



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

“HORMIGAS COMO SISTEMAS MODELO
PARA EL COMPORTAMIENTO COMPLEJO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

GERMÁN OCTAVIO LÓPEZ RIQUELME

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA LUISA FANJUL MOLES

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2008

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de Octubre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **GERMÁN OCTAVIO LÓPEZ RIQUELME** con número de cuenta **89358689** con la tesis titulada: "**Hormigas como sistemas modelo para el comportamiento complejo**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA**:

Presidente:	DR. HUGH MICHAEL DRUMMOND DUREY
Vocal:	DR. FIDEL ALBERTO RAMÓN ROMERO
Vocal:	DR. EDI ALVARO MALO RIVERA
Vocal:	DRA. NORA ELIZABETH GALINDO MIRANDA
Secretario:	DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA
Suplente:	DR. JORGE VALENZUELA GONZÁLEZ
Suplente	DR. WULFILA GRONENBERG

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., 25 de Agosto de 2008.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Agradezco al Coordinador y a todo el personal por todo el apoyo y orientación recibidos durante la realización de mis estudios de Doctorado, así como por haberme permitido continuar con mi formación académica como investigador.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Luisa Fanjul. Durante su realización, se contó con el apoyo de la beca CONACyT 158200 y con la beca complemento de DGEP para Germán Octavio López Riquelme. También se contó con el apoyo parcial de los proyectos CONACyT México 46193-Q y PAPIIT IN 208405, de los cuales es responsable la Dra. María Luisa Fanjul.

Durante la estancia doctoral en los ARLDN de la Universidad de Arizona en Tucson, Az., Estados Unidos, se contó con el apoyo parcial del programa de Posgrado en Ciencias y de la National Science Foundation IBN-0083163.

Los experimentos electrofisiológicos (electroantogramas) fueron realizados en una estancia doctoral en el Laboratorio de Ecología Química de El Colegio de la Frontera Sur, Estación Tapachula, Chiapas, México, en la que se contó con el apoyo parcial del programa del Posgrado en Ciencias.

Agradezco a los miembros del Comité tutorial, quienes han participado de manera determinante en mi formación como investigador y que han fortalecido mi visión del mundo, pero que también me han hecho corregirla cuando he estado equivocado:

Dra. María Luisa Fanjul (Directora de tesis)

Dr. Edi A. Malo Rivera

Dr. Hugh Drummond

Dr. Wulfila Gronenberg

“Se dice que la ciencia es la única cultura que realmente se eleva sobre las diferencias nacionales, moldeando las diferencias idiosincráticas en un solo cuerpo de conocimientos que puede ser expresado simple y elegantemente, y que generalmente puede ser aceptado como verdad. Nosotros entramos a su dominio por rutas marcadamente diferentes de tradición académica, pero impelidos por un placer infantil común en el estudio de los insectos y por la aprobación y el ánimo de los adultos en un momento crítico de nuestro desarrollo mental. Para ponerlo lo más simple posible, nosotros, habiendo entrado a nuestro período de pasión por los bichos cuando niños, fuimos bendecidos porque jamás se nos ha pedido abandonarlo.”

Bert Hölldobler & Edward O. Wilson
Journey to the ants



*A mi madre María Teresa,
mi padre Agustín,
mis hermanos Varinia y Alberto...
mi sangre*



Agradecimientos

André Lwoff dijo una vez que *“el arte de todo científico es, ante todo, buscarse un buen maestro”*. Tenía razón y en mi caso, esa labor la he cumplido y he encontrado en mi camino, maestros extraordinarios de los que he aprendido sobre ciencia, de la vida y con quienes me une una invaluable amistad.

En primer lugar, tengo que agradecer infinitamente a la Dra. María Luisa Fanjul, responsable del Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Un día que toqué a su puerta buscando asilo intelectual, me recibió en su laboratorio con mis ideas, mis proyectos y mis hormigas para, después de un tiempo de tener varios nidos en el laboratorio e incluso uno en su propio escritorio, verse también envuelta por la fascinación por estos minúsculos insectos. Durante toda mi formación y mi investigación, su dedicada y cálida asesoría, su pasión por la vida, su respeto por las personas, sus valores éticos y morales como persona y como científica han sido un ejemplo e inspiración para mí acerca de cómo la pasión por la vida y la curiosidad pueden convertirse en investigación científica seria, honesta y del más alto nivel. Aun en los momentos más difíciles nunca me permitió rendirme y siempre tuvo palabras, en ocasiones fuertes, para que yo continuara; su gran fe en mí, en ocasiones mayor que la que yo he tenido en mí mismo, nunca será defraudada.

Quiero agradecer también al Dr. Wulfila Gronenberg, autoridad mundial en el estudio neuroetológico en hormigas de los Arizona Research Laboratories, Division of Neurobiology, Universidad de Arizona por el honor de haberme recibido en su laboratorio, en su casa y con su familia, y por haberme brindado su amistad desde mi estancia en dicha universidad. Su generosidad, apoyo, consejo y asesoría cuando estuve en su laboratorio, y en interminables charlas por correo electrónico, han sido invaluable para la realización de mi trabajo y de mi formación como investigador y como persona. El Dr. Gronenberg es ejemplo de que se puede ser un gran investigador sin dejar de ser un gran ser humano. Tengo mucho que agradecer a tantas otras personas de los ARLDN: a Birgit Ehmer por su paciencia y ayuda con el microscopio confocal y por compartir la misma pasión por el arte plástico; a Glennis Julian por sus detalladas y sobrias explicaciones y asesorías; a Jim Averill por su generosa amistad que nos hermanó durante mi estancia en su casa. A Michael Zimmerman y a los miembros de “Haunted House”: Brianna y Lindsay Arnold por su hospitalidad y amistad. A mi amigo Pablo Guerenstein y Marco Herrera por hacerme sentir en casa. Agradezco también a John Hildebrand y a Nicholas Strausfeld por haberme hecho sentir realmente parte de los ARLDN.

Agradezco al Dr. Edi Malo la generosa oportunidad de haberme permitido trabajar en su Laboratorio de Ecología Química en El Colegio de la Frontera Sur, en donde pude aprender cosas completamente nuevas para mí. Le agradezco también la confianza y la amistad que me brindó y que me permitió trabajar con toda libertad en su laboratorio, por haberme abierto las puertas de su casa y por los increíbles viajes por todo su territorio. Mi estancia en ECOSUR fue de arduo trabajo, de estimulantes charlas científicas entre sorbos de frías cervezas para apaciguar el implacable calor de Tapachula. Agradezco también a todo el personal de ECOSUR por las facilidades que me brindaron durante los meses que duró mi estancia allá, principalmente a Antonio Santiesteban quien me familiarizó con aparatos e instrumentos; al Dr. Julio Rojas por su experta asesoría; al Dr. Leopoldo Cruz por involucrarse en mi proyecto; a Yolanda Brindis por su ayuda en el funcionamiento del laboratorio.

Al M. en C. Rafael Madrid Ríos del Departamento de Matemáticas de la Facultad de Ciencias, UNAM le agradezco la ayuda incondicional, generosa y entusiasta que me brindó para el análisis de datos. Durante nuestras largas entrevistas, además de aprender sobre estadística, análisis de datos y diseño de experimentos, aprendí sobre el entusiasmo por la vida, la pasión por el conocimiento, la generosidad

humana, la cooperación y ayuda desinteresada. Aun cuando el Profesor Madrid es una eminencia, siempre me trató como un amigo mientras me compartía de su sabiduría. Cada sesión de trabajo siempre empezó con una lección de vida que me ha hecho crecer como ser humano y que jamás olvidaré. Le agradezco también el haberme considerado lo suficientemente interesante como para compartir mi trabajo con sus estudiantes de licenciatura y posgrado.

Quiero expresar un agradecimiento y un reconocimiento especial al Dr. Fidel Ramón ya que cuando más difícil se veía el camino y ninguna puerta más se abría, generosa y desinteresadamente y con la única condición de que me titulara, me ofreció el apoyo económico para que yo pudiera terminar mi tesis. Creo que no es fácil encontrar una persona así de generosa y casi entiendo a todos aquellos no creen cuando digo todo lo que el Dr. Fidel Ramón ha hecho por mí sin jamás exigir algo a cambio y, lo más importante de todo, sin jamás haberme hecho sentir incómodo o frozado a algo por la ayuda que me ha proporcionado. Me siento honrado por contar también con su valiosa amistad. Desde entonces, hemos sostenido largas charlas sobre todo tipo de temas, y por supuesto sobre hormigas, nuestro interés común. No tengo forma ni hay palabras suficientes para agradecerle todo su apoyo y confianza, estoy en deuda con él, ya que sin su ayuda no hubiera podido llegar al final.

También estoy muy agradecido con la Dra. Julieta Ramos Elorduy por sus palabras de aliento, por la ayuda que también me brindó desinteresadamente en momentos difíciles, por su apoyo personal y profesional. He aprendido mucho de su entusiasmo por la investigación, por los insectos y por la biología en general, de su creatividad para generar proyectos y de su calidad humana.

Debo agradecer a la Dra. Dení Rodríguez, jefa del Posgrado en la Facultad de Ciencias, por su paciencia, apoyo y ayuda brindada en los momentos críticos, y por depositar en mí su confianza y por creer que todo ha valido la pena para que termine mi formación y me inicie como investigador.

A la Dra. Nora Galindo le agradezco el haber aceptado formar parte del jurado y dedicar parte de su tiempo a la revisión del manuscrito final aun cuando sus ocupaciones han sido muchas. Sus acertadas y lúcidas sugerencias me han permitido construir un documento final más claro. Su trato amable, generoso, educado y cálido me ha enseñado que se puede ser un académico importante, pero con sencillez y con compromiso por la formación de nuevos recursos humanos.

Al Dr. Jorge Valenzuela le agradezco el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo, así como todos sus sinceros y honestos comentarios y críticas, lo cual sólo ha repercutido en que este mejore.

Al Maestro Aldi de Oyarzabal le agradezco la realización de la acuarela de *Atta* que he empleado para ilustrar este trabajo.

Agradezco muy especialmente al Dr. Hugh Drummond por todo el tiempo dedicado a la asesoría de este trabajo, así como por sus duras pero válidas críticas sobre el mismo. Le agradezco también su honestidad cuando ha manifestado no estar de acuerdo conmigo en uno o en muchos aspectos de mi investigación, lo cual ha permitido que mejore mi preparación y que sea más crítico conmigo mismo.

Agradezco profundamente a la Facultad de Ciencias y a todos los profesores que han participado en mi formación.

Finalmente quiero agradecer y hacer un reconocimiento especial a los árboles de los que se obtiene la pasta para hacer el papel en el que está impresa esta tesis. Sin ellos, a la cultura humana le hubiera sido más difícil hacerse tan compleja y sofisticada, y su desarrollo seguramente hubiera sido distinto.

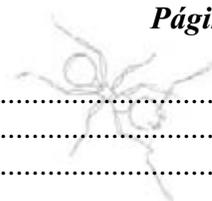


HORMIGAS COMO SISTEMAS MODELO
PARA EL COMPORTAMIENTO COMPLEJO

Bases neurobiológicas de la comunicación química
y la división del trabajo en las hormigas

• INDICE GENERAL

	<i>Página</i>
Índice.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
I. Introducción.....	11
1. <i>División del trabajo: causa del éxito de las hormigas.....</i>	<i>12</i>
2. <i>Biología social de las hormigas.....</i>	<i>20</i>
3. <i>Sistema olfativo periférico de las hormigas.....</i>	<i>27</i>
4. <i>Sistema nervioso de las hormigas.....</i>	<i>34</i>
5. <i>Hormigas como modelos neurobiológicos.....</i>	<i>50</i>
II. Especies seleccionadas.....	52
III. Planteamiento del problema.....	62
IV. Hipótesis.....	67
V. Objetivos.....	70
VI. Estrategia metodológica.....	72
1. <i>Insectos y mantenimiento.....</i>	<i>73</i>
2. <i>Procedimientos experimentales I: Selección de las castas y olores.....</i>	<i>76</i>
3. <i>Procedimientos experimentales II: Electroantenogramas.....</i>	<i>81</i>
4. <i>Procedimientos experimentales III: Experimentos neuroanatómicos.....</i>	<i>95</i>
VII. Resultados.....	99
1. <i>Resultados I: Análisis químico y bioensayos.....</i>	<i>100</i>
2. <i>Resultados II: Experimentos electrofisiológicos.....</i>	<i>110</i>
3. <i>Resultados III: Neuroanatomía.....</i>	<i>134</i>
VIII. Discusión.....	156
1. <i>Discusión I: Liberador químico y especialización en la necroforesis.....</i>	<i>157</i>
2. <i>Discusión II: Especialización olfativa en los soldados.....</i>	<i>162</i>
3. <i>Discusión III: Estructura de los lóbulos antenales y conexiones hacia los CF.....</i>	<i>172</i>
IX. Conclusiones.....	179
Referencias.....	184
Apéndice 1: Perspectivas neuroanatómicas.....	196
Apéndice 2: Necroforesis: remoción de cadáveres.....	205
Apéndice 3: Electroantenogramas.....	206
Apéndice 4: Abreviaciones empleadas.....	210
Apéndice 5: Publicaciones y congresos.....	211





• RESUMEN

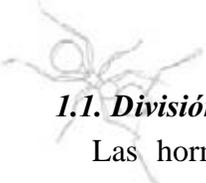
En esta tesis se estudiaron las bases neurobiológicas de la división del trabajo, la comunicación química y la especialización conductual en las hormigas *Atta mexicana*. Utilizando cromatografía de gases y bioensayos se determinó que el ácido oleico es la señal que emana de los cadáveres de hormigas y que libera el comportamiento necroforético, realizado principalmente por obreras llamadas sepultureras. Mediante electroantenografía, se comparó la sensibilidad antenal olfativa en respuesta a olores relacionados con la tarea en tres castas: forrajeras, sepultureras y soldados. Los resultados indican que los soldados son la casta más especializada pues muestran baja sensibilidad a los estímulos olorosos no-relacionados con la defensa, en tanto que las forrajeras son un grupo generalista con una sensibilidad muy desarrollada y versátil. Entre las forrajeras pueden distinguirse dos grupos según sus respuestas sensoriales que podrían constituir subcastas conductuales. Inesperadamente, las sepultureras no mostraron respuestas olfativas periféricas al ácido oleico mayores que las otras castas, lo que sugiere que su comportamiento es el resultado de diferente procesamiento central. Empleando técnicas neuroanatómicas se analizó la estructura de los lóbulos antenales (LA) de los soldados de *A. mexicana*, una especie “olfativa” y especializada, y se comparó con la de los soldados de *Camponotus ocreatus*, una especie generalista y “más visual”. En ambas especies, los LA están organizados en seis grupos de glomérulos inervados cada uno por su propio tracto antenal. Los LA de los soldados de *A. mexicana* presentan más de 305 glomérulos y 3 ó 4 estructuras glomerulares más grandes comparadas con el reducido tamaño del resto de los glomérulos. En contraste, los LA de los soldados de *C. ocreatus* presentaron más de 380 glomérulos de tamaño más homogéneo. Estas características sugieren que el sistema olfativo de *Atta* está morfológica, fisiológica y conductualmente más especializado a expensas de capacidades individuales más generales. Finalmente, se describió la vía olfativa desde el LA hasta los cálices de los cuerpos fungiformes (CF), centros de integración multisensorial. En ambas especies, los grupos de glomérulos están organizados en dos regiones, anterior y posterior. Los glomérulos están innervados por neuronas de proyección (NP) que conectan el LA con el cáliz de los CF a través de tractos antencerebrales (TAC). La información olfativa está segregada en varias capas del cáliz: las NP que inervan los grupos de glomérulos anteriores envían sus axones a través de TAC-interno hacia las capas externas del cáliz y de ahí hacia el protocerebro lateral (PL), mientras que las NP que inervan los grupos posteriores envían sus axones a través del TAC-externo hacia el PL, y de ahí hacia las capas internas del cáliz. Estos resultados sugieren que la organización del LA está representada topográficamente en los CF formando un tipo de mapa odotópico. Las similitudes interespecíficas en la vía olfativa encontradas en esta tesis, sugieren una organización funcional altamente conservada en los himenópteros sociales.

• ABSTRACT

This thesis studied the neurobiological basis of division of labor, chemical communication and behavioral specialization in the ant *Atta mexicana*. Chromatography and bioassays methods revealed oleic acid as the chemical signal that both emanates from ant corpses releasing necrophoric behavior, performed mainly by workers referred as “undertakers”. To determine differences in odor reception between workers of different castes (i.e. foragers, undertakers and soldiers), further antennal sensitivity to task-related odors was tested using electroantennographic techniques. Soldiers are the most specialized caste because they showed the lower antennal responses to all odors, except odorants related to alarm pheromones. Foragers are a generalist group with a well developed and versatile sensitivity. Results indicated statistically significant differences between two groups of the forager’s response sensitivity to floral and alarm odorants that seem to denote two behavioral sub castes. Unexpectedly, electro-antennograms of undertakers did not show increased peripheral olfactory sensitivity to oleic acid compared to other castes, suggesting that behavioral trend to perform necrophoric behavior results from differences in central processing. The structure of primary olfactory centers, the antennal lobes (AL), was analyzed and compared in soldiers of two ant species using neuroanatomical techniques: *A. mexicana*, an “olfactory” and specialized species, and *Camponotus ocreatus*, a generalist and more “visual” species. In both species the AL is composed of six glomeruli clusters each innervated by its own antennal tract. AL of *A. mexicana* soldiers comprise more than 305 glomeruli and 3 to 4 particularly large glomerular structures compared to the small size of the remaining glomeruli. In contrast, AL of *C. ocreatus* soldiers comprises more than 380 glomeruli, homogeneous in size. These features prove the olfactory system of *Atta* workers as morphologically, physiologically and behaviorally specialized at the expense of more general individual properties. Finally, the olfactory pathway from the AL to the mushroom bodies (MB), higher-order multi-sensory integrative centers, was described. In both species, AL glomeruli clusters are distributed in two regions, anterior and posterior. Glomeruli are innervated by projection neurons (PN) that connect the AL with the MB calyx via antennocerebral tracts (ACT). The calyces are layered and seem to receive segregated olfactory information: PN that innervate anterior glomeruli clusters send their axons through the inner ACT to terminate in the outer layers of the calyx and from there to the lateral protocerebrum (LP), while PN that innervate posterior glomeruli clusters send their axons through the outer ACT to the LP and from there to the inner layers of the calyx. These results suggest that AL organization is topographically represented in the MB forming an odotopic map. Interspecific similarity in olfactory pathway found in this thesis indicates a highly conserved functional organization in social hymenopterans.

I. INTRODUCCIÓN

1. DIVISION DEL TRABAJO: CAUSA DEL EXITO DE LAS HORMIGAS



1.1. División del trabajo

Las hormigas son excepcionales entre los insectos debido a su dominancia ecológica como depredadores, excavadores y herbívoros. Su historia evolutiva quizá sea la historia de mayor éxito entre los metazoarios terrestres. Aunque las 11,000 especies de hormigas constituyen aproximadamente 1.5% de la fauna mundial de insectos, constituyen al menos un tercio de su biomasa (Wilson & Hölldobler, 2005). En promedio, las hormigas constituyen el 15-20% de la biomasa animal terrestre, y en regiones tropicales, monopolizan más del 25% (Schultz, 2000). Globalmente constituyen la tercera parte de la biomasa animal total (Hölldobler & Wilson, 1990). Excepto por los polos, Groenlandia, y los mares y lagos, las hormigas se encuentran en todo lugar. Incluso en los ambientes más perturbados las hormigas son abundantes. Debido a su abundancia, a la estabilidad de sus poblaciones y a la diversidad de sus hábitos alimenticios, las hormigas ejercen una influencia importante en muchos hábitats.

¿A qué se debe que las hormigas sean tan abundantes y tan exitosas y que dominen sobre la Tierra? La respuesta se halla en la cooperación y organización social basada en la división del trabajo. Las hormigas son un taxón dominante de escala mundial, lo cual ha sido logrado por medio de modificaciones sociales (Wilson, 1963).

La exitosa vida de las sociedades de insectos ha evolucionado a partir de la división del trabajo reproductivo entre individuos reproductivos e individuos estériles. En segundo término está la división del trabajo en tareas no-reproductivas, las cuales son realizadas por obreras más o menos especializadas. Estas obreras realizan las tareas necesarias para el mantenimiento y crecimiento de la colonia, como forrajeo, cuidado de la cría y defensa contra enemigos, todas actuando coordinadamente a través de un complejo sistema de comunicación quimiotáctil. La principal especialización se encuentra entre obreras que realizan actividades exteriores al nido *versus* las que se dedican a actividades dentro del nido, sin embargo, aun dentro estas categorías puede presentarse especialización.

La intrincada red que implica la división del trabajo es regulada y coordinada a través de un complejo sistema de comunicación. La división del trabajo favorece la eficiencia ergonómica debido a la repartición de tareas (Hölldobler & Wilson, 1990; Jeannie, 1986, citado en Trumbo & Robinson, 1997). En las sociedades, es más ventajoso sustituir a los individuos generalistas y remplazarlos con individuos especialistas ya que se liberan de la realización de múltiples tareas, optimizando el consumo energético debido a la realización de una o pocas tareas. Además, existen menos grupos de obreras activas al mismo tiempo lo cual evita que las obreras se estorben, por lo que disminuye la probabilidad de cometer errores en la elaboración de una tarea (Wilson, 1985a).

La eficiencia de las sociedades de insectos está basada en tres características: 1) la división del trabajo, que implica que grupos coordinados realizan operaciones en paralelo reduciendo los errores especialmente cuando la división del trabajo se basa en especialistas; 2) los grupos pueden concentrar más energía y fuerza en puntos críticos que los insectos solitarios, y 3) el consumo de energía es muy eficiente ya que mientras el alimento puede ser almacenado en las larvas y adultos especializados, la defensa, la construcción, el forrajeo y otras tareas son realizadas por especialistas (Wilson, 1985a,b).

La división del trabajo es un tópico fundamental en la biología de los insectos sociales, pero también para la biología en general, ya que muchos de los principios involucrados se aplican a todos los sistemas biológicos (Bourke & Franks, 1995). La división del trabajo es la única forma de cooperar y funcionar como unidad, en vez de la acción descoordinada de miembros no especializados que sólo se estorbarían durante la realización de una actividad común. Así pues, para una sociedad es más benéfico llevar a cabo diferentes tareas con ensambles de grupos de individuos especializados que con multitudes indiferenciadas. La especialización de tareas implica una alta eficiencia ergonómica lo cual es resultado de tres aspectos: 1) preferencias espaciales, es decir, que los especialistas se enfocan en su actividad en las partes del nido donde es más probable que encuentren estímulos relacionados con su tarea; 2) ejecución de tareas relacionadas que requieren de habilidades sensoriales y motoras similares, y 3) aprendizaje, es decir, que mejora la ejecución de la tarea con la experiencia (Wilson, 1971).

Pero, ¿cómo funciona la distribución de las tareas y qué estímulos, condiciones, factores, etc. determinan, en un momento dado, qué tarea realiza una obrera y cómo una colonia ajusta sus esfuerzos a las demandas del ambiente?; ¿cuáles son los mecanismos por los cuales los miembros de la colonia se diferencian en castas y se reparten el trabajo?; ¿cómo emerge el comportamiento adaptativo colonial de las acciones de los miembros individuales de la colonia?; ¿cómo los individuos pueden convertirse en máquinas tan especializadas de trabajo?; ¿cómo está organizado el sistema nervioso en especies altamente sociales?; ¿cómo funcionan los cerebros en especies sociales?, ¿existe una sola tendencia en la evolución del sistema nervioso en animales sociales?, ¿es la evolución de la complejidad individual compatible con la evolución de la complejidad social?

El estudio de los insectos sociales implica la perspectiva reduccionista y la sistémica al mismo tiempo, ya que el comportamiento de la colonia puede ser entendido sólo si los mecanismos que subyacen al comportamiento individual son explicados hasta el nivel fisiológico, pero esta información sólo tiene sentido cuando los patrones de comportamiento colonial de cada especie es examinado como una adaptación a las condiciones del ambiente en donde las especies viven (Wilson, 1985a, b).

1.1.1. ¿Qué es la casta?

La casta se define como cualquier grupo de miembros que pertenecen a un tipo morfológico o grupo particular de edad, o ambos, que se especializan en tareas particulares por períodos prolongados (Hölldobler & Wilson, 1990). La división del trabajo en insectos sociales está relacionada con diferencias en edad (polietismo temporal), morfología (polimorfismo) o predisposiciones individuales independientes de la edad. Las castas de hormigas pueden ser de los siguientes tipos:

- 1) Casta física. Se distingue por comportamiento y por anatomía, principalmente el tamaño.
- 2) Casta temporal. Se distingue por su comportamiento relacionado con la edad.
- 3) Casta fisiológica. Se distingue por un estado fisiológico que está frecuentemente, pero no necesariamente, vinculado a la anatomía o la edad.

Las castas principales son las reinas y las obreras. Generalmente se refiere a todas las obreras como una casta distinta de la reina y a los subgrupos de obreras como subcastas, aunque es común que

también se les llame casta. La tarea es una secuencia particular de actos que cumplen un propósito específico para la colonia (forrajeo, cuidado de la cría, etc.). Un grupo de tareas relacionadas se define como un papel, aun si los actos son muy diferentes, por lo que diferentes castas pueden participar en un papel (Hölldobler & Wilson, 1990). Las castas en las sociedades de hormigas son:

- 1) Machos. Generalmente, los machos no llenan un papel, sólo reciben alimento mientras llega el vuelo nupcial. Los himenópteros no poseen cromosomas sexuales y la determinación del sexo está determinada por el nivel de ploidía y se denomina haplo-diploide: huevos no fecundados producen machos (n) y los huevos fecundados producen hembras, reinas u obreras ($2n$).
- 2) Reinas. Es la hembra reproductiva con ovariolas completamente desarrolladas. Es anatómicamente distinguible de las obreras: tórax grande, abdomen grande, presencia de ocelos, presencia de alas (que se pierden después del apareamiento), etc. Es aceptado que la determinación de la reina es casi enteramente ambiental, aunque se conocen algunos casos de control genético (Hölldobler & Wilson, 1990; Cahan & Keller, 2003). Por lo tanto, los sistemas de castas pueden ser interpretados como la consecuencia de variaciones entre las especies en la transformación del crecimiento durante el desarrollo larval (Oster & Wilson, 1978).
- 3) Obreras. Son hembras estériles con ovariolas reducidas o atrofiadas y que carecen de espermateca. El tórax está reducido y carecen de alas. La casta de obreras está subdividida en castas adicionales o subcastas que cuando son morfológicas se denominan: *minor*, *media*, *mayor*. Generalmente las obreras *media* son los principales componentes de la sociedad y pueden variar en tamaño, mientras que las *minor* y las *mayor* son fácilmente distinguibles como dos distribuciones de frecuencia con modas distintas. Cuando las obreras *mayor* tienen una función principalmente defensiva, se les llama soldados.

1.2. Sistemas de división del trabajo

La división del trabajo a través de la distribución de tareas entre varias castas se denomina polietismo. En los insectos sociales, existen diferentes vías, no excluyentes entre sí, para alcanzar la división del trabajo (Robinson, 1992): polietismo temporal, polimorfismo y especialistas.

1.2.1. Polietismo temporal

El polietismo temporal está basado en la transición de tareas conforme las obreras envejecen, empezando con tareas de servicio interno como el cuidado de la cría, y avanzando progresivamente hacia el mantenimiento del nido hasta alcanzar las actividades de servicio externo, como el forrajeo. A lo largo de la ontogenia y en el período de envejecimiento, las obreras sufren cambios fisiológicos internos y su respuesta a los estímulos externos varía (Hölldobler & Wilson, 1990; Robinson, 1992).

1.2.2. Polimorfismo

Entre los insectos sociales, el polimorfismo se aplica a la existencia de una variación discontinua en una misma especie en la morfología de los individuos que se traduce en la presencia de varias castas morfológicas y funcionalmente diferentes del mismo sexo (Wilson, 1971). Estas castas se producen por

un crecimiento relativo no-isométrico que se presenta sobre un rango de variación en una colonia normal y madura para producir individuos de diferentes proporciones en los extremos del rango de tamaños. En el polimorfismo, las obreras de un tamaño particular se especializan en la tarea para la cual su tamaño es el más adecuado: obreras pequeñas cuidan a la cría y forrajean, obreras grandes defienden el nido, etc. (Wilson, 1980a,b,c, 1983a,b, 1985a,b; Hölldobler & Wilson, 1990; Jaisson et al., 1988; Blanchard et al., 2000; Breandale et al., 2003). Aunque es empíricamente cierto que esto puede ocurrir en hormigas y en termitas, en las abejas y en las avispas sólo existe un tamaño de obreras, por lo que el tamaño no es definitivo en la determinación de la tarea que un individuo realiza, de manera que el polimorfismo por sí solo no explica la división del trabajo. Aun cuando en una colonia existan individuos de diferente tamaño, la casta está definida en términos conductuales, por lo que la morfología es una especialización relacionada con la conducta.

La forma más representativa de polimorfismo es la presencia, en algunas especies, de obreras enormes llamadas soldados que se dedican principalmente a la defensa. Aun cuando exista el potencial genético para la producción de obreras *mayor*, esto no ocurre de manera indiscriminada. Existe un patrón del desarrollo que determina que las obreras grandes sólo son producidas en etapas particulares del desarrollo colonial. La especialización morfológica generalmente produce individuos que difícilmente pueden realizar tareas diferentes a la que están especializados, por lo que si la demanda de obreras de este tipo se reduce, estas no pueden realizar otras tareas tan eficientemente o no las realizan en absoluto. Debido a que la morfología de los insectos holometábolos está determinada por el tiempo de desarrollo larval, las sociedades polimórficas son poco capaces de responder rápidamente a los cambios ambientales que requieren de ajustes en el nivel social. Por esto, el polietismo físico es relativamente raro entre las sociedades de insectos, encontrándose solamente en cerca del 20% de los géneros de hormigas. Las restricciones para la evolución del polimorfismo son económicas y embriológicas: los especialistas son costosos de producir y la modificación del desarrollo es limitada (Sud & Franks, 1987). Es más común que las sociedades de hormigas basen su sistema de división del trabajo en el polietismo temporal. Incluso aquellas sociedades polimórficas también pueden presentar polietismo temporal. Polimorfismo y polietismo producen una distribución poblacional con individuos tanto de diferentes tamaños como de edades característica para cada especie: la demografía adaptativa (Tofts & Franks, 1992).

En el polimorfismo, el crecimiento alométrico es responsable del desarrollo de castas físicas. El crecimiento alométrico ocurre cuando dos partes diferentes del cuerpo crecen a tasas exponenciales diferentes de manera que cuando el crecimiento de dos individuos termina en diferentes tiempos, el resultado es que los adultos tendrán no sólo diferentes tamaños, sino también diferentes formas, esto es, diferentes proporciones corporales. Cuando se comparan obreras *mayor* con obreras *minor* o *media*, las *mayor* típicamente presentan cabezas que son más grandes en relación con el resto del cuerpo (Wilson, 1985a,b). Es probable que este patrón de alometría esté prescrito genéticamente, pero el tamaño real alcanzado por las obreras, no. En cualquier caso, es inconcebible que sólo la anatomía externa crezca diferencialmente. Ya que la alometría de las castas físicas se encuentra relacionada con el aloetismo, es posible que en el sistema nervioso ocurran cambios alométricos similares. Tanto la alometría como el

aloetismo en las hormigas son adaptativos, y los extremos en tamaño no son incidentales, así como no lo son los cambios en comportamiento relacionados con el incremento en tamaño corporal y, probablemente, con estructuras relacionadas como el cerebro.

1.2.3. Elites o especialistas

Las obreras especialistas, independientemente de su edad y/o tamaño, difieren en su disposición para la realización de una tarea particular. Estas diferencias entre obreras resultan en una división del trabajo aun más fina: por ejemplo, un reducido número de obreras en las colonias de abejas se dedican a la necroforesis o a permanecer en la entrada del nido como guardias. Puede haber componentes inatos y/o aprendidos involucrados (Robinson, 1992).

1.3. Factores involucrados en la determinación de la casta y en la realización de la tarea

Los factores que determinan qué tarea realiza una obrera y cuándo la realiza, pueden ser: 1) internos, basados en atributos de los individuos; y 2) externos, basados en estímulos ambientales transitorios (Gordon, 1996). La probabilidad de que una obrera realice una tarea depende de: 1) la magnitud de la tarea (factores externos), es decir, la probabilidad de exponerse a dicha tarea, y 2) la sensibilidad individual a los estímulos relacionados con dicha tarea (factores internos), es decir, las obreras podrían presentar diferencias casta-específicas en la percepción sensorial y/o en las respuestas conductuales a los estímulos relacionados con una tarea (Robinson, 1992).

1.3.1. Factores externos

Una obrera, dependiendo de las restricciones impuestas por la anatomía, puede cambiar de tareas conforme las circunstancias lo requieren, ajustando su nivel de actividad. De manera general, parece que las tareas son interdependientes por lo que el número de obreras que se unen a una tarea en un momento dado depende del número de obreras que realizan otras tareas. Estas proporciones cambian constantemente, lo que permite que las tareas no queden vacías si existe un descenso en el número de obreras que realizaban una tarea dada. Así, en respuesta a la remoción de individuos de una casta, las obreras restantes cambian para realizar las tareas que las obreras removidas ejecutaban (Gordon, 1996).

1.3.2. Factores internos

En muchas especies de insectos sociales se ha encontrado que existen factores genéticos que influyen la tendencia de los individuos a realizar una tarea (Parker, 2004). Las abejas, por ejemplo, se aparean muchas veces con distintos machos, por lo que la descendencia es genéticamente heterogénea. Experimentos de selección en abejas indican que la descendencia de diferentes padres difiere en la propensión para realizar ciertas tareas (Robinson & Page, 1988, 1989, 1995; Page et al., 1989, 1998; Rothenbuhler & Page, 1989; Giray & Robinson, 1996; Robinson et al., 1989; Pankiw & Page, 2001a), en la producción y sensibilidad a la hormona juvenil (HJ), así como en la sensibilidad social (Giray et al., 1999). En las hormigas cada vez se conocen más casos en los que las castas difieren en sus genotipos (Snyder, 1993; Fraser, et al., 2000; Stuart & Page, 1991). En la hormiga cortahojas

Acromyrmex echinator se ha encontrado que existe un componente genético del polimorfismo, característica que siempre se supuso como un fenómeno controlado exclusivamente por el ambiente. Los individuos de diferentes líneas paternas tienen diferentes predisposiciones para desarrollarse como obreras *minor* o *mayor*. No obstante, esta predisposición no es rígida, ya que en el proceso está involucrada también la crianza y el ambiente. De esta manera la poliandria (la fertilización de una hembra por múltiples machos) tiene un papel fundamental en la división del trabajo y el desarrollo del polimorfismo (Hughes et al., 2003; Sirviö et al., 2006).

El comportamiento de forrajeo en diversas especies de insectos está asociado con la expresión de un gen llamado gen *for* (de forrajeo), el cual codifica para una proteína cinasa dependiente de GMPc que se expresa en las células Kenyon de los CF (Ben-Shahar, 2005). En las abejas *Apis mellifera*, el gene *for* está implicado en la división del trabajo: las obreras forrajeras presentan una expresión más alta de este gen que las nodrizas; además, el tratamiento de las obreras jóvenes con GMPc causa forrajeo precoz (Ben-Shahar, et al., 2002) y fototaxis (Ben-Sahar et al., 2003). En las hormigas ocurre lo opuesto: mientras que las obreras jóvenes presentan altos niveles de expresión de este gen, las obreras forrajeras son las que presentan bajos niveles (Ingram et al., 2005). Los efectos de este gen pueden ser de largo plazo en la organización del sistema nervioso, y de corto plazo sobre la función de las neuronas del sistema sensorial y del SNC.

1.4. El superorganismo

Las hormigas tienen repertorios conductuales relativamente simples, sin embargo, vista desde lejos y en su ambiente, la colonia de hormigas puede considerarse como un superorganismo, una gran y difusa entidad, cuyo aparato de ingestión, compuesto por las obreras forrajeras, se mueve hacia adelante y hacia atrás en un ritmo circadiano sobre el territorio circundante (Hölldobler & Wilson, 1990). La eficiencia de la colonia se debe a la forma en que las hormigas coordinan su comportamiento a través de la comunicación, basada en sustancias que pasan de uno a otro individuo a través del gusto y el olfato llevando información acerca de diferentes aspectos de la vida social. Por esto, es más apropiado tratar a la colonia como una unidad funcional, un superorganismo en vez de como a un grupo de individuos (Heinze et al., 1994). Es la colonia, no los individuos, la que compete con otras entidades semejantes por los recursos y el espacio territorial. Las características que permiten considerar a la colonia como un organismo (Mortiz & Southwick, 1992) son las siguientes:

- 1) Se comporta como una unidad a partir de la función cooperativa de muchos miembros.
- 2) Muestra características sistémicas especie-específicas.
- 3) La colonia pasa por un ciclo de crecimiento y reproducción que es adaptativo.
- 4) La colonia está diferenciada en un "germoplasma" (machos y reinas) y un "soma" (obreras).
- 5) La reproducción de un superorganismo produce descendencia superorganísmica.
- 6) Los superorganismos generalmente son sésiles (pero no sus miembros).
- 7) Los superorganismos mantienen homeostasis intraorganísmica.
- 8) Los superorganismos se encuentran bien armados contra los enemigos o son crípticos.

1.4.1. Homeostasis social

Las respuestas de las colonias a los cambios ambientales producen una tendencia que les permite regresar al estado original por medio de asas de retroalimentación negativa, tanto en fisiología como conducta de los individuos. Esta forma de conservación de una situación estable se denomina homeostasis social: un proceso social se reajusta a sí mismo hacia el *status quo* o cambia hacia un nuevo estado adaptativo, permitiendo que las funciones sociales básicas de sobrevivencia prosigan con una mínima interrupción a través de la distribución de información basada en la emisión de feromonas y contactos físicos, etc., que mantienen estados estacionarios (Hölldobler & Wilson, 1990).

1.5. Demografía adaptativa y sociogénesis

El comportamiento de la sociedad está definido por su demografía. La distribución de frecuencia de edad y tamaño de las obreras son adaptativas ya que han sido moldeadas por la selección natural actuando en el nivel colonial. Los diferentes subgrupos de una sociedad son clases demográficas cuyas proporciones relativas ayudan a determinar el comportamiento del grupo (Wilson, 1980a,b,c). Contrario a la demografía de los organismos no sociales, en los insectos sociales la demografía es adaptativa: el nacimiento y muerte de las obreras tiene significado sólo con referencia a la sobrevivencia y reproducción de la reina, ya que la unidad de selección es la colonia. Lo importante son las características demográficas en el nivel colonial como el número de obreras grandes que actúan como soldados, el número de obreras que actúan como nodrizas, etc. Las proporciones de obreras son determinadas principalmente a través de la demografía adaptativa, la cual es la programación de la producción de individuos de diferentes castas que resulta en distribuciones de frecuencia de edad y tamaño en la casta obrera que son mantenidas constantes y que promueven la sobrevivencia y reproducción de la colonia (Wilson, 1985a,b). Cada especie tiene un programa de diferenciación morfológica y conductual particular por el cual cada grupo de obreras se especializa en tareas particulares, proceso llamado sociogénesis, el cual consiste en los pasos mediante los cuales los individuos sufren cambios en casta, comportamiento, y fisiología para construir la sociedad. Las señales ambientales disparan una secuencia de restricciones fisiológicas progresivas en los individuos que produce una distribución de frecuencias de edad y tamaño de la población obrera que incrementa la sobrevivencia y reproducción de la colonia. La demografía adaptativa se basa en que los insectos sociales son muy sensibles a los estímulos sociales, a los cambios en la densidad de población y a los flujos informativos y energéticos (Hölldobler & Wilson, 1990; Wilson, 1985a,b).

La demografía adaptativa ha sido estudiada en especies polimórficas como las de los géneros *Pheidole* y *Atta*. Las nuevas colonias de la hormiga corta-hojas *Atta cephalotes* son fundadas por reinas solitarias después del vuelo nupcial. La reina cría su primera generación de obreras con las reservas de su cuerpo, suficientes sólo como para criar un pequeño grupo de obreras hasta la madurez. Para que la colonia sobreviva, las obreras producidas deben encontrarse en un rango de tamaño suficientemente grande como para cortar vegetación fresca para sustrato del hongo. Este tamaño permite a la reina producir suficientes obreras y del tamaño mínimo necesario para la colecta de material vegetal (1.6 mm) y obreras lo suficientemente pequeñas (0.8 – 1 mm) para su procesamiento para el cultivo de

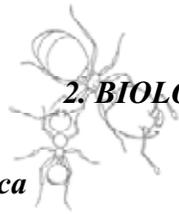
hongo. Conforme la colonia crece, la distribución de frecuencias de tamaño sufre variaciones en ambas direcciones, hacia obreras con tamaños de cabeza menores a 0.7 mm y hacia obreras con tamaños de 5 mm, de manera que la distribución de frecuencia se vuelve más discreta con picos marcados en diferentes tamaños de cabeza (Wilson, 1983b). Las colonias pueden reasignar sus recursos por lo que es el tamaño de la colonia y no la edad lo que determina la demografía adaptativa (Wilson, 1983a).

Aunque la división del trabajo implica una especialización en mayor o menor grado, generalmente es plástica. Las colonias responden a los cambios de condiciones internas y externas ajustando las proporciones de obreras (Wilson, 1985a,b). Esto se logra gracias a la flexibilidad conductual de los individuos ya son muy sensibles a los cambios en la densidad de población y al sistema estructurado de tareas. Esta plasticidad implica la existencia de mecanismos de control que operan en el nivel de la colonia, de manera que la regulación en la demografía adaptativa es una forma de homeostasis social. Las colonias de insectos son entidades biológicas dinámicas: el tamaño y la estructura de la población de obreras cambian con el tiempo, y de acuerdo con los cambios ambientales acelerando, retrasando o invirtiendo el desarrollo conductual o los cambios en la demografía a través de la regulación del desarrollo larval. Incluso las castas físicas más especializadas pueden ser inducidas a realizar tareas fuera de su repertorio normal. Por ejemplo, cuando la proporción de obreras *minor:mayor* de *Pheidole* baja del normal 3:1 ó 20:1 y llega a 1:1, las *mayor* cambian y comienzan a realizar tareas que normalmente sólo realizan las *minor* (Hölldobler & Wilson, 1990; Robinson, 1992). Además, la proporción de *minors:mayors* es controlada por mecanismos homeostáticos de retroalimentación que pueden incrementarla o disminuirla. Cuando la colonia está creciendo, las obreras consiguen suficiente alimento y las larvas son bien alimentadas, por lo que sus niveles de HJ son elevados, predisponiendo a las larvas hacia la determinación de soldados. Conforme la proporción de soldados aumenta, también aumenta la cantidad de una feromona inhibitoria a la cual la larva está expuesta. Esta feromona hace a la larva menos sensible a la HJ, de manera que larvas rodeadas de una alta proporción de soldados tienden a convertirse en obreras *minor*; mientras que aquellas en presencia de una baja proporción de *mayors* serán más sensibles a la HJ, extenderán su período de crecimiento larval y se convertirán en *mayors*. Este mecanismo mantiene constante la proporción de soldados (Hölldobler & Wilson, 1990).

La plasticidad en el comportamiento de las castas es un factor importante en la organización de la colonia que requiere de complejos cambios fisiológicos en los individuos, por lo que, aunque existe plasticidad, también existen límites: las *mayor* de *Pheidole* puedan cambiar su repertorio para realizar las tareas de las *minor*, pero las *minor* no pueden realizar las tareas de las *mayor*. Por lo tanto, las obreras pueden cambiar su comportamiento hacia algunas tareas, pero no a todas (Robinson, 1992).

Como los miembros de la colonia no pueden obtener información acerca del estado de la colonia completa, la información puede ser adquirida a través de las interacciones con otras obreras o a partir del estado del nido, lo cual puede estar facilitado por picos de actividad sincrónica de la actividad de las obreras. La decisión de las tareas a realizar podría estar basada en la integración adquirida a partir de las interacciones sociales acopladas con las predisposiciones conductuales asociadas con la casta o el estado fisiológico, lo cual puede inducir cambios en la actividad endocrina y genética de las obreras, induciendo el cambio en comportamiento (Robinson, 1992).





