

UCH-FC
B. Ambiental
B 957
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

RECONOCIMIENTO DE COMPAÑEROS DE NIDO Y DEFENSA DE COLONIAS POR
SOLDADOS DE *Neotermes chilensis* (ISOPTERA: KALOTERMITIDAE)

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Bióloga, mención medio ambiente.

CAMILA BURGOS LEFIMIL

Director: Dr. Luis Flores Prado

Co-director: Dr. Hermann Niemeyer Marich

Santiago de Chile, Septiembre 2015



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

CAMILA ELIZABETH BURGOS LEFIMIL

“RECONOCIMIENTO DE COMPAÑEROS DE NIDO Y DEFENSA DE COLONIAS POR SOLDADOS DE *Neotermes chilensis* (ISOPTERA: KALOTERMITIDAE)”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

Dr. Luis Flores Prado
Director Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Hermann Niemeyer Marich
Co-Directora Seminario de título

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.
Un sello circular con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE" rodeado por estrellas.

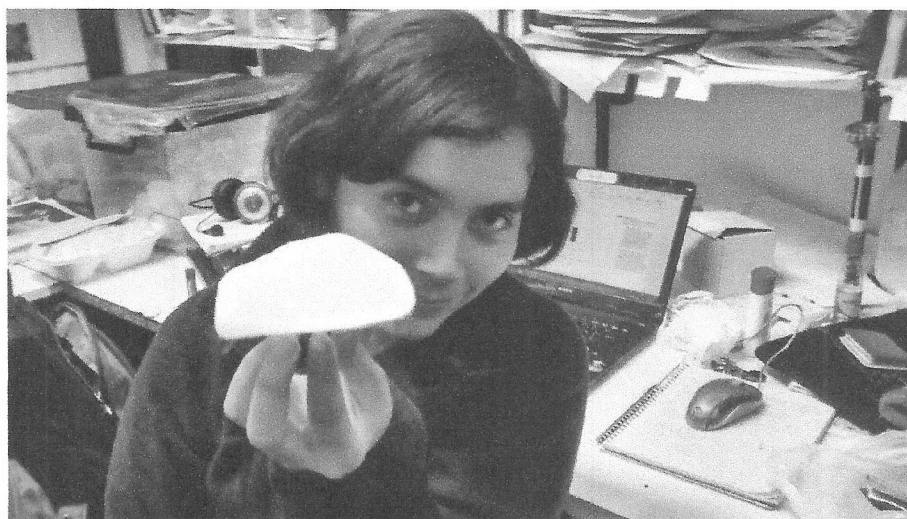
Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Claudio Veloso Iriarte
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

MSc. Patricia Estrada Mancilla
Evaluador

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Una Camila en su entorno natural: escritorio desordenado, restos de papel y comida, cremas, con el computador en los comentarios de la tesis y jugando con cosas que no había visto nunca, como en este caso, CO_2 sólido. Es entropía, hay que aceptarla y no vale la pena gastar energía innecesariamente para combatirla.

Ingresé a bachillerato por la curiosidad de aprender sobre ciencias sociales, era una buena oportunidad para estudiar temas de áreas a las que no me dedicaría, ya que sabía que mi lado era las ciencias naturales y en particular la biología. Animada por un profesor de filosofía, postulé a bachillerato y quedé. Fue un proceso difícil pero apasionante, que me ayudó a ampliar mi mente, y poder integrar lo aprendido en diferentes áreas del conocimiento y ver las temáticas en la carrera desde diferentes perspectivas. En abril 2010 ingresé a Biología Ambiental, en primero-segundo-tercer año, tenía tantos ramos homologados y me faltaban tantos de primer año que me paseaba por todos los niveles casi. En diciembre de 2010 vi un letrero en el baño de niñas de un tesista doctoral que necesitaba un ayudante en temas conductuales en insectos, habiendo tenido el año anterior el ramo de etología en bachillerato (donde salí enamorada del estudio de la conducta) y después de tantos veranos en clases por bachillerato, me dije “total un verano más en la U, no creo que sea tan terrible” y escribí el mail. Ingresé al Laboratorio de Química Ecológica en diciembre de 2010 por una pasantía de verano, recibí una muy buena evaluación que después me dijeron que no tenía nota formal, donde mi estadía en el laboratorio no sería mayor a seis meses. Y aquí estoy, terminando mi seminario de título (o “la tesis”) en 2015, con la compañía y el apoyo de cada una de las personas que, de una u otra forma, ayudaron a que “la tesis” tuviera un final feliz.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano, por el apoyo incondicional y amor constante.

A mi abuela y mi tío por la acogida en su casa siempre y por cuidarme a los cuys, erizos, cocodrilos y cuanto animal hay en “el paraíso de Darwin” (mi pieza, mi padre le puso nombre).

A mi familia en general en Santiago y Concepción, por sus ¿y cómo va la tesis? o ¿y cuándo vas a salir? y otras palabras de ánimo, son geniales.

A Termiteam y todo LQE por la logística, las ganas de ayudar en cualquier cosa, el buen ambiente y todo lo geniales que son (no quise poner nombres porque si se me iba uno, sería terrible, siéntanse todos aludidos).

A Daniel por la paciencia, por la paciencia, por la paciencia, por la paciencia, por la paciencia y por la paciencia (sólo fueron 13 km, deja de llorar por eso).

A Hermann por recibirme en un laboratorio de ecología sin haber cursado ecología, y haber creído en mí y a Luis por las ganas de enseñarme cada vez que no entendía algo y su apoyo en las correcciones como tutor.

A mis amigos que me aguantaron los lloriqueos cuando los experimentos no salían, yo sé que no les importaba, pero gracias por escuchar, tampoco pondré nombres por motivos antes mencionados, siéntanse aludidos.

A Mati por ser Mati, y animarme a estudiar pingüinos (tal vez algún día Mati lo entienda)

A mi Pipe, por ser mi Pipe y ~~retarme~~ animarme cuando no quería ver videos/escribir la tesis/hacer las diapos/dejar de procrastinar/etc.

A las termitas por su sacrificio (literal) y por cooperar (casi siempre) en los experimentos.

A los que se leerán la tesis y a los que seguramente sólo leyeron la dedicatoria y la biografía, por parecer más entretenidas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1120210 a Hermann Niemeyer Marich, CONICYT 7910013 a Daniel Aguilera-Olivares y CONICYT 79100013 a Luis Flores-Prado. Mis agradecimientos también al equipo técnico Carolina Mendoza, Benjamín Thielemann, Daniel Benitez y Daniel Aguilera por su disposición y enseñanzas.

*“Será necesario soportar la molestia de dos o tres orugas,
si quiero conocer las mariposas; creo que son muy hermosas”*

La rosa, El principito, Antoine de Saint-Exupéry

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. Problema estudiado.....	11
3.2. Hipótesis	12
3.3. Objetivo general.....	12
3.4. Objetivos específicos	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. Descripción del área de estudio	13
4.2. Modelo de estudio, colecta y manipulación	14
4.3. Diseño experimental	15
4.4. Análisis de compuestos cuticulares	16
4.5. Bioensayos con compuestos cuticulares	18

4.6. Análisis de videos y conductas de bioensayos	19
4.7. Índice conductual.....	20
4.8. Análisis estadístico de los resultados de los bioensayos	24
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Reconocimiento de compañeros de nido	22
5.2. Análisis químico	23
5.3. Comparación química entre compañeros y no compañeros de nido	26
5.4. Comparación química entre sitios de estudio	27
5.5. Bioensayos químicos	27
6. DISCUSIÓN	30
7. CONCLUSIONES	34
8. REFERENCIAS.....	35
9. ANEXO.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las conductas observadas en bioensayos con

N. chilensis.....20

Tabla 2. Compuestos químicos presentes en extractos cuticulares de

N. chilensis.....24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pareja de reproductores primarios de <i>N. chilensis</i>	7
Figura 2. Grupo de pseudo-obreras de <i>N. chilensis</i>	8
Figura 3. Soldado de <i>N. chilensis</i>	8
Figura 4. Ciclo de vida de <i>N. chilensis</i>	9
Figura 5. Mapa de ubicación de los sitios de muestreo	13
Figura 6. Tallos florales secos (escapos) de <i>P. berteroniana</i>	14
Figura 7. Ejemplo de nido en tul. Colecta en terreno	15
Figura 8. Reinterpretación de los bioensayos conductuales ejecutados por Melendez (2014)	22
Figura 9. Cromatograma maestro	23
Figura 10. Comparación de los índices de similitud química entre individuos de distintas castas, donde las parejas interactuantes son compañeros de nido	25
Figura 11. Comparación de los índices de similitud química entre compañeros y no compañeros de nido usando combinaciones de soldados con todas las otras castas	26
Figura 12. Comparación de los índices de similitud entre sitios (LD-LC) e intrasitio (LD-LD y LC-LC)	27
Figura 13. Bioensayo químico (promedios \pm error estándar). 13a: soldado frente a reproductor primario muerto por congelamiento, con sus compuestos químicos cuticulares	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ANDEVA	Análisis de la Varianza
DER	Derivatizaciones
EM	Espectros de masa
ES	Estándares químicos
FPI _i	Factor de ponderación de la conducta intolerante i
FPT _i	Factor de ponderación de la conducta tolerante i
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
HCC	Hidrocarburos cuticulares
IC	Índice Conductual
IR	Índice de retención
LC	Cuesta Las Chilcas
LD	Cuesta La Dormida
n.s.	Diferencias no significativas
PA	Para análisis
PO	Pseudo Obrero
RP	Reproductor Primario
S	Soldado
TTCT _i	Tiempo total de la conducta intolerante i
TTCT _i	Tiempo total de la conducta tolerante i

