. In: Bignell D. E., Roisin Y., Lo N. (eds) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer Science+Business Media p: 321-247.
- Vargo E. L., Husseneder C., Woodson D. Waldvogel M. G., Grace J. K. 2006.** Genetic analysis of colony and population genetic structure of three introduced populations of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Continental United States. *Environ. Entomol.* 35: 151–166. doi:10.1603/0046-225X-35.1.151.
- Vargo E. L., Labadie P. E., Matsuura K. 2012.** Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proc R Soc Lond B* 279:813–819. doi:10.1098/rspb.2011.1030.
- Weir B. S., Cockerham C. C. 1984.** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

## Electronic supplementary material

### Development of microsatellites

Genomic DNA was obtained from the head and thorax of termites in order to avoid DNA contamination from gut endosymbionts (Indrayani *et al.*, 2006); the Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit was used for such purpose. The microsatellite library was developed by ATG Genetics (Vancouver, BC, Canada). Template DNA of one individual was digested by using the restriction enzymes *Hae* III, *Alu* I and *Rsa* I. DNA was modified by linking an adaptor with T4 DNA ligase and the linker primers M28 (5' CTCTTGCTTGAATTCGGACTA) and M29p (5' TAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACACA). Enrichment was performed through biotin capture of dinucleotide (AG<sub>10</sub> and TG<sub>10</sub>) and tetranucleotide (GATA<sub>6</sub> and CATA<sub>6</sub>) microsatellites. T4 ligase was used to ligate into the *Eco*RI site of *Escherichia coli* DH10B. Ninety-five plasmid clones containing a dinucleotide or tetranucleotide motif were purified and amplified by PCR. Twenty primer pairs were designed using PRIMER 3.0 (Untergrasser *et al.*, 2012), of which ten gave reliable amplifications and polymorphisms in a first view in agarose gel electrophoresis. In order to evaluate polymorphism in an automatic sequencer, reverse primers of each microsatellite were marked with a fluorescent dye.

Genetic variability was assessed in 38 adult individuals collected from Las Chilcas. Polymerase chain reaction (PCR) amplification mixtures (12 µL) contained 100 ng template DNA, 0.25 µM of each primer, 100 µM of each dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µL 10x PCR buffer and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Cycling conditions consisted of an initial denaturing step of 3 min at 95° C, followed by 33 cycles consisting of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C

and 90 s at 72° C, and a final elongation step at 72° C for 5 min. The PCR products obtained were first visualized on 1.5% agarose gels stained with SYBR Safe (Invitrogen). Later on, reverse primers were marked with a dye (FAM, NED, PET and VIC) for visualization in an automatic DNA sequencer. PCR products with fluorescent primers were genotyped by MacroGen Inc. ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) using the internal size standard LIZ 500 (Applied Biosystems) and scored by using Peak Scanner software (Applied Biosystems). Clone sequences were published in Genbank with accession numbers from JX504719 through to JX504728 (Table S1).

Number of alleles per locus, linkage disequilibrium, and expected ( $H_E$ ) and observed ( $H_O$ ) heterozygosities were estimated using the GENETIX 4.0.5 software (**Belkhir *et al.*, 1996**). Conformance to Hardy-Weinberg expectations (HWE) was estimated by using the permutation test associated with the  $F_{IS}$  index calculation implemented in the GENETIX software. MICROCHECKER software (**van Oosterhout *et al.*, 2004**) was used to identify genotyping errors due to null alleles, large allele dropout and stuttering peaks.

**Table 5.** Primer sequences and characteristics for ten microsatellite loci for *Neotermes chilensis* from Las Chilcas (32°52'S; 70°52'W). N, number of individuals analyzed;  $H_o/H_e$ , observed and expected heterozygosity;  $F_{is}$  according to Weir and Cockerham (1984), \* $P < 0.01$  for significant departures from HWE tested after 2000 permutations in GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996);  $N_A$ , number of alleles.