2. BIOLOGIA SOCIAL DE LAS HORMIGAS

2.1. Ubicación zoológica

La sistemática de las hormigas es la siguiente (Gauld & Bolton, 1988; Hölldobler & Wilson, 1990):

- Phylum: Arthropoda
- Clase: Insecta o Hexapoda
- Subclase: Pterygota
- Orden: Hymenoptera
- Suborden: Apocrita. Himenópteros con “cintura” constreñida tipo avispa.
- Infraorden: Aculeata. Himenópteros con aguijón.
- Superfamilia: Formicoidea (hormigas).
- Familia: Formicidae. Hormigas. Himenópteros eusociales distribuidos en 12 subfamilias:
 1. Subfamilia Sphecomyrminae (extinta)
 2. Subfamilia Nothomyrmecinae
 3. Subfamilia Myrmecinae
 4. Subfamilia Ponerinae
 5. Subfamilia Dorylinae
 6. Subfamilia Ecitoninae
 7. Subfamilia Leptanillinae
 8. Subfamilia Pseudomyrmecinae
 9. Subfamilia Myrmicinae
 10. Subfamilia Aneuretinae
 11. Subfamilia Dolichoderinae
 12. Subfamilia Formicinae

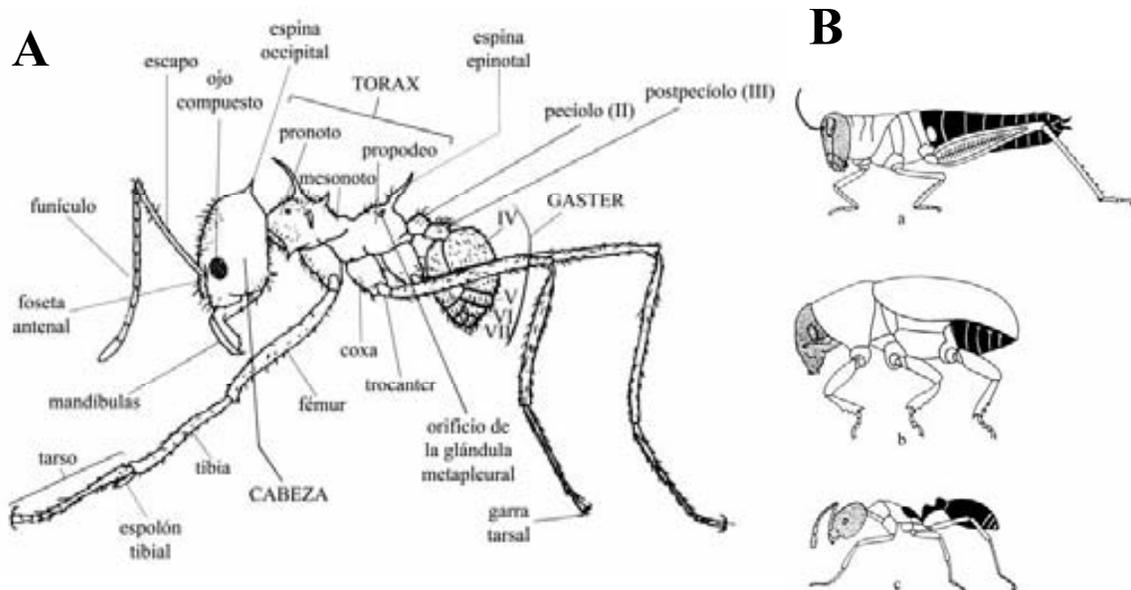


Figura 1. A. Dibujo de una obrera *Atta*, mostrando las principales características morfológicas externas. Los números romanos indican el número del segmento abdominal (Modificado de Weber, 1972). B. Regiones principales de tres clases de insectos: a) una langosta; b) un escarabajo, y c) una hormiga. La región sombreada corresponde a la cabeza, la blanca al tórax, y la región en negro al abdomen (Modificado de Brusca & Brusca, 1990).

2.2. Plan corporal

El cuerpo de las hormigas consta de tres partes apreciables: cabeza, tórax y abdomen (figura 1). En la cabeza están los órganos sensoriales más importantes, el cerebro y glándulas involucradas en la alimentación y comunicación. Las antenas, los ojos y las mandíbulas son las estructuras más conspicuas en la cabeza. El tórax está constituido por tres segmentos, cada uno con un par de patas. Sólo los individuos fértiles presentan alas: un par en el mesotórax y otro par de menor tamaño en el metatórax. En el gáster se encuentran órganos digestivos, de la excreción, glándulas de defensa y comunicación, así como los órganos de la reproducción. En la terminación del gáster se encuentra el aguijón (cuando lo hay) conectado al reservorio de la glándula de veneno (Wheeler, 1960).

2.3. Eusociedades

Una sociedad es un grupo de individuos de la misma especie organizados cooperativamente más allá de la mera actividad sexual mediante sistemas de comunicación (Wilson, 1980a). Las hormigas viven en familias extendidas cuyos miembros son exclusivamente hembras. Todas las hormigas vivientes son eusociales, término que implica cuatro características fundamentales:

- 1) División del trabajo reproductivo. Es la característica clave de la eusocialidad y significa que existen individuos fértiles e individuos estériles que realizan labores de mantenimiento que benefician a los reproductores.
- 2) Cooperación en el cuidado de la cría (la prole ayuda a los progenitores durante su vida).
- 3) Sobrelapamiento de generaciones de adultos que ayudan al cuidado de la descendencia.
- 4) Altruismo. Es el comportamiento que un individuo realiza en tal forma que el resultado es el incremento en sobrevivencia o producción de descendencia de otro individuo con un consecuente decremento en su propia sobrevivencia o producción de descendencia. Es una característica fundamental de la eusocialidad (Bourke & Franks, 1995). La determinación haplodiploide del sexo tiene efectos en la evolución del altruismo. Las hembras (reinas y obreras) de las hormigas se desarrollan de huevos fecundados (diploides) con un juego de cromosomas de la madre y uno del padre. Los machos se desarrollan de huevos no fecundados (haploides), con sólo un juego de genes provenientes de la madre. No hay reducción del número de cromosomas durante la espermatogénesis (Croizer, & Pamilo, 1996). En promedio, todas las hermanas hijas de la misma madre y del mismo padre tienen en común la mitad de los genes de la madre (50%) y todos los genes de su padre (100%). Como las hembras comparten más genes entre ellas (un 75%) que los que comparten con sus hermanos (25%) o con su madre (50%), la aptitud de las obreras depende mayormente de la fecundidad de sus hermanas fértiles que de la suya propia, lo cual ha favorecido la evolución del altruismo (Hamilton, 1964).

2.4. Historia de vida (ciclo biológico)

La actividad de la colonia gira alrededor del bienestar y reproducción de la reina, de manera que el ciclo de vida de la colonia es una forma en la que la reina produce más reinas. Desde esta perspectiva, el ciclo biológico de las sociedades de hormigas involucra la inversión y administración de energía para

producir obreras hasta el momento en el que las “ganancias” pueden ser empleadas en la producción de nuevas reinas y machos (Sudd & Franks, 1987). La historia de vida de las colonias puede dividirse en tres etapas o estados (figura 2): 1) estado de fundación de la colonia; 2) estado ergonómico, y 3) estado reproductivo (Oster & Wilson, 1978; Hölldobler & Wilson, 1990).

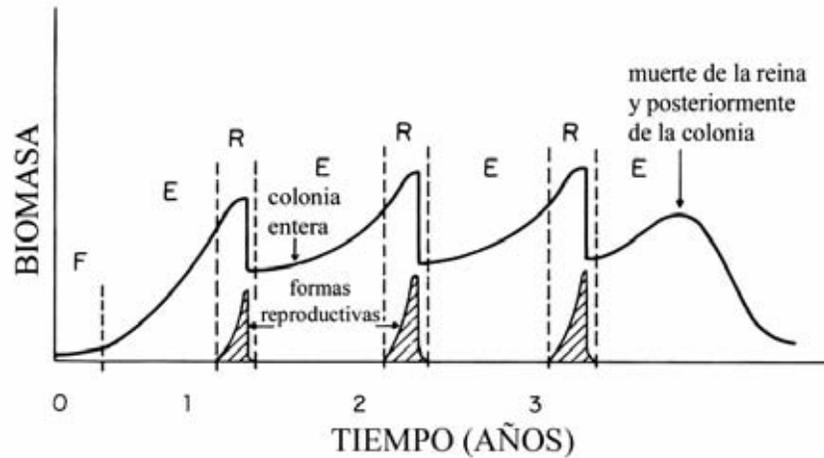


Figura 2. Historia de vida de las colonias de hormigas. *F*, estado de fundación de la colonia; *E*, estado ergonómico; *R*, estado reproductivo. Después de la liberación de las formas reproductivas durante la época de apareamiento, las colonias disminuyen su tamaño y vuelven a entrar en el estado ergonómico. Al morir la reina y cesar la producción de obreras, la población decrece y al final, la colonia perece (Oster & Wilson, 1978).

2.4.1. Estado de fundación de la colonia

Comienza con el vuelo nupcial: la reina virgen parte del nido materno en el que ha sido criada, dejando a su madre y a sus hermanas. En ciertas épocas del año, las colonias producen individuos fértiles, machos y hembras alados que se aparean después de la época de lluvias. Después del vuelo nupcial, todos los machos mueren, hayan logrado aparearse o no. Posteriormente al apareamiento, la hembra se arranca las alas y se enterra excavando una cámara en el suelo y comienza la oviposición empleando las reservas grasas y de los músculos alares. Con esta fuente de energía y proteínas produce huevos y su primera generación de obreras. Las siguientes son lo suficientemente fuertes como para salir al exterior y conseguir alimento. Durante la fundación, las reinas *Atta* producen el tamaño apropiado de obreras que son lo suficientemente grandes como para realizar todas las tareas necesarias de forrajeo, atender al hongo y a la cría, pero son tan pequeñas como sea posible de manera que puedan ser producidas con los limitados recursos disponibles para la colonia (Wilson, 1983b).

2.4.2. Estado ergonómico (exponencial)

Una vez que la segunda generación de obreras ha sido criada, las colonias entran a un período de rápido crecimiento en el que sólo se producen obreras. La reina se consagra a la oviposición y las obreras realizan todas las tareas, incluyendo la alimentación de la reina. La sociedad se cierra y casi nunca se adoptan individuos del exterior. En esta fase, las colonias de *Atta* producen un amplio rango de tamaños de obreras para construir líneas de producción más eficientes con castas más sofisticadas y especializadas. En esta etapa, las sociedades polimórficas producen sus soldados. Posteriormente, el crecimiento del estado ergonómico disminuye hasta detenerse (Sudd & Franks, 1987).

2.4.3. Estado reproductivo

En algún tamaño crítico, una colonia debe comenzar a producir descendencia sexual para realizar su aptitud inclusiva. Esto implica el desvío de recursos de la producción de obreras hacia la crianza de machos y reinas. El tiempo y la cantidad de la producción de descendencia sexuada es crítica para el futuro de la colonia completa. Si la producción ocurre demasiado pronto en el desarrollo de la colonia, puede representar ventajas, ya que es posible que esta descendencia funde nuevas colonias pronto. Sin embargo, esto puede reducir el número total de la descendencia que una colonia puede producir durante toda su vida (Sudd & Franks, 1987; Hölldobler & Wilson, 1990).

2.5. Comunicación

Una de las principales ventajas de la comunicación es que mantiene una sociedad más o menos cerrada. Por medio de estas fronteras, es posible reconocer lo que no pertenece a la sociedad, de manera que sus beneficios permanecen confinados a sus miembros. Por lo tanto, muchas señales están involucradas en el reconocimiento de la membresía. La comunicación está también relacionada con la explotación del ambiente, defensa del nido, e inversión en infraestructura (Sudd & Franks, 1987).

Aunque las formas de comunicación en las hormigas son muy diversas (golpecitos, estridulaciones, frotaciones, sujeciones, antenaciones, gustación, y secreción de sustancias químicas), sus sistemas de comunicación están basados en las señales químicas. Las señales visuales y las ondas atmosféricas no juegan un papel muy importante. Las vibraciones transportadas por el sustrato son usadas en forma limitada como señales de alarma. El tacto no transmite grandes cargas de información. Por el contrario, las señales químicas están implicadas en todas las categorías de comunicación. Las siguientes son las principales categorías de comunicación en hormigas (Hölldobler & Wilson, 1990):

- 1) Alarma.
- 2) Atracción.
- 3) Reclutamiento (a una nueva fuente de alimento o un nuevo nido).
- 4) Asistencia.
- 5) Trofalaxia (intercambio de líquido oral y anal).
- 6) Intercambio de partículas alimenticias sólidas.
- 7) Efectos de grupo: facilitando o inhibiendo una actividad dada.
- 8) Reconocimiento, de compañeros de nido, de castas particulares, o de los muertos.
- 9) Determinación de la casta, por inhibición o por estimulación.
- 10) Control de reproductivos en competencia.
- 11) Señales de rango territorial y marcas de nido.
- 12) Comunicación sexual, incluye reconocimiento especie-específico, reconocimiento sexual y sincronización de la actividad sexual.

2.5.1. Comunicación química

La comunicación química no sólo es universal en el mundo vivo, sino también es el sistema más antiguo y ventajoso. Sin embargo, como depende de la difusión, es lenta y con desaparición gradual

(Wilson, 1980a). Las moléculas usadas en la comunicación entre miembros de la misma especie son llamadas feromonas y son producidas por glándulas exocrinas y liberadas al ambiente por un individuo como una señal en respuesta a un estímulo. Estas señales producen respuestas en otros individuos que las prueban o las huelen (Chapman, 1998). Las acciones de las feromonas pueden ser distinguidas como efectos liberadores (evocando una respuesta), o como efectos cebadores (cuando los sistemas reproductor y endocrino son alterados fisiológicamente) (Hölldobler & Wilson, 1990).

Todos los niveles de la socialidad de las hormigas tienen una base quimiosocial: la regulación, integración y cohesividad dependen de ella. Las respuestas a las feromonas son una función de la concentración y del contexto, por lo que una sola feromona puede tener diferentes funciones elicitando diferentes respuestas (Sudd & Franks, 1987). Las hormigas usan entre 10 y 20 señales químicas diferentes que cumplen diversas funciones y que mantienen a la colonia organizada. Hay dos grupos importantes de feromonas en las hormigas. El primero es el olor de la colonia, el cual reside en la cutícula y participa en la discriminación entre compañeros y extraños. El segundo grupo incluye feromonas producidas en glándulas que eliciten respuestas especie-específicas (Sudd & Franks, 1987).

2.5.1.1. Glándulas exocrinas de las hormigas

En las hormigas existe una gran variedad de glándulas exocrinas que producen feromonas que son liberadas en respuesta a estímulos específicos (figura 3).

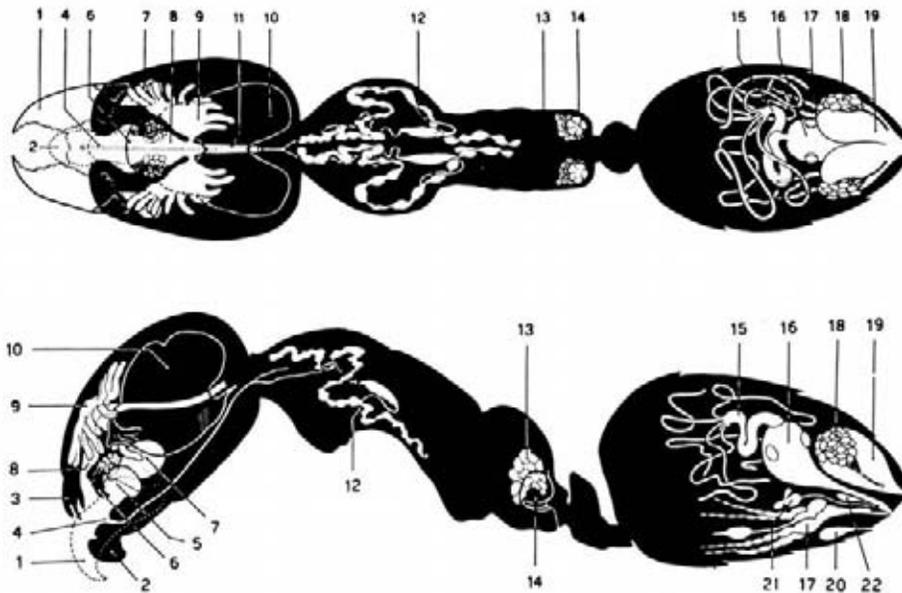


Figura 3. Esquema de una sección sagital de una hormiga *Iridomyrmex humilis* en donde se muestran las principales glándulas exocrinas. 1, mandíbulas; 2, labio; 3, labro; 4, abertura de la glándula labial; 5, bolsa infrabucal; 6, base de la glándula maxilar; 7, glándula mandibular; 8, faringe; 9, glándula postfaríngea; 10, cerebro; 11, ducto de la glándula labial; 12, glándula labial; 13, glándula metapleurar; 14, reservorio de la glándula metapleurar; 15, intestino; 16, vejiga rectal; 17, ovarios; 18, glándula pigidial; 19, reservorio de la glándula pigidial; 20, glándula esternal (glándula de Pavan); 21, glándula de veneno; 22, glándula de Dufour (Modificado de Hölldobler & Wilson, 1990).

Aunque más de diez órganos han sido implicados en la producción de semioquímicos, seis glándulas clave están ampliamente distribuidas entre las hormigas (Hölldobler & Wilson, 1990):

- i) Glándula de Dufour. Produce feromonas de alarma, reclutamiento y atracción sexual.
- ii) Glándula de veneno. Produce veneno usado en la defensa o en la cacería.
- iii) Glándula pigidial. Produce feromonas de alarma, defensa, reclutamiento y atracción.
- iv) Glándula de Pavan. Produce feromonas de trilla o rastro.
- v) Glándulas mandibulares. Son un par de sacos llenos con mezclas de alcoholes, aldehídos y cetonas. Tienen un reservorio y el ducto de salida conectado a las mandíbulas que abre cerca del borde anterior de la boca. Sus productos funcionan como sustancias de alarma y defensa.
- vi) Glándula metapleural. Está situada en el tórax. Sus secreciones sirven como antisépticos que protegen al cuerpo y al nido contra microorganismos. Su presencia es una característica diagnóstica del grupo.

2.5.1.2. *Propiedades de las feromonas*

Aunque las señales químicas no son ambiguas debido a que con muy poca probabilidad se encuentran en el ambiente, la modulación y dirección de la señal es difícil, debido principalmente a que las señales químicas se propagan por difusión o por micro turbulencias, mecanismos fuera de control para el emisor. Además, existe otro problema para terminar con el mensaje ya que la sustancia persiste aun después de que ha producido algún efecto (Sudd & Franks, 1987). El concepto de espacio activo ha sido desarrollado para identificar la zona dentro de la cual la concentración de una feromona se encuentra arriba o abajo de la concentración umbral. Este espacio activo es la señal en sí (Wilson, 1980a; Hölldobler & Wilson, 1990). La velocidad de propagación de las sustancias químicas depende de sus propiedades físicas, particularmente su constante de difusión y volatilidad. Por lo tanto, el tamaño molecular de muchas feromonas representa un balance entre dos requerimientos: volatilidad y especificidad (Chapman, 1994). Generalmente, las moléculas pequeñas son usadas cuando se necesita una dispersión rápida, mientras que moléculas más grandes y menos volátiles tienden a funcionar como atrayentes cuando la exposición prolongada es necesaria (Tumlinson & Teal, 1987). La especificidad comunicativa de las feromonas puede lograrse de dos maneras:

- i) Por la estructura molecular. Tamaño molecular, forma, quiralidad, grado de insaturación, grupo funcional, posición, número y geometría de dobles enlaces, isomerismo, etc.
- ii) Por la mezcla específica de compuestos (Chapman, 1994). Las mezclas de feromonas pueden funcionar sinérgicamente (Tumlinson & Teal, 1987), aunque también los componentes de la mezcla pueden tener efectos distintos.

2.5.1.3. *Tipos de feromonas*

Las feromonas sociales pueden clasificarse en cuatro categorías de acuerdo con su función:

- i) Feromonas de alarma. Son importantes y se presentan cantidades significativas en los individuos (Blum, 1970a). Alarmar a los compañeros de nido significa ponerlo sobre aviso de algún peligro (Wilson, 1980a). Las respuestas a las señales de alarma son variadas y dependen de diversos factores. Una hormiga en estado de alarma puede alejarse del peligro, o dirigirse agresivamente hacia él, o sólo dar vueltas en un estado de alerta. El comportamiento de alarma

puede dividirse en dos etapas: a) alerta, caracterizada por el detenimiento de la actividad, la cabeza se levanta y las antenas se inmovilizan; y b) activación que es marcada por un desplazamiento más o menos rápido orientado hacia la fuente de perturbación. La alarma precede a la acción de defensa: agresión, huida, asistencia de un compañero de nido, trabajo de construcción, etc. (Passera, 1984). Las glándulas mandibulares son el sitio más común de producción de feromonas de alarma. Aunque las sustancias empleadas como feromonas de alarma presentan una gran diversidad estructural, un gran número de ellas son cetonas como la 2-heptanona, la 4-heptanona, la 4-metil-3-heptanona, etc. (Hölldobler & Wilson, 1990).

- ii) Feromonas de reclutamiento. Conducen a los compañeros de nido hacia un sitio en el que son requeridos para alguna labor (Wilson, 1971).
- iii) Feromonas territoriales. Marcan los territorios de uso de una colonia (Jaffe, 1993).
- iv) Feromonas sexuales. Están involucradas en: a) la supresión de la reproducción de las obreras; b) la coordinación del vuelo nupcial, y c) el encuentro de un sexo por el otro durante el vuelo nupcial (Sudd & Franks, 1987). En especies que presentan feromonas sexuales de atracción hacia las hembras, los machos presentan sensilas especializadas en sus antenas y estructuras especializadas de procesamiento en sus cerebros (Homberg et al., 1989).

2.5.2. *Comunicación con mezclas de feromonas y multimodal*

La comunicación de las hormigas, y en general de los insectos sociales, es más compleja que la relación feromona-significado, ya que, en realidad las señales feromonales de un solo compuesto son muy raras. De hecho, su sistema de comunicación depende tanto de las mezclas de feromonas producidas cada una por una glándula, de las mezclas multiglandulares, así como de la modulación multimodal y del contexto en el que se desarrolla el proceso comunicativo (Hölldobler, 1999).

Aunque la comunicación en las hormigas está basada en feromonas, existen señales de otras modalidades sensoriales, como los estímulos vibracionales o táctiles, que, combinadas con las señales químicas, proporcionan modulación al sistema de comunicación a través de sistemas multimodales (Hölldobler, 1995, 1999). De esta manera, una señal puede estar compuesta por distintos componentes físicos transmitidos simultáneamente o en corta secuencia. Entre los componentes que puede presentar una señal multimodal pueden estar las vibraciones propagadas por el sustrato como los golpecitos abdominales de las hormigas, la estridulación generada por el aparato estridulador, etc. Estos componentes incrementan el efecto feromonal. Ciertos componentes funcionan como liberadores, mientras que otros son moduladores de los estados motivacionales de los receptores.



3. SISTEMA OLFATIVO PERIFÉRICO DE LAS HORMIGAS



3.1. Órganos de los sentidos

Los órganos sensoriales son la interfase que monitorea el mundo exterior e interior por medio de células especializadas capaces de detectar diversas formas de energía ambiental. Estas formas de energía son detectadas por una membrana celular especializada y transformada en un potencial receptor eléctrico, el cual es codificado en una descarga de potenciales de acción (PAs) que es transmitida a través de nervios periféricos hacia el sistema nervioso central (SNC), en donde se interpreta la información y se producen respuestas (Withers, 1992). La relación entre la intensidad del estímulo y la respuesta de los receptores (potencial receptor y frecuencia de descarga de PAs), es de carácter logarítmico, lo cual le permite al receptor detectar un amplio rango de intensidades de estímulo ya que la saturación se alcanza a muy altas intensidades de estimulación (Withers, 1992; Randall, 2002).

Los mecanismos perceptuales realizan las siguientes tareas: 1) filtran y transforman las energías ambientales en eventos fisiológicos, y 2) dan “sentido” o extraen información de estos procesos fisiológicos. Los mecanismos centrales realizan una abstracción de las señales del ambiente transformando la “información” sensorial en categorías manejables que tienen sentido para el animal. Las energías ambientales nada tienen que ver con los fenómenos que desencadenan en los receptores sensoriales y en las posteriores etapas de procesamiento en el sistema nervioso. Dentro de los cráneos de los animales no hay olores, no hay colores, no hay sonidos, no hay luz, sólo actividad eléctrica y metabólica. Esto se debe a que los procesos que ocurren en el sistema nervioso se han alejado de los estímulos ambientales que los disparan: se han internalizado y privatizado. Por lo tanto, la percepción del mundo se basa en dos principios organizacionales del sistema nervioso:

1. El mundo sensorial está representado internamente como mapas neurales.
2. Las neuronas de diferentes niveles a lo largo de las vías centrales deben representar e integrar las señales sensoriales para así, extraer diferentes clases de información de esos mapas.

Mientras que los sistemas sensoriales tienen una composición neuronal más o menos constante debido a las restricciones impuestas por el ambiente físico, los sistemas perceptuales son variables ya que dependen de historias filogenéticas de adaptación a condiciones ambientales complejas. Así, los mecanismos sensoriales son adaptaciones desarrolladas para resolver “necesidades” ecológicas particulares en lugar de dispositivos de procesamiento todo-propósito. Un sistema está diseñado para resolver un problema particular, no más (Wehner, 1992). Sin embargo, cuando las presiones de selección son similares, resultan en evolución convergente de estructuras y sistemas.

3.2. Olfato: quimiorrecepción a distancia

Las hormigas tienen una gran diversidad de órganos sensoriales que son importantes tanto para su relación con el medio como para su vida social. No obstante, el olfato es el principal canal sensorial por medio del cual las hormigas reconocen su alimento, presas, enemigos, compañeros de nido, feromonas, etc. El olfato es la base de la organización social de las hormigas (Blum, 1970a,b).

La quimiorrecepción es el proceso por el cual la energía potencial existente en la atracción y repulsión mutua de las partículas que constituyen los átomos es detectada (Dethier, citado en Romoser & Stoffolano, 1994). Es un estado con variaciones en intensidad según las condiciones externas (concentraciones, tipos de químicos, etc.) e internas (motivación, etc.) durante el cual los órganos quimiorreceptores responden al contacto directo con átomos y moléculas.

La quimiorrecepción puede dividirse en tres sentidos químicos (Hodgson, 1974):

1. Quimiorrecepción a distancia u olfato. Es mediada por quimiosensilas que responden a moléculas en bajas concentraciones (≈ 100 moléculas en 1cm^3) y que pueden mostrar un alto grado de especificidad. Los estímulos olfativos están asociados con una amplia variedad de actividades, no sólo la alimentación.
2. Quimiorrecepción por contacto o gusto. Las quimiosensilas por contacto son excitadas por contacto directo con las moléculas en solución en concentraciones más altas que los estímulos quimioolfatorios. Son menos sensibles y están asociadas con actividades alimenticias.
3. Sensibilidad química general. Involucra sensilas menos discriminativas, insensibles excepto a concentraciones altas de un químico. Se asocian con respuestas evasivas o de escape.

Entre el olfato y el gusto, existe una clara distinción: el sistema gustativo generalmente está relacionado con la alimentación, y el sistema olfativo está relacionado no sólo con la alimentación, sino con la detección de una amplia variedad de estímulos químicos: sexo, parentesco, hábitat, etc. Pero la principal diferencia es la organización central de las proyecciones de los receptores del gusto y las del olfato, ya que mientras los quimiorreceptores por contacto terminan en el ganglio del segmento donde se encuentran dichos receptores, los receptores olfativos terminan en los LA del cerebro. Además, el número de células receptoras, las sustancias que estimulan esos receptores y las categorías de estímulos que pueden ser discriminadas, son menores para el gusto que para el olfato (Hildebrand, 1995).

Aunque los estímulos químicos son llamados odoríferos y sus equivalentes perceptuales se refieren como olores, se puede emplear la palabra olor como referente a la sustancia que provoca la percepción olfativa, y aquí se seguirá esta terminología. Existen restricciones fisicoquímicas que han sido importantes durante la evolución en el desarrollo de los sistemas sensoriales olfativos. Así pues, la discriminación olfativa no depende de una sola propiedad, sino de múltiples propiedades moleculares. Estas propiedades pueden ser caracterizadas según tres niveles de organización (Shepherd, 1991):

- 1) Las propiedades individuales de una molécula: grupos funcionales, longitud de la cadena, o posiciones de dobles enlaces. Estas propiedades pueden ser referidas como determinantes.
- 2) El grupo de propiedades de un solo tipo de molécula. En este caso, la molécula individual puede ser referida como ligando odorífero, cuyos determinantes constituyen un olfatóforo.
- 3) La mezcla de diferentes moléculas emitidas por un objeto particular es la que la identifica a nivel perceptual y puede ser referida como el objeto-olor.

Diversos parámetros moleculares determinan la cualidad de un olor: geometría, conectividad, cargas eléctricas y propiedades fisicoquímicas, por lo que puede decirse que la discriminación olfativa cae

dentro del área general del reconocimiento de patrones. El olfato es un sentido molecular en el cual la información de las señales moleculares es transformada en patrones de actividad cerebral. Este proceso es complejo debido a que no hay una obvia organización espacial de las conexiones neurales que se presentan en otros sistemas sensoriales. De esta manera, la vía olfativa realiza una serie de procesos computacionales neurales sobre la información sensorial molecular que da forma a las percepciones olfativas (Homborg et al., 1989; Shepherd, 1991). El procesamiento involucra la formación de una serie de mapas de actividad a lo largo de la vía olfativa: 1) transducción sensorial en los receptores, 2) codificación en los glomérulos del lóbulo antenal (LA), y 3) procesamiento en las neuronas de proyección que terminan en los CF del protocerebro.

3.2.1. Antenas: la nariz de los insectos

Las antenas son los órganos sensoriales más importantes de las hormigas y los principales órganos olfativos. Son apéndices pareados en forma de filamento que se articulan con la cápsula cefálica y están localizadas en la porción anterior cerca de los ojos. Las antenas de las hormigas son de forma geniculada y están formadas por dos partes: el escapo y el funículo (figura 4). El escapo se une a la cabeza en una cavidad llamada foseta antenal. El funículo está formado por pequeñas secciones, de las cuales la primera es llamada pedicelo, y al conjunto formado por las restantes secciones, o *anulli*, se le llama flagelo. En el flagelo se encuentran muchos receptores olfatorios y mecanosensoriales.

Los movimientos antenales relacionados con la detección de estímulos se llaman antenaciones. La antenación involucrada en la orientación táctil o en el análisis de la distribución espacial de los olores, requiere de movimientos activos para el muestreo sensorial, ya que incrementa la detección de gradientes olfatorios por quimiorreceptores fásicos. En respuesta a nuevos estímulos, estos movimientos aumentan en frecuencia. Los movimientos de antenación directa de objetos que se lleva a cabo para explorar superficies, como el cuerpo de otras hormigas, requieren de un control más preciso que los movimientos antenales de olfacción del espacio aéreo (Ehmer & Gronenberg, 1997a,b).

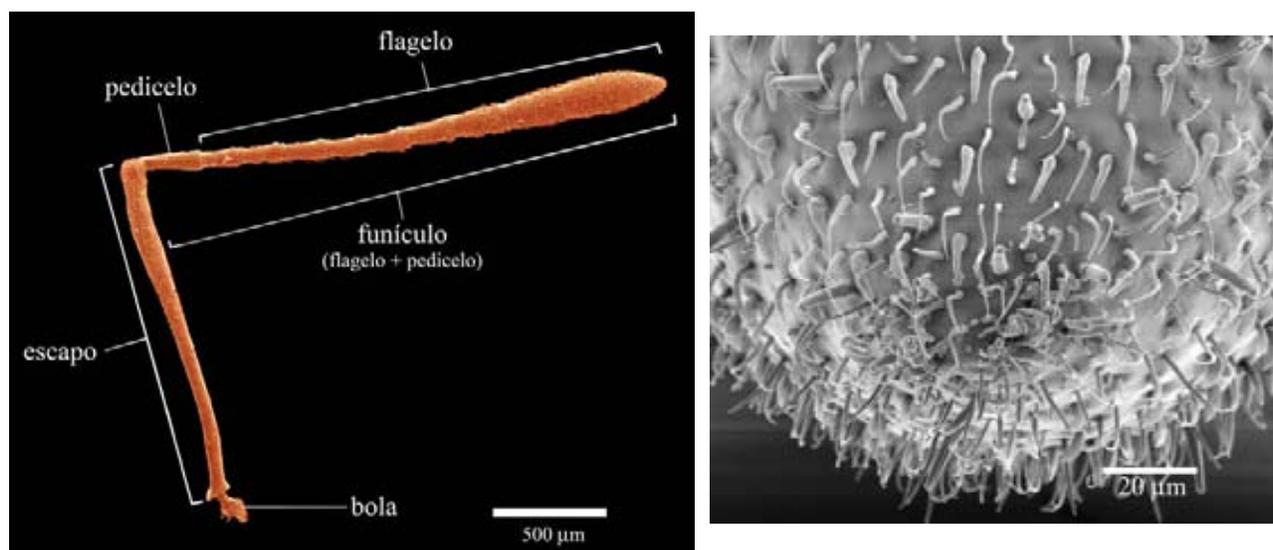


Figura 4. Izquierda. Micrografía electrónica de barrido de la antena de una obrera de *Atta mexicana*. Se indican las principales características morfológicas. Derecha. Micrografía electrónica de barrido de la punta de la antena de una obrera *Atta mexicana*, en donde se observan las sensilas que la cubren. Se distinguen al menos tres tipos de sensilas.

3.2.2. Sensilas: morfología de los órganos sensoriales

Los órganos sensoriales que captan información ambiental y la transducen llevándola al cerebro son llamados sensilas. El número de sensilas varía con las especies, el sexo y la casta en insectos sociales (Jaisson, 1972). Además, sobre la antena las sensilas se encuentran en una distribución especie-específicamente estereotipada. Aunque no hay un tipo morfológico asociado a una función específica, las sensilas que presentan muchos poros de 10-20 nm de diámetro involucran funciones olfativas. Los tipos morfológicos de sensilas varían con la forma de las estructuras cuticulares asociadas y en el número de neuronas receptoras. Aunque esto no implica necesariamente una función particular, algunas sensilas parecen siempre estar asociadas con la misma función (Bullock & Horridge, 1965).

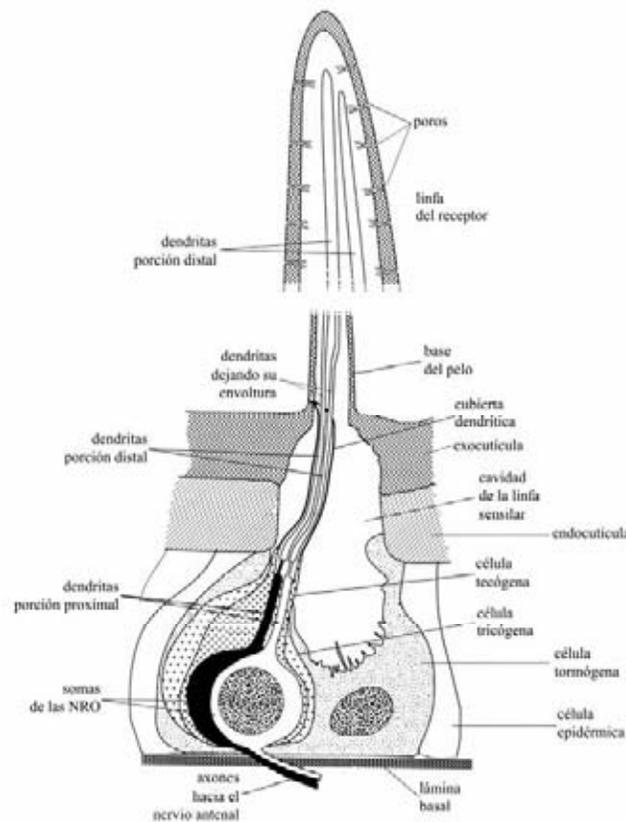


Figura 5. Esquema de una sección a través de una sensila olfativa (Modificado de Chapman, 1998).

Cada sensila está compuesta por tres tipos celulares (figura 5):

- 1) La célula tricógena que forma los proceso cuticulares.
- 2) La célula tormógena, que forma la foseta.
- 3) Una o varias neuronas bipolares (neuronas receptoras olfativas, NRO) con dendritas hacia la linfa, la cual está en contacto con el ambiente, y un axón que proyecta directamente hacia los LA del cerebro (Hodgson, 1974). Los axones de las NRO se juntan con los de las otras sensilas formando el nervio antenal, que se encuentra a lo largo la antena hasta llegar al LA del deutocerebro en donde los axones se segregan hasta terminar en estructuras de neuropilo llamadas glomérulos (Homberg et al., 1989).

3.3. Fisiología de los órganos sensoriales

Las NROs están divididas en dos tipos principales: generalistas y especialistas según sus rangos receptivos. Este rango se ha llamado rango receptivo molecular (RRM), de manera que las generalistas tienen amplios RRM mientras que las especialistas tienen reducidos RRM. Es probable que los RRM reflejen las interacciones de los determinantes de los ligandos con los subsitios del receptor. En los invertebrados existen subtipos de NROs generalistas y especialistas. Además, existe una distribución espacial de subgrupos de NROs: cada *anulli* del flagelo de la antena tiene arreglos característicos de ciertos tipos de sensilas, por lo que las sensilas están distribuidas estereotipadamente en las antenas. Debido a esto, es posible que los insectos monitoreen información acerca de la distribución espacial de los olores en el ambiente conservando los niveles de estimulación en la punta, en el medio y en la base del flagelo (Hildebrand & Shepherd, 1997; Jhaveri et al., 2000; Stocker, 2001). Se han descrito cuatro tipos funcionales de neuronas olfatorias (en los casos 1 y 2 las terminaciones podrían llegar a glomérulos específicos del LA):

1. Especialistas estrechas (feromonas sexuales; extrema especificidad, incluso a *cis* y *trans*).
2. Especialistas de grupo (responden a un grupo cercano de compuestos (alcoholes o esteroides)).
3. Generalistas de grupo (la respuesta varía entre células).
4. Generalistas amplias (responden a una gran variedad de compuestos) el SNC está involucrado en el desciframiento entre este grupo y las generalistas de grupo.

3.3.1. Eventos perirreceptores: contacto odoríferos –linfa/mucosa

Las moléculas odoríferas son adsorbidas por las superficies cerosas de la sensila, después de lo cual difunden hacia la linfa sensilar a través de poros cuticulares (Vogt, 1987). Existen moléculas especiales que transportan los odoríferos a través de la linfa hacia los sitios receptivos de las NROs. Estas moléculas de bajo peso molecular, conocidas como proteínas que unen olores (OBP, olfactory-binding proteins), se encuentran en altas concentraciones en la linfa sensilar principalmente alrededor de las dendritas de las NROs. También existen proteínas que se unen exclusivamente a feromonas (PBPs, pheromone-binding proteins). En la linfa también se han encontrado estererasas que degradan las moléculas odoríferas, tanto generales como feromonales (Hildebrand & Sheperd, 1997). La función de las OBP está relacionada con el reconocimiento, selectividad y discriminación de los estímulos ya que tienen una alta afinidad por sus ligandos. Además, incrementan la solubilidad de los olores ya que muchos olores importantes son hidrofóbicos. Las OBP, solubles en agua, capturan las moléculas odoríferas solubilizándolas y transportándolas a través de la linfa sensilar (ambiente acuoso) hacia las dendritas de las NRO, donde inicia la transducción sensorial. El complejo formado por las OBP-molécula odorífera facilita la acción de las estererasas que inactivan la acción del odorífero, previniendo de la acción extendida de las moléculas odoríferas (Kaisling, 2001) (figura 6).

3.3.2. Interacción entre receptores olfatorios y olores

Después de la migración en la linfa, las moléculas contactan con receptores específicos de la membrana de la célula receptora, lo cual abre canales catiónicos a través de segundos mensajeros vía

un receptor acoplado a proteínas G involucrando la fosfolipasa-C y al IP_3 . En *Drosophila melanogaster* se ha identificado una familia de receptores con siete dominios transmembranales (como en los vertebrados), codificados por una gran familia de multigenes que se expresan en las NRO (Elmore & Smith, 2001) y cuya respuesta a los olores activa la vía metabólica de segundos mensajeros a través de proteínas G (Vosshall, 2000, 2001; Wetzell et al., 2001; Pophof & Van der Goes van Nater, 2002). Se han identificado 60 genes involucrados en la producción de proteínas receptoras olfativas de *D. melanogaster*. La expresión de dichos genes es altamente estereotipada en las antenas: cada gen se expresa en un subgrupo de NRO de la antena o del palpo y en diferentes etapas del desarrollo (Jhaveri et al., 2000; Vosshall, 2001). Probablemente cada NRO expresa un sólo gen receptor (Vosshall, 2001), por lo que tiene un espectro único de respuesta a las moléculas odoríferas. Además, diferentes NRO se encuentran combinadas en configuraciones estereotipadas en cada una de las diferentes sensilas, proporcionando a estas su rango de respuestas (Bruyne et al., 2001).

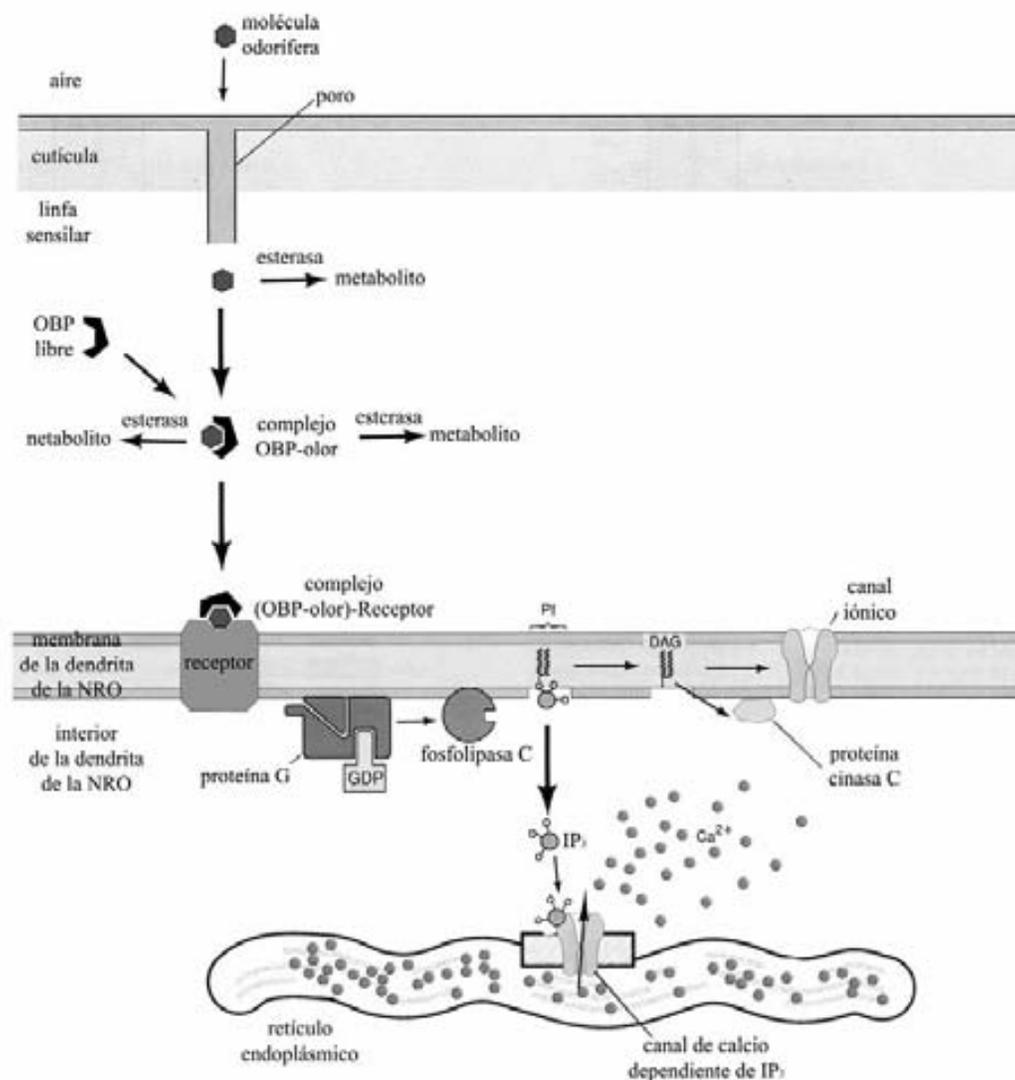


Figura 6. Esquema de los procesos involucrados durante la recepción olfativa. El proceso comienza cuando las moléculas odoríferas del ambiente entran a la sensila a través de los poros de la cutícula. Ya en la sensila, las moléculas odoríferas pueden ser degradadas por esterasas o bien pueden unirse a las OBP. El complejo OBP-moléculas odoríferas puede unirse a los receptores que hay sobre la membrana de la dendrita de la NRO o puede ser degradado por las esterasas. Una vez formado el complejo [OBP-olor]-Receptor, se activa la vía de segundos mensajeros.

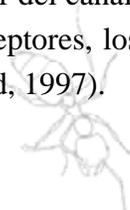
3.3.3. Transducción y discriminación olfativa

Los mecanismos de discriminación olfativa comienzan con las interacciones de las moléculas odoríferas con diferentes tipos de receptores. La discriminación olfativa depende de múltiples propiedades moleculares que interactúan con los subsitios de las proteínas receptoras de la NRO. La alta afinidad de las NROs de los machos de las polillas especializadas en detección de feromonas, sugiere que estas NROs tienen un solo tipo de receptor y que su activación involucra interacciones de grupos funcionales y estequiometría de las moléculas con subsitios específicos del receptor (Hildebrand & Sheperd, 1997).

Las NRO responden a estímulos olorosos con potenciales receptores graduados los cuales producen PAs en los que están codificadas propiedades del estímulo como la cualidad, la cantidad y propiedades temporales que son conducidas hacia el SNC. La amplitud del potencial receptor, así como la frecuencia de los PAs, es proporcional al logaritmo de la intensidad del estímulo. Los potenciales receptores pueden ser despolarizantes o hiperpolarizantes (estos últimos suprimen la generación de trenes de PAs). Los complejos olor-receptor activan proteínas G ubicadas en las membranas de las NRO de las sensilas (Talluri et al., 1995; Laue et al., 1997; Stengl et al., 2001; Jacquín-Joly et al., 2002), las cuales activan la fosfolipasa C, que a su vez hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato membranar liberando IP₃ (inositol trifosfato) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros (Wegner et al., 1993). El IP₃ entra en contacto con receptores de IP₃ que, a su vez, son canales de Ca²⁺ del retículo endoplasmático, lo cual elicitó un incremento temporal en la concentración de Ca²⁺ en la dendrita de las NROs (Hasan & Rosbash, 1992). El incremento transitorio en Ca²⁺ también conduce a la activación de corrientes de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ (Hildebrand & Shepherd, 1997; Wetzel et al., 2001; Pophof et al., 2002). El efecto es la alteración de las propiedades eléctricas de la célula receptora, lo cual genera un potencial receptor (de unos 0.5mV de amplitud y 10-50 ms de duración) y PAs. El cambio en el patrón de disparo varía: a bajas concentraciones del olor el patrón de respuesta es tónico; a medianas concentraciones es tónico-fásico; y en altas concentraciones es sólo fásico. El tiempo de reacción de las respuestas es de algunos cientos de ms, tiempo que incluye el transporte del olor a través de la linfa sensilar. Por su parte, el DAG dispararía la fosforilación de ciertas proteínas que pueden incluir canales iónicos a través de la activación de la protein-quinasa C con efectos diversos.