RESUMEN

En insectos sociales, el reconocimiento de compañeros de nido soporta la estructura social de las colonias. Las termitas son insectos sociales en las que pueden distinguirse tres castas principales: reproductores primarios encargados de la reproducción, obreras o pseudo-obreras encargadas de la mantención del nido, y soldados encargados de la defensa de la colonia. De acuerdo con su conducta de nidificación, se reconocen tres tipos de termitas: a) de una pieza, que anidan y forrajean en un mismo sustrato de madera, b) termitas de piezas separadas, que anidan y forrajean en sustratos diferentes, teniendo que salir del nido para obtener los recursos alimenticios, y c) termitas de piezas intermedias, que anidan y forrajean en un mismo sustrato, pero que tienen la capacidad de cambiar de sustrato si el alimento en él se hace escaso. La presencia de soldados en colonias de piezas separadas y de piezas intermedias se explica dado el flujo de individuos entre la colonia y el exterior de esta, considerando que el rol de los soldados es defender a las termitas que salen a forrajear y evitar que intrusos entren al nido. La presencia de soldados parece menos comprensible en el caso de las nidificadoras de una pieza, tomando en cuenta que no toman contacto con el exterior del nido, solo cuando fundan uno nuevo. Una hipótesis que explicaría la presencia de soldados en termitas de una pieza, es que éstos cumplirían un rol defensivo ante dos situaciones que podrían ocurrir en un contexto natural: a) la búsqueda de un lugar donde anidar, por parte de una pareja recién formada que requiere fundar una nueva colonia, lugar que puede estar ocupado por una colonia residente y b) el establecimiento de una colonia en un sustrato

donde ya existe otra, situación en que los obreros o pseudo obreros de ambas colonias vecinas pueden convertirse en invasores cuando excavan las galerías de sus colonias en expansión. Si esta hipótesis es correcta, entonces los soldados deberían tener la capacidad de discriminar entre compañeros y no compañeros de nido de diferentes castas y, como en otros insectos sociales, este reconocimiento podría estar mediado por hidrocarburos cuticulares. En este seminario de título, se reanalizaron los datos de bioensayos conductuales obtenidos por Melendez (2014) de modo de evaluar el fenómeno de reconocimiento de compañeros de nido. Además se analizaron los extractos de compuestos químicos cuticulares de los individuos utilizados en los bioensayos conductuales antes mencionados, y así hacer una comparación entre composición química y conducta. Para evaluar el rol de los hidrocarburos cuticulares se realizaron nuevos bioensayos entre un soldado y un reproductor muerto bajo diferentes tratamientos. Los resultados evidenciaron el fenómeno de reconocimiento de compañeros de nido, dado que el soldado mostró mayor agresión hacia no compañeros de nido que hacia compañeros de nido; encontrándose que los hidrocarburos cuticulares fueron los que, al menos en parte, mediaron este reconocimiento.

ABSTRACT

In social insects, nestmate recognition supports the social structure of colonies. Termites are social insects that can be classified in three main castes: primary reproducers in charge of reproduction, workers or pseudo-workers in charge of nest maintenance, and soldiers in charge of colony defense. According to their nesting behavior, three kinds of termites are recognized: a) one-piece nesters that nest and forage in a single piece of wood, b) separate-piece nesters that nest and forage in different substrates, leaving the nest to obtain their food supply, and c) intermediate-piece termites that nest and forage in the same substrate, but have the capacity to change substrate if food becomes scarce. The presence of soldiers in separate and intermediate colonies is explained by the flow of individuals between the colony and the outside, considering that the role of soldiers is to defend foragers and avoid intruders entering the nest. The presence of soldiers appears less understandable in one-piece nesters which do not have contact with the outside. The presence of soldiers in a defensive context within the colony in one-piece termites may be hypothesized when: i) the recently paired couples search for a nesting site during swarming, and ii) when in the same substrate neighboring conspecific colonies coexist whose workers or pseudo-workers can become invaders when they dig galleries and expand the colony. If these hypotheses are correct, then soldiers should have the capacity to discriminate between nestmates and non-nestmates of different castes and, as in other social insects, this recognition could be mediated by cuticular hydrocarbons. In this thesis, behavioral bioassay data extracted from Melendez (2014) were reanalyzed to evaluate nestmate recognition. Cuticular chemical compounds were analyzed for the bioassayed

individuals used in behavioral bioassays aforementioned and then, a correlation between chemical and behavioral data was assessed. To establish the role of cuticular hydrocarbons, new bioassays were performed between a soldier and a dead reproductor under different treatments. Results showed the phenomenon of nestmate recognition, given that soldiers showed greater aggression towards non-nestmates than nestmates; moreover, cuticular hydrocarbons were found to mediate this recognition.

INTRODUCCIÓN

El reconocimiento es la capacidad que tiene un individuo de identificar a otros individuos, tanto de su especie como de otras especies (Sherman y col. 1997). El reconocimiento intraespecífico permite la identificación entre los miembros de una especie en diversos contextos. Por ejemplo, en la elección de pareja reproductiva, el reconocimiento de parentesco podría jugar un rol clave en alcanzar un balance óptimo entre endogamia y exogamia (Bateson 1983), mientras que en un contexto social, el reconocimiento de compañeros de nido sería importante en mantener la estructura de la colonia (Hölldobler y Wilson 1990), favoreciendo una alta cooperatividad y una baja agresión entre sus miembros (Paxton y col. 1999). El reconocimiento se hace posible cuando un organismo (o más de uno) porta o emite una señal (de naturaleza química, visual, vibratoria, etc.), que es detectada y procesada por otro organismo, el cual responde a nivel fisiológico o conductual. La constatación de esta respuesta permite evidenciar la ocurrencia del fenómeno de reconocimiento, de modo que si un individuo responde diferencialmente frente a distintos organismos que poseen (o emiten) señales particulares, tal respuesta se conoce como discriminación conductual (Smith y Breed 1995). En tal sentido, se ha demostrado en diversas especies de insectos sociales la ocurrencia de conductas menos intolerantes hacia individuos de la misma colonia y más intolerantes hacia individuos provenientes de colonias distintas (Michener y Smith 1987). Dado que el éxito de las sociedades de insectos depende de la habilidad de sus miembros de defender sus recursos y de mantener la viabilidad de la colonia (Šobotník y col. 2008), se postula que el valor

adaptativo del reconocimiento está vinculado también con la defensa de la colonia (Breed y Bennett 1987).

Estudios en insectos de diferentes grupos taxonómicos (Kaib y col. 2004; Gadagkar 1985; Waldman 1988) han demostrado que el reconocimiento de compañeros de nido depende de señales olfatorias (o químicas) para discriminar a los miembros del grupo familiar de otros conespecíficos (Smith y Breed 1995), siendo los compuestos cuticulares de baja volatilidad (Smith y Breed 1995), en particular los hidrocarburos cuticulares (HCC), los que cumplirían un rol como principal señal de reconocimiento (Singer 1998, Kaib y col. 2002). Estos compuestos tienen además como función posibilitar la retención del agua, proteger contra la abrasión, y actuar como barrera contra microorganismos (Howard y Blomquist 1982).

Las termitas (Isoptera) son un grupo de insectos sociales con desarrollo hemimetábolo (Lo y Eggleton 2011, Ripa y Luppichini 2004), que viven en colonias constituidas por castas, principalmente reproductores (Figura 1), obreros o pseudo-obreros (Figura 2) y soldados (figura 3). Los reproductores se refieren a rey, reina y alados; la reina generalmente es la única que pone huevos y el rey la fecunda constantemente (Korb 2008), en tanto los alados son reproductores con alas que nacen en una colonia y están preparados para abandonar el nido en un evento de enjambrazón y potencialmente fundar nuevas colonias (Eggleton 2011). Por otro lado, los reproductores se pueden categorizar en primarios (aquellos que fundan una nueva colonia después de la enjambrazón) y secundarios o neoténicos (reproductores que nunca han tenido alas y que se desarrollaron dentro del nido a través de una sola muda en la cual sus gónadas crecieron y se desarrollaron) (Korb y Hartfelder 2008). Los obreros o pseudo-obreros constituyen la

casta más abundante dentro de la colonia, cumpliendo labores de recolección de alimento y agua, construcción y mantención del nido, cuidado de crías y de las otras castas (Eggleton 2011). Los pseudo-obreros difieren de los obreros pues son individuos que carecen de diferenciación morfológica y, a diferencia de los obreros, tienen la potencialidad de transformarse en alados o en soldados o mantenerse como pseudo-obreros toda su vida (Korb y Hartfelder 2008); finalmente los soldados son responsables de la defensa del nido (Noirot y Darlington 2000) y en particular del rey y de la reina (Korb y Hartfelder 2008).