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	GenBank Accession no.	N	$H_o/H_e$	$F_{is}$	$N_A$	Size range (bp)
Nchiltet2	F: CTCCTGATATCTAGTGTGTG	(CATA) <sub>3</sub> ..(AC) <sub>4</sub> (TAC) <sub>6</sub>	JX504719	36	0.44/0.42	-0.039	6	198-216
	R: CTTTCAGGGACTATTCACAAC							
Nchiltet3	F: CCCATCCCTTATACATACATAC	(GTAT) <sub>4</sub> ..(GTAT) <sub>4</sub>	JX504720	19	0.21/0.19	-0.059	3	150-182
	R: GAATTCGAAATACCCATCGAGA							
Nchiltet4	F: TGACCCCTCTGTATCAITTTCTG	(CA) <sub>10</sub> ..(CATA) <sub>8</sub>	JX504721	37	0.78/0.92	0.164	20	145-197
	R: GAATTCATGGACCACTCCC							
Nchiltet5	F: GCAATATCAITTCGACGCAAA	(CATA) <sub>7</sub>	JX504722	32	0.21/0.74	0.713*	7	223-247
	R: GTGCAAGGGCTGATTTTGT							
Nchiltet6	F: GGGGTGTATCCGTGAGCAT	(CATA) <sub>5</sub> ..(CATA) <sub>4</sub> ..(CATA) <sub>12</sub> ..(CATA) <sub>8</sub>	JX504723	38	0.74/0.78	0.065	9	202-242
	R: ATTGATCCAATGCGTCACAA							
Nchiltet10	F: AAGGAGTCCCACCAACTGTG	(CTAT) <sub>4</sub> (CCAT) <sub>3</sub> (CTAT) <sub>4</sub> (CCAT) <sub>4</sub>	JX504724	36	0.53/0.76	0.319*	12	221-265
	R: AACCATCCTGCCTGCTATTG							
Nchiltet17	F: ATGCAAGGGAAGTCAGCACT	(GATA) <sub>5</sub> ..(GATA) <sub>4</sub>	JX504725	38	0.34/0.59	0.427*	4	241-251
	R: GAGTCCAACCCCTGTGTAT							
Nchild17	F: GGATTTGTTGGACCCITTTGA	(TG) <sub>16</sub>	JX504726	34	0.75/0.66	-0.102	7	157-171
	R: GTTCGGCAAATTCAGAGGAAG							
Nchild18	F: ACCTTCCTATACACACACACA	(GT) <sub>11</sub>	JX504727	19	0.68/0.67	0.002	7	116-128
	R: GAATTCCTCAACTTCTTCGT							
Nchild19	F: ACACCTGAACATGGGTACC	(C) <sub>11</sub> (CA) <sub>12</sub>	JX504728	34	0.58/0.72	0.201	6	245-259
	R: AAACGAGGCTTTAATCGAACC							

## **Results and discussion of Electronic supplementary material**

From the 95 plasmid clones analyzed, ten showed polymorphic microsatellites, seven with tetranucleotide and three with dinucleotide motifs. In the individuals analyzed, between 3 and 20 alleles per locus were observed (Table S1). The number of alleles obtained point to the utility of these markers for population structure and relatedness studies. Estimated heterozygosities showed the Nchiltet17 locus to have significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Analysis with the MICROCHECKER software suggested possible null alleles in two loci (Nchiltet4 and Nchildi9), no errors due to allele dropout and no stutter peaks present. Furthermore, no significant linkage disequilibrium was observed among pairs of loci studied, indicating that they were not physically linked in the chromosomes. The deficit of heterozygotes in some loci cannot be attributed to the occurrence of null alleles; additional studies including other populations would be necessary to elucidate this deficit.

## **References to Electronic supplementary material**

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 1996.** GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Indrayani Y., Matsumura K., Yoshimura T., Imamura Y., Itakura S. 2006.** Development of microsatellite markers for the drywood termite *Incisitermes minor* (Hagen). Mol. Ecol. Notes 6: 1249–1251.

- Untergrasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. 2012.** Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40: e115.
- van Oosterhout C., Hutchinson W., Wills D., Shipley P. 2004.** MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535-538.
- Weir B. S., Cockerham C. C. 1984.** Estimating  $F$ -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.