3.3.4. Adaptación

La adaptación corresponde a la disminución de la sensibilidad durante la presencia sostenida de un estímulo: incremento en los tiempos de subida de los potenciales, decremento en el tiempo de disminución de los potenciales y disminución en las tasas de disparo de PAs. La exposición prolongada a un estímulo oloroso produce el cierre de canales catiónicos dependientes de moléculas odoríferas a la vez que incrementa la actividad de la guanilato ciclasa aumentando los niveles de GMPc en los somas, pero no en las dendritas. Tanto el inicio de la adaptación como la recuperación son dependientes del nivel de Ca²⁺ intracelular de las NRO. Es posible que el Ca²⁺ actúe sobre un sitio intracelular del canal, disminuyendo la afinidad por el segundo mensajero. Después de la interacción con los receptores, los olores son inactivados por degradación enzimática (Hildebrand, 1995; Hildebrand & Sheperd, 1997).





4. SISTEMA NERVIOSO DE LAS HORMIGAS

4.1. Plan general del sistema nervioso

Los ganglios de los insectos presentan distintos componentes histológicos (Chapman, 1994):

- 1) Lamela neural. Capa no celular externa de tejido conectivo a modo de envoltura presente en el SNC y periférico. Está compuesta de fibras elásticas tipo colágena embebidas en una matriz de glucosaminoglucanos.
- 2) Perineuron. Es una capa de células gliales debajo de la lamela neural. Probablemente, las células del perineuron secretan los materiales que componen la lamela neural.
- 3) Pericaria. Región de somas neuronales asociados con células gliales. Los somas neuronales de los ganglios están situados en la región cortical rodeando al neuropilo central.
- 4) Neuropilo. Se le llama neuropilo a la densa maraña de fibras nerviosas (dendritas y axones) y a sus terminaciones, completamente o casi, desprovista de somas neuronales. Forma gran parte del volumen de los ganglios y es el sitio donde se presentan las sinapsis.

El SN está dividido en tres partes mayores interconectadas (Romoser & Stoffolano, 1994):

- 1) Sistema nervioso central o somático (SNC). Cadena ganglionar ventral que incluye al cerebro, unida por conectivos que corren a lo largo de todo el insecto (figura 7).
- 2) Sistema nervioso periférico (SNP). Consiste de axones y terminales de neuronas motoras y eferentes, axones, terminales y somas neuronales de las neuronas sensoriales, muchas de las cuales tienen sus somas en la periferia cerca de su receptor.
- 3) Sistema nervioso visceral (SNV). Esta formado por: a) sistema estomatogástrico; b) sistema visceral ventral; y c) sistema visceral caudal.

4.2. Sistema nervioso central (SNC)

El SNC consta de un cerebro localizado en la cabeza, y de un doble cordón nervioso ventral que presenta ganglios en cada segmento del cuerpo unidos por conectivos laterales y longitudinales. Aunque puede presentarse algún grado de fusión entre ganglios sucesivos, generalmente cada segmento corporal presenta un par de ganglios conectados a través de la línea media, y unidos al ganglio del segmento anterior y posterior por los conectivos (figura 7). El cerebro, o ganglio supraesofágico, es el ganglio más anterior y más complejo; está conectado por medio de conectivos circumesofágicos con el ganglio subesofágico. El ganglio subesofágico está compuesto por tres ganglios fusionados: un ganglio mandibular (inerva los órganos sensoriales y los músculos de las mandíbulas), un ganglio maxilar (inerva las maxilas) y un ganglio labial (inerva el labio). Posteriormente a los ganglios cefálicos, en el tórax, existen tres ganglios torácicos que son los centros sensoriales y motores de su segmento respectivo. Los ganglios pro y mesotorácicos permanecen sin fusionar y se ubican en sus respectivos segmentos aun en la hormiga adulta. De cada ganglio emergen dos pares de nervios, uno de los cuales se dirige a las patas, y el otro al resto de la musculatura de cada segmento (Wheeler, 1960). En los insectos alados, los ganglios meso y metatorácico dan lugar a un tercer par de nervios asociados con la

musculatura alar. El primero y segundo ganglios abdominales se encuentran dentro del metatórax y están fusionados con el ganglio metatorácico; mientras que el ganglio del tercer segmento abdominal se encuentra en el pecíolo (segundo segmento abdominal). Los ganglios abdominales cuarto, quinto, sexto y séptimo mantienen su independencia, pero los últimos dos se fusionan (Wheeler, 1960).

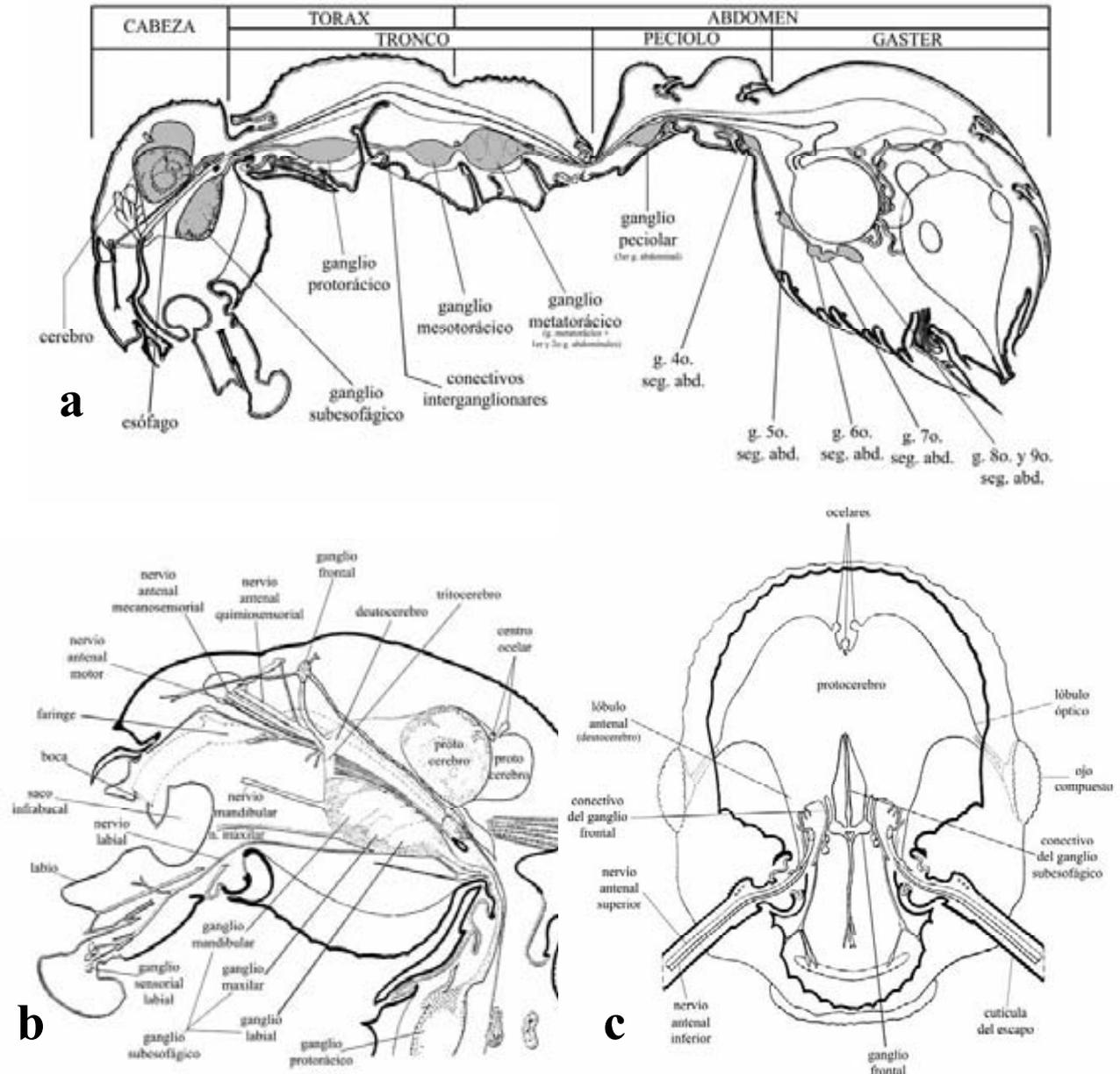


Figura 7. a) Dibujo de una sección sagital de una obrera *Myrmica rubra*. Se observan los principales órganos internos abdominales y el SNC: el cerebro en la parte más anterior, y, ventralmente, la cadena de ganglios conectados por los conectivos interganglionares. b) Sección sagital de la cabeza de una obrera *M. rubra* y c) Sección transversal de la parte anterior de la cabeza de *M. rubra* donde se muestran las principales estructuras nerviosas (Modificado de Janet, 1900).

4.2.1. El cerebro de las hormigas

El cerebro recibe información de los órganos de los sentidos de la cabeza y de interneuronas ascendentes del cordón ventral. El cerebro es el principal centro de asociación; controla las respuestas reflejas de acuerdo con los estímulos recibidos por los órganos de los sentidos. Es responsable de la

orientación, de las formas más complejas de comportamiento y de su modificación por aprendizaje. El cerebro de las hormigas es un órgano tripartita formado por la fusión de tres ganglios pareados: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (figura 8) (Bullock & Horridge, 1965; Burrows, 1996).

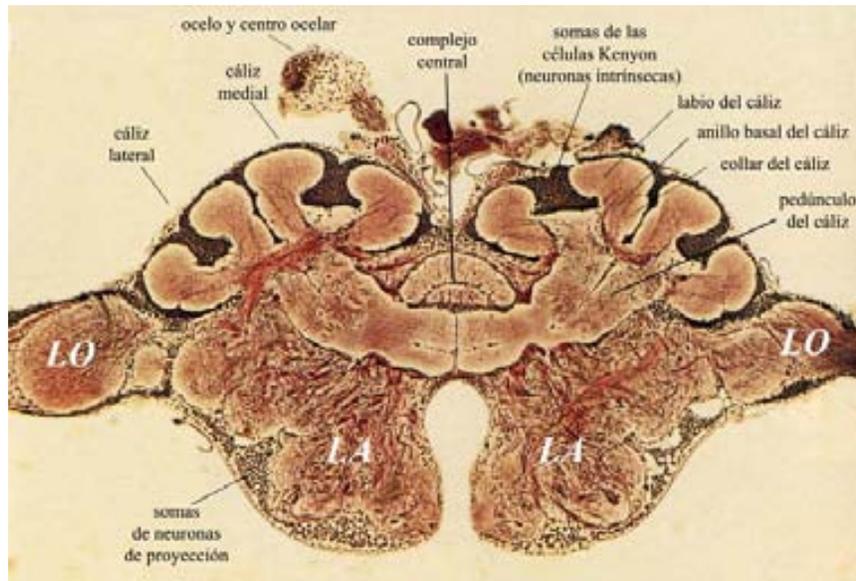


Figura 8. Sección transversal del cerebro de una hormiga reina *Camponotus ligniperda*. Se muestran las principales estructuras de los CF. Cada CF está compuesto de dos cálices, el medial y el lateral, con sus respectivos pedúnculos que se unen para dar lugar a los lóbulos. En cada cáliz puede apreciarse un subcompartimento muy conspicuo, el labio, la principal estructura de aferencias olfativas (Modificado de Hölldobler & Wilson, 1994).

- a) *Protocerebro*. Está constituido por el par de ganglios más anteriores y más grandes en el SNC. Presenta varias áreas de neuropilo y diversos nervios importantes como los nervios ocelares pareados; el nervio ocelar medial, etc. Recibe los nervios de los ojos y de órganos frontales. Contiene cinco tipos de masas de neuropilo:
- i) Lóbulos ópticos (LO). En cada lado hay tres neuropilos ópticos organizados en una serie de capas que forman el camino entrante de excitación de los ojos compuestos: lamina, medulla, medulla accesoria y lobula, en las cuales las neuronas se encuentran en un arreglo retinotópico columnar. En la lámina y la medulla, existe el mismo número de columnas de neuronas que el número de omatidias en el ojo.
 - ii) Cuerpo central. Junto con el puente protocerebral constituye la parte media del cerebro. Es un punto de encuentro de axones de diversas partes del cerebro, sugiriendo una función asociativa (Strausfeld et al., 1998).
 - iii) Puente protocerebral. Es una masa de neuropilo que atraviesa el frente del cerebro. Los axones se conectan con partes separadas del cerebro pero no con los CF.
 - iv) Cuerpos fungiformes, CF (*corpora pedunculata*). Se describen más adelante.
 - v) Centros ocelares. Neuropilos que están en la base de los ojos simples. Reinas y los machos de hormigas presentan tres ocelos, mientras que las obreras carecen de ellos. Sin embargo, los soldados de algunas especies, como *Atta*, pueden presentar dos.

- b) Deutocerebro. El deutocerebro se describe en una sección posterior.
- c) Tritocerebro. En las hormigas, el tritocerebro se encuentra reducido y está representado por un par de pequeñas estructuras debajo de los LA. Inerva el labro y el sistema estomatógástrico que va al canal alimentario, se une con la cadena ganglionar vía conectivos circumesofágicos. Tiene conexiones con los CF y con los LO y neuronas que proyectan hacia el tórax (Burrows, 1996).

4.3. Deutocerebro

El deutocerebro es un neurómero preoral en forma de un par de protuberancias redondeadas que consiste de dos neuropilos distintos: 1) el lóbulo antenal (LA), y 2) el centro motor y mecanosensorial antenal (CMMA), también llamado lóbulo dorsal (Homberg et al., 1989). Ambas áreas reciben fibras sensoriales primarias de las células receptoras de la antena a través del nervio antenal (NA). El NA está compuesto de axones sensoriales que proyectan hacia el deutocerebro. También contiene axones motores que inervan los músculos de la antena. El NA entra al cerebro al nivel del LA, en donde se divide en dos tractos. El corto inerva el LA, mientras que el largo se dirige al CMMA.

4.3.1. Centro Motor y Mecanosensorial Antenal (CMMA)

Los dos segmentos basales de la antena, el escapo y el pedicelo, presentan principalmente células receptoras mecanosensoriales. Además, tiene dendritas de motoneuronas del músculo antenal. Cada músculo es inervado por al menos 3 neuronas (lentas, rápidas e inhibitorias). Todos los mecanorreceptores sobre el escapo y el pedicelo de la antena envían sus axones hacia el CMMA a través de la parte ventral del NA, pero las arborizaciones pueden extenderse hacia el protocerebro, el ganglio subesofágico ipsi- y contralateral e incluso el ganglio torácico (Homberg et al., 1989). En himenópteros, esta parte del NA se divide en dos tractos al llegar al CMMA. El principal de ellos termina en el CMMA, el otro continúa y se divide en tres ramas, una se dirige al protocerebro, otra al ganglio subesofágico y la tercera al área protocerebral medial y posterior (Rospars, 1988).

4.3.2. Lóbulo antenal (LA)

El LA presenta cuatro componentes: 1) una capa de somas celulares localizada en la periferia que forma grupos de células locales; 2) tractos de fibras compuestos de axones de las NRO que llegan por NA; 3) grupos de glomérulos, que son masas discretas de denso neuropilo, y 4) un área central aglomerular fibrosa. Además, existen tractos que conectan el LA con el protocerebro (Rospars, 1988).

El neuropilo de los LA incluye compartimientos discretos llamados glomérulos los cuales son regiones esféricas de neuropilo que contienen las sinapsis entre los axones sensoriales de las NRO y neuronas centrales. Una capa de procesos gliales separan los glomérulos individuales. Probablemente las células gliales juegan un papel importante en la formación de los glomérulos. Todos los axones de las NRO del flagelo tienen arborizaciones terminales en el LA. Las NRO, cuyos somas se encuentran en la antena, envían sus axones hacia el LA a través de la parte dorsal del NA y terminan en los glomérulos ipsilaterales del LA. Al entrar al LA, el NA se divide en diversos tractos que inervan distintos grupos de glomérulos. En la abeja *A. mellifera* se han descrito 4 tractos: T1-T4 cada uno

inervando un grupo de glomérulos. En algunas especies, los glomérulos se distribuyen regularmente y no pueden distinguirse grupos de ellos (Homberg et al., 1989; Rospars, 1988).

El número de glomérulos es especie-específico y generalmente es modesto, entre 50 y 300, pero en casos extremos puede haber tan pocos como 9 ó tantos como 1000 glomérulos (Hildebrand & Shepherd, 1997). En relación al número de glomérulos, pueden distinguirse cuatro categorías: 1) especies sin glomérulos (Ephemeroptera, Odonata y Plecoptera); 2) especies con 10-20 glomérulos; 3) especies con 50-200 glomérulos, y 3) especies que se aproximan a los 1000 glomérulos. Aquellas especies con reducidos LA o que no los presentan, tienen una reducción considerable en el número de sensilas sobre las antenas. El tamaño de los glomérulos varía con la especie, el sexo y probablemente con la casta en los insectos sociales (Rospars, 1988; Withers, et al., 1993). El diámetro de los glomérulos típicamente se encuentra entre los 50 y 200 μm (Homberg et al., 1989).

En general, los glomérulos pueden estar distribuidos a través del LA, como en *Periplaneta americana*, o pueden estar en un arreglo alrededor de una región central de neuropilo formado principalmente por neuritas de las neuronas del LA, como en *M. sexta*. El arreglo espacial de los glomérulos no-feromonales es altamente estereotipado en cada especie de insecto y su posición es lo suficientemente invariante como para identificar a cada uno. En algunas especies (*D. melanogaster*, Laissue et al, 1999; *A. mellifera*, Galizia et al., 1999a), los glomérulos han sido mapeados y pueden ser identificados individualmente según su forma, tamaño y posición relativa (Rospars & Chambile, 1989; Homberg et al., 1989). Además, los LA de los machos de cucarachas, abejas y lepidópteros, y otras especies presentan, además de glomérulos ordinarios, grandes estructuras glomerulares sexualmente dimórficas (Arnold, et al., 1985; Rospars, 1988; Hildebrand & Sheperd, 1997).

4.3.2.1. Estructura neuronal del LA

La estructura de los glomérulos es característica y es el resultado de la localización espacial de las sinapsis y los árboles dendríticos de las neuronas centrales. Cada glomérulo presenta dos regiones: a) una región central compuesta de neuritas y fibras de las neuronas del LA, y b) una región cortical compuesta de las terminales de las NRO que hacen sinapsis con las neuronas del LA. Además, el neuropilo del LA comprende neuritas de tres clases de neuronas centrales (Homberg et al., 1989):

1. Neuronas locales (NL). Las NL son células amacrinas (sin axón) con arborizaciones confinadas al LA. Estas neuronas inervan varios glomérulos conectándolos entre sí. Existen tres tipos de NL: i) NL multiglomerulares con arborizaciones homogéneas en todo el LA; ii) NL multiglomerulares con arborizaciones heterogéneas distribuidas asimétricamente en los glomérulos del LA, y iii) NL oliglomerulares con ramificaciones en unos pocos glomérulos. La respuesta de algunas NL puede ser inhibitoria a través de GABA, mientras que la de otras puede ser excitatoria (Hanson & Anton, 2000).
2. Neuronas de proyección (NP). Tienen dendritas en el LA y axones que proyectan hacia el protocerebro. Las NP pueden ser de dos tipos: i) NP con arborizaciones uniglomerulares (son las más comunes); ii) NP con arborizaciones multiglomerulares. Ambos tipos de neuronas envían sus axones hacia los cálices de los CF a través de los diferentes tractos

antenocerebrales que conectan los LA con el protocerebro. Las NP tienen respuestas más estrechas que las NRO y las hay que pueden responder únicamente a estímulos feromonales. Hasta ahora, no se conoce la topografía de las terminaciones de las NP en el protocerebro.

3. Neuronas centrífugas (NC). Tienen arborizaciones dendríticas fuera del LA y envían axones hacia el LA. Tienen función moduladora.

Las NL y muchas de las NP tienen sus somas en grupos de células en la periferia del LA, aunque en *Manduca sexta*, algunas NP y muchas NC tienen sus somas en el protocerebro. En las hormigas, rodeando la zona glomerular del LA se han identificado 4 principales grupos de somas neuronales: 1) un gran grupo dorsal, 2) un grupo medial; 3) un grupo lateral, y 4) un pequeño grupo anterior. En *M. sexta* hay tres grupos de células en el LA: a) un grupo lateral con dos subgrupos de neuronas GL1 y GL2; b) un pequeño grupo medial (GM) y c) un pequeño grupo anterior (GA) (Homberg et al., 1989).

Los glomérulos están formados por los axones preterminales y las terminales de las NRO de la antena, y por neuritas de las NP, NL y NC y las sinapsis entre ellas. Las sinapsis del LA generalmente están restringidas a los glomérulos (Rospars 1988; Homberg et al., 1989). Las NRO pueden tener arborizaciones en un sólo glomérulo o en varios de ellos (Homberg et al., 1989; Hanson & Anton, 2000). Las NL y las NP reciben sinapsis directas de las NRO. Además, las NP también pueden recibir señales indirectas de las NRO a través de las NL. Las NRO también reciben señales de las NL, pero no de las NP (Hanson & Anton, 2000). La convergencia en el LA puede ser enorme: hasta 350,000 NRO pueden distribuirse en unos 300 glomérulos, lo cual significa una proporción de convergencia que puede ir de 1500:1 a 4500:1 (Hildebrand & Shepherd, 1997). A diferencia del sistema visual, en los órganos olfativos las relaciones espaciales de las NRO no se mantienen en el LA.

4.3.2.2. El código olfativo

El procesamiento olfativo involucra la formación de una serie de mapas de actividad llamadas imágenes moleculares a través de las cuales la información de las moléculas odoríferas es transformada en patrones específicos de actividad a lo largo de la vía olfativa. De esta manera, los glomérulos construyen una imagen molecular colectiva (Shepherd, 1991). Cada glomérulo recibe aferencias de un tipo de NRO, y cada NRO expresa diferentes tipos de receptores en sus membranas dendríticas. De esta manera, cada glomérulo presenta patrones particulares de respuesta a los estímulos olorosos (Wang et al., 2003) que reflejan la estructura química de los olores: longitud de cadena, residuos, polaridad, etc. Los glomérulos con perfiles similares de respuesta frecuentemente son vecinos. Esto está relacionado con el hecho de que NRO con respuestas similares tienden a inervar glomérulos adyacentes. Sin embargo, los patrones de actividad glomerular específicos a un olor pueden estar distribuidos en el LA, esto es, que los glomérulos activados por un olor no siempre son vecinos y esta activación puede depender de las interconexiones glomerulares dadas por las NL (Galizia & Menzel, 2000b). Esto parece sugerir que los glomérulos son las unidades funcionales de codificación olfativa (Rodrigues & Pinto, 1989). No obstante, aunque cada glomérulo responde de manera particular a diferentes olores, un sólo glomérulo no es suficiente para la identificación de los olores.

Aunque los patrones de respuesta del LA son constantes en respuesta a olores particulares o mezclas de ellos, parece que no existen glomérulos particulares que respondan sólo a algunos grupos funcionales. Así, aunque los glomérulos responden preferentemente a la estimulación con moléculas con grupos funcionales particulares (como alcoholes, aldehídos, etc.), esos mismos glomérulos siempre responden, aunque sea débilmente, a otros grupos funcionales (Sachse et al., 1999; Galizia & Menzel, 2001b). Además, las respuestas a las feromonas no-sexuales son codificadas como olores generales ya que el patrón de actividad glomerular evocado para feromonas sociales y otros olores puede incluir los mismos glomérulos (Galizia et al., 1999b). Por el contrario, las feromonas sexuales son codificadas por separado en glomérulos sexualmente dimórficos (Heinbockel et al., 1998; Galizia et al., 2000a). Aunque puede haber un gran número de glomérulos en el LA, existe una gran convergencia en los LA desde las NRO, de manera que probablemente una de las funciones de este neuropilo es amplificar las señales de entrada y mejorar la relación señal-ruido en el sistema completo.

El código olfativo puede entenderse como una serie de reglas de transformación que conducen a una representación neuronal de un estímulo olfatorio. Por supuesto que esta representación está influenciada por el significado conductual de dicho estímulo (Galizia & Menzel, 2000b). El código olfativo parece ser más un patrón de respuesta en el LA que la respuesta de glomérulos individuales a un olor particular (Homborg et al., 1989). Ya que la intensidad de las respuestas es graduada, tanto para el mismo olor en diferentes concentraciones, como para diferentes olores cuando un glomérulo con una débil respuesta para un olor puede responder más fuerte a la estimulación con otro olor, la codificación de la cualidad así como de la concentración parecen ocurrir en todo el LA y no en glomérulos individuales. Las mezclas de olores indican integración molecular en la respuesta de los glomérulos y no mera sumación de la actividad a partir de sus componentes (Galizia & Menzel, 2001).

Cada olor detectado en las antenas, evoca actividad en varios glomérulos y cada glomérulo participa en el patrón evocado por diferentes olores. De esta manera, diferentes olores evocan diferentes patrones de actividad en el LA. Esta representación de los olores es simétrica en cada lado del LA, lo que funcionalmente permite que los insectos comparen gradientes de concentración o retrasos temporales entre los lados del cuerpo (Galizia et al., 1998). Esta simetría sugiere que la actividad e identidad funcional glomerular está preescrita genéticamente. Además, los patrones de actividad son iguales entre individuos de la misma especie, sugiriendo que el código olfativo es conservado (Galizia et al., 1999b).

El LA está topográficamente dividido en áreas designadas para el procesamiento de aferencias particulares. Aunque esta organización funcional del LA parece estar genéticamente predeterminada, existe un componente dependiente de la experiencia que proporciona plasticidad. De esta manera, la representación odorífera es plástica, por lo que los patrones de actividad glomerular son dinámicos (Galizia & Menzel, 2000b). Así, los patrones de actividad no son representaciones estáticas que se encienden o apagan en presencia del olor, sino patrones espaciotemporales que pueden consolidarse con la experiencia cuando se produce un cambio en el patrón de actividad para el olor aprendido (Galizia et al., 2000; Galizia & Menzel, 2000b; Devaud et al., 2001), por lo que el LA contribuye a la formación de la memoria olfativa (Homborg et al., 1989). Existe, además, un mecanismo de seguridad en el código olfativo, y este es la redundancia: no se necesita la representación completa de un olor en

el LA, ni siquiera el LA completo, para su correcta identificación, por lo que se reducen los errores (Galizia & Menzel, 2000b). En resumen, probablemente una representación funcional y no espacial de las señales sensoriales de entrada está mapeada dentro del cerebro. Los glomérulos son los sitios de procesamiento sináptico de la información olfativa primaria aferente, pero la codificación y el análisis de la información olfativa en el SNC comienza con patrones odotópicos de actividad neural mapeada espacialmente en el arreglo glomerular (Hildebrand & Shepherd, 1997).

4.3.2.3. *Sustancias neuroactivas en el LA*

Se han encontrado una gran diversidad de sustancias neuroactivas en el LA, desde neurotransmisores, hasta aminas biogénicas, neuropéptidos y óxido nítrico (Hansson & Anton, 2000):

- Ach (acetil colina). Se ha encontrado en las NRO y en las interneuronas del LA. La ACh puede evocar respuestas tanto inhibitorias como excitatorias.
- GABA (ácido- γ -amino-butírico). Se ha encontrado en los LA como uno de los principales neurotransmisores, el cual produce inhibición, reduciendo la respuesta excitatoria de las NP.
- Aminas biogénicas: serotonina, dopamina y octopamina. Se han encontrado principalmente en NC las cuales tienen un papel modulador y retroalimentativo en el LA.
- Neuropéptidos. Allostatinas y alatotropinas se han encontrado en NL y colocalizan con GABA.
- Oxido nítrico. Se ha encontrado en NRO y NL del LA de abejas y otros insectos. Aparentemente media la información olfativa local y parece estar involucrado en procesos de adaptación.
- Hormonas. La hormona juvenil (HJ) está involucrada en la plasticidad del LA. La HJ tiene efectos en la sensibilidad de las neuronas del LA, regulando la información olfativa.

4.3.2.4. *Conexiones eferentes del LA hacia el protocerebro*

Varios tractos conectan el LA con el protocerebro, el ganglio subesofágico y el LA contralateral. Tres son los principales tractos que conectan el LA con el protocerebro ipsilateral (Arnold et al., 1985; Homberg et al., 1988, 1989; Rospars, 1988) (figura 9):

1. Tracto antenocerebral interno o tracto olfatorio-globularis (TACI). Tracto principal que corre cerca del plano sagital del cerebro hacia el protocerebro, donde las colaterales proyectan al labio de los dos cálices de los CF haciendo sinapsis con las células Kenyon; de ahí se dirigen hacia una región del protocerebro lateral (PL).
2. Tracto antenocerebral medial (TACM). Se ramifica dividiéndose en dos ramas, una de las cuales proyecta hacia el (PL), mientras que la otra corre hacia los CF atrás del cáliz.
3. Tracto antenocerebral externo o lateral (TACE). Emerge del LA independientemente del TACI. Envía colaterales al PL y después proyecta hacia el labio de los dos cálices de los CF.

Se conocen otros tractos: 4) tracto antenocerebral dorsal (TACD) hacia el protocerebro; 5) tracto antenocerebral dorsomedial (TADM) hacia el protocerebro; 6) tracto antenosubesofágico (TASE), hacia el ganglio subesofágico; 7) comisuras que conectan los LA derecho e izquierdo.

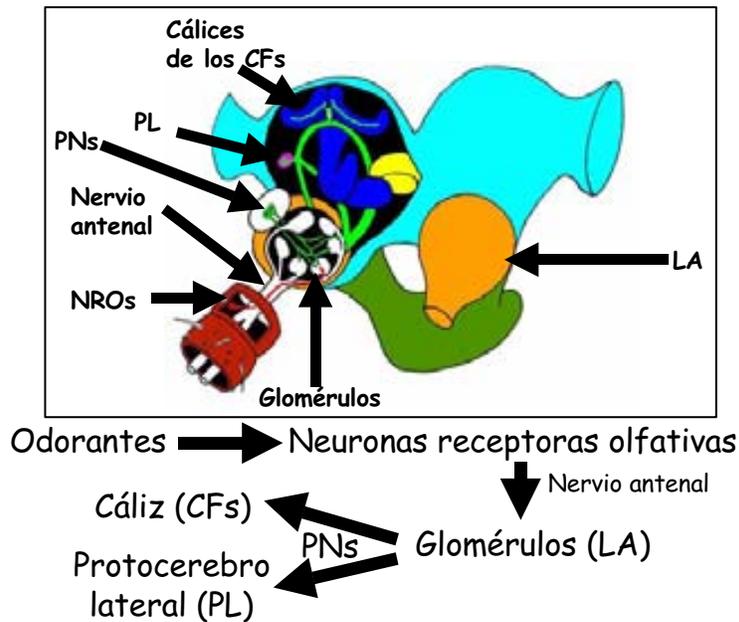


Figura 9. Caricatura de la organización neurofisiológica de las vías olfativas en insectos. (Modificado de Rospars, 1988 y Stocker et al., 1990).

4.4. Los cuerpos fungiformes

A pesar de que la comunicación química y táctil entre los individuos es bien entendida en muchas especies, poco se sabe acerca de las estructuras y mecanismos neurales que generan y controlan el comportamiento de las hormigas y, en última instancia, del superorganismo. La morfología general del cerebro se ha descrito para algunas especies de hormigas (*Lasius*: Janet, 1905; *Formica*: Vowles, 1955; Goll, 1967; Bernstein & Bernstein, 1969; Pietschker, 1911; Burling-Thompson, 1913; Pandazis, 1930). En general, los cerebros de las abejas y las hormigas son similares (Kenyon, 1896; Mobbs, 1982; 1984) excepto que en muchos *taxa* de hormigas, las obreras tienen ojos reducidos y los LO son mucho más pequeños que los de las abejas, o incluso pueden estar ausentes. Sólo los sexuales alados, los cuales dependen de la visión durante el vuelo nupcial, y las obreras de ciertas especies depredadoras, tienen grandes ojos y grandes LO (Gronenberg 1996, Gronenberg & Liebig 1999). En contraste, los CF son relativamente más grandes en hormigas que en abejas (Pandazis 1930; Gronenberg 1996).

Los CF son un par de centros nerviosos encontrados en el protocerebro de muchos artrópodos. Desde su descubrimiento en 1850, a los CF se les ha adscrito el control del comportamiento complejo y plástico (Dujardin, 1850; Huber, 1960; Erber et al., 1980; Strausfeld et al., 1998). Los CF consisten de un par de masas de neuropilo en forma de copa a cada lado del protocerebro, llamadas cálices. Cada CF está compuesto por dos cálices, uno medial y uno lateral. Los cálices se encuentran rodeados de una corteza de somas de neuronas intrínsecas llamadas células Kenyon o células globulares. De cada cáliz, un corto pedúnculo se extiende hacia abajo y hacia adelante. El pedúnculo consiste de un barril con tres columnas de fibras. Los dos pedúnculos del mismo par de cálices se unen e inmediatamente después se dividen para formar dos lóbulos alargados perpendiculares entre sí, uno hacia arriba y hacia adelante de la superficie dorsal del cerebro y el otro hacia la línea media. El primero se llama lóbulo α (o vertical), y el segundo lóbulo β (o medial) (Kenyon, 1896; Strausfeld et al., 1998) (figura 10). El neuropilo de los CF está separado del resto del cerebro por una delgada capa de lamela glial.

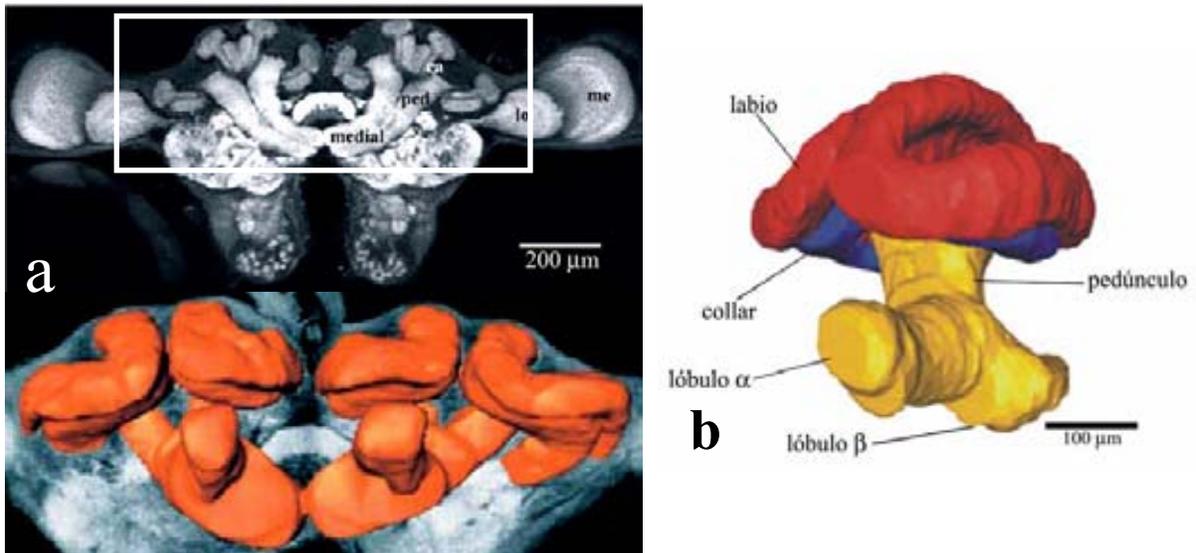


Figura 10. a) En la parte superior se muestra un cerebro de la hormiga *Cataglyphis bicolor* en vista frontal donde se muestran las principales estructuras cerebrales (*medial*, lóbulo medial o β ; *ped*, pedúnculo del cáliz; *ca*, cálices de los CF; *lo* y *me*, lobula y medula del LO). Parte inferior, se muestra una reconstrucción tridimensional de los CF, superimpuesta a una imagen confocal. Se observan los cálices y cómo los pedúnculos de cada cáliz se fusionan para formar los lóbulos α y β (modificado de Whener, 2003). b) Reconstrucción tridimensional de los CF de *C. bicolor*. Se muestran los principales subcompartimientos de neuropilo (Modificado de Kün-Bühmann & Whener, 2005).

Los CF están compuestos de muchas células Kenyon cuyas dendritas, elementos postsinápticos, forman el neuropilo del cáliz (Fahrbach, 2006). Un axón se extiende desde cada árbol dendrítico a través del pedúnculo y se ramifica hacia los lóbulos α y β (figura 11).

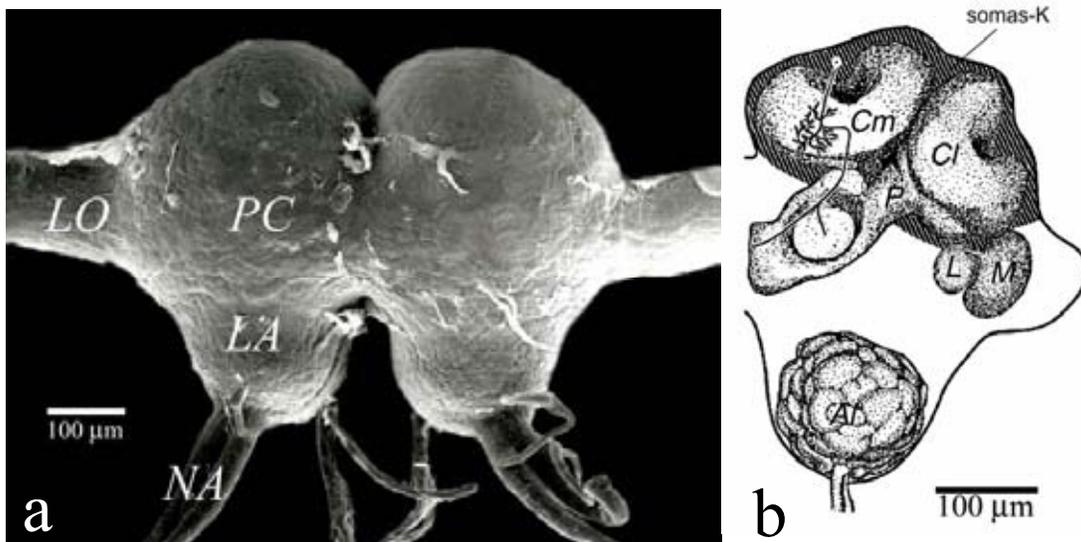


Figura 11. a) Micrografía electrónica de barrido del cerebro de *C. floridanus*. Se indican las principales estructuras. b) Esquema de la mitad izquierda del cerebro en donde se muestra el LA, el LO y los CF. Se muestra además, la trayectoria de los axones de las células Kenyon hacia los lóbulos α y β . El área sombreada representa los somas de las células Kenyon (*somas-K*). *Cm*, cáliz medial; *Cl*, cáliz lateral; *L* y *M*, lobula y medula del LO (Modificado de Gronenberg, 1996b).

Los cálices reciben aferencias colaterales de neuronas olfatorias originadas del LA en el mismo lado del cerebro. En aquellos *taxa* con LO, los cálices reciben aferencias de ellos en ambos lados del cerebro (Mobbs 1982, Gronenberg 1986, 1999). En las abejas y en las hormigas el cáliz está subdividido

concéntricamente en tres compartimientos: el labio, que recibe aferencias de los LA; el collar, que recibe aferencias visuales; el anillo basal, el cual está dividido en dos capas, recibe aferencias visuales y olfativas (Mobbs, 1982; Homberg, 1984; Gronenberg, 1986, 1999, 2001). Toda esta información puede ser combinada en los CF para dar una imagen compleja del ambiente y del estado interno del animal, ya que los CF son el sitio donde la información visual y la olfativa convergen (Gronenberg, 1986; Fahrbach, 2006). Neuronas eferentes de los lóbulos α y β terminan principalmente en los neuropilos protocerebrales, de manera que hay un número importante de conexiones recurrentes entre los lóbulos y los cálices (Mobbs, 1982; Schildberger, 1984; Gronenberg, 1987; Homberg et al., 1988; Grünewald, 1999). El neuropilo protocerebral circundante también provee neuronas aferentes que invaden los cálices y/o los lóbulos. Estos atributos hacen de los CF neuropilos cardinales en un complejo sistema de aferencias, eferencias y conexiones recurrentes entre los diferentes núcleos protocerebrales (Mobbs, 1982; Strausfeld et al., 1998; Rybak & Menzel, 1998).

4.4.1. *Neuronas de los cuerpos fungiformes*

A pesar de su homogeneidad morfológica en secciones histológicas, se han descrito diversos tipos de células Kenyon según la morfología de sus arborizaciones cálicas y de sus proyecciones a los lóbulos α y β . Los tipos de células Kenyon son (Fahrbach, 2006):

1. Clase I. Esta es la típica célula Kenyon. Envía su neurita principal a lo largo de la superficie interna del cáliz. Sus arborizaciones dendríticas forman cuñas en el cáliz principal y se describen como espinosas. Sus axones se ramifican para inervar el lóbulo α y el lóbulo β .
2. Clase II. Estas células envían su neurita principal a través del neuropilo del cáliz y tienen arborizaciones en forma de clavos en el cáliz principal. Sus terminales axónicas están restringidas a regiones específicas del llamado lóbulo γ (una región del lóbulo β).
3. Clase III. Los somas y las neuritas de estas células están localizadas en las regiones periféricas de los cálices y sus dendritas se encuentran en un pequeño cáliz accesorio adyacente al pedúnculo que ha sido descrito en las cucarachas.

4.4.2. *La función de los cuerpos fungiformes*

Se ha sugerido repetidamente la existencia de correlaciones entre la complejidad del comportamiento de una especie y el tamaño de los CF (Forel, 1874; Jonescu, 1909; Alten, 1910; Hanström, 1926). Otros estudios han adscrito funciones más específicas a los CF: su papel en el comportamiento social (Cole, 1985; Jaffe & Perez, 1989); en el aprendizaje y la memoria (Vowles, 1964; Menzel et al., 1994; Erber et al., 1980; Heisenberg et al., 1985); en la orientación y memoria espacial (Vowles, 1964; 1967; Mizunami et al., 1998b). Los CF se han considerado los centros de la inteligencia de los insectos ya que dichos centros son particularmente grandes en hormigas, avispas y abejas, insectos supuestamente más “inteligentes” que otros. Aunque no existen datos fisiológicos para hormigas, la evidencia proveniente de otros insectos sugiere que ciertas neuronas eferentes responden a información multimodal: olfato, gusto, visión, vibración, tacto, sonido (Homberg, 1984; Schildberger, 1984; Kaulen et al., 1984; Gronenberg, 1987; Li & Strausfeld, 1997, 1999; Grünewald, 1999). Los CF

están involucrados en las capacidades de discriminación olfativa, aprendizaje olfativo, y procesamiento de señales provenientes de diversos canales sensoriales, principalmente el olfato (Fahrbach, 2006). Se ha reportado que las eferentes codifican aspectos temporales y la historia inmediata de estímulos previos (Kaulen et al., 1984; Gronenberg, 1987; Mauelshagen, 1993; Laurent et al., 1998). La ablación de los neuroblastos embriónicos de los CF de *Drosophila* sugiere que los CF están involucrados en la actividad locomotora (Martin et al. 1998) y el control motor (Mizunami et al., 1998 a,b). Probablemente coordinan los movimientos en respuesta a los estímulos recibidos por los órganos sensoriales cefálicos. Es posible que exista una relación entre el comportamiento complejo y el desarrollo de los CF. Bernstein & Bernstein (1969) demostraron que hay una correlación entre la eficiencia de forrajeo, el tamaño de la cabeza y los CF en las hormigas. Además, en hormigas y abejas se ha demostrado el crecimiento volumétrico de los CF relacionado con la edad y con la experiencia (Withers et al., 1993, 1995; Durst et al., 1994; Gronenberg, 1996; Fahrbach et al., 1995; 1998; Kühn-Bülmann & Wehner, 2005).

4.5. Características del cerebro de las hormigas

En las hormigas, el tamaño relativo del cerebro y el de sus compartimientos es más importante que el volumen absoluto. Aunque el volumen cerebral absoluto varía según la casta, la mayor variación se observa cuando se considera el volumen relativo al tamaño corporal. Las especies con sistemas de casta polimórficos muestran una tendencia general: el volumen del cerebro en relación al tamaño corporal decrece con el aumento de tamaño del cuerpo, contrario a lo que sucede con el volumen cerebral absoluto (Jaffe & Perez, 1989; Gronenberg & Hölldobler, 1999).

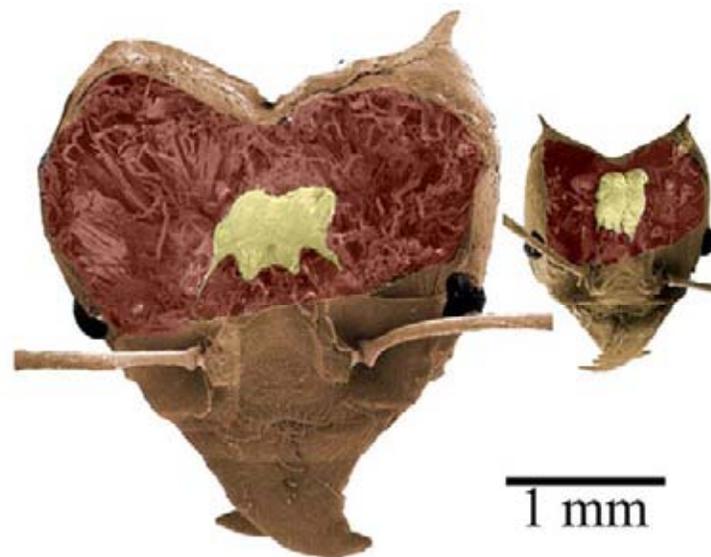


Figura 12. Micrografía electrónica de barrido mostrando las diferencias en el tamaño de la cabeza en relación al tamaño del cerebro en *Atta sexdens*. Nótese que, mientras el tamaño de la cabeza varía enormemente, el del cerebro apenas difiere (Modificado de Gronenberg & Hölldobler, 1999).