Figura 1: Pareja de reproductores primarios de *Neotermes chilensis*



Figura 2: Grupo de pseudo-obreras (blancas) de *Neotermes chilensis*.



Figura 3: Soldado de *Neotermes chilensis*

En un evento de enjambrazón, los individuos alados abandonan la colonia, encuentran pareja y buscan un sustrato (madera o suelo, dependiendo de la especie) donde construir su nido y así fundar una nueva colonia (Eggleton 2011); dicho sustrato puede estar libre de termitas o puede ser uno con colonias ya establecidas (Figura 4).

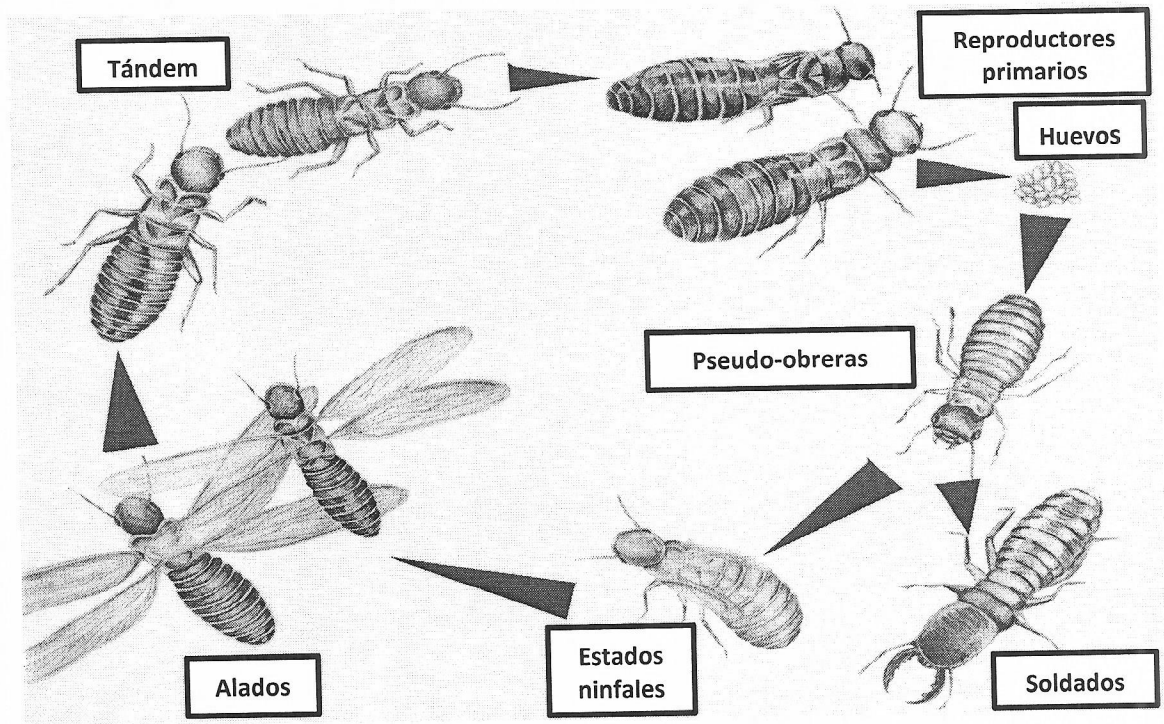


Figura 4: Ciclo de vida de *Neotermes chilensis*.

Según su conducta de nidificación las termitas han sido agrupadas en tres categorías (Eggleton y Tayasu 2001): i) nidificadoras de múltiples piezas, que anidan y forrajean en sustratos diferentes, ii) nidificadoras de una pieza, que anidan y forrajean en un mismo sustrato y iii) nidificadoras de piezas intermedias, que anidan y forrajean en un mismo sustrato, pero tienen la capacidad de moverse a otro cuando el recurso se torna escaso.

En termitas de múltiples piezas y de piezas intermedias, la casta obrera sale del nido en busca de alimento para la colonia, los soldados defienden a la colonia de potenciales competidores intraespecíficos como miembros de otras colonias, e interespecíficos como potenciales depredadores (Korb y Hartfelder 2008). Sin embargo, en termitas de una pieza, no hay flujo de individuos hacia o desde el exterior (Korb y Hartfelder 2008), por lo cual el rol defensivo de los soldados se manifestaría en interacciones con depredadores o interacciones intraespecíficas ya sea durante la enjambrazón, cuando la pareja que fundará una nueva colonia busca un lugar de nidificación y cabe la posibilidad que ella intente nidificar en sustratos ya ocupados; o frente a la presencia de colonias vecinas que pudieran constituir también eventuales fuentes de invasiones. En cualquiera de estas situaciones, el papel defensivo de los soldados se basa en su capacidad para distinguir entre compañeros de nido y no compañeros de nido.

En termitas de múltiples piezas, se ha demostrado que los HCC están involucrados en el reconocimiento de compañeros de nido (Clément y Bagnères 1998, Batista-Pereira y col. 2004, Kaib y col. 2004). No se han publicado trabajos sobre reconocimiento de compañeros de nido en termitas nidificadoras de una pieza.

Neotermes chilensis (Kalotermitidae) es una de las cinco especies de termitas descritas en Chile. Es una termita endémica, nidificadora de una pieza, que en la zona central de Chile coloniza la madera seca de distintas especies nativas. Entre sus hospederos se encuentran los escapos secos del chagual (*Puya spp.*) (Ripa y Luppichini 2004). En estos últimos, se ha observado que un mismo escapo puede contener una o más colonias (datos no publicados), y bioensayos preliminares han mostrado que la agresividad

de los soldados hacia individuos de otras castas aumenta en la medida que la distancia entre los nidos sometidos a interacción aumenta; sin embargo, los niveles de agresividad no varían entre castas (Melendez 2014).

Problema estudiado

De acuerdo con las observaciones preliminares en *N. chilensis*, los niveles de agresividad de los soldados hacia individuos de distintas castas son mayores conforme aumenta la distancia de procedencia de las colonias y a su vez son menos agresivos hacia individuos compañeros de nido de diferentes castas que hacia individuos provenientes de otras colonias, lo cual es un indicador conductual del fenómeno de reconocimiento entre compañeros de nido. Adicionalmente, en termitas nidificadoras de múltiples piezas, en las que se ha evidenciado discriminación entre compañeros y no compañeros de nido, se ha demostrado que los HCC están involucrados en el fenómeno de reconocimiento. Considerando tales antecedentes, en este seminario de título se aborda el problema de la función de los HCC como mediadores de ese reconocimiento en la termita nidificadora de una pieza *N. chilensis*.

Hipótesis

Dado que los soldados de *N. chilensis* muestran mayor agresividad hacia conespecíficos cuanto mayor es la distancia que separa sus nidos, y que el reconocimiento en otros insectos sociales está basado en sus perfiles de HCC, entonces existirá reconocimiento de compañeros de nido en *N. chilensis*, evidenciado por medio de discriminación conductual, y dicho reconocimiento se basará en los perfiles de HCC.

Objetivo general

- Evaluar en *N. chilensis* la existencia de reconocimiento de compañeros de nido y determinar si los HCC son mediadores de este reconocimiento.

Objetivos específicos

- Reanalizar los datos de Melendez (2014) considerando las categorías de compañeros de nido y no compañeros de nido en interacciones entre soldados y cada una de las castas presentes en una colonia de *N. chilensis*.
- Realizar bioensayos que evalúen el rol de los HCC en el proceso de reconocimiento de compañeros de nido.
- Correlacionar la conducta de compañeros y no compañeros de nido con sus respectivos perfiles de HCC.
- Analizar y comparar los perfiles de HCC de diferentes castas de *N. chilensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

Los sitios de estudio son cuesta Las Chilcas ($32^{\circ}52'S$; $70^{\circ}52'W$) y cuesta La Dormida ($33^{\circ}03'S$; $71^{\circ}00'W$), ambas ubicadas en la Región de Valparaíso y separadas por unos 30 km (Figura 5). Ambos sitios presentan una vegetación de tipo bosque esclerófilo y matorral típico de la zona central de Chile (Gajardo 1994).