Esto puede estar relacionado con la especialización conductual en tareas particulares. Las obreras muy grandes generalmente están relacionadas con la defensa del nido y realizan pocas tareas además de

esta. Al aumentar el tamaño, generalmente existe una relación de crecimiento alométrico entre las diferentes partes corporales, por lo que las obreras grandes de las especies polimórficas tienen enormes cabezas con grandes mandíbulas. En los soldados de estas especies la relación volumen cerebral:tamaño corporal es menor ya que gran parte del espacio cefálico es ocupado por los músculos mandibulares. Aunque el tamaño de la cabeza de obreras *mayor* y *minor* de *Camponotus floridanus*, presenta grandes diferencias, los cerebros de las *mayor* sólo son cerca de un 8% más grandes que los de las *minor*. Entre las castas *mayor* y *minor* de *Atta* ocurre algo parecido: los soldados tienen enormes cabezas, pero gran parte de la cápsula cefálica está ocupada por los músculos de las mandíbulas y el tamaño del cerebro no varía proporcionalmente ya que en las obreras *minor* el cerebro ocupa el 60% del volumen total de la cabeza, mientras que en las obreras *mayor* apenas el 5% (Gronenberg & Hölldobler, 1999; figura 12). En cuanto a la complejidad conductual, los soldados presentan reducidos repertorios conductuales (Wilson, 1980a).

La diversidad de tamaño de diferentes compartimientos depende del grado del influjo sensorial, es decir, del tamaño del correspondiente órgano. El cerebro de las hormigas presenta tres características importantes relacionadas con la vida social:

- 1) Los LO son muy pequeños, lo cual refleja la poca importancia que tiene la visión en el comportamiento de las hormigas.
- 2) Los LA son muy complejos y grandes. Esto refleja la importancia que el olfato tiene para las hormigas ya que el número y tamaño de los glomérulos parece estar relacionado con la capacidad de discriminación olfativa.
- 3) Los CF son muy grandes.

El tamaño relativo de los CF en las hormigas es 35-55% del cerebro y es más grande en obreras y en las especies más “intelectuales”. En general, los machos tienen los CF relativamente más pequeños, las obreras los mayores, y las reinas intermedios. En *C. floridanus*, el volumen absoluto del cerebro es aproximadamente de 0.06 mm^3 . Mientras que los LO son pequeños, los CF son muy grandes y aportan más del 40% del volumen cerebral total (células Kenyon y neuropilo). Por su parte, los LA aportan cerca del 9% del volumen total del cerebro (Gronenberg et al., 1996). En obreras grandes (no soldados) de *Atta*, los CF constituyen el 20% del volumen cerebral, mientras que los LA el 12% (Gronenberg & Hölldobler, 1999). Sin embargo, el volumen relativo de los LA y de los CF es constante en muchas especies de hormigas, por lo que se ha sugerido que existe un cerebro hormiga “estándar”, con una composición evolutivamente muy estable. Este cerebro comprende los LA y los CF en una proporción fija de volúmenes relativos: en las obreras, los CF son el doble del volumen del los LA, mientras que en los machos, cuyo repertorio conductual es menor, son del mismo tamaño. Por el contrario, en hormigas “más visuales”, existe una relación CF:LA mayor. En el caso de los LA y los LO, existe una correlación negativa que sugiere que las hormigas pueden ser agrupadas en: 1) visuales, con LO y región del collar de los CF grandes, y 2) olfativas, con LO y collar reducidos, pero con LA y región del labio de los CF más grandes (Gronenberg & Hölldobler, 1999).

4.6. Correlatos fisiológicos y neurobiológicos de la división del trabajo

4.6.1. División del trabajo y fisiología

Diversos estudios han demostrado que existen correlatos fisiológicos de la división del trabajo, tales como la síntesis y niveles de hormona juvenil (HJ) y el polietismo temporal en abejas *Apis mellifera* (Huang et al., 1994; Robinson, 1987). Conforme una obrera envejece, los niveles de HJ aumentan. Niveles bajos de HJ están asociados con el comportamiento dentro del nido. Después de las primeras tres semanas, la actividad del *corpora allata* aumenta y los niveles de HJ también aumentan y comienza la vida forrajera de las abejas. El incremento en los niveles de HJ tiene efectos importantes en la fisiología de las abejas: causa la degeneración de las glándulas hipofaríngeas (que producen alimento para las larvas) y promueve la producción de feromonas de alarma.

Estos cambios en los niveles de HJ pueden tener efectos dramáticos en la estructura y función del SNC debido a que el cerebro presenta receptores para esta hormona (Robinson, 1992).. Las obreras que se convierten en forrajeras desarrollan incrementos en el volumen glomerular en los LA: la exposición prolongada a olores seleccionados incrementa el tamaño de glomérulos identificables que procesan esos olores (Sigg et al., 1997). Además, no sólo el neuropilo glomerular se ve afectado, también regiones superiores del cerebro, como los CF, incrementan su volumen conforme las abejas envejecen y se convierten en forrajeras. Withers et al. (1995) demostraron que la HJ está directamente relacionada con los cambios en volumen de los CF. Estos cambios modifican el comportamiento y la fisiología sensorial provocando que las abejas dejen de realizar tareas internas al nido y comiencen a forrajear. Aunque estos cambios están directamente relacionados con la ontogenia, se ven afectados por el estado de la sociedad, por lo que pueden existir reversiones en los niveles de HJ si es que, por ejemplo, las nodrizas son retiradas del nido, con lo que las forrajeras regresan del forrajeo al cuidado del nido.

El polietismo temporal de las abejas también está asociado con el desarrollo de ritmos circadianos: las abejas jóvenes que cuidan la cría dentro del nido a cualquier hora, son arrítmicas, mientras que las obreras de mayor edad que forrajea presentan ritmos circadianos usados para la navegación por compás solar y para la visita de las fuentes de alimento (Bloch et al., 2002). Acompañan a estos cambios en actividad, la expresión del gen *period*, un componente molecular del reloj circadiano: las forrajeras presentan las más altas oscilaciones en los niveles de expresión de este gen (Toma et al., 2000). Sin embargo, los cambios en la ritmicidad no están controlados por la HJ (Bloch et al., 2002). Cuando las condiciones sociales lo requieren, las forrajeras pueden regresar a cuidar de las crías, volviéndose arrítmicas (Bloch & Robinson, 2001; Bloch et al., 2001).

La sensibilidad a los estímulos también está relacionada con la casta. Abejas recién eclosionadas que presentan bajos umbrales de respuesta a la sacarosa se convierten en forrajeras de agua, mientras que aquellas con umbrales altos se convierten en forrajeras de polen y néctar. Estos umbrales están relacionados con el genotipo y la edad (Pankiw & Page, 1999, 2000, 2001b). Sin embargo, Robinson (1987) no pudo demostrar correlación entre la casta de abejas y la sensibilidad olfativa antenal a la feromona de alarma (Robinson, 1987). En contraste, Masterman et al., (2001) demostraron que abejas criadas selectivamente para comportamientos higiénicos tienen umbrales conductuales y sensoriales menores que las abejas criadas para comportamientos no-higiénicos.

En hormigas existen muy pocos reportes acerca de correlatos fisiológicos de la casta y de la división del trabajo. Es posible que en aquellas especies en las que existe división del trabajo por polietismo temporal, también haya cambios en la ritmicidad individual ya que recientemente se ha demostrado la presencia de ritmos circadianos en las hormigas individuales (Sharma et al., 2004; López-Riquelme & Fanjul-Moles, 2006). En cuanto a correlatos de fisiología sensorial y división del trabajo existen algunos trabajos. Por ejemplo, Payne et al. (1975) encontraron diferencias sensoriales antenales (medidas con EAG) entre hembras (reinas u obreras) y machos en la detección antenal de la secreción de la glándula mandibular pero no en la detección de la feromona de alarma. Por su parte, Andryszak et al. (1990), encontraron que las obreras *mayor* (no especifican el tamaño) de la hormiga *Atta texana* muestran umbrales sensoriales de detección (medidos con EAG) de la feromona de alarma menores que las reinas y los machos. Sin embargo, no encontraron diferencias en los umbrales de detección de la feromona de rastro entre las mismas castas. Estos mismos autores encontraron que las reinas parecen ser más sensibles y responsivas a la feromona de rastro que los machos y las obreras. Kleineidam et al. (2005) encontraron que las obreras de *A. vollenweideri* presentan respuestas sensoriales antenales (medidas con EAG) menores que las de *A. sexdens* a los componentes de la feromona de rastro. A pesar de que en estos trabajos se exploró la fisiología sensorial, en ninguno de ellos se realizaron comparaciones entre diferentes castas de obreras, lo cual hubiera podido determinar si existen diferencias casta-específicas en la sensibilidad a estímulos relacionados con tareas específicas, como ya antes ha sido sugerido (Wilson, 1985c; Robinson, 1992).

4.6.2. División del trabajo y cerebro: plasticidad neuronal y flexibilidad conductual

Es poco probable que la organización completa de la complejidad conductual esté codificada solamente por el genoma. Es más probable que muchos comportamientos resulten de la modificación experiencial de circuitos genéticamente definidos. El comportamiento de las hormigas está caracterizado por el aprendizaje y la adaptación, ya que las necesidades cambiantes de la colonia obligan la plasticidad conductual: el olor del nido debe ser aprendido por las hormigas juveniles para reconocer a sus compañeros (Jaisson, 1975; Haskins & Haskins, 1974; Carlin & Hölldobler, 1987); las forrajeras pueden recordar la localización de fuentes de alimento y de su nido (Wehner & Wehner, 1986; Schatz et al., 1994). En algunas especies, esta habilidad deriva de señales visuales aprendidas como marcas del terreno o del dosel (Rosengren, 1971; Jander, 1957; Jander & Voss, 1963; Hölldobler, 1980; Rosengren, 1971). Además, las hormigas aprenden estímulos visuales, olfatorios o cinestésicos (Schneirla, 1929; 1933; Vowles, 1964; 1967; Bernstein & Bernstein, 1969; Schulze-Schencking, 1970; Dobrzanski, 1971; Stratton & Coleman, 1973; Schatz et al., 1994, 1999; Rocas, 1994).

La plasticidad en los glomérulos del LA ha sido demostrada en las abejas (Sigg et al., 1997). Además, partes discretas del cáliz aumentan en volumen antes de la transición conductual de nodriza a forrajera, lo cual también está correlacionado con el aumento en los niveles de HJ (Withers et al., 1993; 1995; Fahrbach et al., 1995, 1998, 2003; Durst et al., 1994). Esos cambios plásticos resultan, en parte, de programas del desarrollo bajo control hormonal (Fahrbach et al., 1997), pero también dependen de la experiencia y de aferencias sensoriales: en adultos de *Drosophila melanogaster* y *Apis mellifera*, la

exposición a condiciones diferentes de iluminación conduce a diferencias significativas en el volumen del cáliz (Fahrbach et al., 1998). En las abejas, la exposición a la luz cambia dramáticamente cuando las nodrizas, que residen dentro del oscuro panal, se vuelven guardias en la entrada del nido o forrajeras fuera de él. De igual manera, el volumen total del cerebro de la hormiga *Camponotus floridanus* incrementa hasta en un 20% con la edad. Sin embargo, aunque los LO crecen de igual manera que el cerebro completo, no todos los compartimientos del cerebro incrementan su tamaño por igual, ya que los LA y los CF crecen más rápido que el resto del cerebro, llegando a duplicar su tamaño inicial. Además, las obreras que forrajean pueden incrementar el volumen del neuropilo de los CF hasta en un 50% adicional debido a la experiencia (Gronenberg et al., 1996). En las hormigas *Cataglyphis bicolor*, en las que la división del trabajo está basada en el polietismo temporal, ocurre un incremento más dramático de los CF, principalmente en la región del collar (que recibe aferencias visuales) ya que ocurre en los seis días de vida dedicada al forrajeo (tiempo promedio de vida de una forrajera) después de los 28 días dedicados a tareas dentro del oscuro nido, con lo que las condiciones de iluminación cambian drásticamente (Khün-Bülmann & Wehner, 2005). En la hormiga *Pheidole dentata* ocurre incremento en el número de sinapsis relacionado con el polietismo temporal: conforme las obreras envejecen y pasan de realizar actividades dentro del nido al forrajeo fuera de él, los botones presinápticos en la región del labio de los CF, crecen y adquieren más sinapsis y vesículas, aunque el número total de sinapsis en el labio no cambia (Seid et al., 2005). Resultados similares han sido reportados para diferentes castas temporales en abejas (Coss et al., 1980).

Diversos neurotransmisores también están relacionados con la división del trabajo. En las abejas se ha demostrado que las obreras de mayor edad presentan niveles de tres aminas biogénicas (serotonina, dopamina y octopamina), en los CF y en los LA, más altos que las obreras jóvenes que realizan labores dentro del nido (Schulz & Robinson, 1999; Wagener-Hulme et al., 1999). En la hormiga *P. dentata* se ha reportado que los niveles de serotonina y dopamina incrementan con la edad, aunque los niveles de octopamina no cambian (Seid, et al. 2005). Esto sugiere que el incremento en aminas biogénicas juega un papel importante en el control de la división del trabajo basada en el polietismo temporal. Las aminas biogénicas parecen regular el desarrollo conductual influenciando la expresión de diferentes tipos de comportamiento a través de la modulación de la sensibilidad olfativa y la respuesta a diferentes estímulos (Macmillan & Mercer, 1987; Schulz & Robinson, 1999, 2001).

Aunque se ha demostrado que existen variaciones en el tamaño de los diferentes compartimientos cerebrales relacionadas con la edad y la experiencia, no existen reportes acerca de las diferencias anatómicas y fisiológicas entre castas comparables a aquellas reportadas para las abejas. Incluso, no sólo hay pocos reportes sobre división del trabajo y cerebro en hormigas, sino que además existen pocas descripciones anatómicas y funcionales detalladas del cerebro de las hormigas que permitan comparar diferentes centros nerviosos entre diferentes especies y/o castas.





5. *HORMIGAS COMO MODELOS NEUROBIOLÓGICOS*

Los mirmecólogos, como ha dicho Chauvin (1969), estamos hechos de diferente material que otros entomólogos, ni mejor ni peor, por supuesto. Nuestro interés estriba en entender el misterio de la organización del hormiguero. Generalmente, los mirmecólogos “nacen” cuando accidentalmente descubren una ciudad de hormigas bajo una piedra o un tronco podrido, en el bosque, en el campo o en la ciudad. De pronto, ante sus ojos surge una visión casi mística, prácticamente de otro planeta: cientos o miles de diminutas criaturas corriendo de un lado para otro en un espectáculo que parece caótico, pero al que subyace una compleja organización. Esto mismo le pasó a muy temprana edad a muchos mirmecólogos como Wheeler, Hölldobler, Wilson, y por supuesto a mí.

Las hormigas son un grupo importante debido a su abundancia e impacto sobre la biosfera que ejerce una fuerte acción sobre la vida y evolución de muchas especies, por lo que son importantes para el estudio de la variación y distribución geográficas. Por su edad sobre la Tierra, representan un problema evolutivo acerca de su capacidad de desarrollo social y para sobrevivir a desastres geológicos. Su extraordinario polimorfismo, la partenogénesis y la determinación del sexo las convierten en extraordinarios modelos de estudio anatómico, embriológico, genético, fisiológico, así como para la biología molecular. Los sorprendentes casos de parasitismo y simbiosis social son únicos en el mundo animal. Por la división del trabajo, las hormigas representan un importante problema para resolver debido a su comportamiento, su instinto e inteligencia. Con más de 100 millones de años de existencia, las hormigas se han diversificado dentro de un esquema social que, aunque presenta variaciones, esencialmente se ha conservado. Su organización social, en la que la colonia es un superorganismo, posibilita un estudio comparativo con los metazoarios acerca de los mecanismos de regulación, división de labores, especialización morfofuncional; en resumen, el estudio de la sociogénesis, proceso análogo a la morfogénesis (Hölldobler & Wilson, 1990).

A pesar de su gran valor como objeto de estudio, las hormigas han pasado inadvertidas para muchas áreas del conocimiento. Sin embargo, las hormigas podrían ser uno de los más importantes objetos de estudio científico. Ningún otro grupo de animales presenta tal cantidad de problemas fascinantes para los biólogos, psicólogos, sociólogos, físicos y matemáticos. Dos características importantes y de especial interés en esta tesis, son la organización social y la división del trabajo, y por supuesto su sofisticado y complejo sistema de comunicación (Gronenberg, 1996). Todas estas propiedades tienen como sustrato físico el cerebro hormiga. Es en este diminuto órgano donde el comportamiento individual complejo es generado y controlado. No obstante, no es el comportamiento aislado lo que hace a las hormigas seres dominantes en la biosfera, sino el comportamiento sistémico de la colonia. Uno de los principales problemas para los investigadores es establecer los mecanismos mediante los cuales los individuos colaboran en el complejo comportamiento del superorganismo. El estudio de las hormigas es fundamentalmente el estudio de los niveles de organización y, por supuesto, de los niveles de selección, por lo que puede ayudar a la comprensión del funcionamiento de sistemas biológicos complejos. Las capacidades individuales han evolucionado dentro de un contexto social y es bajo esas condiciones que debe ser evaluado.

De esta manera, las capacidades mentales complejas de las hormigas asociadas con la simplicidad relativa de su sistema nervioso las hacen importantes objetos de estudio en el campo de la conducta animal, la morfología y las neurociencias. Los cerebros de los insectos sociales ya habían llamado la atención de muchos investigadores en el pasado debido a la complejidad de su comportamiento y a sus capacidades de aprendizaje. Aunque sus cerebros son grandes comparados con su tamaño corporal, no es el tamaño absoluto del cerebro la característica importante, sino los tamaños relativos de los subcompartimientos que lo constituyen.

Debido a su complejidad conductual relacionada con la vida social, las hormigas constituyen estupendos modelos para los neurobiólogos. Sin embargo existen limitaciones técnicas que hacen difícil la investigación neuroetológica en hormigas. El tamaño es una de ellas, por lo que las investigaciones neuroetológicas que se han realizado, quedaron restringidas al nivel del procesamiento de información sensorial o al de respuestas motoras. A pesar de ello, existen estudios sobre la descripción anatómica de algunas estructuras neurales, y algunas aproximaciones neuroetológicas han intentado revelar su significado y función. Aunque en las abejas se ha alcanzado un grado considerable de conocimiento sobre el tema, se conoce muy poco acerca del sistema nervioso de otros himenópteros, como las hormigas, otras abejas y las avispas (Gronenberg, 1996).

La década de los 90 fue la época de la mayor aceleración del estudio de los insectos sociales y de la mirmecología. En su "*Sociobiología...*" (1980a), Wilson pronosticó que las neurociencias se fundirían con la ecología conductual y la sociobiología. Actualmente se están gestando las bases de lo que ha sido llamado siconeurobiología y sociogenómica (Robinson, 1997; 2002). La idea fundamental es que tanto la estructura y función cerebral así como la expresión génica en el cerebro son sensibles al contexto social. Se han propuesto vías de comunicación entre el sistema nervioso y el genoma que contribuirían al control del comportamiento social. Así, la información adquirida por el sistema nervioso bajo ciertas condiciones sociales puede inducir cambios en la función genómica que, a su vez, modificarían la estructura y función del sistema nervioso. Por lo tanto, uno de los aspectos más importantes y trascendentes a la mirmecología es el estudio del cerebro hormiga, un cerebro social, lo cual puede mostrarnos los mecanismos neurofisiológicos del comportamiento social y cómo la evolución social afecta la evolución cerebral. En cualquier caso, los cerebros de los insectos sociales pueden ser escrutinados más allá de las técnicas histológicas ordinarias. Con la nueva tecnología de trazadores moleculares, microscopía confocal y fluorescente, nuevas técnicas electrofisiológicas, moleculares, bioquímicas y de registro conductual, el estudio de las bases neurobiológicas del comportamiento social de las hormigas ha sufrido una aceleración sin precedentes. Sólo recientemente la mirmecología está popularizándose entre los científicos y la sociedad.

Como ha dicho Robinson (2002): "*Estos son buenos tiempos para la investigación sobre insectos sociales ya que aún tenemos mucho que aprender de estos minúsculos insectos acerca de su éxito ecológico, evolutivo, de su comportamiento, de la regulación entre genes, sistema nervioso y sociedad*". A final de cuentas, los insectos sociales pueden enseñarnos mucho acerca del funcionamiento y de la evolución de los sistemas sociales, y, por qué no, como lo desearon muchos mirmecólogos del pasado, también podrían enseñarnos mucho sobre nosotros mismos.

II. ESPECIES SELECCIONADAS

· ESPECIES SELECCIONADAS



Las hormigas de la especie *Atta mexicana* fueron seleccionadas debido a que el género *Atta*, y las Attinas en general como grupo entre las hormigas, tienen uno de los sistemas de castas y de división del trabajo más complejo entre las hormigas (Wilson, 1980a,b,c); es una especie altamente polimórfica y poliética. Las castas de *A. mexicana*, *minor* y *mayor*, son altamente especializadas tanto morfológica como conductualmente, por lo que es de esperar que también en fisiología sensorial. La importancia de este grupo de hormigas radica principalmente en que su organización social y sistema de castas es una adaptación al cultivo de hongos sobre sustrato vegetal. Las características que hacen de las hormigas *Atta* excelentes insectos sociales para investigación y de fácil manejo en laboratorio son:

- La colonia es fácil de cuidar después del período crítico de fundación de la colonia.
- El extremo polimorfismo y polietismo de los individuos o grupos de individuos.
- El gran tamaño de muchos de los individuos (casta soldados) y de sus colonias.
- Conductas altamente estereotipadas tanto en el forrajeo, manejo de sustrato vegetal, remoción de desperdicios, defensa, etc.
- Facilidad de observación.

Tabla 1. Especies del género *Atta* y distribución. (Hölldobler & Wilson, 1990).

Especie	Distribución
<i>Atta bisphaerica</i>	Brasil
<i>A. capiguara</i>	Brasil, Paraguay
<i>A. cephalotes</i>	Sur de México a Brasil
<i>A. colombica</i>	Guatemala a Colombia
<i>A. goiania</i>	Brasil
<i>A. insularis</i>	Cuba
<i>A. laevigata</i>	Colombia a Paraguay
<i>A. mexicana</i>	Arizona hasta El Salvador
<i>A. opaciceps</i>	Brasil
<i>A. robusta</i>	Brasil
<i>A. saltensis</i>	Argentina, Bolivia, Paraguay
<i>A. sexdens</i>	Costa Rica a Argentina y Paraguay
<i>A. silvai</i>	Brasil
<i>A. texana</i>	Louisiana, Texas (Estados Unidos)
<i>A. vollenweideri</i>	Argentina, Brasil, Bolivia



Figura 13. Distribución geográfica de *A. mexicana*. (Modificado de Weber, 1972).

1.1. Historia natural y taxonomía de *Atta*

Las hormigas cultivadoras de hongos son criaturas únicas entre los animales por su capacidad para hacer crecer hongos sobre sustratos de vegetación fresca. Las colonias de las hormigas del género *Atta* alcanzan tamaños inmensos, llegando a estar constituidas en su madurez por millones de obreras. Debido a la cantidad de vegetación que consumen son plagas de agroecosistemas en México, América Central y del Sur. Sin embargo, también constituyen un elemento clave de los ecosistemas al remover y grandes cantidades de suelo con lo que hacen circular nutrientes esenciales, además de airear el suelo.

La tribu Attini, clasificada dentro de la subfamilia Myrmicinae, contiene 12 géneros y entre 180-200 especies. El género *Atta* cuenta con 15 especies (tabla 1). Estas hormigas también son conocidas como hormigas arrieras, hormigas setistas, hormigas parasol, cortahojas, cultivadoras de hongos, y en regiones rurales como talatas, chicatanas, zompopos, etc.

1.2. Distribución geográfica de *Atta mexicana*

Todas las Attinas son del Nuevo Mundo. Se les encuentra principalmente en hábitats tropicales de Sudamérica, Centroamérica y México. Sin embargo, algunas especies se encuentran bien adaptadas a climas más secos, como *Atta mexicana* que puede encontrarse en los desiertos de México y el sur de Arizona; y *A. texana* que se encuentra exclusivamente en Texas y Louisiana, en Estados Unidos (Weber, 1972). Las diferentes especies presentan distribuciones regionales, y aunque muchas especies coexisten, otras se encuentran distribuidas localmente (figura 13).

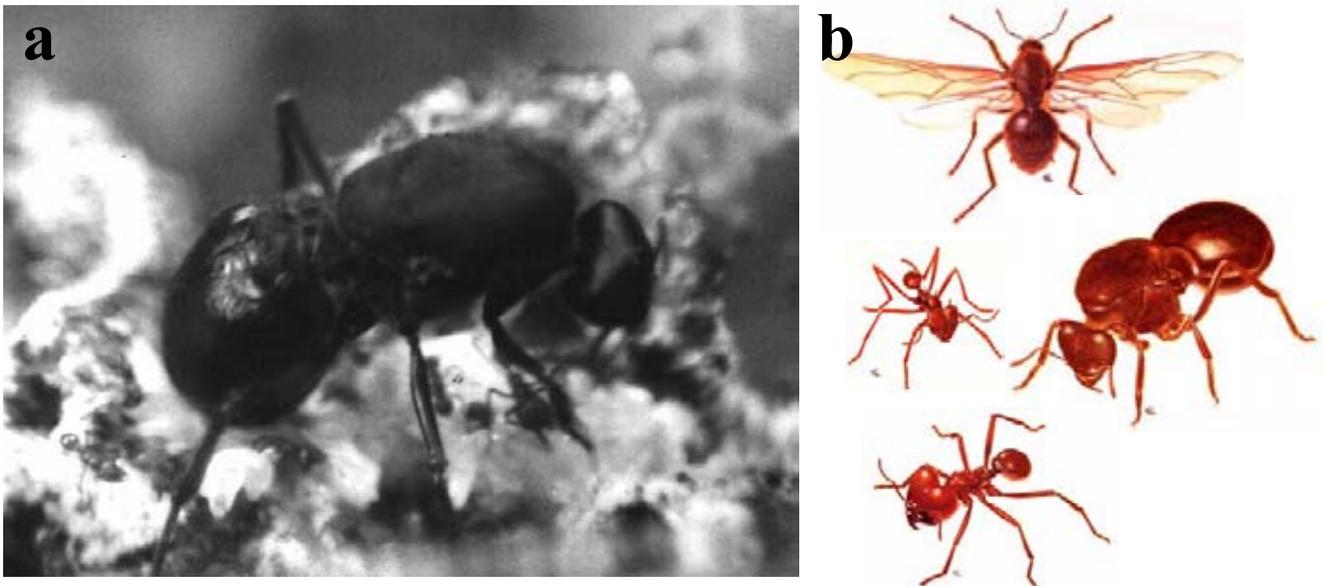


Figura 14. a) Reina de *Atta mexicana* con su jardín de hongos y obreras de una colonia del Laboratorio de Neurofisiología Comparada. b) Castas de *Atta*. Arriba y con alas se muestra el macho. Abajo, la reina junto con un soldado y una obrera media (Dibujos de Eduardo Pérez, tomados de Jaffe, 1993).

1.3. Organización social

Las colonias consisten de una sola y enorme reina (>2 cm) con su progenie de hasta varios millones de obreras estériles. Las obreras son marcadamente polimórficas, con una variación de tamaño que va desde los 2 a los 15 mm, lo cual permite un alto grado de especialización en la realización de tareas.

Las obreras más pequeñas permanecen dentro del nido y se dedican al cuidado de la cría y del jardín de hongos; las obreras de mediano tamaño se dedican al forrajeo y al mantenimiento del nido, mientras que las obreras más grandes se dedican a la defensa. Además, también se presenta polietismo temporal. El sistema de castas, basado en tamaño y edad, está constituido por al menos 7 castas de obreras que realizan más de veinte tareas distintas (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990) (Figura 14 y 15).

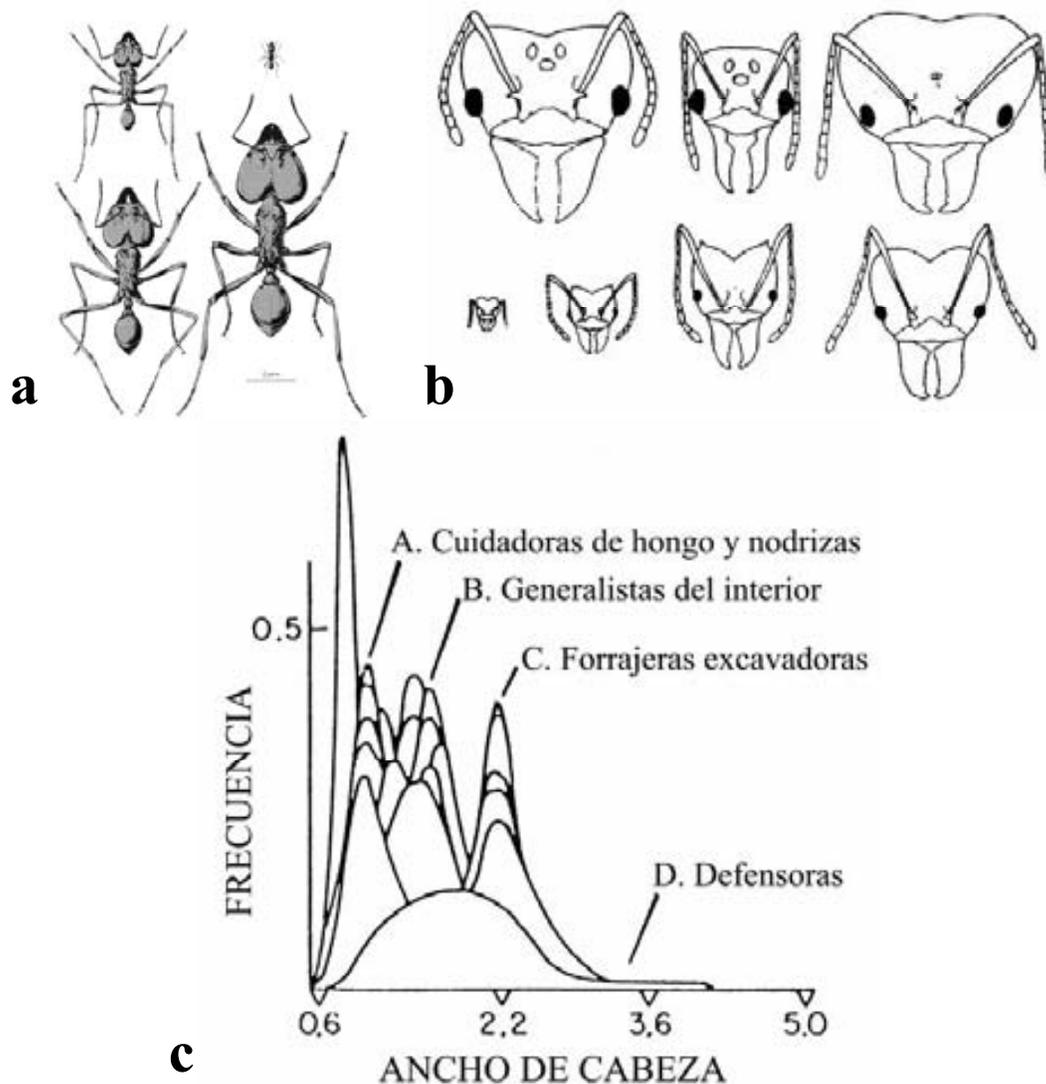


Figura 15. (a) Castas de *Atta* (Modificado de de Hölldobler & Wilson, 1990). (b) Cabezas de *Atta* dibujadas a la misma escala. Fila superior, de izquierda a derecha: reina, macho, soldado (con ocelos). Fila inferior, de izquierda a derecha: obrera mínima, obreras medias, y obrera máxima (Tomado de Weber, 1972). (c) Curvas de polietismo, se grafica la frecuencia tamaños de obreras observadas en la realización de tareas. Las 22 tareas sociales contabilizadas se distribuyen en cuatro grupos de tamaño de manera parcialmente discreta pero que se traslapan. A lo largo de la variación continua de tamaños, existen obreras de una clase particular de tamaño que tienden a realizar ciertas tareas sobre otras (Tomado de Wilson, 1980b).

Las castas temporales se distribuyen en todos los grupos excepto en las defensoras de mayor tamaño. De esta manera, el sistema de castas de *Atta* es el siguiente (Wilson, 1980b):

- 1.- Machos
- 2.- Reinas

3.- Obreras

- a) Cuidadoras del hongo. Tamaño de cabeza centrado en 1mm. Están especializadas en el cuidado de las hifas, implantación del sustrato al hongo u cuidado de la cría.
- b) Generalistas del interior. Tamaño de cabeza centrado en 1.4 mm. Realizan una gran variedad de tareas, incluyendo la degradación de la vegetación antes de su incorporación al hongo, reconstrucción de la estructura del hongo, desecho de desperdicios y cadáveres, transporte de obreras, asistencia de las larvas durante la ecdisis y cuidado de la reina.
- c) Excavadoras-forrajeras. Tamaño de cabeza centrado en 2.2 mm. Estas obreras exploran y reclutan para la colecta de vegetación, la cortan y también se dedican a la excavación del nido.
- d) Defensoras. Corresponden a las obreras de mayor tamaño. Se les puede distinguir simplemente por su tamaño de cabeza mayor 3 mm. Dentro y fuera del nido, los soldados son inactivos. Exclusivamente se dedican a la defensa.

No obstante la especialización, existe solapamiento en las curvas de polietismo y en los roles, por lo que los individuos de un mismo tamaño y aun los mismos individuos realizan múltiples tareas. Sin embargo, la probabilidad de que una obrera realice una tarea particular está en función de su tamaño. Este sistema de castas es una adaptación para el procesamiento de vegetación (Wilson, 1980b).

1.3.2. Reproducción

El comienzo de una nueva colonia y de un nuevo huerto de hongos tiene lugar en el nido materno, cuando miles de reinas vírgenes se lanzan a su vuelo nupcial después de las lluvias. Los nidos maduros producen cada año machos y hembras, los cuales, en la temporada de lluvias, vuelan masivamente para aparearse. En el aire, las reinas se aparean hasta con cinco machos recibiendo más de 200 millones de espermatozoides. Los machos mueren después del apareamiento (Hölldobler & Wilson, 1990).

Las reinas vírgenes llevan consigo, en el saco infrabucal, un paquete de hongo tomado del nido materno. Después de la inseminación, las reinas caen al suelo, se arrancan sus alas y comienzan a cavar un túnel hasta llegar a unos 30 cm de profundidad, donde construyen una pequeña cámara en la que se encierran y comienzan su nueva colonia. Allí, ella escupe el paquetito de hongos y comienza a cuidarlo abonándolo con materia fecal. Poco tiempo después comienza a ovipositar. Al principio, el crecimiento de la colonia es muy lento, pero se acelera después del nacimiento de las primeras obreras ya que estas realizan todas las tareas (Wilson, 1980b,c). La madurez reproductiva colonial se alcanza aproximadamente a los cinco años y una reina puede vivir más de 15 años.

1.3.3. Estructura del nido

Los nidos establecidos son muy grandes y se extienden muchos metros bajo el suelo. Dentro, contienen centenares de jardines de hongos en cámaras construidas en la tierra. La estructura del nido es muy compleja y su diseño está adaptado para controlar el ambiente de los jardines de hongos.

Construidos bajo la tierra, las cámaras de cría y de hongos mantienen condiciones de alta humedad, favorables para el desarrollo del hongo. Galerías y túneles constituyen un sistema de ventilación de intercambio gaseoso: los túneles centrales sacan aire de desecho cargado con CO₂ y calor producidos por los procesos de descomposición del hongo, mientras que el aire fresco entra por los túneles de la periferia. Además, existe otro sistema de galerías y túneles que drenan el agua evitando inundaciones en la época de lluvias. Por el contrario, en época de sequía, las hormigas reducen las aberturas del nido y abandonan las galerías superficiales mudándose hacia las húmedas profundidades (Weber, 1972).

1.3.4. Sustrato vegetal para el hongo: forrajeo

Al material vegetal que emplean las hormigas para hacer crecer el hongo se le conoce como sustrato. Debido a que las hormigas *Atta* prefieren las plantas de cultivares sobre las plantas silvestres, constituyen una plaga para la agricultura. Ellas prefieren hojas y flores frescas sobre las maduras, hojas tiernas sobre las duras y aquellas astringentes son evitadas. Las forrajeras salen continuamente al exterior en caravanas ordenadas hacia árboles y hierbas de los alrededores del nido para traer fragmentos de materia vegetal. Las forrajeras que cargan los enormes fragmentos de hojas, los sueltan en las cámaras donde son recogidos por obreras de menor tamaño (Weber, 1972).

1.3.5. Cuidado del hongo

El material vegetal es tratado en una serie de pasos por obreras de distintos tamaños. Después de que las forrajeras han depositado los fragmentos de materia vegetal dentro del nido, son recogidos por obreras de menor tamaño que los desmenuzan en fragmentos de aproximadamente 1 mm. Después, hormigas más pequeñas toman estos fragmentos y los trituran formando con ellos pequeñas bolitas húmedas que son insertadas en la masa de hongos. Este hongo constituye el único alimento de las hormigas y de las larvas. Obreras más pequeñas, extraen hebras de la masa de hongos y las colocan sobre el sustrato vegetal recién incorporado. Obreras todavía más pequeñas, patrullan la red de hongos, examinándolos, lamiéndolos y limpiando su superficie de esporas e hifas de moho extraño, a la vez que los abonan con materia fecal. El sustrato ya agotado y viejo es sacado hacia los basureros (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990)

1.3.6. El jardín de hongos

Dependiendo de la especie, las cámaras pueden ser pequeñas, medianas o grandes. Los nidos de *A. mexicana* pueden presentar cámaras de más de 60 cm de diámetro llenas con hongo. El aspecto del hongo depende de la actividad de las hormigas, ya que, cuando el forrajeo es intenso, el jardín de hongos tiene un aspecto verdoso, mientras que en tiempos de escasez de vegetación o cuando el material vegetal tiene tiempo de haber sido insertado, el jardín se observa como una masa esponjosa blanquecina o grisácea. Las partes superiores del hongo están constituidas por cavidades o cámaras grandes formadas en el hongo, el cual generalmente tiene un aspecto granular. La parte basal, está formada por una masa compacta de hongo de color amarillento a pardo con pequeñas cámaras. Los jardines maduros presentan grupos de micelio brillantes que son estructuras fúngicas ricas en nutrientes

y que constituyen la dieta principal de las hormigas de la colonia, aunque las obreras también se alimentan de la savia de las hojas que cortan. Tanto la reina, como los huevos, larvas y pupas, se encuentran entre los laberintos de cámaras del jardín de hongos (Weber, 1972).

1.3.7. Mutualismo hormigas-hongo

El hongo y las hormigas *Atta* han establecido una de las relaciones mutualistas más estrechas conocidas. El hongo *Leucocoprinus gongylophorus* no es capaz de existir en otro sitio más que en los nidos de las hormigas y bajo sus cuidados, asimismo, la hormiga es incapaz de sobrevivir con una dieta diferente a la que le proporciona el hongo. El hongo proporciona alimento a las hormigas y las hormigas proporcionan cuidado y aseguran la permanencia y dispersión del hongo a siguientes generaciones. La simbiosis mutualista trasciende a niveles fisiológicos, ya que el hongo forma parte del sistema digestivo de la colonia en el proceso de metabolización del material vegetal debido a que las hormigas son incapaces de digerirlo. Así, el hongo es capaz de degradar la celulosa convirtiéndola en biomasa, la cual es devorada por las hormigas. Cada obrera proporciona enzimas digestivas presentes en las gotitas fecales que depositan sobre el hongo, tales como quitinasas, amilasas y proteinasas. Estas últimas se originan en el hongo y pasan a través del sistema digestivo de las hormigas sin alteraciones de regreso al hongo. Ellas no las alteran evitando secretar sus propias enzimas sobre las del hongo. Evolutivamente, las hormigas cultivadoras de hongos han perdido enzimas importantes, por lo que dependen del hongo para adquirir nutrientes (Hölldobler & Wilson, 1990).

1.4. Importancia de las hormigas corta-hojas (cultivadoras de hongos)

Debido al cultivo de hongos que realizan a partir de vegetación fresca y a que sus colonias son muy numerosas, las hormigas del género *Atta* y *Acromyrmex* constituyen insectos con un alto impacto sobre el ambiente y los agroecosistemas. En el Nuevo Mundo, las hormigas cortahojas son los principales herbívoros dominantes de las zonas tropicales: las hormigas del género *Atta* pueden llegar a colectar hasta el 12-17% de la producción vegetal de hojas en bosques tropicales (Hölldobler & Wilson, 1990). No sólo es la cantidad de material vegetal lo que las hace plagas económicamente importantes, sino también la diversidad de plantas que pueden usar como sustrato para su cultivo, y casi todos los cultivos son susceptibles de ser depredados ya que estas plantas crecen de manera intensiva en los agroecosistemas. Además, ya que las hormigas *Atta* seleccionan sitios de anidación con vegetación escasa, la deforestación necesaria para el desarrollo de los cultivos favorece la proliferación de colonias. Aunque se ha desarrollado una industria plaguicida especializada en la eliminación de estas hormigas, su eliminación es complicada debido a que los nidos son gigantescos y pueden llegar a estar constituidos por millones de obreras y cientos de metros cuadrados de ocupación.

A pesar de que las pérdidas mundiales causadas por la acción de las hormigas cortahojas podría ser del orden de los miles de millones de dólares, existe poca investigación sobre ellas, y los métodos convencionales de control de plagas son completamente insatisfactorios ya que las colonias son casi invulnerables al envenenamiento con insecticidas, y las estrategias menos tecnificadas, como la quema de nidos, resultan inútiles. En México, no obstante que las hormigas cortahojas tienen efectos negativos

en la agricultura, no se tiene el conocimiento de las pérdidas económicas causadas por estos insectos. Contrario a la erradicación de las cortahojas, debemos tener la meta de lograr un manejo integral de sus poblaciones, lo cual sólo se logrará a través de la comprensión de su biología.

1.5. Hormigas carpinteras: *Camponotus ocreatus*

Las hormigas *Camponotus ocreatus* fueron seleccionadas para comparar la neuroanatomía de la vía olfativa con la de *Atta mexicana* y, así, establecer la organización básica deutocerebral para las hormigas y determinar las adaptaciones especie-específicas a diferentes formas de vida ya que *C. ocreatus* es una especie con una forma de vida menos especializada y un sistema de castas menos complejo (cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación entre las principales características de las formas de vida de *Atta* y *Camponotus*

<i>Atta</i>	<i>Camponotus</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Conservan el aguijón. - Han perdido el capullo en la etapa de pupación. - El gáster está tubulado de manera que la distención es limitada (no adaptada para el almacenamiento de líquidos). - Son cultivadoras de hongos. - Muy polimórficas. - Forrajean material vegetal. - Visión reducida: ojos, LO y collar del cáliz pequeños. - Dependencia del olfato: LA y labio del cáliz grandes. - La simbiosis entre las hormigas y el hongo que cultivan no se limita a la alimentación, sino que se extiende a la fisiología y bioquímica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pérdida del aguijón y sustitución por la glándula de veneno. - Pupación con capullo. - El gáster no está tubulado permitiendo la distención y la alimentación y almacenamiento de líquidos. - Depredadoras, carroñeras y cuidadoras de pulgones. - Dimórficas con tendencia al polimorfismo. - Visión nocturna y de luz polarizada, orientación por compás estelar: ojos, LO y collar del cáliz desarrollados. - Plasticidad neural. - División del trabajo principalmente por polietismo temporal.



Las hormigas *Camponotus ocreatus* pertenecen a la subfamilia Formicinae, un grupo bastante homogéneo que predomina en el neártico y paleoártico, separado por millones de años de evolución de la subfamilia Myrmicinae a la cual pertenece *A. mexicana* (figura 16). Las hormigas Formicinae han perdido el aguijón, el cual está reemplazado por un aparato que eyecta una mezcla de sustancias, incluyendo ácido fórmico en altas concentraciones. La abertura de esta estructura, llamada acidóporo, es circular y está en la punta del gáster. Esta familia está bien adaptada a la alimentación de néctar, y todas las especies tienen un eficiente contenedor para el almacenamiento de alimento líquido, formado por sépalos que se proyectan hacia adelante dentro del buche desde el proventrículo.

El enorme y cosmopolita género *Camponotus* tiene más de 1,000 especies. Son llamadas hormigas carpinteras por su hábito de horadar los árboles vivos para hacer sus nidos en ellos. *Camponotus* es uno de los géneros más grandes de hormigas, con amplia distribución y gran tolerancia ecológica (Bolton, 1995). Aunque anidan preferencialmente en la madera, muchas especies también lo hacen en el suelo, bajo piedras o en ramas huecas de árboles. Tienen asociaciones con áfidos, cuyas secreciones azucaradas consumen. Las obreras *mayor* almacenan sustancias dulces en sus cuerpos. Su actividad es principalmente nocturna y a temperaturas bajas (Hölldobler & Wilson, 1990).

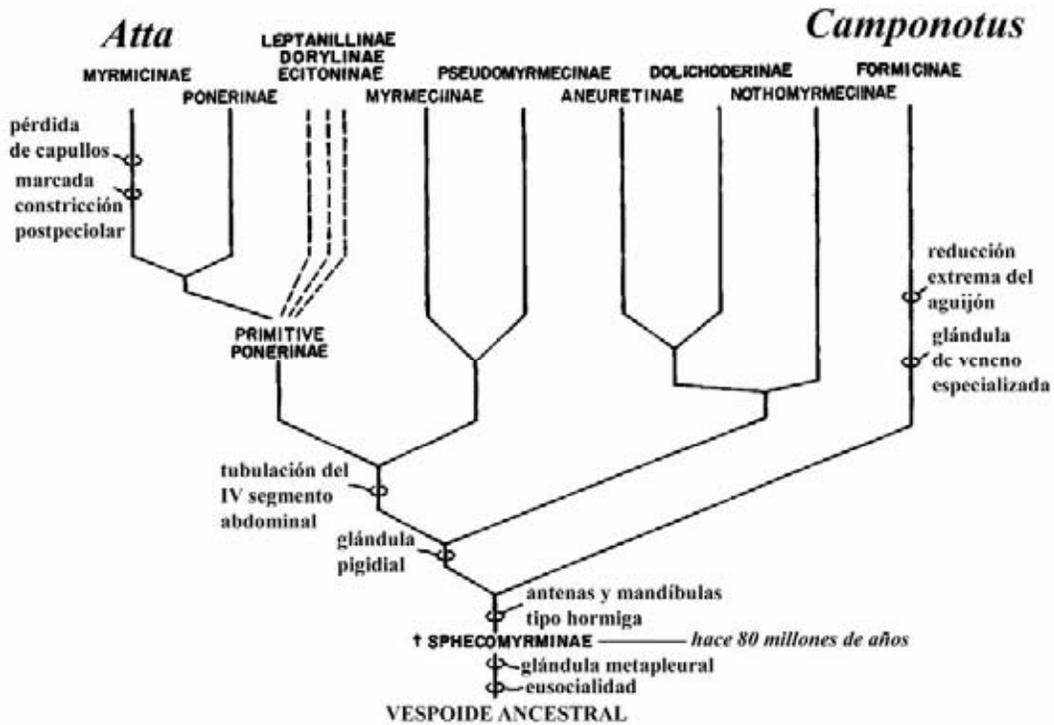


Figura 16. A pesar de la distancia evolutiva y en hábitos de vida, *Atta* y *Camponotus*, representantes de las familias Myrmicinae y Formicinae respectivamente, presentan una similar estructura de los LA (Modificado de Hölldobler & Wilson, 1990).

Las hormigas *Camponotus* son consideradas “hormigas visuales”, no porque no empleen feromonas en su sistema de comunicación, o porque no dependan del olfato para encontrar su alimento, sino porque, en comparación con otras hormigas, tienen un sistema visual desarrollado ya que dependen de la visión para orientarse por compas durante el forrajeo, usando la luz de la luna o de las estrellas ((Hölldobler & Wilson, 1990), por lo que presentan grandes ojos y grandes LO (Gronenberg & Hölldobler, 1999). Aunque algunos autores las consideran polimórficas, en general se consideran dimórficas y con un sistema de división el trabajo basado en el polietismo temporal (Wilson, 1953, 1954, 1974; Hölldobler & Wilson, 1990), cuyos individuos tienen desarrolladas capacidades de aprendizaje (Gronenberg et al., 1996). En el dimorfismo de las hormigas *Camponotus* se presenta la coexistencia de obreras *minor* de proporciones ordinarias, con grandes obreras *mayor* o soldados, los cuales no sólo son más grandes y pesan más, sino que además, tienen una cabeza desproporcionadamente grande, la cual se encuentra bien adaptada para la defensa (figura 17). El

repertorio conductual de estos soldados también es limitado en comparación con el de las *minor* (Wilson, 1974).



Figura 17. Fragmento de un nido de *Camponotus sp.* Nótese la presencia de obreras *minor* y obreras *mayor*. También se observan las pupas con capullo y algunas larvas.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque el comportamiento de las hormigas se ha estudiado desde hace mucho tiempo, poco se sabe acerca de la neuroanatomía y neurofisiología del sistema nervioso central así como de los mecanismos neurales que controlan su comportamiento. El estudio del comportamiento involucra la investigación sobre la evolución conductual así como de los mecanismos neurales (centrales y periféricos) y neuroendocrinos subyacentes. Para los neuroetólogos es importante conocer las relaciones causales y conexiones entre el sistema nervioso y el comportamiento, causas que Hogan (1994) ha denominado causa eficiente (que incluye la causa motivacional o los efectos de factores inmediatos denominados estímulos); causa formal (la cual se refiere a la estructura del comportamiento, es decir, la organización neuroanatómica de los sistemas de comportamiento).

Las hormigas son buenos modelos neuroetológicos para estudiar las causas y la estructura del comportamiento debido a su organización social y división del trabajo, por sus adaptaciones conductuales especie-específicas, así como por su sistema sensorial sofisticado y especializado en la detección de señales comunicativas (Gronenberg, 1996). Estos insectos, como todas las especies altamente sociales, están especialmente adaptados a su cambiante ambiente social, por lo que presentan mecanismos que los capacitan para modificar su comportamiento en respuesta a los cambios del medio (Robinson et al., 1997). Puesto que las hormigas son hermanas entre sí, comparten una gran proporción de sus genes, de manera que las diferencias de tamaño entre los individuos provienen principalmente de diferencias en el crecimiento alométrico relacionadas tanto con la crianza como con sutiles diferencias genéticas (Parker, 2004). Además, las tareas se encuentran distribuidas entre los individuos de diferentes edades y tamaños (Wilson, 1985a,b).

En la vida social de las hormigas, el olfato es una modalidad sensorial muy importante ya que, debido a su forma de vida principalmente subterránea, las hormigas viven en un mundo perceptual de naturaleza química y táctil que es procesada en sus cerebros. La percepción de señales químicas, tanto provenientes del ambiente como de los otros miembros de la colonia, juega un papel esencial en la sobrevivencia y organización de las sociedades de hormigas. Por lo tanto, su sistema olfativo, desde las antenas hasta el cerebro, debe ser un sistema elaborado capaz de detectar diversas señales y liberar el comportamiento adecuado de acuerdo con el contexto. Así pues, el entendimiento del sistema olfativo de las hormigas es fundamental para la comprensión de las bases neurobiológicas del comportamiento social y la división del trabajo. Sin embargo, aún se desconoce el detalle de cómo está integrada la vía olfativa. Descifrar la organización neuroanatómica de la vía olfativa es fundamental para entender los mecanismos fisiológicos involucrados en el procesamiento olfativo y en el comportamiento guiado por el olfato.

Determinar los mecanismos que subyacen la diferenciación de las castas y la división del trabajo constituye un problema fundamental en el estudio de los insectos sociales. Ya que el olfato es la modalidad sensorial principal en los insectos sociales, en diversas ocasiones se ha sugerido que la división del trabajo podría estar basada en diferencias casta-específicas en la sensibilidad olfativa a estímulos relacionados con tareas específicas (Topoff et al., 1973; Wilson, 1985c; Robinson, 1992). Sin

embargo, aunque se han realizado algunas investigaciones acerca de correlatos entre fisiología sensorial periférica y casta (Payne et al., 1975; Andryszak et al., 1990; Kleineidam et al., 2005), en ninguna de ellas se compararon las respuestas entre castas de obreras.

Las hormigas cultivadoras de hongos *Atta mexicana* constituyen un grupo de hormigas de particular interés debido a su complejo sistema de castas y división del trabajo, ya que representa una adaptación a la colecta de material vegetal como sustrato para el cultivo del hongo que constituye su alimento. El material fresco debe ser cortado en pequeñas piezas, masticado y tratado con enzimas, y finalmente incorporado al jardín de hongos, el cual debe ser atendido constantemente. Las diferentes obreras de *Atta* organizan la operación de cultivo en forma de una línea de ensamblaje en la que castas de obreras especializadas de distintos tamaños realizan operaciones sucesivas para el procesamiento de vegetación fresca (Weber, 1972; Wilson, 1983a,b; 1985a,b). De esta manera, las colonias de *Atta* presentan un polimorfismo extremo relacionado con el polietismo, por lo que es plausible suponer que los mecanismos sensorio-perceptuales y los centrales de individuos de diferentes castas, presenten adaptaciones especializadas para la vida social relacionadas con la división del trabajo.

Se ha sugerido que el comportamiento especializado de los soldados podría estar basado en capacidades sensorio-perceptivas diferentes en relación con otras castas: las obreras *mayor* podrían ser más sensibles a la feromona de alarma que las obreras *minor* y serían más fácilmente movilizadas en caso de necesidad (Topoff et al., 1973; Passera, 1984). Jaisson (1972) ha reportado que las obreras de diferentes tamaños de la hormiga *Atta laevigata* presentan diferentes proporciones de sensilas en sus antenas. Debido a su reducido repertorio conductual, al tiempo en el que son producidos en la sociogénesis de una sociedad (Wilson, 1980a), y a que es posible que el polimorfismo en el tamaño del cuerpo vaya acompañado de un polimorfismo neural, es posible que los soldados constituyan la casta más especializada en las sociedades de hormigas, principalmente en las sociedades del género *Atta*. Los soldados, junto con otros grupos de obreras de reserva, permanecen la mayor parte del tiempo pasivos, lo cual reduce la energía consumida por la colonia como un todo. En el momento en que estos grupos de obreras son requeridos, son activadas y movilizadas hacia los sitios adecuados. Las señales de tal requisición deben involucrar estímulos químicos y/o mecánicos.

En las colonias de *Atta*, existen patrones distintivos de variación en estructuras corporales relacionados con el tamaño y el comportamiento. Algunos órganos, como las glándulas exocrinas y las espinas corporales, se encuentran máximamente desarrollados en las clases de tamaño que se especializan en las tareas en las que dicho órgano sirve (Wilson, 1980a). Por lo tanto, el polimorfismo no sólo involucra un cambio de tamaño externo en los individuos. Es necesario tener en mente que estas características de las colonias han evolucionado por selección natural, por lo que las variaciones en tamaño no son un epifenómeno, sino que se deben a complejos mecanismos en los que los programas de desarrollo individual están bajo los efectos del estado de la colonia completa: demografía adaptativa. Así, seguramente las variaciones en tamaño no son incidentales ni pueden ir solos sin cambios en la maquinaria neural. De esta manera, es posible que un cambio en tamaño corporal, relacionado con una mayor probabilidad en la ejecución de una tarea particular, probablemente incluya cambios en el sistema nervioso y sensorial que es el sustrato físico de la conducta.

El propósito de este trabajo es estudiar la respuesta sensorial olfativa en tres castas de *A. mexicana* a olores casta-específicos con el objetivo de determinar el papel potencial del sistema sensorial periférico en la división del trabajo y la selección de la tarea. No obstante, aun cuando las diferencias en la respuesta a los estímulos químicos no ocurra en el nivel periférico, estas podrían presentarse en el SNC, ya sea en el primer centro de procesamiento de las señales olfativas, el lóbulo antenal (LA), o en áreas superiores como los cuerpos fungiformes (CF) o el protocerebro lateral (PL), sitios a donde llaga la información olfativa desde los LA. Por tal motivo, en este trabajo también se examinó la morfología general del LA y la topografía antenal aferente en el sistema nervioso central de los soldados de *A. mexicana*, con la finalidad de obtener más información acerca de la organización de las vías olfativas en el cerebro de las hormigas. El olfato es una modalidad sensorial en la cual la información de las señales moleculares es transformada en patrones de actividad cerebral (Shepherd, 1991). Este proceso es muy complejo debido a que no existe una organización espacial obvia de conexiones neurales como la que presentan otros órganos sensoriales. Por el contrario, el sistema olfativo sensorial periférico no extrae propiedades espaciales de un estímulo oloroso. Debido a esto, la vía olfativa realiza una serie de procesos computacionales acerca de la información molecular que da sentido a las percepciones olfativas. En sustitución de un mapa de la posición espacial de los estímulos químicos, el sistema olfativo debe emplear una segregación espacial de la información sensorial para codificar la cualidad de un olor (Wong *et al.*, 2002). El principio organizacional es que el procesamiento olfativo involucra la formación de una serie de mapas de actividad (Shepherd, 1991), de tal forma que ha sido sugerido que si la cualidad de un olor es codificada por patrones de actividad, es posible esperar que exista una representación del mapa glomerular en el protocerebro (Wong *et al.*, 2002). De hecho, se ha reportado que diferentes grupos de neuronas de los CF de *D. melanogaster* son activados por diferentes clases de olores, lo cual sugiere que un mapa topográfico de la información olfativa está presente en el protocerebro (Marin *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002). Para entender el proceso de codificación olfativa, su papel en el comportamiento guiado por el olfato en insectos dependientes de esta modalidad sensorial como las hormigas, así como para poder realizar comparaciones morfológicas y funcionales en el procesamiento olfativo entre especies de hormigas y entre castas de una misma especie, en esta tesis también se estudió de manera exploratoria la estructura del LA y sus vías eferentes hacia los CF. Con los resultados de este trabajo exploratorio, posteriormente se podrán realizar estudios morfológicos, morfométricos y funcionales comparativos en *loci* específicos del sistema olfativo entre castas de una misma especie¹, así como entre especies, para determinar cómo cerebros sutilmente diferentes procesan los mismos estímulos olfativos para producir comportamientos diferentes.

Ya que los soldados son considerados como una de las castas más especializadas en el sistema polimórfico de división del trabajo de estas hormigas, la neuroanatomía del sistema olfativo de *A. mexicana*, una especie considerada como “olfativa”, se ha comparado con la de *Camponotus ocreatus*, una especie “más visual”, generalista, filogenéticamente lejana y con un sistema de castas dimórfico,

¹ Para este trabajo fue considerada la comparación de la estructura del LA entre diferentes castas de *A. mexicana*, tal como se comparó la respuesta sensorial antenal. Sin embargo, debido a dificultades técnicas, descritas en la sección de resultados, fue imposible obtener resultados de la estructura del LA de obreras *media* y *minor*, por lo que sólo se reportan los obtenidos para los soldados.

menos especializado basado en el polietismo temporal (Wilson, 1974; Hölldobler & Wilson, 1990; Gronenberg et al., 1996). Debido a que el amplio rango de adaptaciones conductuales y formas de vida está relacionado con diferencias morfológicas marcadas entre las especies, es posible adjudicar significado funcional a regiones particulares del cerebro correlacionando la morfología con el comportamiento de una especie particular. Por lo tanto, las adaptaciones neurofisiológicas de *A. mexicana* relacionadas con su especializada forma de vida y con su complejo sistema de castas podrían estar basadas principalmente en especializaciones de las vías olfativas, por lo que es posible que algunas partes de esta vía estén más o menos desarrolladas en diferentes castas. De esta manera, la finalidad de comparar la organización del sistema olfativo entre especies es establecer la organización deutocerebral para las hormigas, así como determinar las adaptaciones a diversas formas de vida, y así aportar datos para el entendimiento del papel que juega la estructura y función del sistema nervioso en la generación y control del comportamiento social especializado. Si la comparación entre individuos de una misma especie puede proporcionar información acerca de los mecanismos que subyacen a las diferencias conductuales, la comparación entre especies proporcionará información sobre las características de unidad y diversidad relacionadas con las restricciones del procesamiento sensorial y de la vida social.

El presente trabajo toma como punto de partida, primero y como es sugerido por el título, el mostrar que las hormigas son excelentes modelos para el estudio neuroetológico debido a las diferencias conductuales en las que se basa la división del trabajo y la complejidad conductual que involucran desarrolladas capacidades de aprendizaje y memoria, así como las adaptaciones conductuales relacionadas con diferencias morfológicas entre especies. Este trabajo es un primer paso para iniciar el estudio socioneurobiológico en México, en donde la miremcología es casi inexistente, y el estudio de los insectos sociales está restringido a los aspectos biogeográficos y a los productivos y zootécnicos de las abejas de miel.



IV. HIPOTESIS

• HIPOTESIS 1

H: La casta tiene influencia sobre la sensibilidad olfativa. La respuesta eléctrica sensorial (electroantenograma) a diferentes olores es diferente entre las castas. En general, la hipótesis puede ser representada como sigue de acuerdo con el sistema de hipótesis nula y alternativa:

$$H_0: \mu_{EAG_{soldados}} = \mu_{EAG_{forrajeras}} = \mu_{EAG_{sepultureras}}$$

$$H_a: \text{al menos una } \mu_{EAG_i} \text{ no es igual a las otras}$$

De acuerdo con lo propuesto acerca de la especialización extrema de los soldados (figura 18):

Ha: La sensibilidad antenal (respuestas EAG en general o respuesta a cualquier dosis de cada olor) de cada casta es mayor a los olores relacionados con la conducta en la que está especializada.

Hb: Puesto que los soldados de *A. mexicana* son la casta conductual más especializada, presentarán una respuesta antenal mayor a olores relacionados con la defensa del nido, o respuestas menores o nulas a olores relacionados con otras tareas.

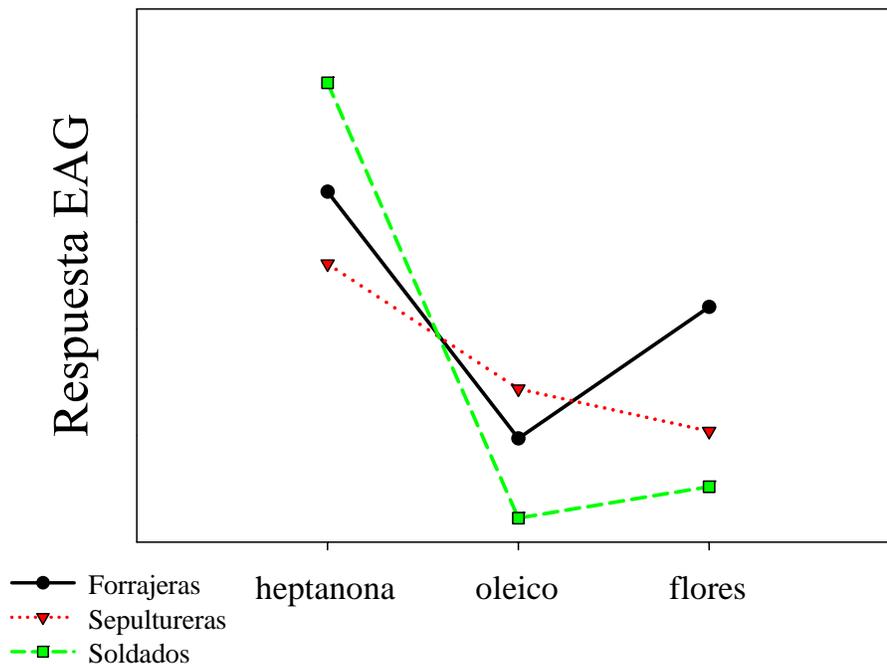


Figura 18. Respuesta EAG hipotética de cada casta en respuesta a cada odorante. Se espera que cada obrera presente respuestas mayores a los odorantes relacionados con la tarea que realiza y que los soldados presenten respuestas EAG menores a todos los odorantes excepto al odorante relacionado con la defensa (2-heptanona).

• HIPOTESIS 2

Ha: La especialización extrema en el sistema polimórfico de castas de la especie *A. mexicana* está correlacionada con características neuroanatómicas en los LA, no presentes en la especie *C. ocreatus*.

Hb: En ambas especies, las eferencias de los lóbulos antenales se encuentran segregadas en diferentes regiones de los cuerpos fungiformes de manera que la organización de los lóbulos antenales podría estar representada de manera abstracta en los cuerpos fungiformes.

V. OBJETIVOS

· **OBJETIVOS**

1.1. Objetivos generales

El propósito de este trabajo fue:

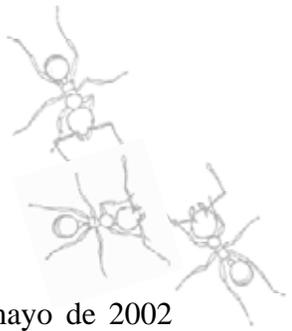
1. Estudiar la respuesta sensorial olfativa en tres castas de *A. mexicana* a olores casta-específicos con el objetivo de determinar el potencial papel del sistema sensorial olfativo periférico en la división del trabajo y la selección de la tarea.
2. Describir la morfología general del LA y de la topografía antenal aferente en el sistema nervioso central de los soldados de *A. mexicana* y compararla con la de soldados de *Camponotus ocreatus*.

1.2. Objetivos particulares

1. Identificar las castas y seleccionar individuos de tres castas: forrajeras, sepultureras y soldados, para los estudios de comparación de la sensibilidad olfativa.
2. Comparar la sensibilidad olfativa (medida mediante la respuesta EAG) de las tres castas de hormigas a estímulos olorosos relacionados con tareas específicas, para determinar si las diferentes castas presentan respuestas sensoriales diferentes y especializadas a los olores relacionados con las tareas que cada una tiende a realizar.
3. Describir y comparar la estructura del lóbulos antenales de los soldados de *Atta mexicana* y los soldados de *Camponotus ocreatus*.
4. Describir las conexiones nerviosas entre los lóbulos antenales y los cuerpos fungiformes en las hormigas *A. mexicana* y *C. ocreatus*.

VI. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

1· INSECTOS Y MANTENIMIENTO



1.1. Colecta de hormigas *Atta mexicana*

Colonias de *Atta mexicana* fueron colectadas de Yecapixtla, Morelos, México en mayo de 2002 desenterrándolas de su nido. También se colectaron reinas recién fecundadas después del vuelo nupcial y se establecieron colonias de laboratorio con ellas.

1.1.1. Colonias de laboratorio

Las colonias desenterradas fueron mantenidas en el laboratorio en contenedores de acrílico transparente interconectados con tubos de plástico (figura 19). Con las hormigas *Atta mexicana* se realizaron experimentos conductuales, electrofisiológicos y neuroanatómicos.



Figura 19. Disposición de los nidos de laboratorio. Se aprecian las tres cámaras que componen el nido y los tubos que las interconectan.

1.1.2. Formicarios de laboratorio: alojamiento

Cada nido de laboratorio de *Atta mexicana* consistió de contenedores de acrílico transparente de 20 x 15 x 18 cm, interconectados mediante tubos de acrílico transparente de 1 cm de diámetro. En el fondo de cada cámara se dispuso una capa de yeso para mantener la humedad. Cada colonia tuvo el siguiente sistema de cámaras (figura 20):

- i) 1-2 cámaras de nidificación (cultivo de hongo, reina y cría)
- ii) 1 cámara de forrajeo
- iii) 1 cámara para el depósito de desperdicios y cadáveres

Conforme la colonia fue creciendo (número de obreras y biomasa fúngica), se fueron añadiendo más contenedores, en los cuales, las hormigas desarrollaron nuevos jardines de hongos.

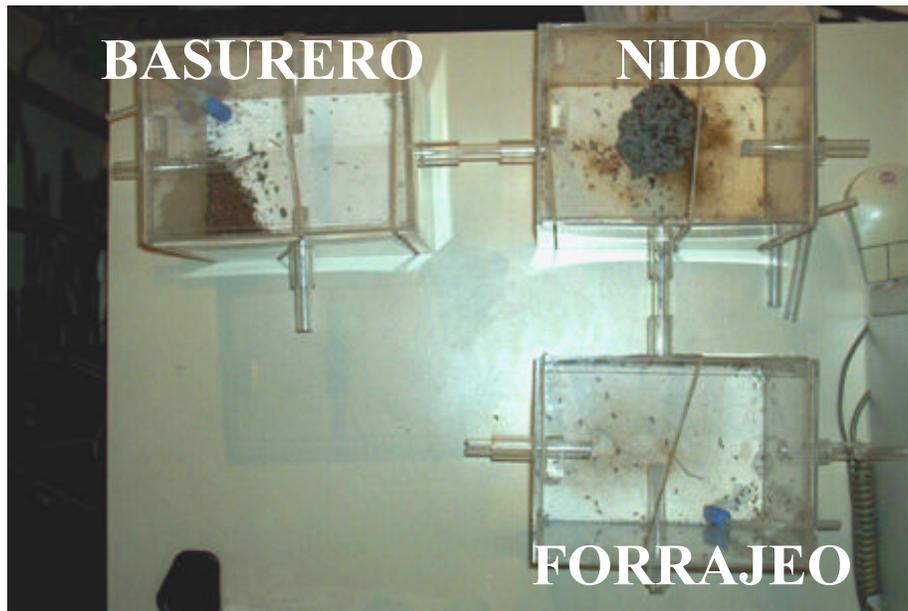


Figura 20. Los nidos consistieron de tres cámaras: una de nidificación en donde se ubicó a la reina, el hongo y a la cría; una de forrajeo en donde se suministró el materia vegetal, y una para el depósito de desperdicios o basurero.

1.1.3. Cuidado de la colonia en cautiverio: condiciones de laboratorio

1.1.3.1. Humedad

Aunque las hormigas pueden soportar un amplio intervalo de niveles de humedad siempre y cuando tengan acceso a agua para beber, el hongo que cultivan necesita una alta y constante humedad, preferentemente cerca del punto de saturación (80-100% Humedad Relativa, HR). Sin embargo, el agua de condensación es perjudicial para el desarrollo del hongo, por lo que es necesario considerar sistemas para drenar el exceso de agua, así como ventilación para evitar el exceso de condensación y la formación de hongos oportunistas. Con este fin, a cada contenedor se le practicaron 5 perforaciones en la base para el drenado de exceso de agua. Además, se hizo otra perforación lateral a cada contenedor por el que se hizo pasar una manguera de acuario de 3 mm de diámetro a la que al final se le conectó una piedra difusora de acuario. Por medio de esta manguera se inyectó agua cuando fue necesario. Además, actuó como sistema de intercambio de aire y evaporación de exceso de humedad. Se mantuvo una HR de 20-25% en el área de forrajeo, y de 50-70% en las cámaras de jardín de hongos. Para evitar la proliferación de microorganismos oportunistas, se eliminaron periódicamente los desperdicios (sustrato vegetal agotado, hormigas muertas, etc.) de la cámara basurero.

1.1.3.2. Temperatura

Para el adecuado desarrollo del hongo, se recomienda mantener una temperatura de entre 25-27°C. Es necesario, para que el hongo no se deteriore, evitar la disminución de la temperatura debajo de los 20°C, así como evitar llegar a los 30°C. Por su parte, las hormigas soportan bien los cambios de temperatura: a temperaturas bajas, disminuye el metabolismo de las hormigas y se vuelven lentas, aunque se recuperan al aumentar la temperatura. Sin embargo, temperaturas por encima de los 35°C son mortales. Los nidos de laboratorio se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

1.1.3.3. Luz

Las hormigas soportan bien la luz solar, sin embargo, el hongo jamás debe recibir los rayos directos del sol. Aunque las cámaras pueden recibir iluminación artificial, esta no debe sobrecalentar aquellas donde se ubica el jardín de hongos. Los nidos se mantuvieron en fotoperíodo LO 12:12.

1.1.3.4. Sustrato proporcionado para el hongo

Aunque existe una gran variedad de sustrato vegetal que las hormigas aceptan para el cultivo de su hongo, no es necesario contar con todas ellas para mantener la colonia. A las colonias del laboratorio se les proporcionó el siguiente sustrato (figura 21):

- i) Sustrato vegetal fresco o seco: hojas y flores de rosas; hojas de cítricos (limón), etc.
- ii) Sustitutos de vegetales frescos: cereales comerciales (avena, hojuelas de maíz, salvado de trigo, etc.).

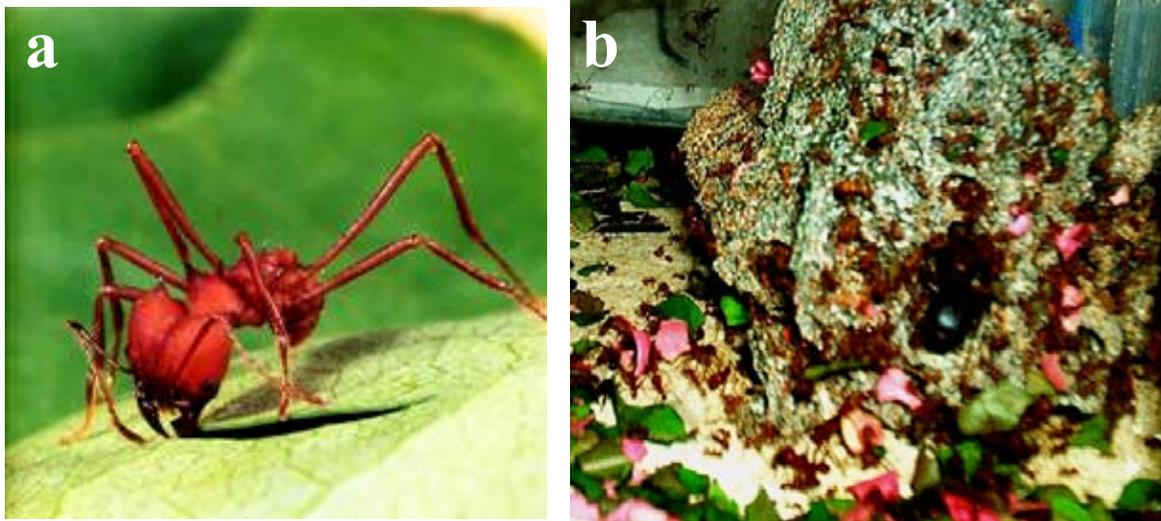


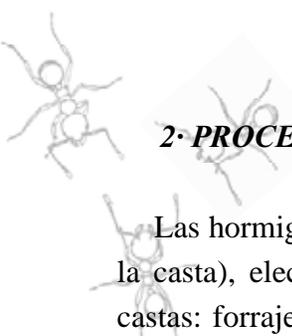
Figura 21. a) Forrajera cortando una hoja (tomado de Hölldobler & Wilson, 1990). b) Aspecto de un nido de *A. mexicana* del Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados durante el forrajeo. Los fragmentos de hojas ya se encuentran dentro del nido y listos para ser procesados. Nótese el jardín de hongos.

1.1.3.5. Monitoreo

Cuando fue necesario, las colonias y las hormigas fueron videograbadas.

2.1. Colecta de hormigas *Camponotus ocreatus*

Fragmentos de colonias de *Camponotus ocreatus* conteniendo obreras, machos y reinas vírgenes fueron colectadas en Coronado National Forest en las montañas de Catalina, del norte de Tucson, Arizona, Estados Unidos, y llevadas al laboratorio en los Arizona Research Laboratories Division of Neurobiology en la Universidad de Arizona, Tucson, Az. Las hormigas se mantuvieron en contenedores plásticos bajo fotoperíodo LO 12:12 a 25°C y fueron alimentadas con grillos en trozos y agua con miel.



2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES I: SELECCION DE LAS CASTAS Y OLORES

Las hormigas se sometieron a uno de los siguientes niveles de estudio: conductual (identificación de la casta), electrofisiología, y neuroanatomía. Para los estudios EAG se seleccionaron las siguientes castas: forrajeras, sepultureras y soldados. Forrajeras y sepultureras fueron seleccionadas por medio de criterios conductuales, mientras que los soldados por criterios morfológicos.

2.1. Selección de las castas

2.1.1. Selección de sepultureras

La extrema división del trabajo ha producido individuos que se dedican a tareas muy especializadas como la remoción de miembros de la colonia que han muerto, un comportamiento altamente estereotipado y dependiente de estímulos liberadores en las hormigas que es llamado necroforesis, y aquellas hormigas que lo realizan son conocidas como sepultureras (Visscher, 1988; Hölldobler & Wilson, 1990; Trumbo et al., 1997). Aunque se han realizado algunos trabajos acerca de la necroforesis y los estímulos liberadores relacionados en algunas especies de hormigas (Wilson et al., 1958; Haskins & Haskins, 1974; Howard & Tshcinkel, 1976), se sabe poco sobre este comportamiento en otras especies. Antes de someter a las sepultureras a las pruebas de sensibilidad antenal (EAG), se realizó un estudio de análisis químico para determinar la naturaleza de la señal liberadora de la necroforesis en *Atta mexicana*, con el objetivo de seleccionar el olor relacionado con esta tarea. Además se realizaron bioensayos para determinar si esta tarea es realizada por cualquier individuo o si es una conducta que algunos individuos realizan más frecuentemente. Con base en esto, se determinaron los criterios para identificar a las sepultureras para los experimentos electrofisiológicos.

El protocolo de selección de sepultureras se usó para definir el criterio para la identificación de las hormigas que realizaron el mayor número de veces el comportamiento necroforético. Estas obreras se definieron operacionalmente como sepultureras. Para identificar a las sepultureras se utilizó un protocolo basado en el empleado y descrito por Julian & Cahan (1999), que consistió en crear la oportunidad a las hormigas para que exhibieran el comportamiento necroforético por medio de la introducción de una obrera muerta dentro de la cámara de hongos y cría (figura 22). Se utilizaron insectos muertos por congelamiento que fueron utilizados como estímulo para evocar la respuesta necroforética. Las hormigas muertas se prepararon de la manera siguiente: se sacaron del nido de 10 a 20 hormigas y se metieron en el congelador durante 30-60 minutos. Después de este tiempo, los insectos fueron sacados del congelador y se les dejó dentro de cajas de acrílico a temperatura ambiente durante 12-24 horas.

A través de accesos en los contenedores de plástico se introdujo una hormiga muerta en cada prueba en diferentes lugares de la cámara de cría cada ocasión. Se marcaron todas las obreras que realizaron el comportamiento necroforético completo. Después de que cada hormiga hubo soltado el cadáver, se le capturó y saco del nido para marcarla. Las hormigas se marcaron con códigos de color sobre tórax y abdomen con pinturas acrílicas no tóxicas marca Lodela® (Mega Grupo Industrial S.A. de C.V., México, D.F., México) empleadas para aeromodelismo. Una vez marcadas, las hormigas se

mantuvieron aisladas durante 24 horas en contenedores cerrados con ventilación y humedad con la finalidad de que los solventes volátiles se evaporaran, y así evitar el comportamiento alterado del resto de los individuos hacia la hormiga marcada al ser reintroducida. En experimentos preliminares, las hormigas marcadas y reintroducidas antes del tiempo suficiente para el secado de la pintura fueron tratadas como objetos extraños y llevadas al exterior del nido. Después del período de secado, las hormigas fueron reintroducidas al nido. Las hormigas pueden portar las marcas por largo tiempo (1-2 semanas) aunque siempre es necesario remarcar a los individuos debido al comportamiento de aseo y aloaseo (limpieza propia y limpieza entre compañeros de nido respectivamente) que frecuentemente realizan las hormigas. Durante las pruebas conductuales de identificación de la casta se registraron los siguientes datos para cada individuo:

1. Número de veces que una hormiga realizó el comportamiento completo.
2. Latencia: tiempo desde que se introduce el cadáver hasta que la hormiga lo encuentra.
3. Duración: tiempo desde que la hormiga encuentra el cadáver hasta que lo suelta en la pila de desperdicios.
4. Si el cadáver fue llevado hasta la pila de desperdicios o no.
5. Destino final del cadáver.

Las pruebas conductuales de identificación de sepultureras se realizaron tres veces por día durante 10 días hasta completar 30 pruebas. Con base en criterios estadísticos de la distribución de Poisson (Julian & Cahan, 1999), aquellas obreras marcadas que no se ajustaron a la distribución probabilística de Poisson (Zar, 1999) se consideraron sepultureras.

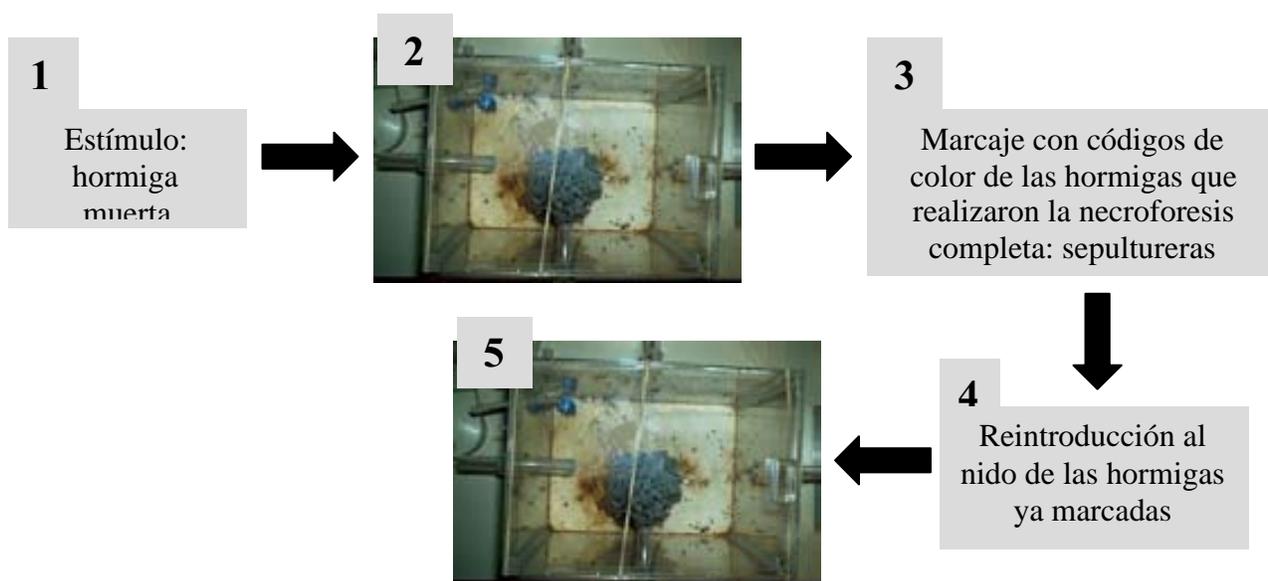


Figura 22. Esquema del protocolo de selección de sepultureras.

2.1.1.1. Análisis de los extractos de hormigas muertas: selección del olor necroforético

En otras especies de hormigas se ha reportado que el ácido oleico (**Apéndice 1**) presente en los cadáveres de hormigas, actúa como estímulo liberador del comportamiento necroforético (Wilson,

1958; Blum, 1979; Haskins, 1970; Haskins & Haskins, 1974; Gordon, 1983, 1999). Para probar que los cadáveres de *Atta mexicana* presentan ácido oleico, se realizó un análisis químico de extractos de cadáveres de hormigas.

a) *Extractos de cadáveres*

Se realizaron tres extractos por separado. Los extractos se realizaron de acuerdo al siguiente procedimiento. Se sacaron del nido 10 hormigas y se mataron por congelamiento durante 30-60 minutos. Después de este tiempo, los insectos fueron sacados del congelador y se les dejó dentro de viales de vidrio a temperatura ambiente durante al menos 5-10 horas. Posteriormente, los insectos se pasaron a viales de vidrio y se cubrieron con 4 mL de hexano y se dejaron incubar durante otras 24 horas a temperatura ambiente para completar la extracción. Al término de este tiempo, se retiraron los cadáveres de hormigas y se concentró el extracto con nitrógeno hasta los 200 μ L.

b) *Análisis químico*

El análisis de los extractos de hormigas muertas fue realizado en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS/MS) Varian Saturn 4D modelo 3400 CX GC (Palo Alto, California). Una columna DB5 (30 m x 0.25 mm de diámetro interno) fue programada a una temperatura de 50°C (mantenida por 2 min) a 250°C a 15°C min⁻¹. La temperatura final (250°C) de la columna fue mantenida por 10 minutos. La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 200°C. La ionización fue realizada por impacto de electrones a 70 eV a 230°C, y la identificación espectral fue confirmada por comparación de los tiempos de retención y el espectro de masas con un estándar de ácido oleico (Sigma-Aldrich Chem. Co., St Louis, Missouri).

b) *Bioensayos para comprobar la efectividad del ácido oleico versus extracto de cadáveres*

Se realizaron bioensayos con extractos de cadáveres y con ácido oleico puro (Sigma-Aldrich Chem. Co., St Louis, Missouri) sobre trozos de papel filtro (Whatman No. 1) de 5 mm² de área. Para el extracto de cadáveres, los trozos de papel filtro fueron mojados con 2 μ L de extracto de cadáveres. Se permitió que el solvente (hexano) se evaporara por algunos segundos (20-30). Como control para el extracto de cadáveres se utilizaron trozos de papel filtro con 2 μ L de hexano. Cada trozo de papel filtro estuvo marcado con una letra mayúscula escrita con lápiz para su identificación. Después de la evaporación del solvente, ambos papeles (control y extracto) fueron introducidos dentro de la cámara de la reina al mismo tiempo.

Para el ácido oleico se realizó el mismo protocolo, pero en lugar del extracto, se utilizó 1 μ L de ácido oleico puro sobre los trozos de papel filtro. Como control para el ácido oleico se utilizó papel filtro solo. Al igual que en los experimentos con extracto de cadáveres, ambos papeles, control y con ácido oleico, fueron introducidos simultáneamente en la cámara de la reina. En cada prueba, las hormigas tuvieron 1 hora para completar la tarea. Este tiempo fue determinado en ensayos preliminares en los que se observó que tiempo promedio en el que una hormiga muerta es detectada dentro del nido y llevada a la pila de desperdicios es de 1 hora. Se registró el destino de cada trozo de papel filtro. La prueba se consideró positiva cuando el papel fue transportado a la pila de desperdicios y negativa

cuando no (cuando quedaron dentro del nido). La posición en la que se introdujeron los papeles filtro en el nido fue cambiada en cada réplica para evitar algún sesgo causado por la posición. En cada ensayo se utilizaron trozos de papel-filtro nuevos. Para cada bioensayo (con ácido oleico y con extracto de cadáveres) se realizaron 10 réplicas (total = 20 pruebas). Se compararon las pruebas positivas de cada olor *versus* su control. En estos bioensayos no se marcaron las hormigas que realizaron el acarreo de los trozos de papel filtro con los estímulos ya que el objetivo fue sólo determinar la eficacia del ácido oleico como estímulo.

c) Análisis estadístico de los datos de los experimentos conductuales

Los resultados de los bioensayos fueron analizados por medio de la prueba de X^2 -cuadrada para muestras independientes (tabla de contingencia de 2 x 2), y para la duración del comportamiento se utilizó una *t* de Student (Zar, 1999). Los análisis se realizaron con el programa SPSS.

2.1.2. Selección de forrajeras

Las forrajeras también fueron identificadas mediante criterios conductuales. Este protocolo se usó para identificar a las hormigas que realizan más frecuentemente el forrajeo. Se suspendió el suministro de sustrato para el hongo (avena, hojas de plantas, flores), por un período de 2 semanas. Después de este tiempo de privación, se introdujo sustrato vegetal fresco en la cámara de forrajeo. Se capturaron y marcaron los individuos que llegaron al sitio de forrajeo sin reclutamiento y que comenzaron a cortar y transportar material vegetal. Después de dejar que la pintura secase (24 hrs aprox.), se reintrodujeron al nido. Este protocolo se repitió una vez más una semana después y las hormigas marcadas que realizaron el forrajeo dos veces fueron consideradas como forrajeras.

2.1.3. Selección de soldados

Los soldados tienen repertorios conductuales reducidos y principalmente se dedican a la defensa del nido. Fueron identificados por su tamaño: obreras con ancho de cabeza > 3 mm (Wilson, 1980a,b). Se probó el comportamiento defensivo perturbando el nido y estimulando con 2-heptanona.

2.2. Olores seleccionados para los experimentos electrofisiológicos

Para los experimentos electrofisiológicos, se seleccionaron tres olores, comercialmente disponibles, relacionados con tareas particulares realizadas por cada casta:

- i) Ácido oleico (Sigma-Aldrich Chem. Co., St Louis, Missouri). Producto de los cadáveres de las hormigas y que evoca el comportamiento sepulcral (ver sección de análisis químico).
- ii) Esencia de rosas (Belmay Flavours & Fragrances Ltd., U.K.). Este olor está relacionado con la tarea de forrajeo y con la casta de forrajeras.
- iii) 2-heptanona (Sigma-Aldrich Chem. Co., St Louis, Missouri). Este olor está relacionado con la tarea de defensa del nido y con la casta de soldados. Los olores de alarma fueron seleccionados como olores casta-específicos para los experimentos de sensibilidad antenal debido a que sincronizan la importante tarea de defensa del nido contra los enemigos, y los

soldados constituyen la casta especializada en esta labor. En el momento de los experimentos conductuales y electrofisiológicos no se tenía identificada la feromona de alarma de *Atta mexicana*, así que se usó 2-heptanona, un compuesto cercano a la mayoría de las feromonas de alarma que presentan las hormigas y muchos himenópteros (Hölldobler & Wilson, 1990). En muchas especies de *Atta*, la 4-metil-3-heptanona es el componente principal de la feromona de alarma, aunque se han encontrado otros componentes como la 2-heptanona. Moser et al. (1968) encontraron que la 4-metil-3-heptanona y la 2-heptanona en una proporción de 4:1 son los componentes principales de la feromona de alarma en las obreras mayor de *Atta texana*. Ambas cetonas han sido identificadas en proporciones especie-específicas en las feromonas de alarma de otras seis especies de *Atta*, incluyendo *Atta bisphaerica* y *Atta capiguara* (Blum et al., 1968; Hughes et al., 2001). De esta manera, la 4-metil-3-heptanona y la 2-heptanona son componentes extremadamente comunes y se han encontrado en muchas otras especies de hormigas (Hölldobler & Wilson, 1990) y ha sido usada como sustancia de alarma en otros estudios de sensibilidad antenal medida con EAG en especies en las que aún no se había identificado la feromona de alarma (Andryszak et al., 1990). En pruebas preliminares se comprobó la efectividad de la 2-heptanona como feromona de alarma y se demostró que evoca el comportamiento agresivo: búsqueda, apertura de mandíbulas y sujeción de la fuente de 2-heptanona con las mandíbulas (Moser et al., 1968).

2.2.1. Efectividad conductual de los olores seleccionados

Cada olor también fue probado en experimentos conductuales para determinar su efectividad en la liberación del comportamiento casta-específico. En este caso, se ha denominado estímulo experimental a cada olor en los experimentos conductuales. Se utilizó el protocolo de estímulo experimental usando los olores: flores, ácido oleico y 2-heptanona (1 μ L) sobre trozos de papel filtro (Whatman No. 1) de 5 mm² de área. Como control, se emplearon trozos de papel filtro limpios. Para cada olor se realizó la siguiente prueba: ambos papeles, control y con estímulo experimental se introdujeron simultáneamente dentro del nido. En cada prueba se utilizaron papeles filtro nuevos rotulados con lápiz (C=control; H=heptanona; O=ácido oleico; F=flores). Se registró el efecto conductual de cada olor:

1. Para ácido oleico: se consideraron positivas aquellas pruebas en las que los papeles filtro con ácido oleico fueron transportados hacia los basureros. Se compararon con su control.
2. Para la 2-heptanona: Se consideraron positivas aquellas pruebas en las que los papeles filtro evocaron comportamientos defensivos o agresivos. Se compararon con su control.
3. Para esencia de flores: se consideraron positivas aquellas pruebas en las que el papel filtro con la esencia de rosas fue transportado dentro del nido. Se comparó con su control.