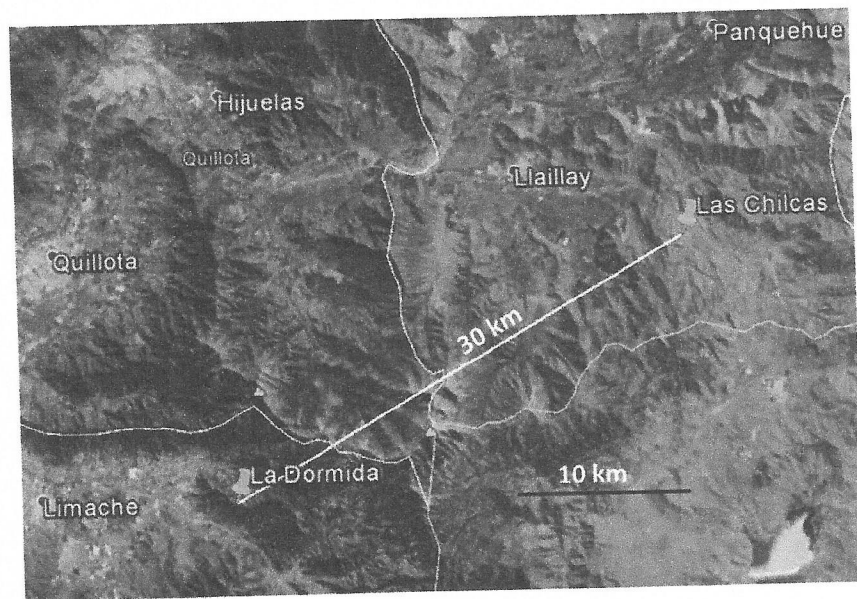


Figura 5. Mapa de ubicación de los sitios de muestreo.



Modelo de estudio, colecta y manipulación

Se colectaron escapos (tallos florales secos) de *Puya berteroniana* (Figura 6) que contenían nidos de *Neotermes chilensis*, durante el período comprendido entre enero y abril de 2014, los cuales fueron llevados al laboratorio enmallados en tul (tamaño del poro 0,3 mm) de modo de evitar fuga de individuos (Figura 7). El almacenaje de los nidos se hizo a temperatura ambiente y bajo fotoperiodo natural.



Figura 6: Tallos florales secos (escapos) de *P. berteroniana*.



Figura 7: Ejemplo de nido en tul. Colecta en terreno.

Diseño experimental

- *Reanálisis de bioensayos conductuales*

Todos los datos de Meléndez (2014) correspondientes a bioensayos conductuales entre un soldado e individuos de distintas castas (soldados, reproductores primarios y pseudo-obreros) provenientes del mismo nido, de nidos del mismo parche (distancia entre nidos menor de 300 m), del mismo sitio (distancia entre nidos entre 300 m y 3 km) o de distintos sitios (distancia entre nidos de aproximadamente 30 km), fueron reanalizados en función de solo dos categorías (o tipos de interacción): compañeros de nido y no compañeros de nido, donde los individuos provenientes del mismo nido fueron catalogados como

“compañeros de nido” y los que provenían de distinto nido, independientemente de la distancia, se catalogaron como “no compañeros de nido”

- *Análisis de compuestos cuticulares*

Para realizar el análisis químico se usaron los extractos cuticulares de los individuos utilizados por Meléndez (2014) en el estudio de reconocimiento de compañeros de nido en *N. chilensis*. Cada termita fue sumergida durante 10 minutos en 250 μ L de pentano con el fin de extraer sus compuestos cuticulares. Estos análisis, detallados posteriormente, tuvieron por objeto analizar una relación entre la conducta y la composición química cuticular de los individuos, y evaluar así el rol de los HCC en el fenómeno conductual de reconocimiento entre compañeros de nido.

Se efectuaron extracciones de HCC sumergiendo de forma individual cada termita en 250 μ L de pentano P.A. Así, en adelante se utilizará el término “extracto” para referirse a una extracción individual de los HCC de una termita. Los extractos se mezclaron de la siguiente forma: se tomaron 10 extractos por cada casta (pseudo-obrero, soldado y reproductor primario) haciendo un total de 30 extractos provenientes de Las Chilcas y lo mismo se hizo con el sitio de La Dormida. Los extractos de ambos sitios se mezclaron de modo de obtener un extracto que contenía la mayor cantidad de HCC de las termitas colectadas en cada sitio de estudio, llamado “extracto maestro”. Este extracto maestro fue posteriormente utilizado en la identificación y asignación de compuestos en los extractos individuales, basándose en análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para ello los extractos fueron inyectados y se compararon: i) los índices de retención (Kováts 1958) de los compuestos contenidos en los extractos, con

aquellos índices de retención de compuestos informados en literatura, y ii) los espectros de masas (patrones de abundancias relativas de iones producidos por la fragmentación de las moléculas eluidas causada por bombardeo de iones con un haz de electrones: Webster y col. 1998) de los compuestos eluidos con aquellos incluidos en una base de datos (NIST08). Para determinar la posición del doble enlace en el hidrocarburo no saturado, se usó derivatización con disulfuro de dimetilo siguiendo el protocolo de Attygalle (1998).

Los cromatogramas de los perfiles cuticulares individuales obtenidos fueron analizados cualitativamente en términos de presencia y ausencia de compuestos. Con estos resultados se evaluaron diferencias químicas entre castas calculando un coeficiente de similitud simple como la razón entre las coincidencias de compuestos presentes y ausentes en una pareja de individuos, y el número máximo de compuestos identificados en el cromatograma maestro (Krebs 1989). Se obtuvieron de este modo los coeficientes de similitud simple para parejas de termitas de las castas interactuantes, vale decir, soldado-soldado, soldado-pseudoobreros y soldado-reproductor, que fueron obtenidas desde un mismo nido (comparación entre castas, analizadas mediante ANDEVA) de modo de tener la comparación entre la similitud química de las parejas y las conductas mostradas por ellas. Adicionalmente, se obtuvieron coeficientes de similitud para parejas de termitas de cualquier casta obtenidas desde un mismo nido y desde distinto nido (comparación entre compañeros y no compañeros de nido, analizadas mediante prueba t de Student de una cola). Por último, se compararon los coeficientes de similitud entre parejas de termitas que provenían de un mismo sitio y de distinto sitio (comparación entre sitios) con el objeto de optimizar el diseño de los bioensayos descritos a continuación.

- *Bioensayos con compuestos cuticulares*

Para determinar el rol de los HCC en el reconocimiento de compañeros de nido, se adaptó el protocolo propuesto por Flores-Prado y col. (2008), estudiando la conducta de un soldado vivo frente a un reproductor primario conespecífico sometido a los siguientes cuatro tratamientos: i) reproductor muerto por congelamiento durante 5 minutos a -20°C de modo de eliminar el efecto conductual (dada la ausencia de movimiento del individuo) no alterando su composición química cuticular (n=20 compañeros de nido; n=20 no compañeros de nido), ii) reproductor muerto sumergido en 250 μL de pentano durante 10 minutos, de modo de eliminar el efecto conductual y extraer la señal química (n=20 compañeros de nido; n=20 no compañeros de nido), iii) reproductor primario proveniente de una colonia distinta a la del soldado, al que se le extrajeron sus HCC, y que posteriormente fue recubierto con el extracto cuticular de un reproductor primario perteneciente a la misma colonia del soldado de modo de tener un disfraz químico donde el reproductor primario es físicamente no compañero de nido pero químicamente compañero de nido del soldado; también se realizó el bioensayo donde el reproductor primario era físicamente compañero de nido pero químicamente no compañero de nido del soldado (n=20 compañeros de nido; n=20 no compañeros de nido) y iv) un control del bioensayo anterior, donde al reproductor primario se le extrajeron y luego se repusieron sus HCC (n = 20 compañeros de nido; n = 20 no compañeros de nido), para evaluar si la extracción y devolución de los HCC afectaba la conducta del soldado.

Cada réplica de los bioensayos se llevó a cabo en placas Petri de vidrio de 12 cm de diámetro cuya base fue cubierta con papel filtro de modo de facilitar el movimiento del

individuo focal (soldado). Una vez que los dos individuos fueron introducidos en la placa Petri, ésta se cerró con su tapa de vidrio y se procedió a grabar con una cámara Sony ® Cybershot durante 15 minutos.

- *Análisis de videos y conductas de bioensayos*

Para el análisis de los bioensayos, se identificó un conjunto de conductas catalogadas como intolerantes y tolerantes a partir de conductas definidas en investigaciones anteriores realizadas en insectos sociales (Kaib y col. 2004; Haverty y Thorne 1989; Jmhasly y Leuthold 1999; Cornelius y Osbrink 2003; Šobotník y col. 2008; Flores-Prado y col. 2008); las conductas analizadas están descritas en la Tabla 1. Las grabaciones de los bioensayos fueron registradas y analizadas con el programa JWatcher V1.0 (Blumstein y col. 2007), el cual permite registrar la frecuencia y la duración de cada una de las conductas.

Tabla 1. Clasificación de las conductas observadas en bioensayos con *N. chilensis*.