Se realizaron 10 pruebas para cada sustancia con su control. Para el caso de las pruebas con ácido oleico y esencia de flores, en cada prueba los insectos tuvieron un tiempo de 1 hora para completar la tarea. Para la 2-heptanona las respuestas resultaron inmediatas durante los primeros 5 minutos de exposición a los estímulos. Los datos se analizaron con la prueba de X^2 cuadrada.

3· PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES II: ELECTROANTENOGRAMAS



3.1. Técnica de registro EAG

La hipótesis de que la división del trabajo tiene influencia sobre la sensibilidad olfativa fue probada examinando la sensibilidad antenal, mediante la técnica EAG, en diferentes castas ante olores relacionados con tareas casta-específicas. La respuesta antenal de las hormigas de las tres castas de la hormiga *Atta mexicana* a los diferentes olores fue determinada por medio del EAG convencional (Malo et al., 2002) usando el electroantenograma de Syntech (NL 1200, The Netherlands).

3.1.1. Insectos: unidades experimentales seleccionadas

De acuerdo a los criterios conductuales y morfológicos ya descritos, se seleccionaron las siguientes subpoblaciones de hormigas *A. mexicana*:

- 1.- Castas conductuales
 - a) Forrajeras: Hormigas que fueron vistas forrajeando al menos 2 veces. Se seleccionaron 18 forrajeras ($n_{\text{forrajeras}} = 18$).
 - b) Sepultureras: Hormigas que fueron vistas acarrear cadáveres al menos 2 veces. Se seleccionaron 5 sepultureras ($n_{\text{sepultureras}} = 5$).
- 2.- Casta morfológica
 - c) Soldados. Hormigas con tamaño de cabeza ≥ 3 mm. Se seleccionaron 9 soldados ($n_{\text{soldados}} = 9$).

3.1.2. Olores de prueba y concentraciones

Los olores empleados para el registro electroantenográfico se prepararon en diluciones seriales usando aceite de parafina: 1:1000, 1:250, 1:75 y 1:10, resultando en las siguientes concentraciones: 1, 4, 13 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Los estímulos empleados fueron los siguientes:

- a) 2-heptanona
- b) Esencia de rosas
- c) Acido oleico
- d) Como control 1, se usó el vehículo en el que se disolvió cada olor: aceite de parafina.
- e) Como control 2 para descartar sensibilización y/o deterioro de la preparación biológica se utilizó hexanol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)

3.1.3. Sistema de registro e instrumentación

3.1.3.1. Electrodo

Se utilizaron tubos capilares de vidrio (de borosilicato) de 75 mm de longitud y 1 mm de diámetro interno llenos de solución salina e insertados en un alambre de plata clorurada fijados a un mango de tungsteno para constituir los electrodos de registro y de referencia. Los capilares se estiraron manualmente de manera que se redujera el diámetro hasta unos 0.5-0.6 mm. Los capilares de vidrio fueron llenados con solución Ringer para insectos: 2mmol $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$; 5 mmol KCl; 2mmol NaHCO_3 ; 130 mmol NaCl (Kern & Bestmann, 1993). Los electrodos se conectaron a una sonda que lleva la señal a un amplificador de alta impedancia (Syntech NL 1200, Hilversum, Netherlands). La señal fue desplegada en un monitor de computadora usando el software para el procesamiento de señales EAG (figura 23).

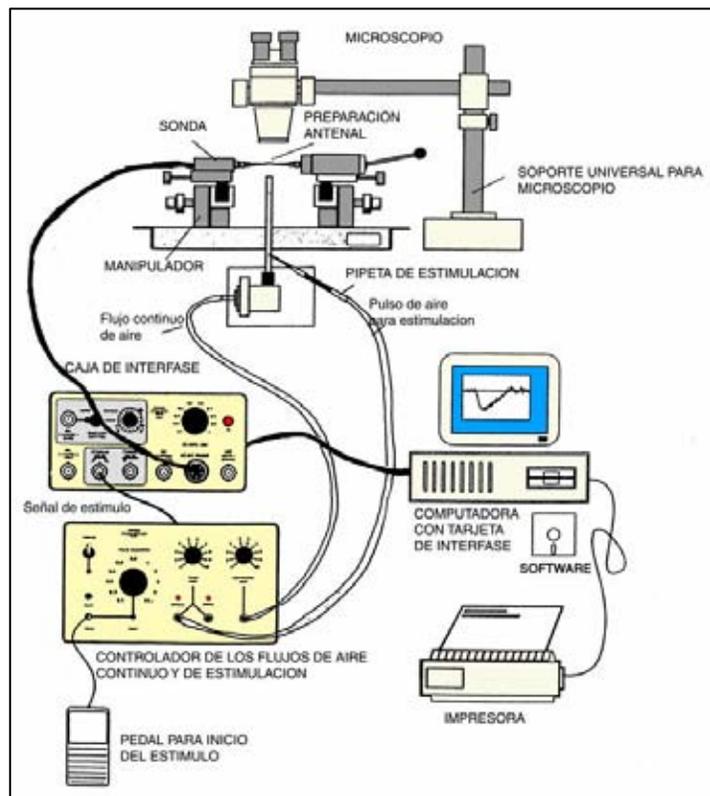


Figura 23. Sistema de registro y estimulación EAG

3.1.3.2. Montaje experimental

Se utilizaron insectos completos, lo cual permitió tener preparaciones de larga duración. En experimentos convencionales de EAG se emplean antenas aisladas que proporcionan respuestas confiables a corto plazo ya que se deterioran mucho más rápido que preparaciones de insectos completos. La amplitud del EAG obtenida a partir de antenas aisladas o de cabezas de insectos, puede disminuir hasta en un 50% en 30 minutos (Malo et al., 2000). Por el contrario, en experimentos preliminares realizados para esta tesis, se encontró que la amplitud del EAG registrado a partir de insectos completos se mantiene constante por al menos durante 3 horas. Para su montaje, las hormigas se anestesiaron con frío para inmovilizarlas y facilitar su manipulación. Al sacarlas de la cámara de

hielo, las patas fueron cortadas para evitar que, con ellas, las hormigas interfirieran o desconectaran los electrodos. El electrodo de referencia fue insertado en un pequeño agujero practicado en la espina occipital de la cápsula cefálica, esto inmovilizó y proporcionó soporte y sujeción a la hormiga. El electrodo de referencia, montado en un micromanipulador, se conectó con la punta de la antena (sólo hasta hacer contacto con la solución Ringer). Como ayuda óptica se utilizó un microscopio estereoscópico de disección para posicionar el electrodo de registro. La antena se mantuvo intacta sin cortar segmentos. Las señales generadas por la antena fueron pasadas a través de un amplificador de alta impedancia y procesadas en el software para señales EAG (Syntech).

a) Sistema de estimulación

El sistema de estimulación consistió de tres partes (figura 23): 1) un controlador del flujo de aire (CFA) para la estimulación que, por un lado mantiene un flujo continuo de aire humidificado (1.7 L min^{-1}) a través de un tubo de plástico conectado a un tubo de vidrio de 10 mm diámetro cuya salida se mantiene a 10 mm de la antena; 2) el CFA utiliza un segundo flujo de aire para la estimulación, el cual se conecta a otro tubo que hace pasar una corriente o pulso de aire de 0.5 L min^{-1} durante 1 segundo y que se activa al accionar un botón o un pedal; 3) este tubo se conecta con el cartucho de estimulación, el cual consistió de una pipeta Pasteur en cuyo interior se colocó un trozo de papel filtro de 5 mm^2 conteniendo el producto o estímulo a evaluar. Para probar cada olor, alícuotas de $5 \mu\text{L}$ de las diluciones de cada compuesto ($1, 4, 13$ y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) se depositaron en trozos de papel filtro (Whatman No. 1) de 5 mm^2 . Las cargas finales de los olores en los cartuchos de estimulación fueron: $0.005, 0.02, 0.06$ y $0.5 \mu\text{g}$. Para cada concentración y olor se prepararon nuevos cartuchos con papel filtro nuevo. El aire del laboratorio fue continuamente ventilado hacia fuera a través de un extractor.

b) Entrega del estímulo.

Al inicio cada experimento, se conectó el flujo continuo para adaptar a los mecanorreceptores y se mantuvo el flujo de aire durante todo el experimento. Cada olor fue probado pasando el pulso de aire a través del cartucho de estimulación. La punta de la pipeta del cartucho de estimulación fue puesta dentro un orificio localizado a 10 mm del final del tubo de vidrio de 10 cm de diámetro dirigido hacia la antena. Debido a que el pulso de estimulación de un segundo añade un cambio de presión en el flujo continuo, la respuesta de los mecanorreceptores de la antena se suma a la de los quimiorreceptores en el EAG. Este valor de los experimentos control debe ser sustraído de los valores EAG en respuesta a cualquier sustancia de prueba (ver análisis de datos EAG).

3.1.4. Diseño experimental

Después de haber montado cada hormiga para el registro, se permitió la estabilización y adaptación de la preparación durante 10 minutos. Después de este tiempo, se aplicó el tren de estimulación que consistió en la estimulación con los controles correspondientes y los diferentes olores en sus diferentes concentraciones. En cada experimento, la antena fue estimulada primero con el estímulo control 1 que consistió en papel filtro con $5 \mu\text{L}$ de aceite de parafina, que fue el solvente en el que se diluyeron los

compuestos (en pruebas preliminares se determinó que el aceite de parafina en el papel filtro produce respuestas iguales a la estimulación con papel filtro limpio o aire). Después, se aplicó el estímulo control 2 que consistió en papel filtro con 5 μL de hexanol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esto fue seguido por la estimulación con cada olor (ácido oleico, 2-heptanona y esencia de rosas) en orden creciente de concentración. Al final de cada serie de concentraciones para cada olor se volvió a estimular con hexanol, lo que permitió monitorear la preparación antenal. El tiempo ínterestímulos fue de 3 minutos, con lo cual se permitió que la antena recuperara su sensibilidad al 100 % (figura 24).

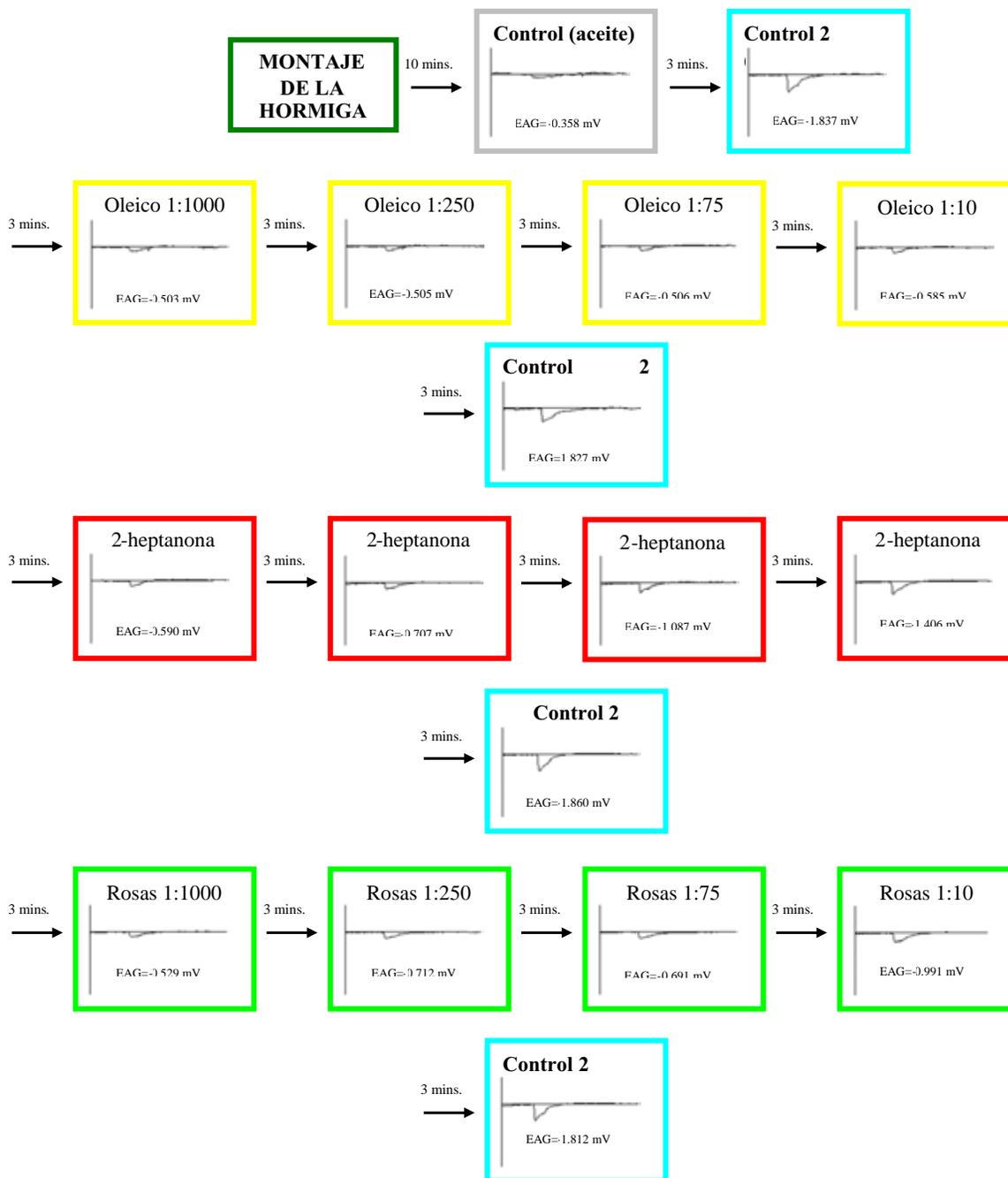


Figura 24. Diseño experimental EAG.

3.1.4.1. Controles y período de lavado: eliminar efectos acarreados

En muchos estudios de EAG en los que probaron diferentes dosis, la serie de estimulación fue presentada en dosis crecientes (Glancey & Dickens, 1988; Kern & Bestmann, 1993; Masterman et al., 2001; Sheridan et al., 1996), mientras que en otros estudios las dosis se administraron en orden aleatorio (Krishnan et al., 1999; Malo et al., 2000). Aunque en este trabajo las mediciones se realizan en los mismos sujetos, y los tratamientos (es decir, los estímulos) se aplicaron en órdenes fijos a todos los individuos, esto no implica una mayor correlación ni covarianza entre las mediciones adyacentes. Cuando se realiza una aleatorización de los tratamientos a las unidades experimentales, dicho diseño sólo representa una muestra aleatoria de todos los experimentos posibles que pudieran realizarse al aleatorizar los tratamientos. De esta manera, aleatorizar no elimina la correlación entre las observaciones. Sin embargo, la correlación esperada entre las unidades experimentales puede considerarse constante con todas las aleatorizaciones posibles. Así, si varianzas y correlaciones son constantes, las covarianzas tendrán el mismo valor constante (simetría compuesta) (Kuehl, 2001).

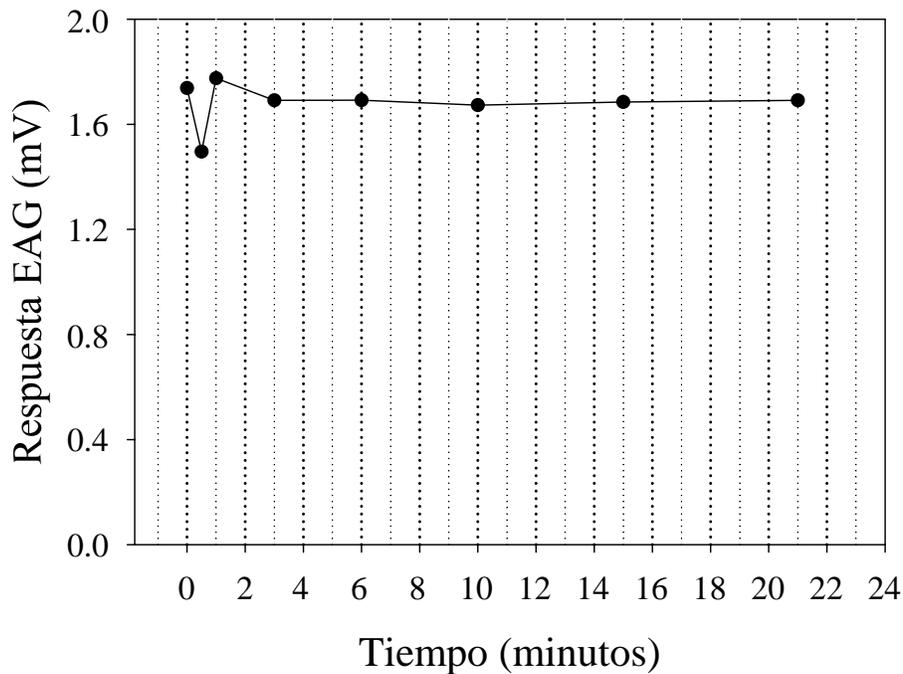


Figura 25. En la gráfica se muestra la recuperación de la respuesta EAG a la 2-heptanona de la antena de una obrera *A. mexicana*. En el tiempo 0 se realizó el primer estímulo. Medio minuto después (en tiempo 0.5) se estimuló nuevamente. Un minuto después de esta estimulación, en el minuto 1 se realizó una nueva estimulación; dos minutos después (en el minuto 3), se estimuló nuevamente; posteriormente se estimuló 3 minutos después (en el minuto 6), y así sucesivamente. Como se observa en la gráfica, tres minutos es suficiente tiempo para que la respuesta EAG se recupere.

Si consideramos que las varianzas y correlaciones son constantes, la presentación de los estímulos en dosis crecientes y en orden fijo, junto con el periodo de lavado, no implica efectos acarreados (ver mas adelante), ni correlación entre mediciones (es decir, no-independencia de los datos) ya que la correlación se elimina con el período interestímulo (o de lavado) que permite la recuperación de la sensibilidad de la antena al 100%. Si el tiempo interestímulo es suficiente para que la recuperación sea del 100%, entonces podemos considerar que las mediciones realizadas en el mismo sujeto a diferentes

dosis son estadísticamente independientes. En los experimentos, cada estimulación estuvo separada temporalmente de la otra por un período de 3 minutos (tiempo interestímulo ó “lavado”) con la finalidad de permitir la recuperación de la respuesta antenal al 100% con lo que las mediciones pueden considerarse estadísticamente independientes y, así, se eliminan los efectos acarreados (figura 25).

En algunos trabajos sobre EAG el período interestímulo usado ha sido de 30 segundos (Krishnan et al., 1999) en otros ha sido suficiente con 1 minuto (Brockmann & Brückner, 1998; Sheridan et al., 1996), otros han dejado transcurrir 2 minutos entre estímulos (Masterman et al., 2001; Robinson, 1987); en otros trabajos se ha establecido un tiempo entre estímulos de 3 minutos (Glancey & Dickens, 1988), y en otros más hasta 4 minutos de intervalo entre estímulos (Kern & Bestmann, 1993), ya que la recuperación de la sensibilidad depende del insecto y del estímulo usado.

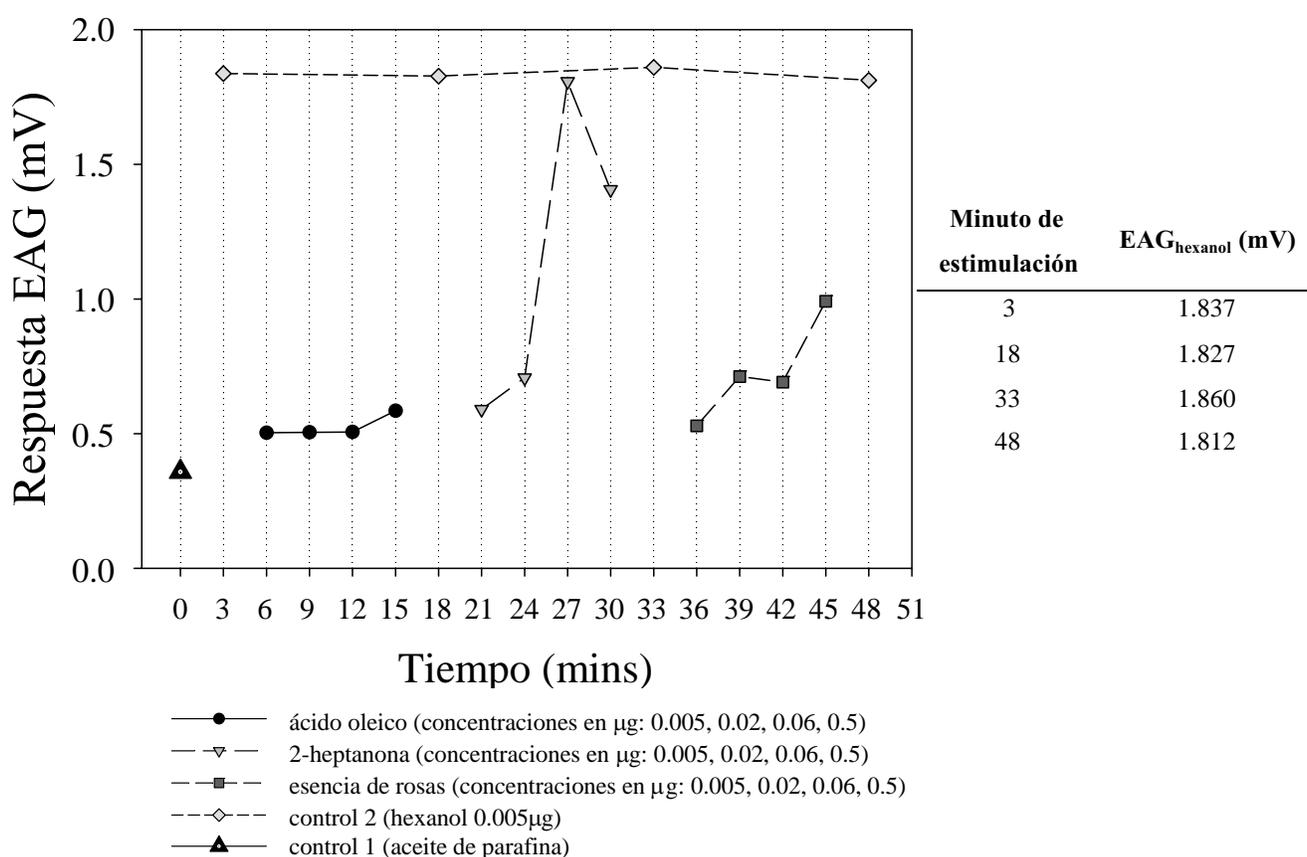


Figura 26. Secuencia de respuestas EAG a la estimulación en un tren de estimulación para una obrera de *A. mexicana*. En el tiempo 0 se estimula con el control 1 que es el aceite de parafina, tres minutos después (tiempo de lavado), se estimula con el control 2 (hexanol), tres minutos después (en el minuto 6) se inicia el tren de estimulación para el ácido oleico con la dosis más baja (0.005 µg). Después de otros 3 minutos de lavado (minuto 9) se estimula con la siguiente concentración de ácido oleico (0.02 µg) y así sucesivamente con las siguientes concentraciones del ácido oleico. Al finalizar el tren de estimulación con la última concentración de ácido oleico (0.5 µg), y después de tres minutos de lavado, se estimula con el control 2 (hexanol), y así sucesivamente para cada olor. Como puede verse en la gráfica, la respuesta EAG a la estimulación control 2 se mantiene lo suficientemente constante, lo cual descarta efectos acarreados, adaptación, sensibilización y deterioro de la preparación biológica. La tabla de la derecha muestra la amplitud de las respuestas EAG al control 2 de hexanol y el tiempo en el que fueron realizadas durante el experimento. Promedio de las respuestas EAG al hexanol: $1.83 \pm .01$ mV.

Este período de lavado o descanso que transcurre antes de suministrar el siguiente tratamiento elimina los efectos del tratamiento anterior, lo cual es importante ya que los efectos de ciertos tipos de tratamientos pueden transferirse al siguiente tratamiento cuando se administran en secuencia a los sujetos. Estas transferencias pueden sesgar severamente las estimaciones de las medias de tratamiento debido a que los tratamientos suministrados en períodos anteriores influyen en el efecto del tratamiento aplicado en períodos sucesivos. Si el período de lavado (interestímulos) se aplica correctamente basándose en el conocimiento del sistema bajo estudio, los efectos acarreados pueden evitarse (Kuehl, 2001).

Para asegurarse que se han eliminado los efectos acarreados, se hicieron pruebas EAG preliminares de recuperación de la respuesta que permitieron establecer un tiempo confiable entre estimulaciones de manera que la sensibilidad antenal quedara recuperada al 100%. Además, durante los experimentos, al final del tren de estimulación de diferentes dosis de cada olor, se aplicó un estímulo con el control 2 (hexanol), lo que permitió comprobar experimentalmente que no hay efectos acarreados (figura 26-30). Así pues, tanto el orden de estimulación en orden creciente, como el período de lavado de 3 minutos y las estimulaciones controles con hexanol que monitorean la respuesta al final de la estimulación de cada olor, permiten afirmar que en este diseño experimental se han eliminado los efectos acarreados y la correlación sesgada entre las mediciones.

La figura 26 muestra las respuestas EAG en secuencia del diseño experimental y la secuencia de estimulación. En la figura 27 se muestran las respuestas EAG promedio de las forrajeras al estímulo control de hexanol que se presentó al final de cada tren de estimulación de cada olor.

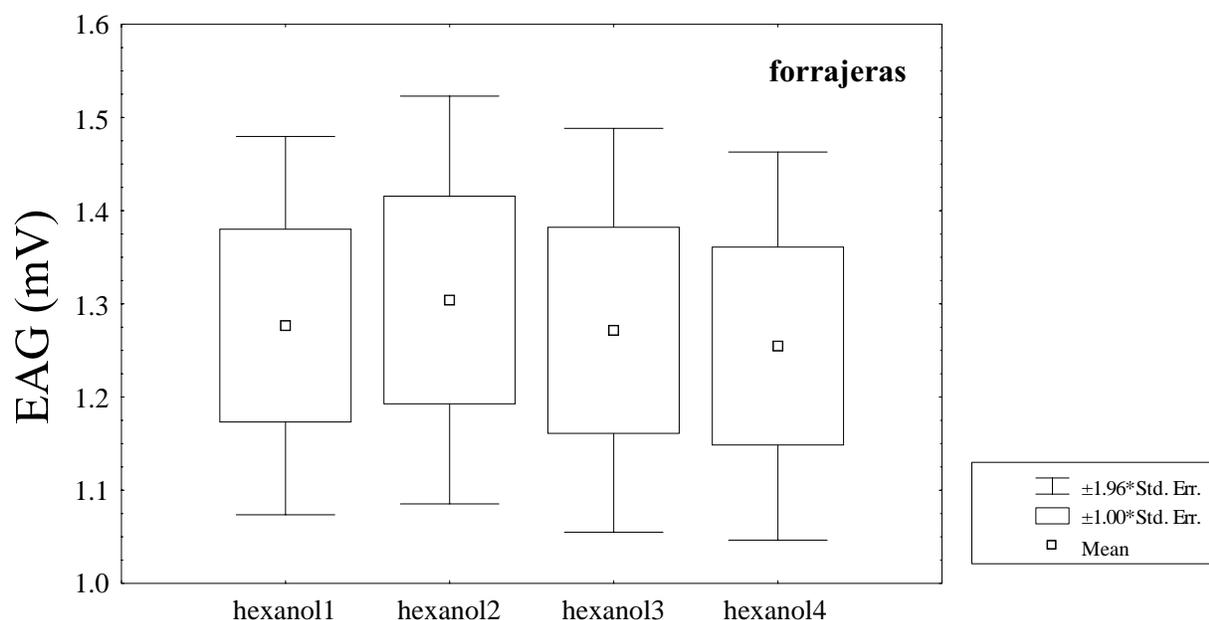


Figura 27. Respuestas promedio EAG al control de hexanol para forrajeras. A los 3 minutos después de haber estimulado con el control de aceite de parafina, se realizó la primera estimulación con el control de hexanol (hexanol 1). A los 18 minutos, después del tren de estimulación con el ácido oleico, se realizó la segunda estimulación con el control de hexanol (hexanol 2). A los 33 minutos, después del tren de estimulación con la 2-heptanona, se realizó la tercera estimulación con el hexanol (hexanol 3). Finalmente, a los 48 minutos se realizó la última estimulación con el control de hexanol (hexanol 4). No hay diferencias significativas entre las medias ($F = 0.131$; $df = 68$; $P = 0.94$).

En la figura 28 para sepultureras y en la figura 29 para soldados. En la figura 30 se grafican las medias de la respuesta EAG al control de hexanol de todas las castas para su comparación. En las figuras se observa que la respuesta EAG al control 2 de hexanol se mantiene constante, con lo que se asegura que la antena se encuentra en buen estado y que los estímulos previos no alteran la respuesta EAG de los estímulos subsiguientes.

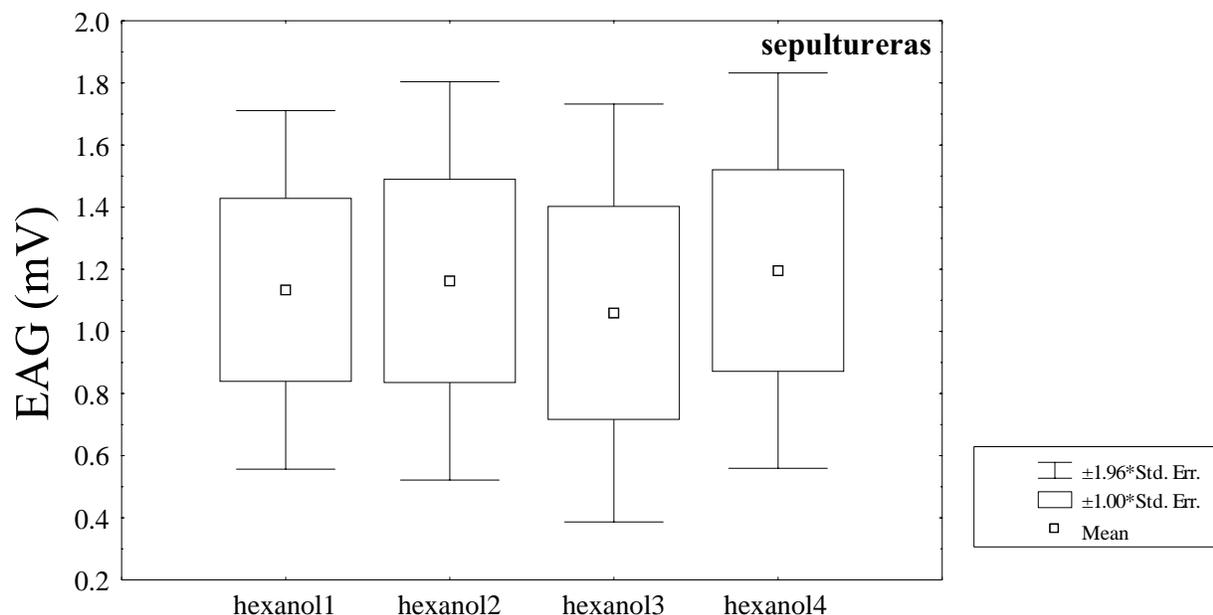


Figura 28. Respuestas promedio EAG al control de hexanol para sepultureras. No hay diferencias significativas entre las medias ($F = 0.032$; $df = 16$; $P = 0.99$).

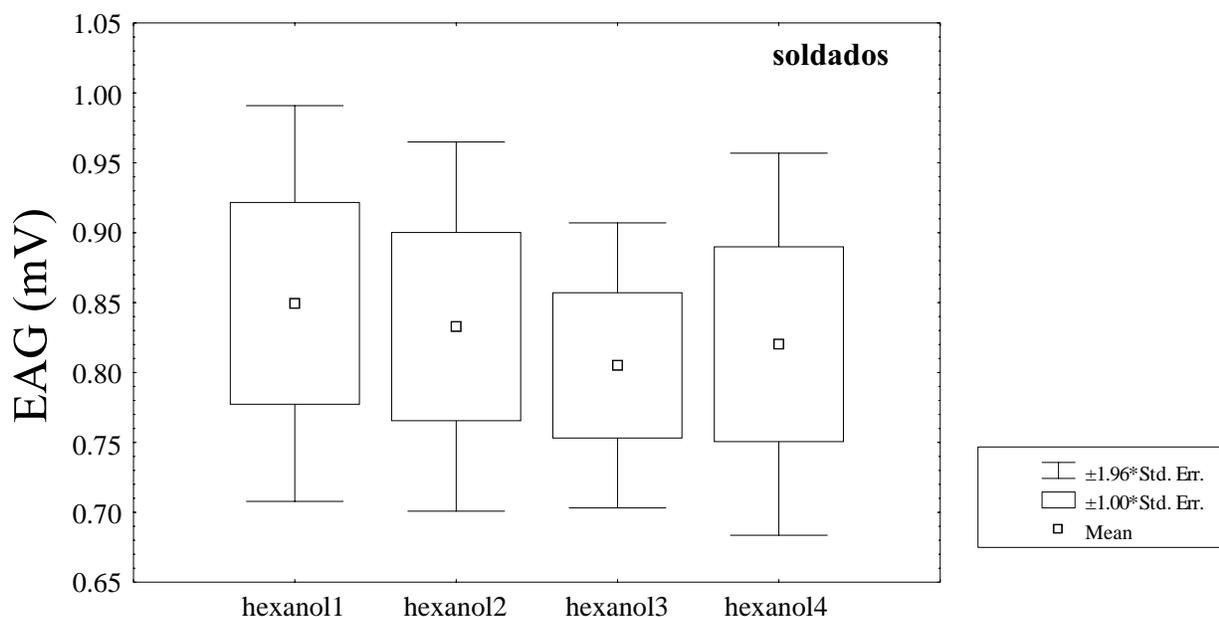


Figura 29. Respuestas promedio EAG al control de hexanol para soldados. No hay diferencias significativas entre las medias ($F = 0.081$; $df = 32$; $P = 0.97$).

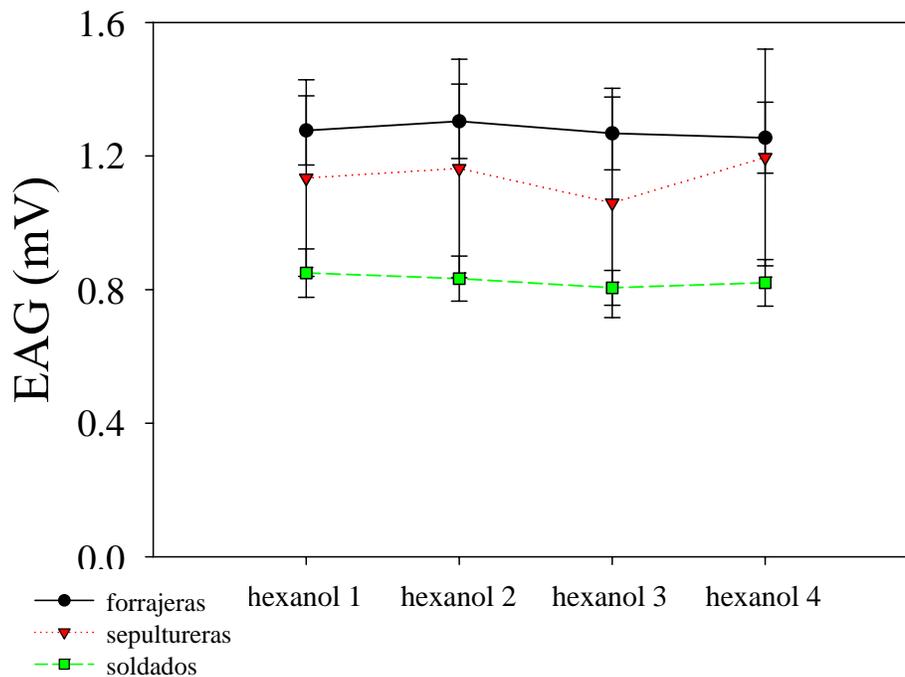


Figura 30. Respuestas promedio EAG a los controles de hexanol para todas las castas

3.2. Análisis de los datos del EAG

3.2.1. Obtención del valor de EAG quimiosensorial

El valor absoluto del EAG obtenido al estimular con el control fue sustraído de cada valor absoluto de EAG en respuesta a cada olor y concentración. El EAG en respuesta al estímulo control representa la respuesta de los mecanorreceptores a la presión adicional de aire introducida al flujo continuo de aire que llega a la antena. Como en todas las estimulaciones con los olores de prueba existe este componente mecanosensorial, es necesario restarlo del valor EAG ya que cada registro EAG obtenido contiene la suma de la respuesta mecánica y la quimiosensorial (Visscher et al., 1995). Así, a cada valor EAG de una corrida se le restó el valor de la respuesta EAG control (figura 31).

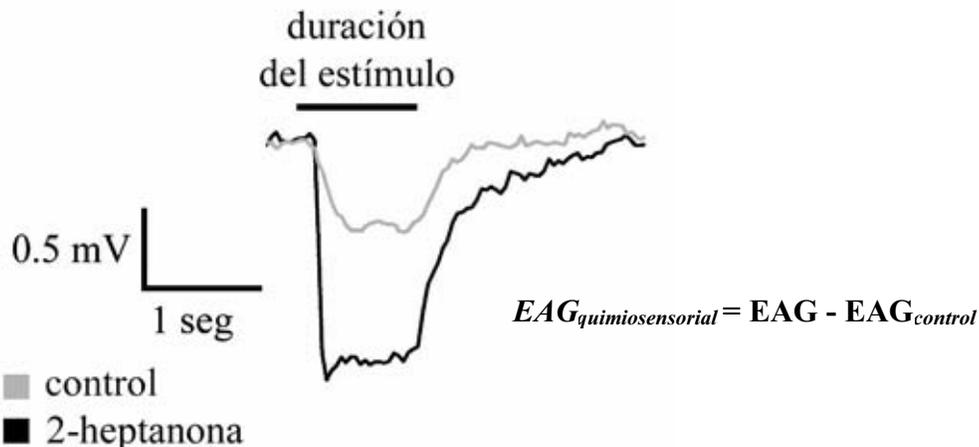


Figura 31. A cada registro de EAG en respuesta a los olores de prueba, se les sustrajo el valor de la respuesta EAG al estímulo control, la cual representa la respuesta mecanosensorial de la antena. Como puede apreciarse, la respuesta control puede representar una gran proporción de la respuesta EAG.

El valor $EAG_{quimiosensorial}$ representa la respuesta real de los quimiorreceptores antenales. Para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad), los datos de EAG fueron transformados elevándolos a la 0.58 potencia ($x^{0.58}$) cuando fue necesario. Los datos control o de respuesta mecanosensorial también fueron transformados para estabilizar varianzas ($x^{-1.206}$)

3.2.2. Análisis estadístico

Los análisis se realizaron con el paquete SPSS (Inc., Chicago, Illinois). Los datos de $EAG_{quimiosensorial}$ fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías con todos los valores fijos, asumiendo un diseño factorial con tres factores (casta, olor y dosis) y diferentes niveles, seguido de una prueba de *Tukey* para comparaciones múltiples:

- a) casta (factor cualitativo) = 3 niveles
 - i. forrajeras
 - ii. sepultureras
 - iii. soldados
- b) olor (factor cualitativo) = 3 niveles
 - i. 2-heptanona
 - ii. ácido oleico
 - iii. esencia de rosas
- c) dosis (factor cuantitativo) = 4 niveles
 - i. 0.005 μg
 - ii. 0.02 μg
 - iii. 0.06 μg
 - iv. 0.5 μg

Los datos se organizaron en una base de datos de la siguiente forma:

	Olor 1: 2-heptanona				Olor 2: Acido oleico				Olor 3: Esencia de flores			
CASTA	Dosis 1: 0.005 μg	Dosis 2: 0.02 μg	Dosis 3: 0.06 μg	Dosis 4: 0.5 μg	Dosis 1: 0.005 μg	Dosis 2: 0.02 μg	Dosis 3: 0.06 μg	Dosis 4: 0.5 μg	Dosis 1: 0.005 μg	Dosis 2: 0.02 μg	Dosis 3: 0.06 μg	Dosis 4: 0.5 μg
Forrajeras												
1	X_{1111}	X_{1112}	X_{1113}	X_{1114}	X_{1121}	X_{1122}	X_{1123}	X_{1124}	X_{1131}	X_{1132}	X_{1133}	X_{1134}
2	X_{2111}	X_{2112}	X_{2113}	X_{2114}	X_{2121}	X_{2122}	X_{2123}	X_{2124}	X_{2131}	X_{2132}	X_{2133}	X_{2134}
...	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}
Sepultureras												
1	X_{1211}	X_{1212}	X_{1213}	X_{1214}	X_{1221}	X_{1222}	X_{1223}	X_{1224}	X_{1231}	X_{1232}	X_{1233}	X_{1234}
2	X_{2211}	X_{2212}	X_{2213}	X_{2214}	X_{2221}	X_{2222}	X_{2223}	X_{2224}	X_{2231}	X_{2232}	X_{2233}	X_{2234}
...	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}
Soldados												
1	X_{1311}	X_{1312}	X_{1313}	X_{1314}	X_{1321}	X_{1322}	X_{1323}	X_{1324}	X_{1331}	X_{1332}	X_{1333}	X_{1334}
2	X_{2311}	X_{2312}	X_{2313}	X_{2314}	X_{2321}	X_{2322}	X_{2323}	X_{2324}	X_{2331}	X_{2332}	X_{2333}	X_{2334}
...	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}	X_{nabc}

Para cada olor se construyeron curvas dosis-respuesta, y un análisis de regresión fue empleado para obtener un despliegue visual. Además, se realizó un análisis estadístico adicional para probar

diferencias estadísticamente significantes entre coeficientes de correlación. En este análisis, el coeficiente de correlación (r) fue transformado a un valor z de Fisher, con lo que, posteriormente, se calculó el valor de X^2 -cuadrada. Cuando se detectaron diferencias significativas por medio de *ji-cuadrada*, se obtuvo un valor de q en una prueba de Tukey para comparaciones múltiples, lo cual determina las diferencias entre coeficientes de correlación (Zar, 1999).

Para comparar los coeficientes de correlación de la relación dosis-respuesta EAG de los estudios electrofisiológicos se siguió el procedimiento descrito en Zar (1999). A continuación se describe brevemente. Si k muestras se han obtenido y se ha calculado una r para cada una de ellas, el objetivo de la comparación entre coeficientes de correlación es concluir si las muestras provienen de poblaciones que tienen idénticos ρ 's, es decir, si $H_0: \rho_1 = \rho_2 = \rho_3 = \dots = \rho_k$ no se rechaza, entonces todas las muestras deben combinarse y debe calcularse un valor de r para estimar el ρ poblacional. Para probar esta hipótesis, cada valor de r debe ser transformado a un valor z de Fisher.

Entonces, el valor de *ji-cuadrada* con $k - 1$ grados de libertad será:

$$X^2 = \sum(n_i - 3)z_i^2 - \frac{[\sum(n_i - 3)z_i]^2}{\sum(n_i - 3)}$$

Para transformar cada r en un valor z , se realiza el siguiente cálculo:

$$z = 0.5 \ln \left(\frac{1 + r}{1 - r} \right)$$

Si H_0 no se rechaza, entonces todos los coeficientes de correlación de las muestras k deben ser sumados y estimar un ρ de la población. Un r "común" puede ser obtenido a partir de la transformación del valor z :

$$z_w = \frac{\sum(n_i - 3)^2}{\sum(n_i - 3)}$$

A partir del valor z_w se calcula la r común ó r_w de la siguiente manera:

$$r_w = \frac{e^{2z} - 1}{e^{2z} + 1}$$

Por el contrario, si H_0 se rechaza, se determina cuáles de los k coeficientes de correlación son diferentes de los otros. Esto se realiza usando otra vez la transformación z de Fisher, de manera que se prueba cada par de coeficientes de correlación, r_B y r_A , mediante la prueba de Tukey:

$$q = \frac{z_A - z_B}{SE}$$

en donde, si $n_A = n_B$:

$$SE = \sqrt{\frac{1}{n-3}}$$

Pero si $n_A \neq n_B$:

$$SE = \sqrt{1/2 \left[\frac{1}{n_A-3} + \frac{1}{n_B-3} \right]}$$

Si $q > q_{0.05, \infty, k}$, existe diferencia entre los coeficientes de correlación que se comparan, es decir, se rechaza $H_0: \rho_B = \rho_A$.

3.2.3. Fluctuaciones aleatorias y análisis complementarios

De acuerdo con el modelo lineal:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n \end{cases}$$

en donde y_{ij} es la (ij)ésima observación, μ es un parámetro común a los tratamientos o la media, τ_i es un parámetro único al i ésimo tratamiento llamado el efecto del tratamiento, y ε_{ij} es el componente de error aleatorio, dentro del cual tenemos los siguientes factores:

- Tamaño. Las castas tienen diferentes tamaños y diferentes tamaños antenales: hay una relación lineal entre el EAG y la longitud de la antena (Roelofs, 1984).
- Edad de las hormigas. No se conoce y aunque podría tener implicaciones en la respuesta EAG y conductual, todos los individuos sometidos al experimento fueron adultos (coloración oscura de la cutícula).
- Variaciones imperceptibles en el montaje experimental, por ejemplo la forma de los electrodos, la ubicación sobre la antena, etc.

Así, como el valor absoluto del EAG en mV podría variar entre las antenas debido a las fluctuaciones aleatorias mencionadas, además del análisis a los datos crudos, se realizaron análisis complementarios con los datos escalados, también llamados normalizados, para una conveniente comparación y para contrastar los análisis realizados con los datos crudos. Los análisis complementarios fueron los siguientes:

1. *Índice 1* = $EAG_{0.5} - EAG_{0.005}$, que representa el rango de los datos crudos: la diferencia entre la medida de EAG a mayor concentración y la de menor concentración para cada olor.

2. *Índice 2* = EAG/EAG_{\max} , *escalamiento o normalización*. Cada valor EAG de una corrida fue dividido entre el valor máximo de dicha corrida.
3. *Índices* $3_{EAG} = (EAG/EAG_{\max})_{0.5} - (EAG/EAG_{\max})_{0.005}$. Este índice representa el rango obtenido a partir de los datos normalizados.
4. Comparación entre coeficientes de correlación para datos normalizados.

3.2.3.1. Análisis complementarios I (Rango): Índice $I_{EAG} = EAG_{0.5} - EAG_{0.005}$

Se obtuvo el rango a partir de los datos crudos. Al valor de EAG de la dosis más alta para cada olor (0.5 µg) de cada corrida, se le sustrajo el valor de EAG para la dosis más baja del mismo olor (0.005 µg):

$$\text{Índice } I_{EAG} = EAG_{0.5} - EAG_{0.005}$$

Este rango indica la diferencia entre la respuesta EAG a la mayor concentración y la menor concentración de un olor, de manera que proporciona información acerca de la sensibilidad a los cambios en la concentración del estímulo. Los índices fueron transformados a la potencia 0.508 [$(\text{Índice } I_{EAG})^{0.508}$] para cumplir con los supuestos de homocedasticidad y así someterlos al ANOVA de 2 vías (factor 1: casta y factor 2: olor) y se organizaron en una base de datos como la siguiente:

CASTA	Olor 1: 2-heptanona	Olor 2: Acido oleico	Olor 3: Flores
Forrajeras			
1	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
2	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
...	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
Sepultureras			
1	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
2	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
...	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
Soldados			
1	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
2	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$
...	$EAG_{\text{hepta}_{0.5}} - EAG_{\text{hepta}_{0.005}}$	$EAG_{\text{goleico}_{0.5}} - EAG_{\text{goleico}_{0.005}}$	$EAG_{\text{flor}_{0.5}} - EAG_{\text{flor}_{0.005}}$

3.2.3.2. Análisis complementarios II: Escalamiento o normalización

La amplitud de las respuestas relativas a un estándar particular pueden ser altamente reproducibles con diferentes antenas (Roelofs, 1984). El valor estándar empleado en esta tesis fue el valor EAG máximo de cada corrida, por lo que cada valor de EAG de cada corrida fue dividido entre el valor de EAG de mayor amplitud de dicha corrida, obteniéndose el siguiente índice:

$$\text{Índice } 2_{EAG} = EAG/EAG_{\max}$$

Para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad), estos datos también fueron transformados elevándolos a la 0.58 potencia ($x^{0.58}$). Estos datos se sometieron a un análisis de ANOVA de 3 vías con los mismos factores y niveles. Los datos se organizaron en una base de datos de la siguiente manera:

	Olor 1: 2-heptanona				Olor 2: Acido oleico				Olor 3: Esencia de flores			
CASTA	Dosis 1: 0.005 µg	Dosis 2: 0.02 µg	Dosis 3: 0.06 µg	Dosis 4: 0.5 µg	Dosis 1: 0.005 µg	Dosis 2: 0.02 µg	Dosis 3: 0.06 µg	Dosis 4: 0.5 µg	Dosis 1: 0.005 µg	Dosis 2: 0.02 µg	Dosis 3: 0.06 µg	Dosis 4: 0.5 µg
Forrajeras												
1	EAG/EAG max111	EAG/EAG max112	EAG/EAG max113	EAG/EAG max114	EAG/EAG max121	EAG/EAG max122	EAG/EAG max123	EAG/EAG max124	EAG/EAG max131	EAG/EAG max132	EAG/EAG max133	EAG/EAG max134
2	EAG/EAG max211	EAG/EAG max212	EAG/EAG max213	EAG/EAG max214	EAG/EAG max221	EAG/EAG max222	EAG/EAG max223	EAG/EAG max224	EAG/EAG max231	EAG/EAG max232	EAG/EAG max233	EAG/EAG max234
...	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc
Sepultureras												
1	EAG/EAG max1211	EAG/EAG max1212	EAG/EAG max1213	EAG/EAG max1214	EAG/EAG max1221	EAG/EA Gmax1222	EAG/EA Gmax1223	EAG/EAG max1224	EAG/EAGm α1231	EAG/EAG max1232	EAG/EAG max1233	EAG/EAG max1234
2	EAG/EAG max2211	EAG/EAG max2212	EAG/EAG max2213	EAG/EAG max2214	EAG/EAG max2221	EAG/EA Gmax2222	EAG/EA Gmax2223	EAG/EAG max2224	EAG/EAGm α2231	EAG/EAG max2232	EAG/EAG max2233	EAG/EAG max2234
...	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EA Gmaxnabc	EAG/EA Gmaxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAGm αnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc
Soldados												
1	EAG/EAG max1311	EAG/EAG max1312	EAG/EAG max1313	EAG/EAG max1314	EAG/EAG max1321	EAG/EA Gmax1322	EAG/EA Gmax1323	EAG/EAG max1324	EAG/EAGm α1331	EAG/EAG max1332	EAG/EAG max1333	EAG/EAG max1334
2	EAG/EAG max2311	EAG/EAG max2312	EAG/EAG max2313	EAG/EAG max2314	EAG/EAG max2321	EAG/EA Gmax2322	EAG/EA Gmax2323	EAG/EAG max2324	EAG/EAGm α2331	EAG/EAG max2332	EAG/EAG max2333	EAG/EAG max2334
...	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EA Gmaxnabc	EAG/EA Gmaxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAGm αnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc	EAG/EAG maxnabc

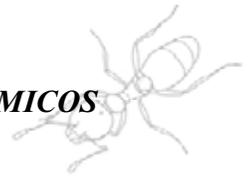
3.2.3.3. Análisis complementarios III (Rango): Índice 3

Finalmente, se realizó un último análisis a partir de la obtención de un tercer índice que representa el rango a partir de los datos normalizados:

$$\text{Índices } 3_{EAG} = (EAG/EAG_{\max})_{0.5} - (EAG/EAG_{\max})_{0.005}$$

CASTA	Olor 1: 2-heptanona	Olor 2: Acido oleico	Olor 3: Flores
Forrajeras			
1	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
2	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
...	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
Sepultureras			
1	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
2	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
...	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
Soldados			
1	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
2	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}
...	Índice3EAG _{2-heptanona}	Índice3EAG _{oleico}	Índice3EAG _{flores}

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES III: EXPERIMENTOS NEUROANATOMICOS



4.1. Estructura de los lóbulos antenales (LA)

El arreglo espacial de los glomérulos en el LA es altamente estereotipado en cada especie de insecto además de que la posición es lo suficientemente invariante como para realizar estudios comparativos. En *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta* y *Apis mellifera*, los glomérulos se han contado y mapeado, permitiendo identificar cada glomérulo y realizar estudios comparativos y funcionales (Galizia et al, 1999a). Los glomérulos primarios pueden identificarse basándose en su forma, tamaño y posición relativa a marcas estereotipadas del LA como tractos mayores, mientras que los glomérulos secundarios se identifican en relación según su posición relativa a los glomérulos primarios (Rospars & Hildebrand, 1992).

Para hacer visibles los glomérulos en el microscopio confocal, se realizó un trazado masivo desde el nervio antenal (NA). El propósito del trazado neuronal es la descripción de las conexiones anatómicas del sistema nervioso. El trazado neuronal puede ser realizado por medio de una gran variedad de técnicas. En esta tesis se realizó el trazado neuronal *in vivo* con neurobiotina. La neurobiotina o biocitina es una vitamina que actúa como componente de enzimas específicas que catalizan carboxilaciones. La neurobiotina puede ser usada como un trazador anterógrado y retrógrado por microinyección o por medio de la colocación de cristales sobre neuronas en las que se ha realizado algún daño. Debido a su pequeño tamaño y bajo peso molecular (PM = 286), la neurobiotina es transportada efectiva y rápidamente en el medio intracelular. Para revelar su localización intraneural después del trazado, las preparaciones se tratan con avidina, una glicoproteína que se presenta en abundancia en la clara de huevo, o estreptavidina, producida por *Streptomyces avidinii*. La neurobiotina tiene una alta afinidad por la avidina y la unión resultante es altamente resistente debido a la formación de enlaces covalentes. Se ha sugerido que la presencia de avidina en el huevo funciona como un antibiótico que termina con la presencia de biotina en el ambiente (Metzler, 2001). La avidina empelada para revelar la localización intraneural de la neurobiotina estuvo conjugada con rojo Texas o fluoresceína, colorantes fluorescentes.

Se utilizaron soldados (obreras *mayor*) de *A. mexicana* y *C. ocreatus* para determinar la estructura del LA. Se intentó el trazado con castas de tamaños menores, pero debido al procedimiento quirúrgico y al tamaño de las antenas, los NA sufrieron daños que impidieron que el trazado tuviera éxito, por lo que para este trabajo sólo se reportan datos para las castas *mayor*. La reconstrucción se realizó a partir de secciones ópticas adquiridas con microscopía confocal. Los individuos se inmovilizaron en cera al igual que las antenas (figura 32). La inmovilización de las antenas debe ser realizada con sumo cuidado ya que el NA puede ser dañado impidiendo el trazado neuronal.

A continuación se expuso la parte del NA que corre dentro del escapo (en este punto todos los axones de las neuronas olfativas se encuentran juntos). Con cortes de capas delgadas de cutícula es posible exponer el NA sin causar daño. De esta manera, puede obtenerse un excelente trazado masivo con lo que los glomérulos captan una gran cantidad del trazador. En la fotografía pueden observarse los dos nervios que conforman el NA (figura 33).

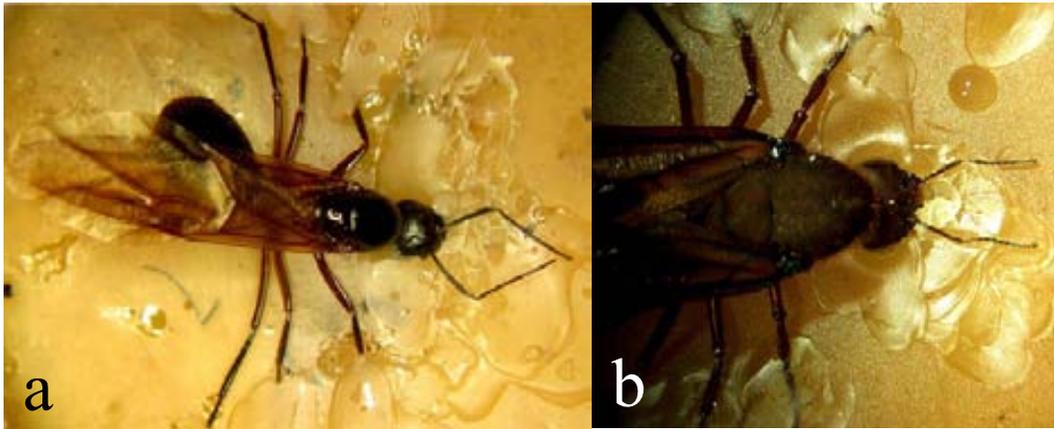


Figura 32. a) Inmovilización de una hormiga reina *Camponotus ocreatus* en cera. b) Inmovilización de una reina *Atta mexicana*.

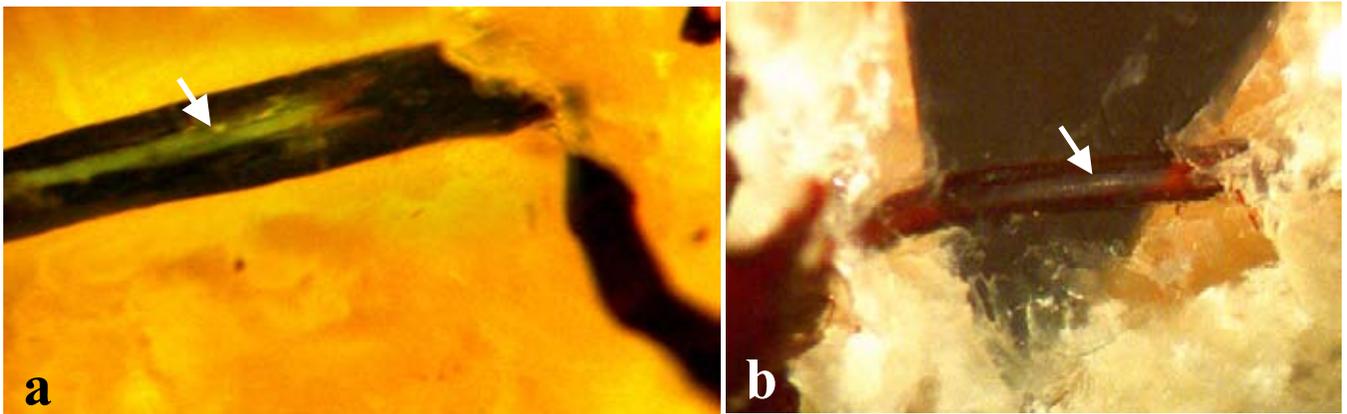


Figura 33. Con cortes de capas delgadas de cutícula es posible exponer el NA sin causar daño. De esta manera, puede obtenerse un excelente trazado masivo con lo que los glomérulos captan una gran cantidad del trazador. (a) Antena de *C. ocreatus* y (b) antena de *A. mexicana*, en donde pueden observarse los dos nervios que conforman el NA (flecha).

Una vez expuesto el NA, se colocaron algunos cristales de neurobiotina y se rompió el NA, después de lo cual, la antena se cubrió con vaselina o silicón para evitar la desecación. Los insectos se dejaron entre 12 y 24 horas en incubación en cámaras húmedas a temperatura ambiente (del laboratorio).

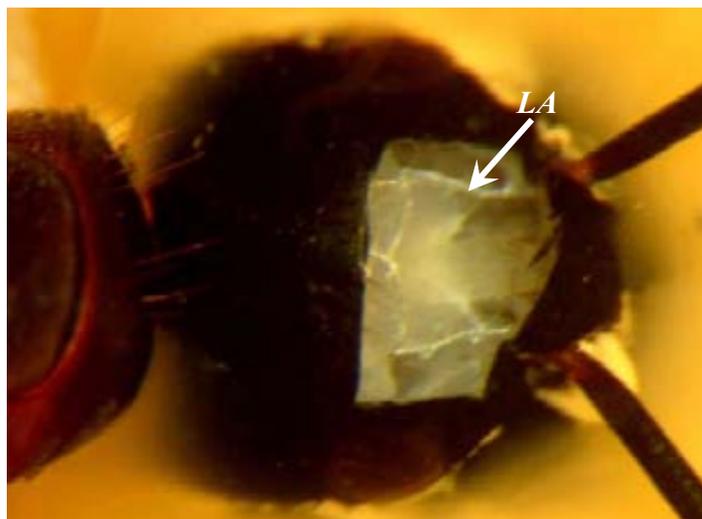


Figura 34. Para obtener el cerebro, después de un período de incubación en el que se permite que el trazador viaje desde el sitio de colocación (el NA), se abre una ventana en la cápsula cefálica, se remueven las glándulas y tráqueas y se baña en formaldehído 4% y, después de 15 minutos, se saca el cerebro completamente.

Después del tiempo de incubación, los cerebros fueron disecados: se abrió una pequeña ventana en la cápsula cefálica (figura 34), se retiró tanto como se pudo las tráqueas y glándulas y se inyectó formaldehído al 4% dentro de la cápsula cefálica. Esta fijación *in situ* se realizó para reducir la distorsión del cerebro que puede ocurrir al sacar el cerebro sin fijación previa. Después de 15 minutos de prefijación *in situ*, el cerebro fue retirado y transferido a viales con formaldehído 4% donde permanecieron por 2 horas más en fijación. A continuación, los cerebros se lavaron: en Buffer de fosfatos 4 veces de 30 minutos cada una; agua destilada, 2 de 15 minutos; dimetoxipropano (10 minutos); alcohol etílico 50% (10 mins); agua destilada (10 mins); buffer (20 mins); 15-30 mins en solución digestiva (1 mg/ml hialuronidasa, 1 mg/ml colagenasa, 0.1 % triton en solución de buffer de fosfatos) para eliminar lamela y perineuron y permitir que los reveladores lleguen más fácilmente al cerebro.

Después de la solución digestiva, los cerebros se pasaron nuevamente a Buffer (2-3 veces, 30 mins cada una) y después a solución de avidina conjugada con rojo Texas en buffer de fosfatos (concentración 0.0025% del conjugado) con 0.5% de triton-X. Los cerebros fueron dejados incubando en esta solución con el conjugado toda la noche (12 horas aproximadamente). Posteriormente se lavaron nuevamente: con buffer de fosfatos 4 veces de 30 minutos cada uno; agua destilada (2 de 15 mins); dimetoxipropano (10 mins). Estos cerebros se montaron en portaobjetos cóncavos en salicilato de metilo y cubiertos con cubreobjetos. A partir de las preparaciones de cerebro completo se realizan las secciones ópticas en microscopio confocal (20X) a 2 μm . Las imágenes del confocal se procesaron en Adobe Photoshop para el mejoramiento de la imagen. Los contornos de cada glomérulo y tracto del NA se trazaron y los polígonos resultantes se procesaron nuevamente en Adobe Photoshop.

4.2. Contribuciones sensoriales a los cuerpos fungiformes

Las neuronas en los LA se marcaron anterógradamente usando trazadores fluorescentes para revelar las relaciones aferentes de los CF. El trazado anterógrado (marcando neuronas aferentes desde su región de origen a sus terminales en los cálices) se utilizó para determinar si las aferencias al cáliz están mapeadas topológicamente y si las aferencias olfatorias a la región del labio están segregadas en subcompartimientos.

Los experimentos de trazado se hicieron localmente aplicando diferentes fluorocromos a la región cerebral respectiva con microelectrodos capilares usando inyección pasiva. Los trazadores usados fueron pequeñas moléculas de dextrán (PM 3000-10000) acopladas a fluoresceína o Rojo Texas, las cuales han sido usadas exitosamente en cerebros de hormigas (Gronenberg 1999). Los dextranes son polisacáridos hidrofílicos producidos por la bacteria *Leuconostoc*, caracterizados por su alto peso molecular, buena solubilidad en agua, baja toxicidad, además de ser relativamente inertes. Estas propiedades hacen de los dextranes efectivos acarreadores de colorantes solubles en agua. Además, son resistentes a la ruptura intracelular por glucosidasas endógenas. Los dextranes pueden ser utilizados por microinyección, fusión vesicular, electroporación, así como por la incorporación de materiales externos por fagocitosis y endocitosis o como cristales colocados en sitios específicos. Estos cristales son incorporados por neuronas en las que se ha practicado algún grado de daño. Inmediatamente después de

su incorporación, los dextrans son transportados principalmente en dirección anterógrada, aunque también de manera retrógrada. En esta tesis se emplearon dextrans de peso molecular de 3000, los cuales se transportan intracelularmente más rápido que aquellos con pesos moleculares más altos. Los fluorocromos conjugados a los dextrans fueron rojo Texas con una absorbancia máxima en 595 nm y una emisión máxima en 625 nm, y fluoresceína con una absorbancia máxima en 494 nm y una emisión máxima en 521 nm.

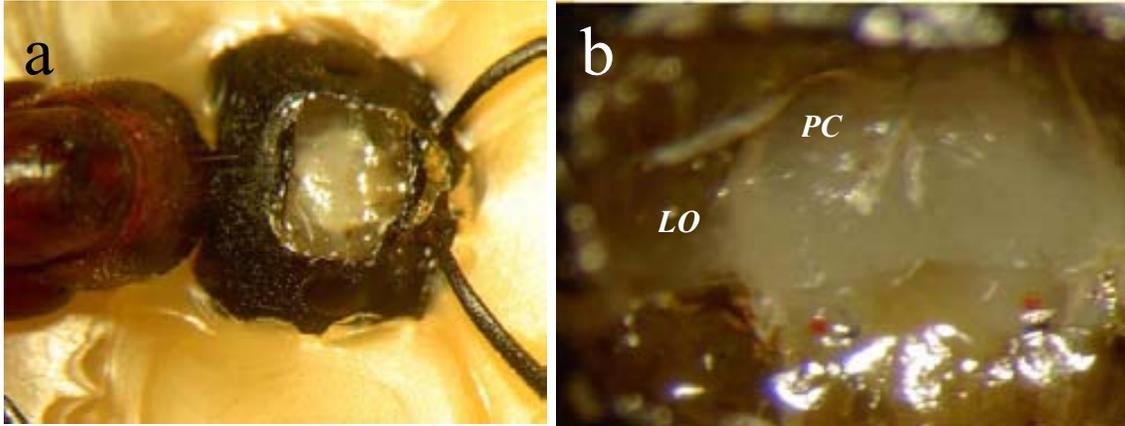


Figura 35. Después de haber eliminado el exceso de hemolinfa (a), se inserta el electrodo con el colorante en los LA (b). *LO*, lóbulo óptico; *PC*, protocerebro.

Para preparaciones permanentes con alta resolución de detalle fino, la neurobiotina se aplicó de la misma forma que los trazadores fluorescentes. Después de fijar e inmovilizar a la hormiga, se abrió una pequeña ventana en la cápsula cefálica de manera que el cerebro quedara expuesto, principalmente en la región de los LA. Posteriormente se procedió a secar con papel la hemolinfa que baña al cerebro para evitar que los colorantes se disolvieran en la hemolinfa antes de llegar al LA. Una vez seco el cerebro, se cargo un microelectrodo con uno de los colorantes y se inserto la punta del electrodo con el colorante en el LA (figura 35). Lo mismo se hizo con el otro colorante. Después de esto, se colocó el trozo de cutícula cortada previamente para evitar desecación del cerebro. Las hormigas se colocaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente (de laboratorio) y se dejaron incubar por 12-24 horas. Después, los cerebros fueron disecados, fijados en formaldehído, incluidos en plástico y seccionados a 15-20 μm y observados por medio de microscopía epifluorescente.

Los cerebros marcados con Neurobiotina o marcadores fluorescentes se procesaron de acuerdo a Gronenberg & Peeters (1993) y Gronenberg (1999): fijación en aldehído, uso del kit vectorstain ABC para cerebros marcados con Neurobiotina, embebido en plástico, seccionado en serie (15-20 μm), microscopía epifluorescente para marcadores fluorescentes. Para detalles, ver párrafos anteriores.

Debido al daño neuronal que se practica en el tejido para que los trazadores (neurobiotina o dextrans) sean incorporados, existe un estrecho balance en el tiempo de incubación del trazado y la sobrevivencia de la proyección neural. Si el tiempo de incubación es demasiado corto, los trazadores podrían no haber alcanzado las terminales nerviosas, pero si el tiempo es demasiado largo, las proyecciones neurales podrían haber degenerado y el trazado podría perderse.

VII. RESULTADOS

1· RESULTADOS I: ANALISIS QUIMICO Y BIOENSAYOS



1.1. Liberador químico y especialización conductual de la necroforesis en *Atta mexicana*

1.1.1. Descripción del comportamiento necroforético.

A partir de la introducción de cadáveres de hormigas muertas en el nido, se observó y videograbó el comportamiento necroforético, el cual se describe a continuación. El comportamiento en *Atta mexicana* consta de las siguientes pautas conductuales (figura 36):

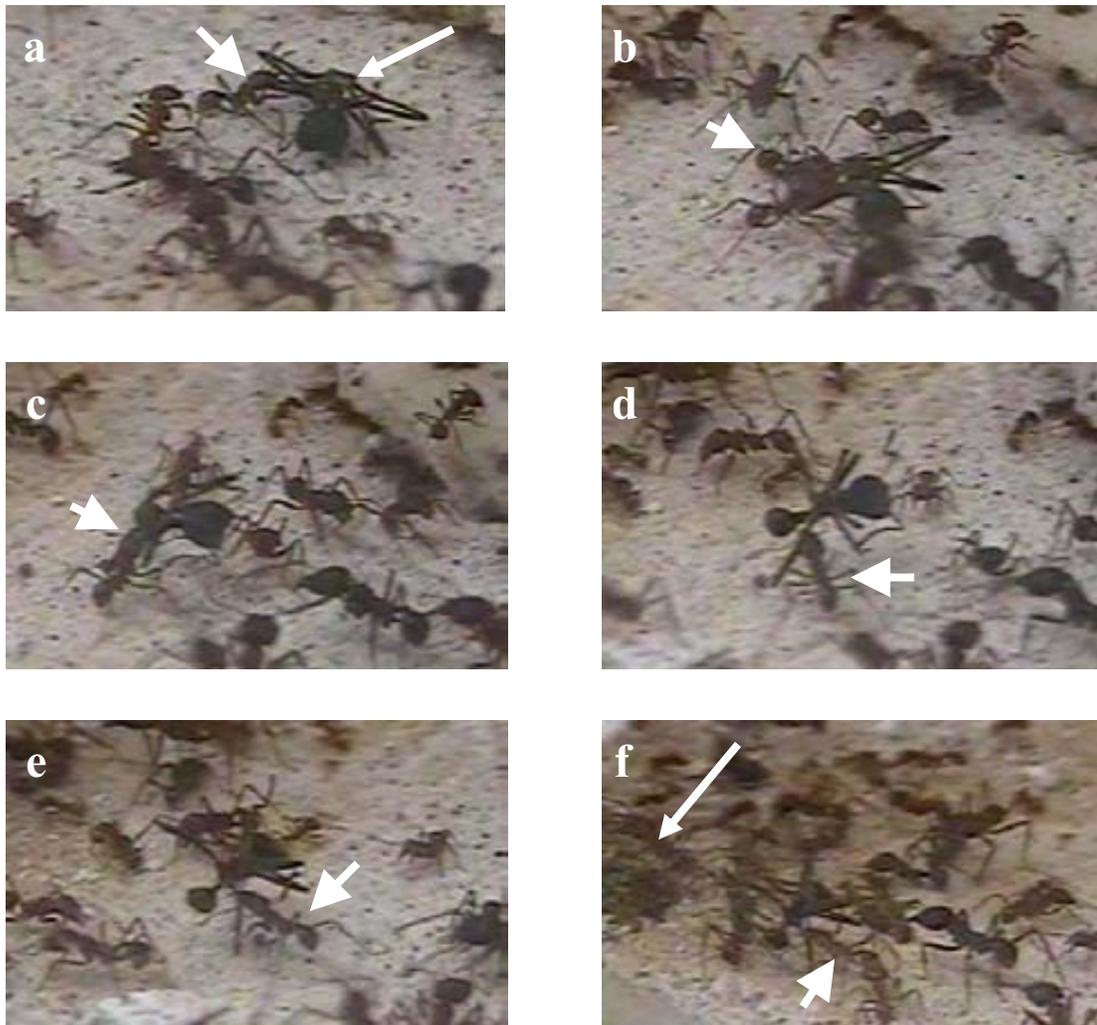


Figura 36. Secuencia de etapas del comportamiento necroforético. En (a) la flecha larga indica el cadáver introducido en el nido; hacia la izquierda del cadáver, se observa la obrera sepulturera, indicada con la flecha de cabeza grande en todas las imágenes. La flecha larga en (f) indica la pila interna de desperdicios. Imágenes tomadas de un video. Ver texto.

- 1) Aproximación. La obrera se acerca lentamente al cadáver con las antenas extendidas hacia adelante.
- 2) Contacto y antenación. En esta fase, las obreras realizan antenaciones sobre el cadáver y lo examinan. Después de un período de exploración, el cual puede variar en duración, las obreras pueden extender sus lenguas sobre el cadáver y pueden o no subirse sobre él.

- 3) Sujeción y levantamiento del cadáver con las mandíbulas. En esta fase, las obreras buscan una parte del cadáver por el cual levantarlo. Esta parte corporal de los cadáveres puede ser la cabeza, las patas, el pecíolo, las mandíbulas, la cabeza, etc.
- 4) Acarreo del cadáver hacia la pila de desperdicios. En esta fase, las hormigas, llevando el cadáver en las mandíbulas, comienzan su marcha hacia la pila de desperdicios con la cabeza levantada y las antenas hacia los lados y realizando antenaciones sobre el suelo y el ambiente. Esta marcha puede durar desde unos segundos en las obreras más especializadas, hasta más de 60 minutos. Las obreras siempre siguen la misma ruta hacia la pila de desperdicios y cuando esta última es cambiada de sitio, las sepultureras cambian de ruta con facilidad. En ocasiones, las sepultureras son seguidas por grupos de otras obreras.
- 5) Abandono del cadáver. Cuando las sepultureras han llegado a la salida del nido o al basurero, estas pueden, simplemente soltar el cadáver o bien acomodarlo en la pila de desperdicios, proceso que puede llevarles varios minutos.

No obstante que Howard & Tschinkel (1976) mencionan que no ocurre orientación de las obreras de *Solenopsis saevissima* hacia los cadáveres antes del contacto con ellos, en este trabajo se observó que las obreras de *Atta mexicana* se orientan hacia los cadáveres antes de hacer contacto con ellos (figura 37). Las hormigas muestran un comportamiento similar hacia los trozos de papel filtro con extracto de cadáveres y a aquellos con ácido oleico (ver más adelante). Después del primer contacto, las hormigas no dejan de tocar los cadáveres hasta que comienza su marcha hacia la pila de desperdicios.

1.1.2. Identificación de sepultureras especializadas

En las 30 observaciones realizadas, sólo 12 hormigas (el 0.6%) de las 2000 aproximadamente, realizaron el comportamiento necroforético completo al menos una vez.

Tabla 2. Obreras que realizaron la necroforesis

Hormiga	Código de color	No. ocasiones	Porcentaje del total de observaciones
1	Amarillo-rojo	1	3.33
2	Amarillo-azul	15	50
3	Amarillo-verde	2	6.67
4	Amarillo-blanco	1	3.33
5	Blanco	1	3.33
6	Rojo	2	6.67
7	Blanco-azul	1	3.33
8	Rojo-blanco	1	3.33
9	Blanco-rojo	2	6.67
10	Blanco-verde	2	6.67
11	Azul	1	3.33
12	Verde	1	3.33

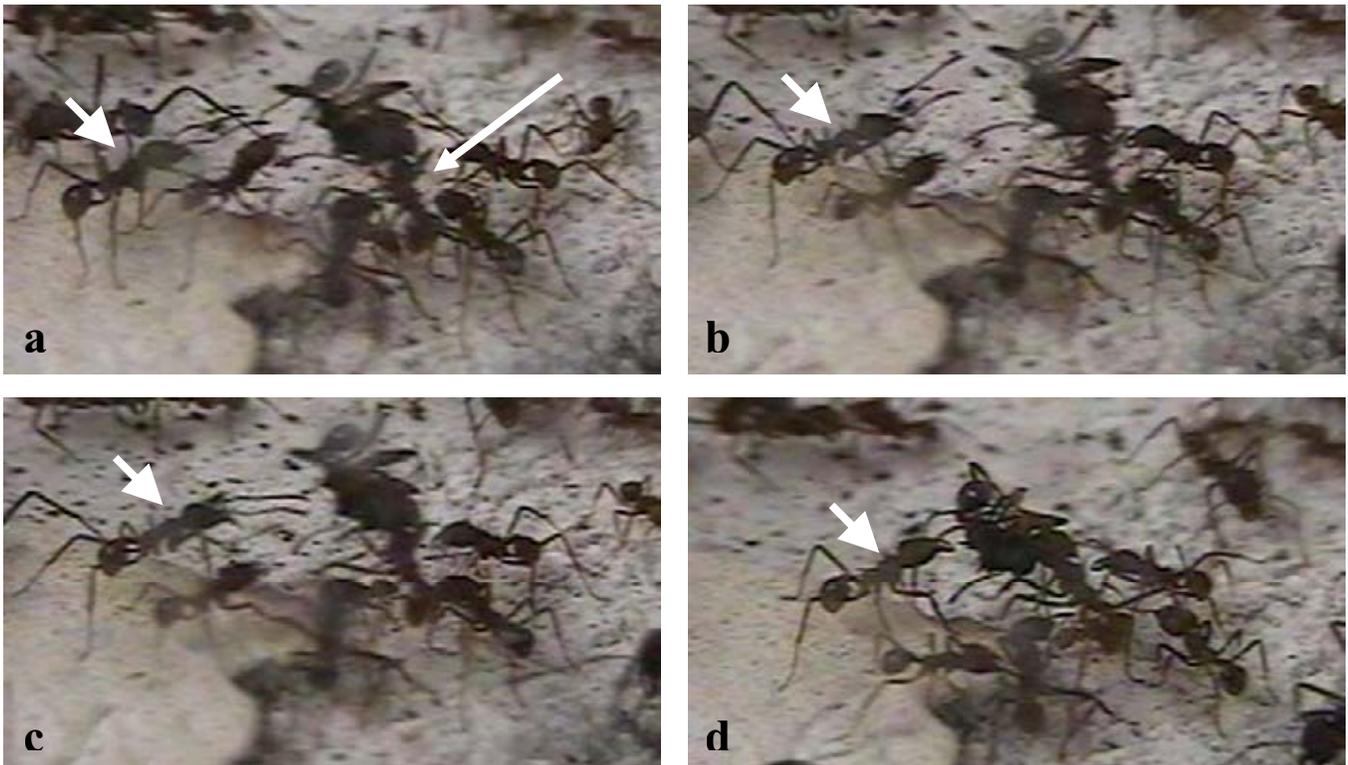


Figura 37. Secuencia de imágenes tomadas a partir de una videograbación del comportamiento necroforético. La flecha grande en (a) indica la hormiga sepulturera. La flecha pequeña de cabeza ancha en todas las imágenes indica otra hormiga que se aproxima al cadáver que transporta la sepulturera. Como puede observarse, esta hormiga que se aproxima lleva las antenas extendidas y orientadas hacia el cadáver. Incluso desde mucho antes de aparecer en cuadro, esta hormiga llevaba sus antenas extendidas. En (a), la hormiga que se aproxima realiza antenaciones direccionadas hacia el cadáver. En (b) y (c), la hormiga aun realiza antenaciones sin hacer contacto con el cadáver. Finalmente, en (d), se observa que la hormiga hace contacto físico con el cadáver. El comportamiento de las sepultureras al aproximarse al cadáver es similar: orientan sus antenas hacia el cadáver, se aproximan a él y finalmente hacen contacto, después de lo cual, levantan el cadáver y lo transportan hacia la pila de desperdicios. Un comportamiento similar fue realizado por las sepultureras hacia papeles filtro con ácido oleico.

De estas, la obrera marcada con el código de color *amarillo-azul*, realizó en 15 ocasiones el comportamiento completo, es decir, la mitad de las veces que se realizó la prueba (tabla 2). El resto de las ejecuciones está repartido entre las otras 11 obreras, de las cuales, cuatro obreras: *amarillo-verde*, *rojo*, *blanco-rojo* y *blanco-verde* lo realizaron en 2 ocasiones. De las 12 hormigas, cinco de ellas (el 0.25%) lo realizaron dos o más ocasiones, y 7 (0.35%) lo realizaron sólo una ocasión. De las cinco obreras que realizaron la necroforesis dos o más veces, cuatro (el 0.2%) lo realizaron dos veces, y una (el 0.05%) realizó el comportamiento 15 ocasiones; es decir que el 50% del total de observaciones efectuadas de este comportamiento fue realizado por un sólo individuo (la sepulturera *amarillo-azul*). Aquellas hormigas que realizaron más de dos veces la necroforesis, se dirigieron directo al basurero, depositaron el cadáver y de inmediato regresaron al interior del nido y comenzaron de nuevo a patrullar las cámaras y túneles. El resto de las hormigas presentes en la colonia no participaron ni realizaron el comportamiento necroforético, aun cuando muchas tuvieron la oportunidad de hacerlo.

En la gráfica de la figura 38, se muestra la distribución del comportamiento necroforético por obrera para todas las obreras observadas comparada con la distribución de Poisson que representa la distribución esperada del comportamiento si este fuese realizado al azar entre todas las obreras de la colonia. En la gráfica se observa que aquellas obreras que realizaron la necroforesis más de dos veces no se ajustan a la distribución probabilística de Poisson, por lo que, el criterio para identificar a las

sepultureras se basó en estos resultados. Así, las sepultureras se definieron operacionalmente como aquellas obreras que realizaron dos o más veces el comportamiento necroforético completo. Estas obreras son, además, las más rápidas en el desplazamiento dentro del nido y hacia la pila de desperdicios una vez que han encontrado y levantado un cadáver (figura 39).

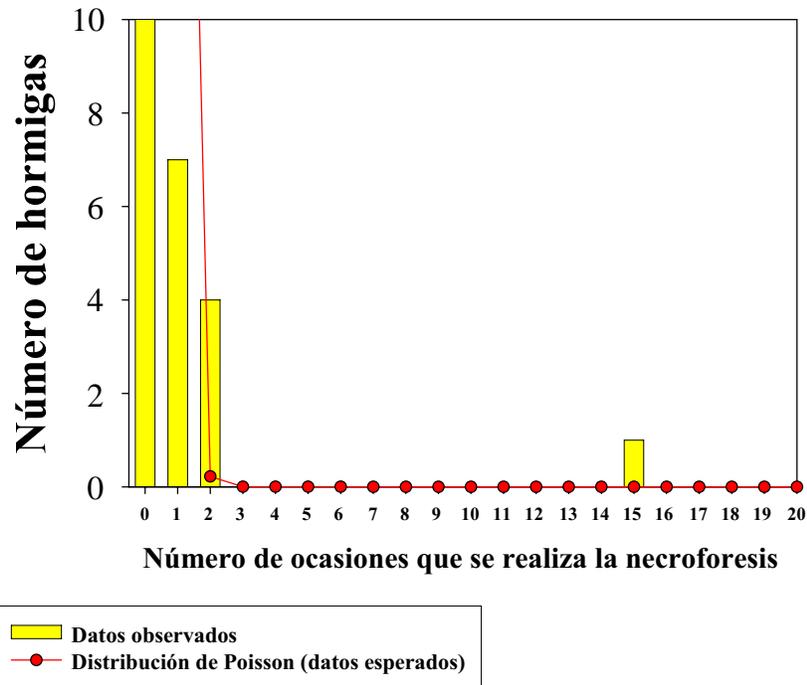


Figura 38. Distribución del comportamiento necroforético observado comparado con la curva probabilística de Poisson. Se observa que las obreras que realizaron más de dos veces el comportamiento necroforético salen de la distribución de Poisson que representa los eventos esperados si el comportamiento fuese realizado al azar.

Tabla 3. Promedios de latencia y duración de la necroforesis (en segundos)

	Obreras 1 vez		Obreras 2 veces		Obreras 15 veces	
	Promedio	Desv. Estándar	Promedio	Desv. Estándar	Promedio	Desv. Estándar
Latencia	665.71	663.32	297.75	266.15	559.33	871.68
Duración	470.57	380.60	106.87	28.73	131.66	60.75

En la figura 39 están graficadas las latencias y duración de la tarea entre las obreras que realizaron la necroforesis completa una vez, 2 veces y la obrera que la realizó 15 veces (tabla 3). Las obreras que realizaron la tarea una sola vez tienen la latencia y duración promedio más altas, mientras que las obreras que realizaron la tarea dos veces, las más bajas, y la obrera que realizó la necroforesis 15 veces tiene una latencia promedio similar a aquella de las obreras que realizaron la necroforesis una sola vez, pero con una duración promedio similar a la de las obreras que realizaron la necroforesis en dos ocasiones. Una vez definido el criterio para la identificación de sepultureras, para los experimentos electrofisiológicos se realizaron bioensayos introduciendo hormigas muertas en el nido y todas aquellas obreras que realizaron la necroforesis completa dos o más veces fueron sometidas al EAG.

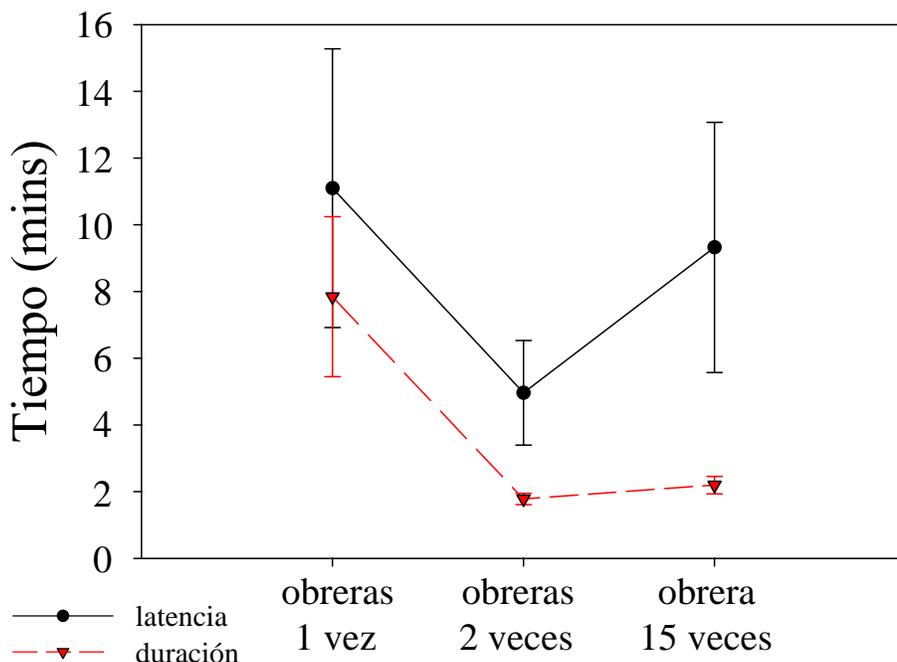


Figura 39. Gráfica de latencia y duración de las obreras que realizaron la necroforesis completa categorizadas en tres grupos: 1) las que la hicieron una vez (media de latencia = 11.09 ± 4.18 mins; media de duración = 7.84 ± 2.4 mins); 2) las que la hicieron 2 veces (media de latencia = 4.96 ± 1.57 mins; media de duración = 1.78 ± 0.17 mins), y 3) la que lo hizo 15 veces (media de latencia = 9.32 ± 3.75 mins; media de duración = 2.19 ± 0.26 mins).

1.1.3. Análisis de los extractos de hormigas muertas

La figura 40a muestra un cromatograma de gas de 100 ng de estándar de ácido oleico, y en la figura 40b un cromatograma de extracto de hormigas muertas. En (a) se observa un pico para el estándar de ácido oleico que eluye a los 17.2 minutos, y en (b), el cromatograma del extracto de cadáveres muestra un pico que aparece al mismo tiempo de retención que el del ácido oleico.

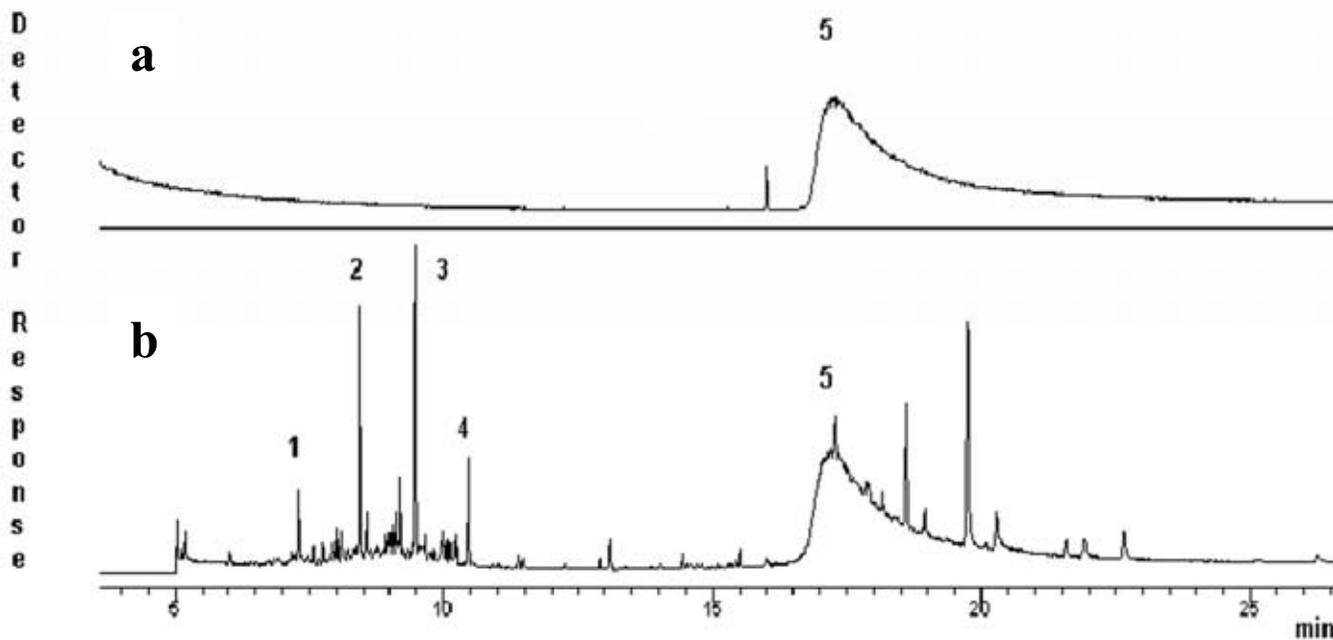


Figura 40. (a) Cromatograma de 100 ng μL^{-1} del estándar de ácido oleico. (b) Cromatograma de gas típico de extracto de cadáveres. Los picos 1, 2, 3 y 4 probablemente correspondan a compuestos hidrocarbonados de cutícula. El pico 5 eluye al mismo tiempo que el estándar de ácido oleico, sugiriendo que es ácido oleico.

Además de presentar ácido oleico (pico 5 en la figura 40b), el extracto presenta muchos hidrocarburos (los picos 1, 2, 3 y 4), los cuales parecen ser más volátiles ya que eluyen rápidamente. Es posible que estos hidrocarburos pudieran ser componentes volátiles de la cutícula, quizá implicados en el reconocimiento de compañeros de nido (olor de la colonia). Los resultados del análisis demuestran la presencia de ácido oleico en los extractos de cadáveres de las hormigas *Atta mexicana*, compuesto que otros autores encontraron en cadáveres de *Pogonomyrmex badius* y *Solenopsis invicta* (Wilson et al., 1958; Blum, 1970; Howard & Tschinkel, 1976), de manera que el ácido oleico debe estar involucrado en la identificación de los individuos muertos en diferentes especies de hormigas.