Clasificación de Conductas	Conductas	Descripción	(FPI)
Intolerante	Morder	Morder perforando el exoesqueleto	7
	Alzar o agarrar	Levantar con las mandíbulas sin daño aparente	6
	Abrir mandíbulas, próximo ^a	Abrir las mandíbulas a una distancia equivalente o menor a una longitud corporal	5
	Abrir mandíbulas, lejos ^b	Abrir las mandíbulas a una distancia mayor a la equivalente a una longitud corporal	4
	Retroceder	Huir o retroceder después de contacto directo	3
	Vibrar	Mover el cuerpo a manera de saltos, sacudidas corporal hacia arriba y abajo, o hacia delante y atrás muy rápidamente	2
	Permanecer quieto, lejos ^b	No desplazarse estando a una distancia mayor a la equivalente a una longitud corporal	2
	Escapar	Trasladarse por las paredes de la arena intentando huir	1
Tolerante	Pasar	Pasar por encima o debajo del oponente	2
	Permanecer quieto, próximo ^a	No desplazarse estando a una distancia equivalente o menor a una longitud corporal	1

^apróximo se consideró cuando ambos individuos se encontraban a una distancia equivalente a una longitud corporal, como máximo.

^blejos se consideró cuando ambos individuos se encontraban a una distancia mayor a una longitud corporal.

FPI: Factor de ponderación de la conducta *i*.

- *Índice conductual*

Se le asignó a cada conducta un factor de ponderación sobre la base de estudios anteriores con termitas (Jmhasly y Leuthold 1999; Roulston y col. 2003; Kaib y col. 2004; Šobotník y col. 2008). Este factor de ponderación tomó un valor de 7 para la conducta más intolerante y de 1 para aquella menos intolerante, mientras que en el caso de conductas tolerantes tomó un valor de 2 para aquella conducta más tolerante y un valor de 1 para

aquella menos tolerante, como se indica en la Tabla 1. Con estas conductas y sus respectivas ponderaciones se calculó el siguiente índice conductual:

$$IC = \text{Intolerante} - \text{Tolerante} = \Sigma[TTCI_i \times FPI_i] - \Sigma(TTCT_i \times FPT_i)$$

donde:

IC : índice conductual

TTCI_i : tiempo total que duró la conducta intolerante *i* realizada por el soldado.

FPI_i : factor de ponderación de intolerancia asignado para la conducta *i*.

TTCT_j : tiempo total que duró la conducta tolerante *j* realizada por el soldado.

FPT_j : factor de ponderación de tolerancia asignado para la conducta *j*.

Cabe hacer notar que dada la fórmula del índice conductual, cuando los valores son mayores que cero existe un predominio de las conductas intolerantes respecto a las tolerantes.

- *Análisis estadístico de los resultados de los bioensayos*

Se realizó una prueba de t de Student de una cola para comparar el índice conductual entre las interacciones compañeros de nido y no compañeros de nido. Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad que exige la prueba anterior, se aplicaron transformaciones a logaritmo natural o se elevaron al cuadrado los valores de modo de normalizar los datos y equiparar sus varianzas; si aun así no se lograron dichas condiciones, se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Siegel y Castellan 1988). Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa SigmaPlot 12 (Systat 2011).

RESULTADOS

Reconocimiento de compañeros de nido

La Figura 8 muestra que el índice conductual fue significativamente mayor en no-compañeros de nido que en compañeros de nido ($F_{1, 119} = 6,242$; $P = 0,014$); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a nivel de castas ($F_{2, 119} = 0,188$; $P = 0,829$), ni en la interacción entre factores ($F_{2, 119} = 0,297$; $P = 0,744$).

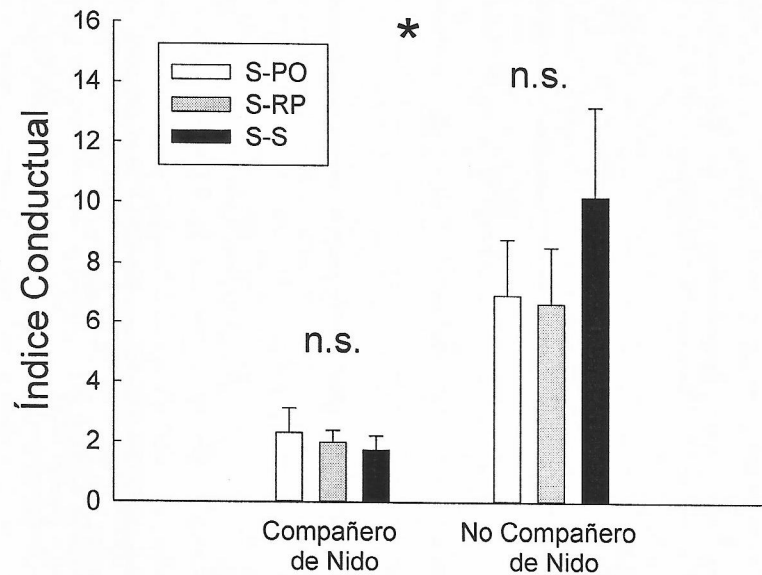


Figura 8. Reinterpretación de los bioensayos conductuales ejecutados por Melendez (2014). RP: reproductor primario, PO: pseudo-obrero, S: soldado; n.s.: diferencia no significativa entre castas; *: diferencia significativa ($P < 0,05$).

Análisis químico

En la cutícula de las termitas fueron detectados 31 compuestos, todos hidrocarburos, entre los cuales se encuentran *n*-alcanos, metil-alcanos y dos *n*-alqueno junto a cuatro compuestos no identificados (Tabla 2, Figura 9, Anexo 1).

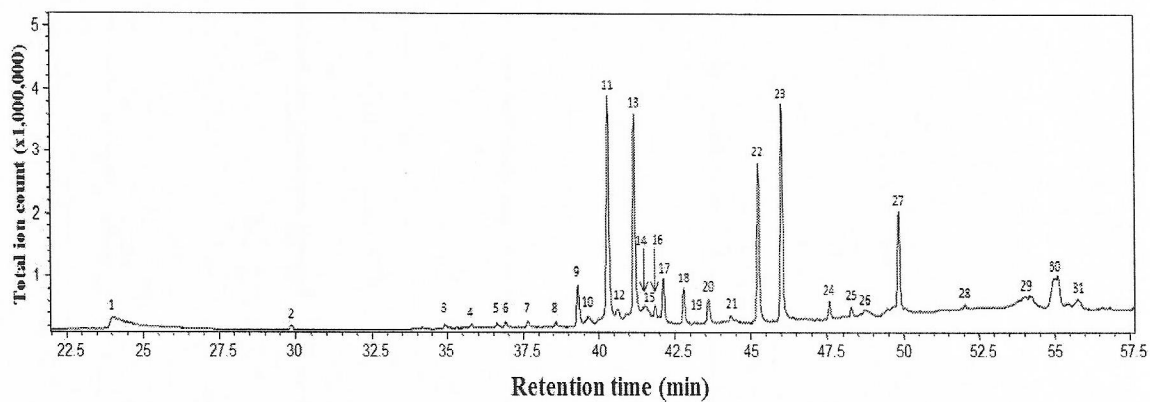


Figura 9: Cromatograma maestro.

Tabla 2. Compuestos químicos presentes en extractos cuticulares de *Neotermes chilensis*, identificados por comparación de sus espectros de masas con estándares (ES), por interpretación de sus espectros de masas (EM), por derivatización (DER) y por comparación con índice de retención (IR) disponibles en literatura.

Nº	IR	Compuesto	Método de Identificación
1	1919	Desconocido 1	-
2	2117	Desconocido 2	-
3	2300	Tricosano	ES, IR, EM
4	2329	11-Metiltricosano	IR, ES
5	2364	2-Metiltricosano	IR, ES
6	2373	3-Metiltricosano	IR, EM
7	2400	Tetracosano	ES, IR, EM
8	2433	9-Metiltetracosano	IR, EM
9	2463	2-Metiltetracosano	IR, EM
10	2470	3-Metiltricosano	IR, EM
11	2500	Pentacosano	ES, IR, EM
12	2517	Desconocido 3	-
13	2535	11-Metilpentacosano	IR, EM
14	2548	7-Metilpentacosano	IR, EM
15	2553	5-Metilpentacosano	IR, EM
16	2562	2-Metilpentacosano	IR, EM
17	2573	3-Metilpentacosano	IR, EM
18	2599	Hexacosano	ES, IR, EM
19	2614	Desconocido 4	-
20	2632	11-Metilhexacosano	IR, EM
21	2662	2-Metilhexacosano	IR, EM
22	2699	Heptacosano	ES, IR, EM
23	2732	11-Metilheptacosano	IR, EM
24	2798	Octacosano	ES, IR, EM
25	2828	13-Metiloctacosano	IR, EM
26	2899	Nonacosano	ES, IR, EM
27	2964	2-Metilnonacosano	IR, EM
28	2998	Triacotano	ES, IR, EM
29	3093	1-Hentriaconteno	IR, EM, DER
30	3129	13-Metilhentriacontano	IR, EM
31	3184	(Z)-7-Dotriacontano	IR, EM, DER



Análisis de castas

Dado que no se obtuvo diferencias significativas a nivel de castas en el bioensayo conductual (Figura 8) se hizo un análisis de comparación entre los perfiles químicos de individuos del mismo nido pero de diferentes castas, en las interacciones realizadas, y de este modo comparar los perfiles químicos de los soldados versus las tres castas enfrentadas, pseudo-obreras, reproductores y otros soldados. Los resultados muestran que los perfiles de compuestos cuticulares de individuos de distintas castas no difieren entre sí (Figura 10: $H_2=0,752$; $P=0,687$).

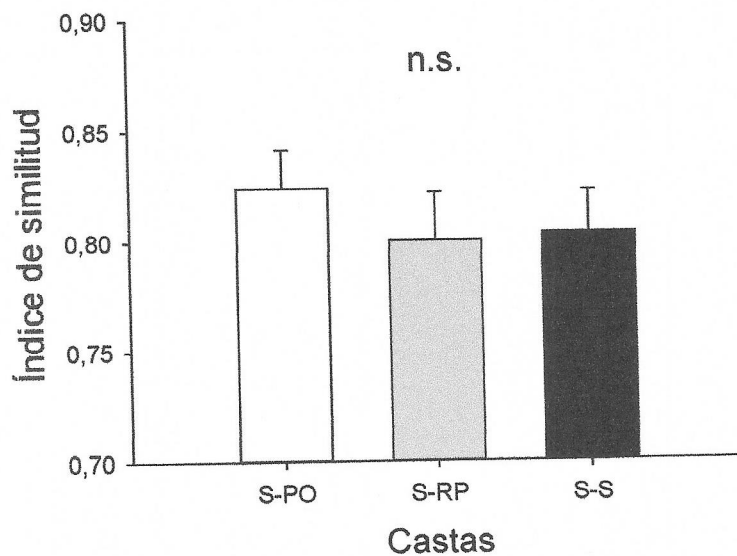


Figura 10. Comparación de los índices de similitud química entre individuos de distintas castas, donde las parejas interactuantes son compañeros de nido. n.s.: no significativo.

Comparación química entre compañeros y no compañeros de nido

Habiendo demostrado que los perfiles cuticulares no dependen de la casta del individuo, se compararon los perfiles cuticulares entre compañeros de nido y no compañeros de nido, independiente de su casta. Se mostró que los perfiles químicos de los compañeros de nido fueron más similares entre sí que los perfiles químicos entre no compañeros de nido (Figura 11: $U_{77,106}=2065$; $P < 0,001$).

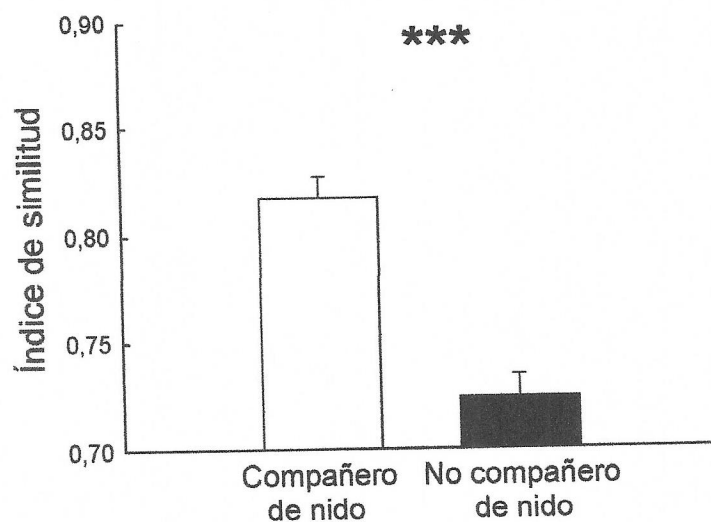


Figura 11: Comparación de los índices de similitud química entre compañeros y no compañeros de nido usando combinaciones de soldados con todas las otras castas; ***: diferencia significativa entre compañeros y no compañeros de nido ($P < 0,001$).

Comparación química entre sitios de estudio

La Figura 12 muestra que el índice de similitud fue mayor en la comparación dentro de cada sitio que entre los distintos sitios de estudio ($U_{272, 289} = 9918$; $P < 0,001$).

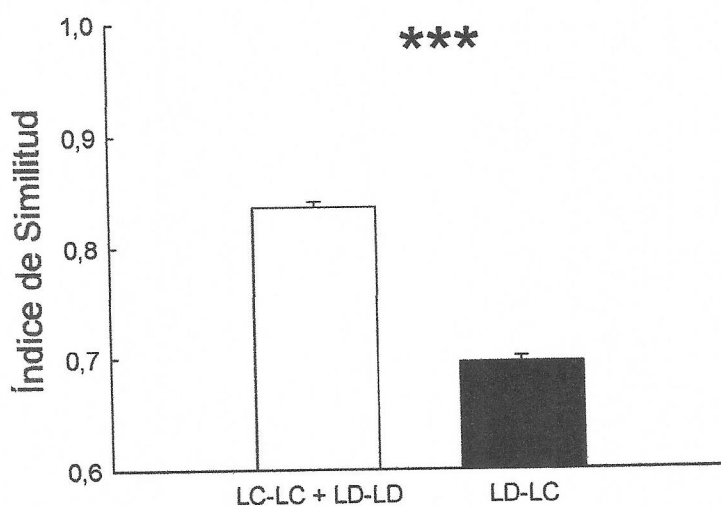


Figura 12: Comparación de los índices de similitud entre sitios (LD-LC) e intrasitio (LD-LD y LC-LC). LD= La Dormida, LC= Las Chilcas. ***: Indica diferencias significativas $P < 0,001$.

Bioensayos químicos

Dado que los perfiles químicos de individuos provenientes de distintos sitios fueron más distintos entre sí que aquellos provenientes del mismo sitio, se diseñaron bioensayos químicos con interacciones compañero de nido tomando dos individuos proveniente del mismo nido, y no compañero de nido tomando dos individuos provenientes de distintos

sitios (Figura 12). Además, con el fin de estudiar el rol de los compuestos químicos cuticulares en el reconocimiento y discriminación de compañeros de nido en *N. chilensis*, el reproductor primario fue muerto previo a la interacción de modo de evitar que la conducta de éste afectara al soldado focal, pero manteniendo íntegro sus compuestos cuticulares. En la Figura 13a se muestra que el índice conductual fue significativamente mayor (más intolerancia) en la interacción entre no compañeros de nido en comparación con la interacción entre compañeros de nido ($U_{16,16} = 8,0$; $P < 0,001$). Cuando además del repertorio conductual, los compuestos químicos cuticulares fueron eliminados con el lavado en pentano, tales diferencias desaparecieron (Figura 13b: $U_{16,16} = 89$; $P = 0,147$). Por otro lado, el uso del disfraz conductual mostró que en términos generales aumentaron las conductas intolerantes hacia compañeros de nido en comparación con 13a, al tener estos los hidrocarburos cuticulares de un no compañero de nido; sin embargo, este experimento no mostró diferencias significativas (Figura 13c: $t_{32} = 0,433$; $P = 0,334$). Las diferencias tampoco se encontraron en el bioensayo control, donde se observó un predominio de las conductas intolerantes respecto a las tolerantes, similar al resultado 13a (Figura 13d: $U_{16,16} = 86,0$; $P = 0,118$).

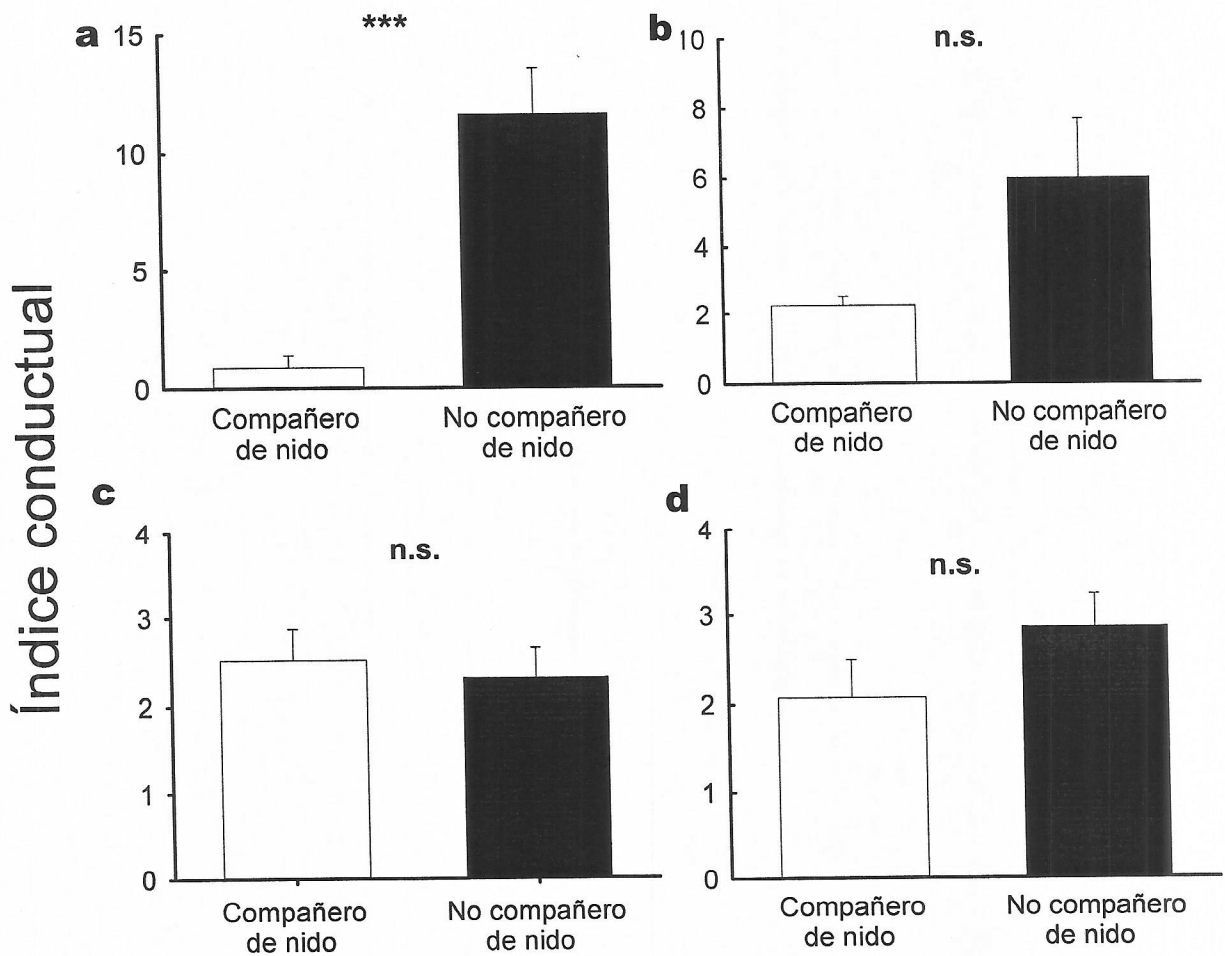


Figura 13. Bioensayo químico (promedios \pm error estándar). 13a: soldado frente a reproductor primario muerto por congelamiento, con sus compuestos químicos cuticulares; 13b: soldado frente a un reproductor primario muerto y despojado de sus compuestos cuticulares; 13c: soldado frente a un reproductor primario muerto con disfraz químico; 13d: control. ***: indica diferencias significativas ($P < 0,001$); n.s.: indica diferencias no significativas.

DISCUSIÓN

Neotermes chilensis, al igual que todas las termitas nidificadoras de una pieza, habitan en estrechas galerías interconectadas distribuidas a lo largo de un trozo de madera. Ya que tales galerías son un sistema totalmente oscuro y esencialmente sin flujo de individuos desde o hacia la colonia, se ha planteado que las principales modalidades sensoriales de las termitas serían táctil, quimiosensitiva (Howard y col, 1982) y acústica (Hunt y Richard 2013).

El re-análisis de los datos obtenidos por Melendez (2014) muestra diferencias en las conductas desplegadas por un soldado focal al enfrentarse a un compañero de nido vs. un no compañero de nido, evidenciando un mayor índice conductual y, por lo tanto, una mayor agresividad hacia un no compañero de nido que hacia un miembro de su grupo familiar. Este resultado evidencia la capacidad de reconocimiento de compañeros de nido en una especie nidificadora de una pieza, al igual que lo demostrado por Jmhasly y Leuthold (1999) para *Macrotermes subhyalinus* y *M. bellicosus*, especies nidificadoras de múltiples piezas. Más aún, tales autores no observaron diferencias significativas en la conducta del soldado al verse enfrentado a diferentes castas, resultado análogo al encontrado en el bioensayo conductual.

La agresión hacia reproductores por parte de soldados y obreras dentro de un nido es conocida en un variado número de especies de termitas, particularmente en un contexto de eliminación de exceso de reproductores (por ejemplo, Grassé 1986). Thorne y Haverty (1991) mencionan que en experimentos naturales los encuentros intraespecíficos con reproductores que no pertenecen a una colonia han producido una respuesta agresiva; es

el caso de *Reticulitermes hesperus*, donde al introducir un reproductor en otra colonia, este fue agredido hasta la muerte por variados miembros de la colonia (Pickens 1934).

El análisis químico al nivel de casta mostró que no existen diferencias entre estas. Sin embargo, el análisis se hizo solo en términos de presencia y ausencia de compuestos, y no en cantidades relativas de estos. Howard y col. (1982) encontraron diferenciación química al nivel de las proporciones de los HCC entre las diferentes castas de *R. virginicus* sin observar diferencias en los tipos de hidrocarburos presentes en la cutícula de las termitas de distintas castas. Resultados similares fueron encontrados por Blomquist y col. (1979) para *Zootermopsis angusticollis* y por Howard y col. (1978) para *Reticulitermes flavipes*, por lo que en *N. chilensis* se podrían evidenciar diferencias efectuando un estudio cuantitativo de estos compuestos, análisis se está llevando a cabo con otras muestras en el mismo laboratorio. Al respecto, obreras de *Macrotermes falciger* muestran la habilidad de discriminar vecinos de individuos que no sean sus vecinos ni compañeros de nido, independientemente de los fenotipos químicos y, por tanto, las termitas podrían reconocer no sólo compañeros de nido de los no compañeros de nido, sino también diferentes tipos de no compañeros de nido (Kaib y col. 2002).

Thorne (1982), Traniello y Beshers (1985) y Schuurman y Dangerfield (1995) sugieren que los obreros son probablemente el primer combatiente en conflictos intraespecíficos y que el soldado está más involucrado en encuentros interespecíficos, lo cual podría dar una explicación a los resultados presentados, dado que según este argumento, serían las pseudo-obreras quienes se encargarían de la defensa contra invasiones intraespecíficas, además de sus labores de alimentación de reproductores, soldados y ninfas, por lo que podrían tener un mejor sistema de reconocimiento inter-casta



en comparación con el soldado, quien sólo debe reconocer lo que es propio de su colonia de lo que no lo es. Esto podría explicar la ausencia de diferencias en índice conductual entre castas en el bioensayo conductual, no así la existencia de diferencias en la agresividad de los soldados ante compañeros y no compañeros de nido independiente de la casta.

Los bioensayos químicos con el reproductor primario muerto, donde se elimina toda influencia que pueda tener la conducta de este en la conducta del soldado focal, mostraron que los HCC juegan un rol importante en el reconocimiento de compañeros de nido. En efecto, cuando la señal química es retirada del cuerpo del reproductor primario, no se observan diferencias significativas en el índice conductual entre compañeros y no compañeros de nido (Figura 13b). En el bioensayo con el disfraz químico (Figura 13c) se esperaba que la tendencia fuera inversa a la del bioensayo químico con el reproductor muerto y los HCC intactos (Figura 13a), y en el caso de su respectivo control se esperaba la misma tendencia que el bioensayo con el reproductor con sus compuestos químicos intactos (Figura 13a). Sin embargo, a pesar que la tendencia fue la esperada, esta resultó ser no significativa en ambos casos. Los resultados de estos dos últimos bioensayos ponen en evidencia una limitación metodológica pues es posible que no se extraigan completamente los compuestos cuticulares desde una termita y/o que no puedan ser restituidos completamente en la termita receptora. En apoyo de esta hipótesis, el índice conductual promedio fue mucho más bajo en el gráfico 13c y 13d que 13a, e incluso más bajo que 13b donde se extrajeron los HCC pero no se repusieron.

El hecho de observarse diferencias conductuales entre los tratamientos compañeros de nido y no compañeros de nido, que tales diferencias desaparezcan al

momento de extraer los HCC del individuos no focal y las variaciones que mostraron los perfiles químicos entre compañeros y no compañeros de nido, apoyan la hipótesis que los HCC son mediadores, al menos en parte, del reconocimiento de compañeros de nido en *N. chilensis*. Similar resultado fue obtenido para *M. subhyalinus* por Kaib y col (2004), quienes plantearon que las variaciones entre los HCC son suficientes para permitir el reconocimiento de compañeros de nido. Se hace necesario profundizar en estos estudios para entender de manera más completa la evolución de la eusociabilidad en insectos, a partir de principios explicativos relacionados con el fenómeno del reconocimiento de conoespecíficos (Singer 1998).

CONCLUSIONES

Se evidenció la existencia de reconocimiento de compañeros de nido en *Neotermes chilensis*, fenómeno consistente con el rol defensivo de soldados en termitas nidificadoras de una pieza.

Además, el reconocimiento de compañeros de nido en *N. chilensis* estaría mediado por compuestos químicos cuticulares, fundamentalmente hidrocarburos. Adicionalmente, existiría una relación inversa entre el tipo interacción conductual, es decir compañeros de nido y no compañeros de nido, y la similitud química de las termitas, relación que se ve reflejada en que el grado de intolerancia de un soldado hacia un reproductor fue mayor cuando este último fue un individuo externo a su grupo familiar (colonia) que cuando es miembro de este. Complementariamente las diferencias químicas epicuticulares son mayores cuando ambos individuos provienen de colonias diferentes.

REFERENCIAS

- Attygalle, A. 1998. Microchemical Techniques. En: Millar, J.G. y Haynes K.F. (eds.), *Methods in Chemical Ecology*, pp. 207-294. Chapman y Hall, New York.
- Bateson, P. 1983. Optimal out breeding. En: Bateson, P. (ed.), *Mate Choice*. pp. 257–275. Cambridge University Press, Cambridge.
- Batista-Pereira, L.G., Santos, M.G., Corrêa, A.G., Fernandes J.B., Arab, A., Costa-Leonardo, A.M., Camargo-Dietrich, C.R.R., Pereira, D.A. y Bueno, O.C. 2004. Cuticular hydrocarbons of *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae): analyses and electrophysiological studies. *Z Naturforsch* 59c: 135-139.
- Blomquist, G.J., Howard, R.W. y McDaniel, C.A. 1979. Structures of the cuticular hydrocarbons of the termites *Zootermopsis angusticollis* (Hagen). *Insect Biochem.* 9: 365-370.
- Blumstein D.T., Daniel. J.C y Evas, C.S. 2007. Quantifying behavior the JWatcher way. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Breed, M.D. y Bennett, B. 1987. Kin recognition in highly eusocial insects. En Fletcher D.J.C. y Michener C.D. (eds) *Kin recognition in animals*. pp 243-285. John Wiley, Chichester, U.K.
- Clément, J.L. y Bagnères, A.G. 1998. Nesmate recognition in termites En: VanderMeer R.K., Breed M.D., Winston M.L. y Espalio K.E. (eds). *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. pp. 126-155. Westview Press. Oxford.
- Cornelius, M.L. y Osbrink, W.L.A. 2003. Agonistic interactions between colonies of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in New Orleans, Louisiana. *Environm. Entom.* 32: 1002-1009.
- Eggleton, P. 2011. An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology. En: Bignell, D.E., Roisin Y. y Lo, N. (eds.), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*, pp. 1-26. Springer. New York.
- Eggleton, P. y Tayasu, I. 2001. Feeding groups, life types and the global ecology of termites. *Ecol. Res.* 16:941–960.

- Flores-Prado, L., Aguilera-Olivares, D. y Niemeyer, H.M. 2008. Nest-mate recognition in *Manuelia postica* (Apidae: Xylocopinae): an eusocial trait is present in a solitary bee. *P. Roy. Soc. B.* 275: 285–291.
- Gadagkar, R. 1985. Kin recognition in social insects and other animals. A review of recent findings and a consideration of the irrelevance for the theory of kin selection. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)* 94: 587-621.
- Gajardo, R. 1994. La vegetación natural de Chile. Clasificación y distribución geográfica. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Grassé, P.P. 1986. Défence de la société: le nid, l'alarme, les armes, l'agressivité. En: Grassé, P.P (ed). *Termitologia*, Vol II. Pp. 102-152. Masson, Paris.
- Haverty, M.I. y Thorne, B.L. 1989. Agonistic behavior correlated with hydrocarbon phenotypes in dampwood termites, *Zootermopsis* (Isoptera: Termopsidae). *J Insect Behav.* 2: 523-543.
- Hölldobler, B. y Wilson, E.O. 1990. Communication. En Hölldobler, B. y Wilson, E.O. (eds) *The Ants*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Howard, R.W. y Blomquist, G.J. 1982. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 27: 149-172.
- Howard, R.W., McDaniel, C.A. y Blomquist, G.J. 1978. Cuticular hydrocarbons of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Chem. Ecol.* 4: 233-245.
- Howard, R.W., McDaniel, C.A., Blomquist, G.J., Gelbaum, L.T. y Zalkow, L.H. 1982. Cuticular hydrocarbons of *Reticulitermes virginicus* (banks) and their role as potential species-and caste- recognition cues. *J. Chem. Ecol.* 8: 1227-1239.
- Hunt, J.H. y Richard, F-J. 2013. Intracolony vibroacoustic communication in social insects. *Insect Soc.* 60: 403-417.
- Jmhasly, P. y Leuthold, R.H. 1999. Intraspecific colony recognition in the termites *Macrotermes subhyalinus* and *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Soc.* 46: 164-170.
- Kaib, M., Franke, S., Francke, W. y 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. y Brandl, R. 2004. Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*. *J. Chem. Ecol.* 30: 365–385.
- Krebs C.J. 1989. *Ecological methodology*. New York, NY: Harper Collins Publishers
- Korb, J. 2008. Termites, hemimetabolous diploid white ants? *Front. Zool.* 5:15.
- Korb, J. y Hartfelder, K. 2008. Life history and development - a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. *Biol. Rev.* 83: 295–313.
- Kováts, V.E. 1958. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta* 41: 1915-1932.
- Lo, N. y Eggleton, P. 2011. Termite Phylogenetics and Co-cladogenesis with Symbionts. En: Bignell, D.E., Roisin, Y. y Lo, N. (eds.), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*, pp. 27-50. Springer. New York.
- Melendez, W. 2014. Reconocimiento de compañeros de nido en soldados de la termite chilena de madera seca *Neotermes chilensis* (Isoptera: kalotermitidae). Tesis de Licenciatura. Universidad autónoma “Gabriel René Moreno”.
- Michener, C.D. y Smith, B.H. 1987. Kin recognition in primitively eusocial insects. En: Fletcher D.J.C. y Michener C.D. (eds.), *Kin Recognition in Animals*, pp.209–242. John Wiley y Sons, New York.
- Noirot, Ch. y Darlington, J.P.E. 2000. Termite nests: architecture, regulation and defence. En: Abe, T., Bignell D.E. y Higashi, M. (eds.), *Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. pp. 121-139. London: Kluwer Academic Press.
- Paxton, R.J., Kukuk, P.F. y Tengö, J. 1999. Effects of familiarity and nest mate number on social interactions in two communal bees, *Andrenascotica* and *Panurguscalcaratus* (Hymenoptera, Andrenidae). *Insectes Soc.* 46: 109-118.
- Pickens, A.L. 1934. The biology and economic significance of the western subterranean termite *Reticulitermes Hesperus*. En Kofoid C.A. (ed) *Termites and termite control*. Pp. 157-183. Univ. Calif. Press, Berkeley, Calif.
- Ripa, R. y Luppichini, P. 2004. Especies de termites de importancia económica presentes en Chile. En: Ripa, R. y Luppichini, P. (ed.), *Termitas y Otros Insectos Xilófagos en Chile: Especies, Biología y Manejo*. pp. 73-105. Colección libros INIA. Santiago, Chile.

- Roulston, T.H., Buczkowski, G. y Silverman, J. 2003. Nestmate discrimination in ants: effect of bioassay on aggressive behavior. *Insectes Soc* 50: 151–159.
- Schuurman, G. y Dangerfield, J.M. 1995. Assessment of intraspecific aggression in *Macrotermes michaelseni* (Isoptera: Macrotermitinae). *Sociobiology* 26: 33-38.
- Sherman, P.W., Reeve, H.K. y Pfennig, D.W. 1997. Recognition systems. En: J.R. Krebs y N.B. Davies (eds) *Behavioural ecology: an evolutionary approach*, pp. 69-96. Black well Science.
- Siegel, S. y Castellan Jr. N.J. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, 2nd ed. McGrawHill International Editions. New York.
- Singer, T. 1998. Roles of Hydrocarbons in the Recognition Systems of Insects. *Amer. Zool*, 38: 394-405.
- Smith, B. y Breed, M. 1995. The chemical basis for nestmate recognition and mate discrimination on social insects. En Cardé, R. y Bell, W.J. (eds.), *Chemical ecology of insects 2*. pp 287-317. Chapman and Hall, New York.
- Systat software Inc, 2011. SIGMAPLOT 12. www.systat.com.
- Šobotník, J., Hanys, R. y Roisin, Y. 2008. Agonistic behavior of the termite *Prorhinotermes canalifrons* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Insect Behav.* 21: 521-534.
- Thorne, B.L. 1982. Termite-termite interactions: workers as an agonistic caste. *Psyche* 89: 133-150.
- Thorne, B.L. y Haverty, M.L. 1991. A review of intracolony, intraspecific, and interspecific agonism in termites. *Sociobiology* 19: 115-145.
- Traniello, J.F.A. y Beshers, S.N. 1985. Species-specific alarm/recruitment response in a neotropical termite. *Naturwissenschaften* 72: 491-492.
- Waldman, B. 1988. The ecology of kin recognition. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19: 543-571.
- Webster, F.X., Millar, J.G. y Kiemle, D. J. 1998. Mass spectrometry. En: Millar J.G. y Haynes K.F. (eds) *Methods in Chemical Ecology*. pp. 127-152. Chapman y Hall. U.S.A.