1.1.4. Resultados de los bioensayos conductuales con el extracto y el ácido oleico

En los bioensayos que se realizaron con los trozos de papel filtro con extracto de cadáveres y ácido oleico, se observó que las hormigas realizan las mismas pautas conductuales que cuando se encuentran un cadáver de hormiga. Sin embargo, la fase de sujeción y levantamiento del papel filtro con las mandíbulas presenta diferencias evidentes con la sujeción de un cadáver de hormiga ya que la forma del papel es muy diferente a la de una hormiga. Sin embargo, los trozos de papel filtro son más fácilmente sujetados y levantados que las hormigas, ya que las sepultureras realizan diferentes maniobras para acomodar el cadáver sobre sus cabezas. En los bioensayos, todos los trozos de papel filtro con el extracto de cadáveres que fueron introducidos en el nido, fueron transportados a la cámara de desperdicios, significando que el extracto es 100% efectivo liberando el comportamiento necroforético. Todos los controles (papeles filtro limpios) permanecieron dentro del nido (figura 41).

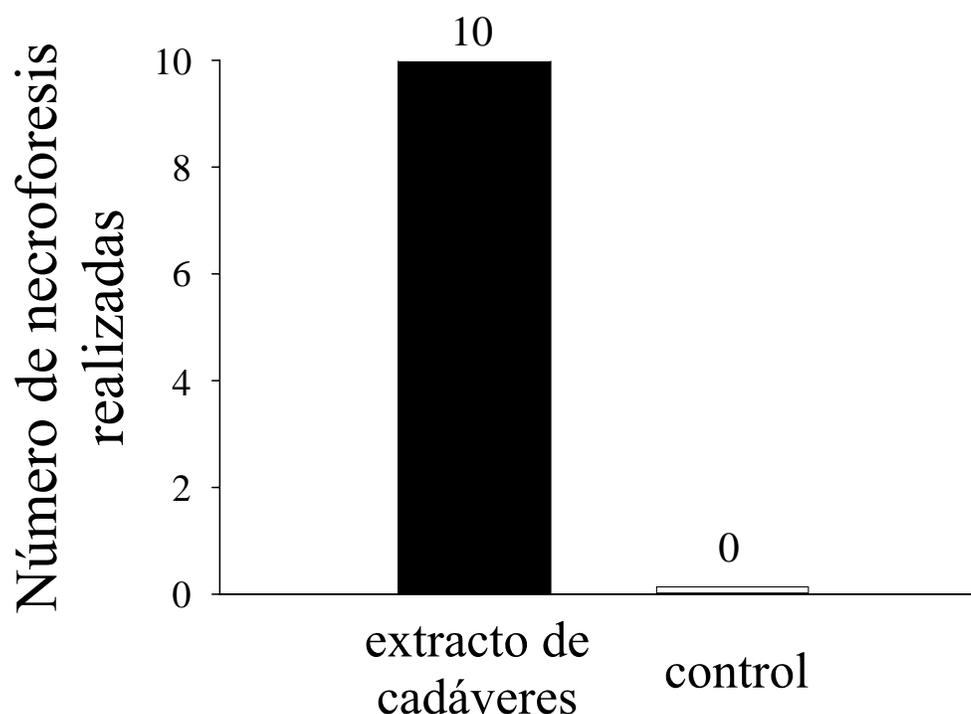


Figura 41. Número de veces que se observó el comportamiento necroforético al utilizar como estímulo papel filtro impregnado con extracto de cadáveres; como control se utilizó papel filtro con hexano.

Resultados similares fueron encontrados para los bioensayos en los que se introdujeron papeles filtro con ácido oleico (figura 42). Aunque sólo siete pruebas fueron positivas usando ácido oleico como estímulo, se encontraron diferencias significativas comparadas con sus controles ($X^2 = 7.9$; $P < 0.005$). Los controles (trozos de papel filtro tratados con hexano) no fueron transportados fuera del nido. Al final, horas después del tiempo de prueba aquellos papeles filtro con ácido oleico que no fueron sacados durante la prueba, finalmente fueron transportados también hacia la pila de desperdicios. Sin embargo, estos datos no fueron considerados por el límite de tiempo de cada prueba definido previamente en ensayos con cadáveres de hormigas. Por el contrario, todos los papeles filtro control permanecieron dentro del nido, e incluso fueron tratados como sustrato vegetal, incorporándolos al jardín de hongos.

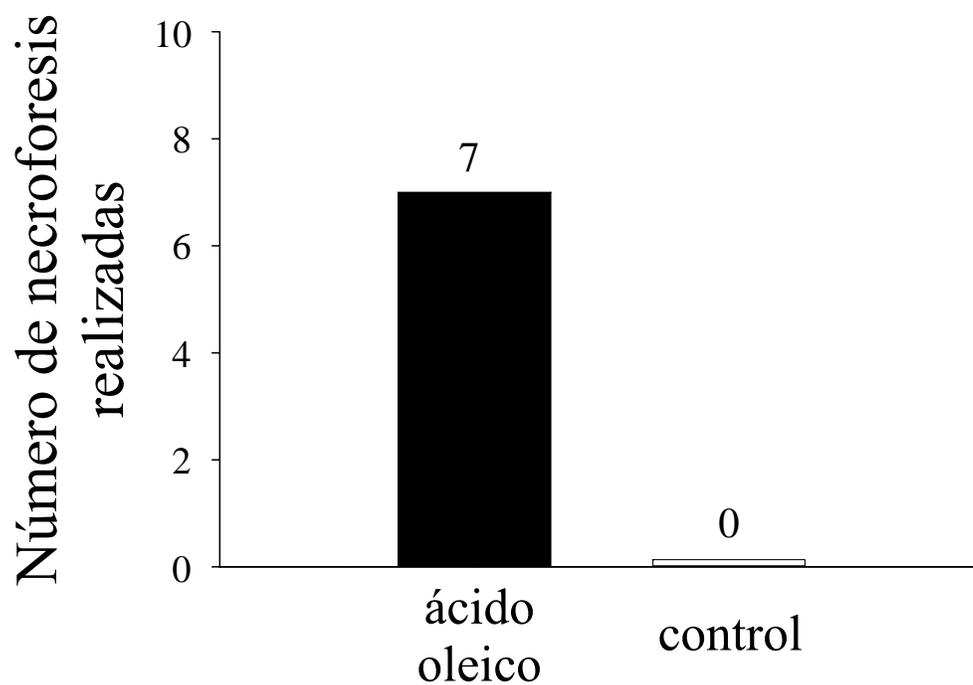


Figura 42. Número de veces que se observó el comportamiento necroforético al utilizar como estímulo papel filtro impregnado con ácido oleico; como control se utilizó papel filtro limpio.

La figura 43 muestra el tiempo en el que se completó la remoción de los papeles filtro con extracto de cadáveres y con ácido oleico. En la prueba de *t*-student no se encontraron diferencias significativas ($t = 0.553$; $P = 0.58$) entre el tiempo en el que se completa el transporte de los trozos de papel con ácido oleico y el tiempo de transporte de trozos de papel con extracto de cadáveres, por lo que puede considerarse los papeles con extracto de cadáveres y aquellos con ácido oleico se remueven en el mismo tiempo. Estos resultados demuestran que el ácido oleico libera el comportamiento necroforético en una forma similar a los extractos de cadáveres.

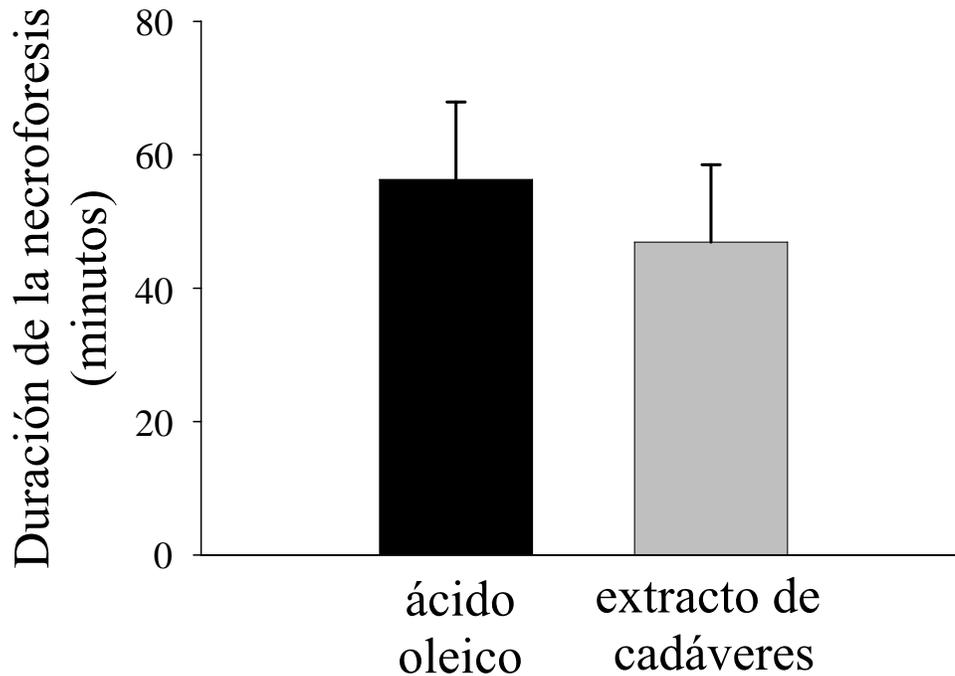


Figura 43. Tiempo en el que se completó la remoción del estímulo experimental (ácido oleico vs. extracto de cadáveres). Tiempo promedio de remoción para el ácido oleico = 56.2 ± 11.6 minutos; tiempo promedio de remoción para el extracto de cadáveres = 49.9 ± 11.6 minutos.

1.2. *Casta forrajeras*

Las forrajeras fueron identificadas mediante criterios conductuales. Las hormigas que se usaron para los protocolos experimentales de electrofisiología fueron aquellas a las que se les observó forrajeando más de 2 veces. Se utilizaron 18 forrajeras para los experimentos EAG.

1.3. *Casta soldados*

Como se mencionó antes, los soldados fueron identificados por su tamaño: obreras con ancho de cabeza > 3 mm (Wilson, 1980a,b). Se seleccionaron 9 soldados.

1.4. *Efectividad conductual de los olores*

1.4.1. *Acido oleico.* La figura 42 muestra las frecuencias observadas para el oleico y su control.

1.4.2. *2-heptanona.*

En los bioensayos en los que se empleó la 2-heptanona, se encontró que esta fue 100% efectiva al liberar el comportamiento agresivo: los insectos se levantan en sus patas, caminan con las mandíbulas abiertas y se dirigen contra cualquier objeto que se mueva a sus alrededores mordiéndolo de inmediato y si es la fuente de la 2-heptanona, lo muerden y difícilmente lo sueltan espontáneamente. Sólo después de transcurridos algunos minutos, los insectos responden menos al estímulo. Posiblemente ocurra un proceso de adaptación. La figura 44 muestra los resultados de respuesta conductual de los soldados a la 2-heptanona. Como puede observarse, las hormigas fueron agresivas al 100% de las pruebas. La dosis usada fue 1 μ L de 2-heptanona pura sobre papel filtro. Los trozos de papel filtro control fueron tratados como sustrato vegetal y transportados hacia el nido e incorporados como sustrato al jardín de hongos.

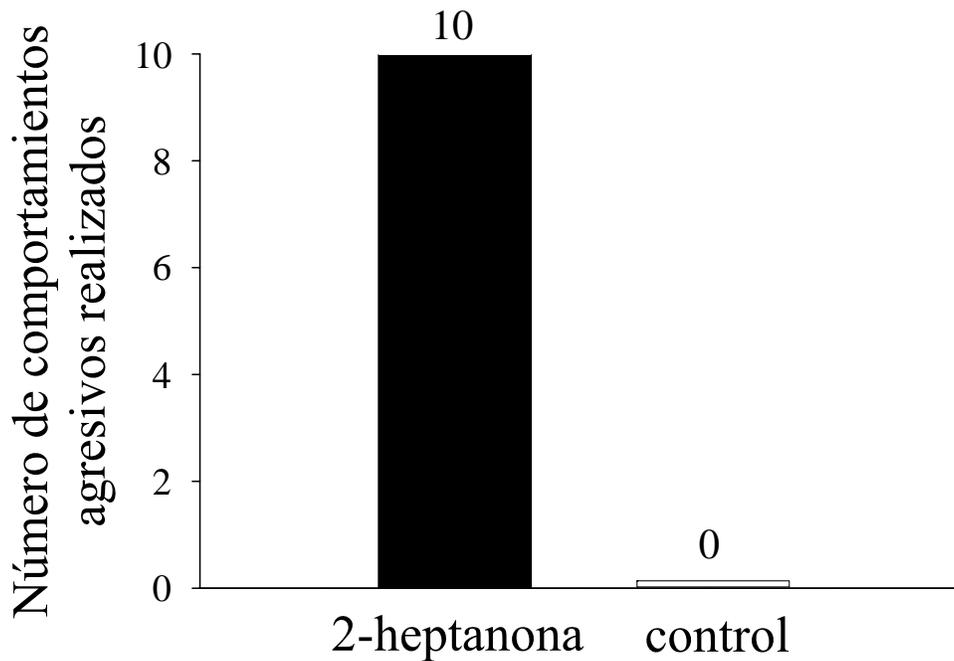


Figura 44. Número de ocasiones en las que se observó comportamiento agresivo de soldado hacia trozos de papel filtro con 1 μ L de 2-heptanona.

1.4.3. Esencia de rosas.

Los resultados de los bioensayos con el olor de flores se muestran en la figura 45. Como puede observarse, las obreras actúan ante el estímulo control como al de prueba con el comportamiento de forrajeo, por lo que no se encontraron diferencias entre ambos estímulos ($\chi^2 = 0$; $P > 0.999$).

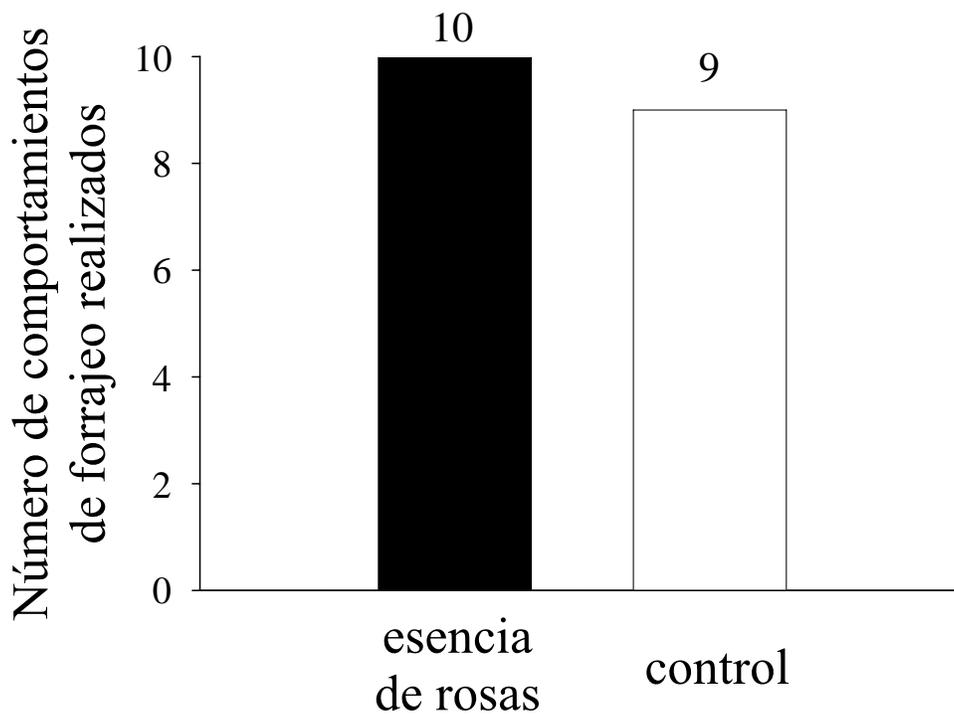


Figura 45. Resultados de las pruebas conductuales para la esencia de rosas. No hay diferencias significativas ($\chi^2 = 0$; $P > 0.999$). Ver texto.

Debido a que el papel filtro está hecho de celulosa, probablemente resulta atractivo como sustrato para el hongo. Así, el papel filtro limpio actúa como un falso control por sus características propias. Por tal motivo, se sustituyó el material utilizado como vehículo del estímulo de forrajeo por parafilm impregnado con el olor de prueba. El parafilm impregnado con esencias ha sido exitosamente empleado como sustituto de sustrato vegetal en otras hormigas cortadoras de hojas como *Acromyrmex lundii* (Roces, 1990; 1993). En los bioensayos se encontró que la esencia de rosas es efectiva como olor de forrajeo (figura 46).

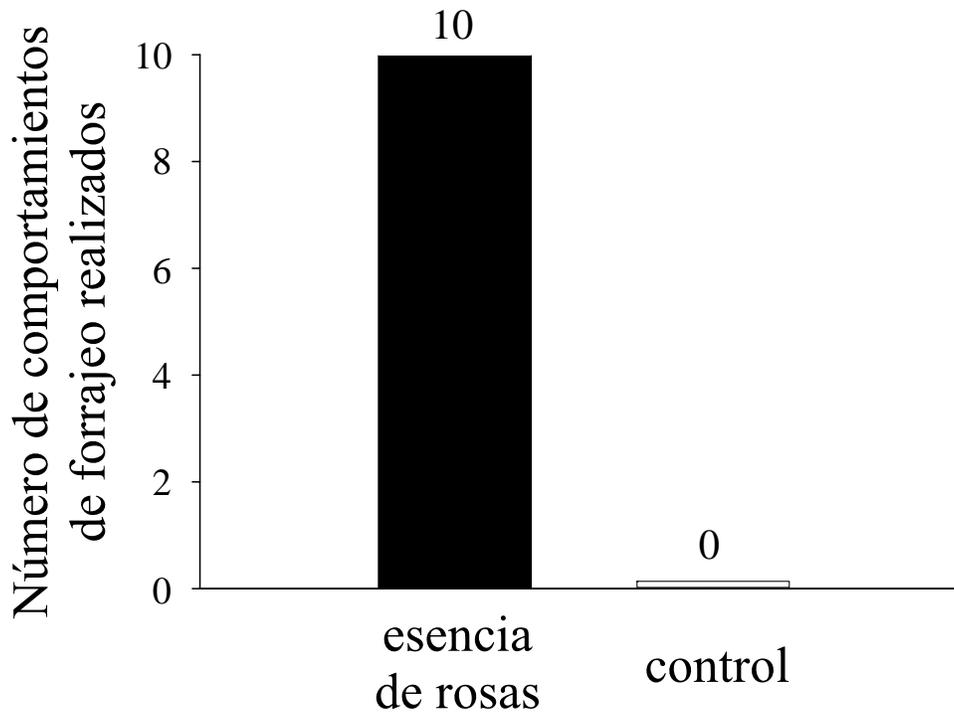


Figura 46. Ocasiones en las que el parafilm con esencia de rosas evocó el comportamiento de forrajeo, en comparación con parafilm solo como control.

2· RESULTADOS II: EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS



La figura 47 muestra registros típicos de hormigas de cada casta en respuesta a los olores de prueba a la máxima carga en el papel filtro ($0.5 \mu\text{g}$). Los valores del EAG para las hormigas sometidas a los experimentos se encontraron entre 0.05 y 2.5 mV.

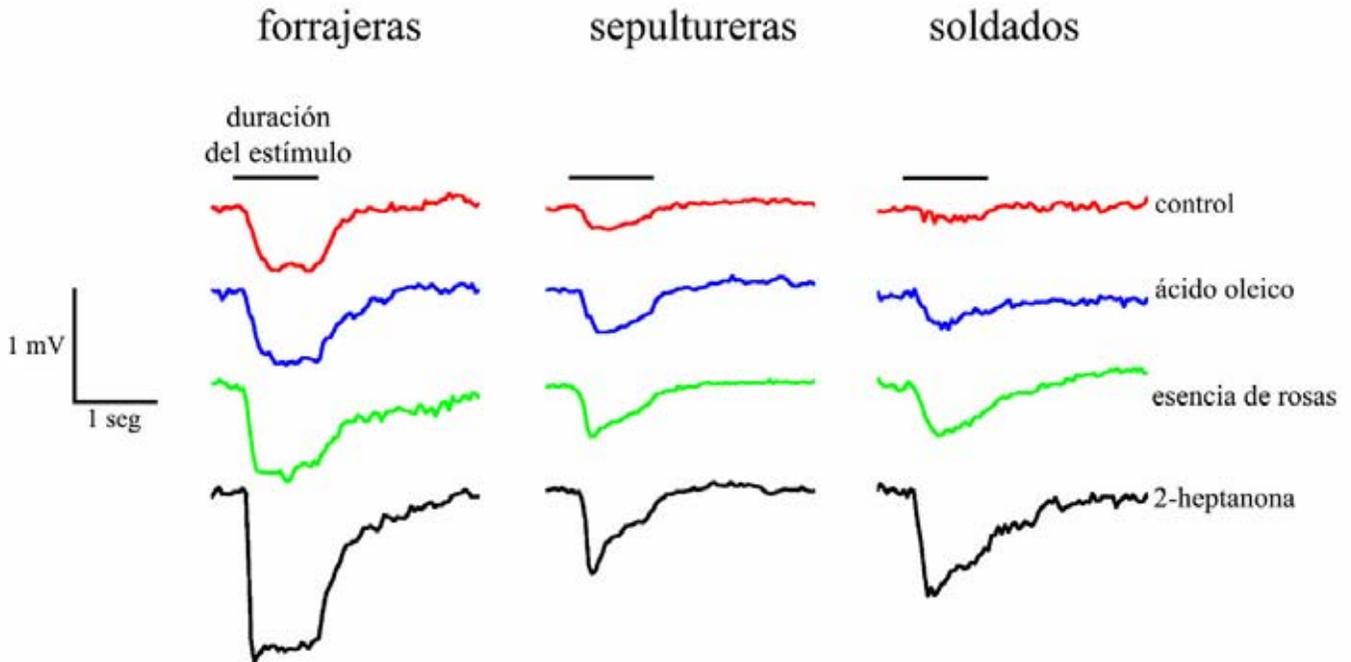


Figura 47. Registros electroantenográficos (EAG) típicos de hormigas de cada casta en respuesta a $0.5 \mu\text{g}$ de los odorantes empleados sobre el papel filtro. El primer registro para cada obrera (en rojo) corresponde a la respuesta EAG al estímulo control (aceite de parafina). La duración del estímulo (1 segundo) se representa con la barra negra.

2.1. Respuesta EAG de las obreras al aire

La respuesta EAG al control representa la respuesta de los mecanorreceptores antenales al pulso de aire extra que se incorpora al flujo principal de aire cuando se activa el estimulador.

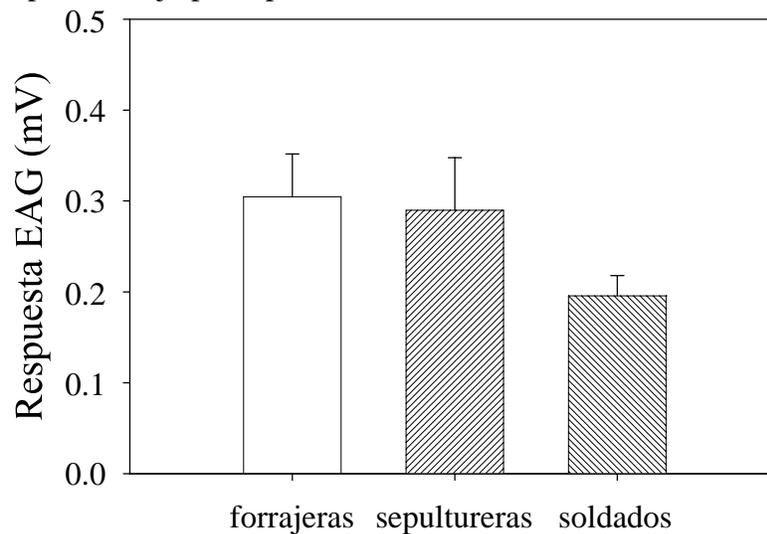


Figura 48. Medias \pm SE (error estándar) de la respuesta EAG al estímulo control de las tres castas ($n_{\text{forrajeras}} = 18$; $n_{\text{sepultureras}} = 5$; $n_{\text{soldados}} = 9$). $\text{EAG}_{\text{forrajeras}} = 0.304 \pm 0.047 \text{ mV}$; $\text{EAG}_{\text{sepultureras}} = 0.289 \pm 0.057 \text{ mV}$; $\text{EAG}_{\text{soldados}} = 0.195 \pm 0.022 \text{ mV}$.

Para la estimulación control, la respuesta EAG promedio de las forrajeras fue mayor (figura 48), aunque el análisis de varianza de una vía (ANOVA de un factor cualitativo: casta con tres niveles, forrajeras, sepultureras y soldados) no detectó diferencias significativas ($F = 0.34$; $df = 2$; $P = 0.71$). Para datos normalizados ($Indice_{EAG} = EAG_{control}/EAG_{max}$) de la respuesta EAG al estímulo control tampoco se encontraron diferencias significativas entre castas ($F = 2.62$; $df = 2$; $P = 0.09$).

2.2. Respuestas EAG de las castas a los olores: curvas dosis-respuesta

2.2.3. Curvas dosis-respuesta graficadas por olor

Tanto en forrajeras como en sepultureras, los tres olores, principalmente la 2-heptanona, produjeron una relación dosis-respuesta logarítmica, característica de los sistemas sensoriales de alta resolución (figura 49, 50 y 51). En los soldados, esta relación logarítmica sólo fue observada en respuesta a la 2-heptanona y, débilmente, a la esencia de rosas.

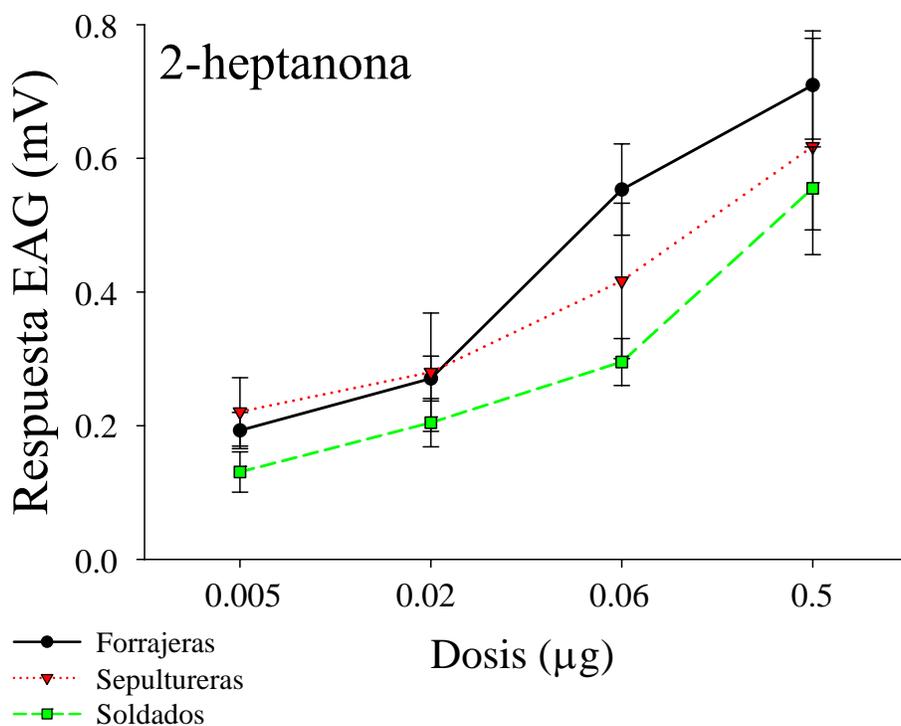


Figura 49. Curva dosis-respuesta en donde se presenta la amplitud EAG como una función de la dosis del odorante 2-heptanona. Cada línea representa una casta ($n_{forrajeres} = 18$; $n_{sepultureras} = 5$; $n_{soldados} = 9$). Las barras representan el error estándar.

Como puede observarse en la figura 49, la 2-heptanona produjo la más alta actividad eléctrica en las antenas de las hormigas de las tres castas en todas sus concentraciones. Además, las curvas dosis-respuesta de las tres castas para este olor presentan un comportamiento muy similar y se encuentran más o menos sobrelapadas. Las respuestas antenales de los soldados en todas las dosis de la 2-heptanona, mostraron las menores desviaciones estándar comparadas con aquellas de las forrajeras y sepultureras (tabla 5), sugiriendo que los soldados son un grupo más homogéneo. Forrajeras y sepultureras mostraron desviaciones estándar similares entre ellas.

Tabla 5. Medias de la respuesta EAG y desviaciones estándar (mV) a la 2-heptanona de las tres castas

Castas	Dosis: 0.005 μg		Dosis: 0.02 μg		Dosis: 0.06 μg		Dosis: 0.5 μg	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras ($n = 18$)	0.192	0.115	0.270	0.142	0.553	0.290	0.709	0.344
Sepultureras ($n = 5$)	0.220	0.114	0.280	0.198	0.416	0.260	0.617	0.361
Soldados ($n = 9$)	0.130	0.090	0.204	0.108	0.295	0.105	0.555	0.186

En el caso del ácido oleico, sólo la respuesta EAG de las forrajeras y sepultureras muestra un comportamiento logarítmico, aunque con una pendiente no tan definida como la que presentan estas mismas castas en respuesta a la 2-heptanona (figura 50).

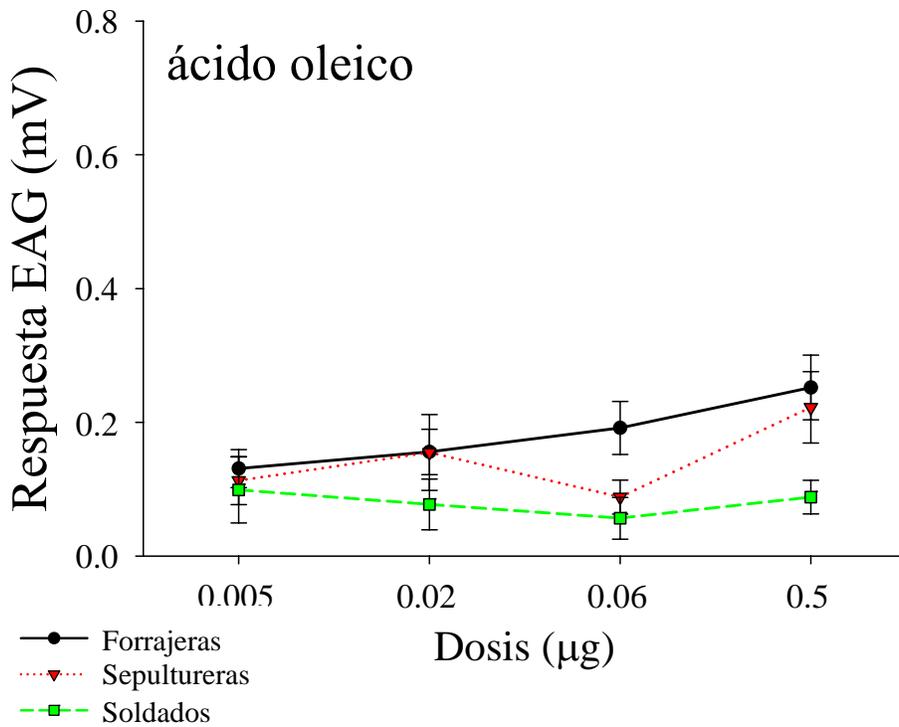


Figura 50. Curva dosis-respuesta de las respuestas EAG de las tres castas ($n_{\text{forrajeres}} = 18$; $n_{\text{sepultureras}} = 5$; $n_{\text{soldados}} = 9$) al ácido oleico. Las barras representan el error estándar.

En los soldados el ácido oleico no produce una relación dosis-respuesta logarítmica y la pendiente es cero (figura 50), de manera que puede decirse que en los soldados el ácido oleico no provoca incremento en las respuestas EAG ni aún con las dosis más altas, indicando que la detección del ácido oleico en los soldados es nula. Como ocurre para la 2-heptanona, los soldados también presentan las menores desviaciones estándar de la respuesta EAG al ácido oleico. Aunque en las sepultureras hay una caída en la respuesta EAG en la dosis 0.06 μg , las curvas dosis-respuesta de forrajeras y sepultureras muestran una tendencia tan similar que están casi sobrelapadas, excepto porque la variación es mayor en las forrajeras que en las sepultureras (tabla 6).

Tabla 6. Medias de la respuesta EAG y desviaciones estándar (mV) al ácido oleico de las tres castas

Castas	Dosis: 0.005 μg		Dosis: 0.02 μg		Dosis: 0.06 μg		Dosis: 0.5 μg	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras ($n = 18$)	0.130	0.121	0.155	0.144	0.191	0.168	0.252	0.205
Sepultureras ($n = 5$)	0.112	0.080	0.154	0.126	0.088	0.056	0.222	0.119
Soldados ($n = 9$)	0.098	0.148	0.077	0.114	0.056	0.093	0.088	0.075

Las respuestas EAG de las tres castas a la esencia de rosas (figura 51), muestran una relación logarítmica con la dosis; sin embargo, en los soldados esta relación es muy débil. Forrajeras y sepultureras tienen curvas dosis-respuesta similares, aunque antes de la dosis 0.06 μg , la curva de las sepultureras se encuentra por encima de la curva de las forrajeras, y después de esta concentración se invierte y está por debajo. La curva dosis-respuesta de las forrajeras presenta la pendiente más clara en comparación con las otras castas. Para este olor, soldados y sepultureras mostraron las menores desviaciones estándar, mientras que las forrajeras presentaron las mayores (tabla 7).

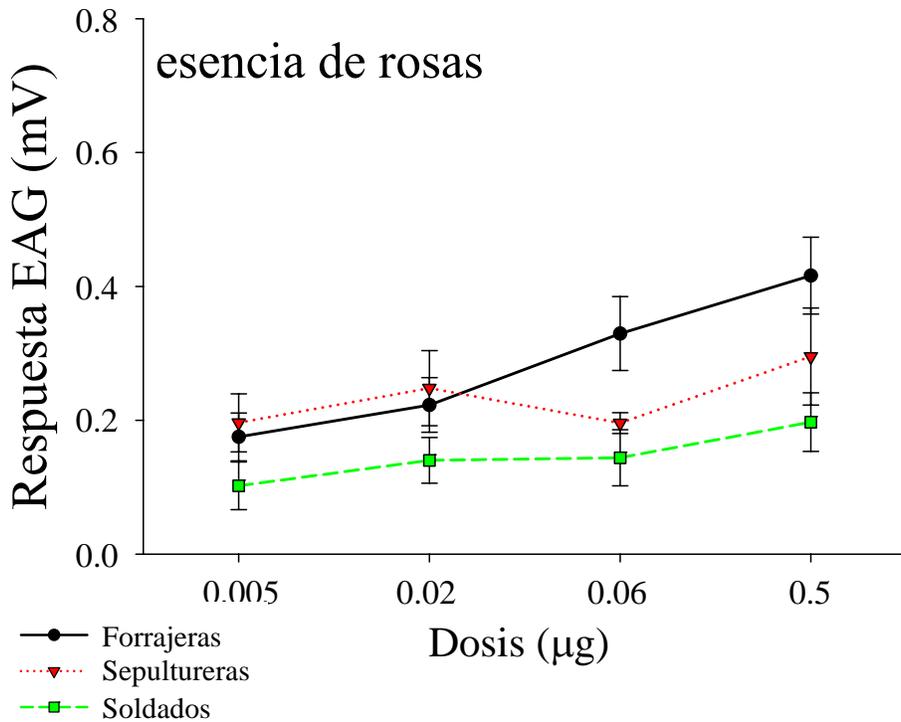


Figura 51. Curva dosis-respuesta construida a partir de las respuestas EAG de las tres castas ($n_{\text{forrajeras}} = 18$; $n_{\text{sepultureras}} = 5$; $n_{\text{soldados}} = 9$) a la esencia de rosas. Las barras representan el error estándar.

Tabla 7. Medias de la respuesta EAG y desviaciones estándar (mV) a la esencia de rosas de las tres castas

Castas	Dosis: 0.005 µg		Dosis: 0.02 µg		Dosis: 0.06 µg		Dosis: 0.5 µg	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras (n = 18)	0.175	0.152	0.222	0.173	0.329	0.234	0.416	0.243
Sepultureras (n = 5)	0.196	0.096	0.248	0.125	0.195	0.034	0.295	0.162
Soldados (n = 9)	0.102	0.107	0.140	0.102	0.144	0.126	0.197	0.121

2.2.4. Curvas dosis-respuesta graficadas por casta

En esta sección se muestran las curvas dosis-respuesta a cada olor graficadas por casta. Las forrajeras (figura 52) presentaron las más altas respuestas EAG a la 2-heptanona, intermedias a la esencia de flores y menores al ácido oleico.

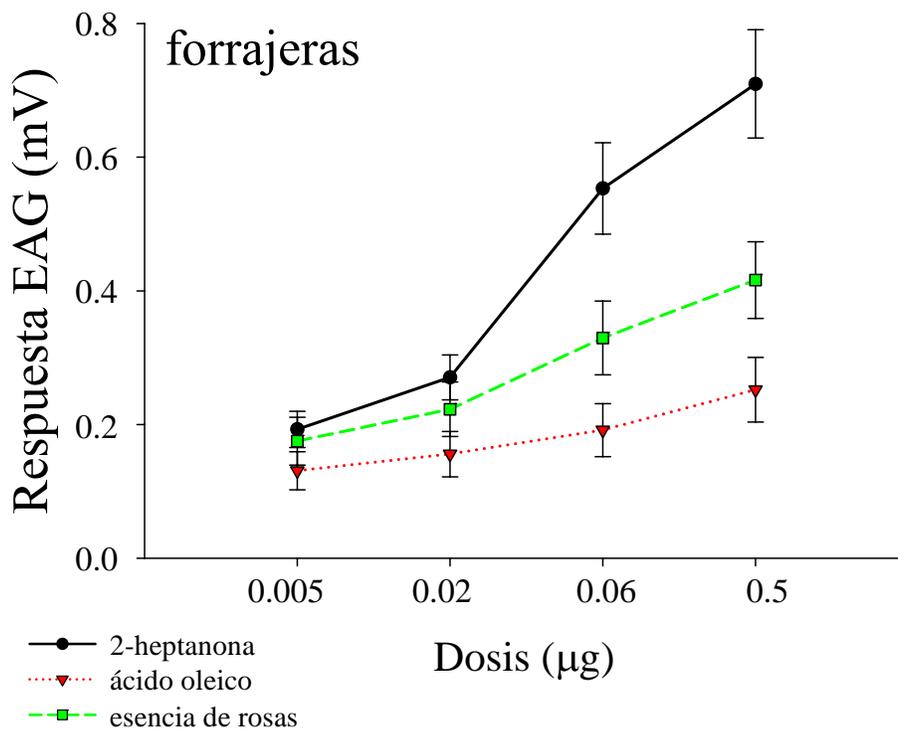


Figura 52. Curvas dosis-respuesta de las forrajeras a los tres odorantes.

Asimismo, las desviaciones estándar de las respuestas antenales de las forrajeras fueron mayores para la 2-heptanona, intermedias para la esencia de flores y las más bajas para el ácido oleico. En este mismo orden también disminuye la pendiente de las curvas dosis-respuesta. Como puede observarse en la gráfica, las respuestas EAG a los tres olores incrementan claramente con el incremento en la dosis.

Las sepultureras (figura 53) también presentan las mayores respuestas EAG a la 2-heptanona, intermedias a la esencia de rosas y las más bajas al ácido oleico. La respuesta EAG a la 2-heptanona claramente incrementa con la dosis, aunque las desviaciones estándar son mayores comparadas con las respuestas a los otros olores. Las curvas dosis-respuesta a la esencia de flores y al ácido oleico

muestran un comportamiento muy similar. Para los olores de flores y ácido oleico, las desviaciones estándar de las sepultureras son menores que aquellas para la 2-heptanona.

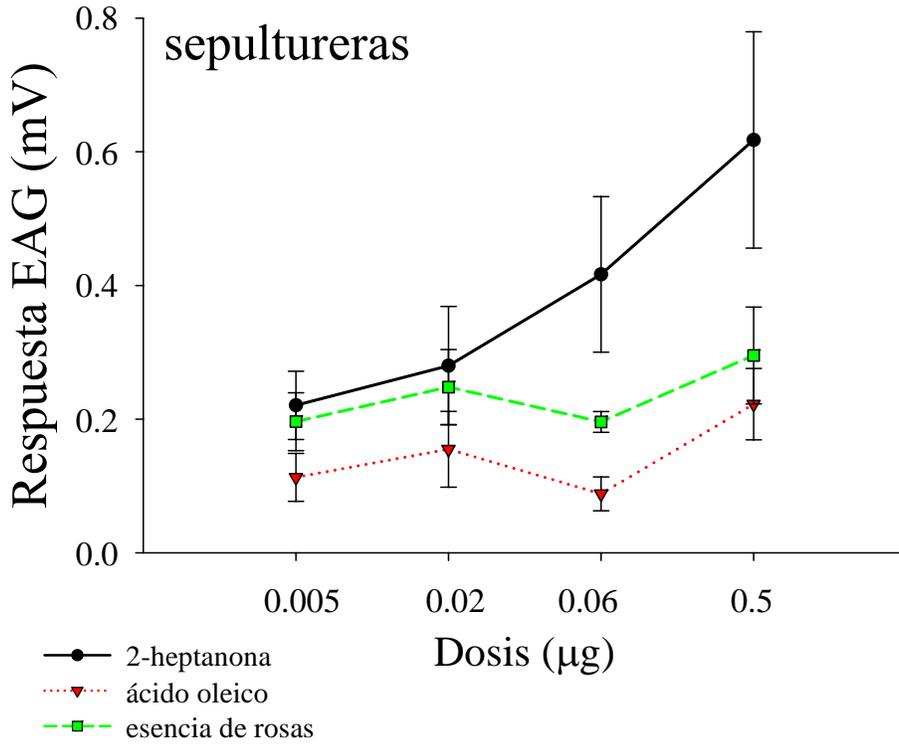


Figura 53. Curvas dosis-respuesta EAG de las sepultureras a los tres odorantes.

Los soldados (figura 54) muestran un claro incremento en la respuesta EAG al aumento de la concentración de la 2-heptanona, por lo que la relación logarítmica dosis-respuesta es muy clara para este olor.

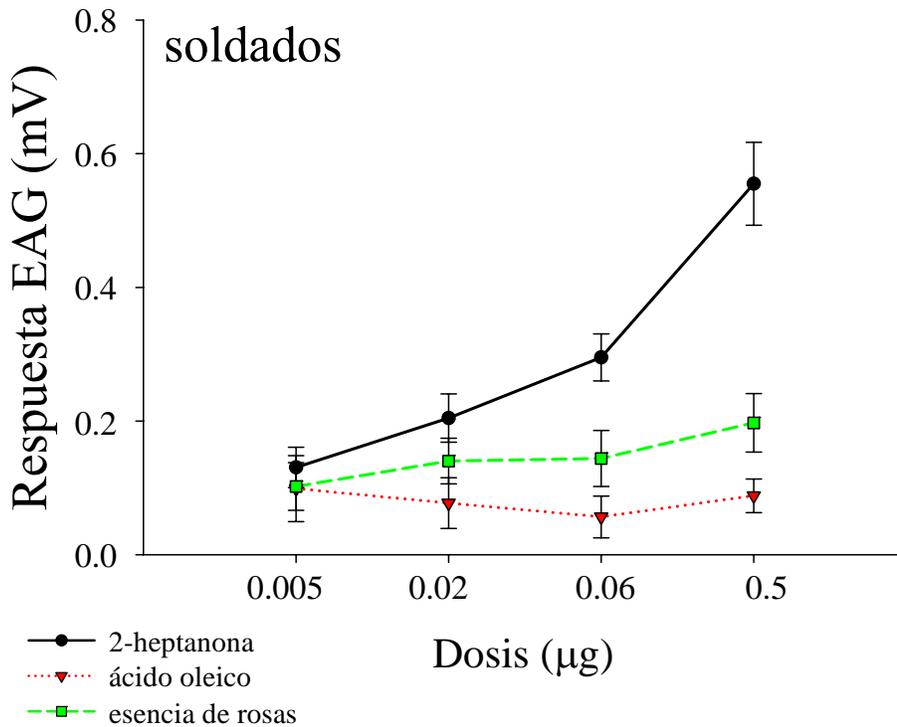


Figura 54. Curvas dosis-respuesta EAG de los soldados a los tres odorantes.

Como en todos los sistemas sensoriales de alta resolución, la respuesta EAG aumenta rápidamente con la dosis del olor de alarma. La esencia de flores, por otro lado, produce una muy débil curva ascendente con el incremento en concentración. Por el contrario, el ácido oleico no produce incremento en la respuesta EAG al aumentar la dosis, por lo que las antenas de los soldados parecen no responder a los cambios en la concentración de este olor. Para los tres olores, las desviaciones estándar son pequeñas, comparadas con las de las otras castas.

2.3. Respuestas EAG de las castas a los olores: resultados de ANOVA

Como puede verse en las curvas dosis-respuesta graficadas por olor, las forrajeras presentan las mayores respuestas EAG a los tres olores, las sepultureras las intermedias y los soldados las menores. El análisis de varianza (ANOVA) reveló que los efectos principales de casta ($F = 20.8$; $df = 2$; 348 ; $P < 0.001$); olor ($F = 48.1$; $df = 2$, 348 ; $P < 0.001$) y dosis ($F = 18.5$; $d.f. = 3$, 348 ; $P < 0.001$) son estadísticamente significativos, mientras que los efectos de interacción de casta x olor ($F = 0.356$; $df = 4$; $P = 0.840$) y de casta x dosis ($F = 0.225$; $df = 6$; $P = 0.293$) no son significativos, pero el efecto de interacción olor x dosis sí es significativo ($F = 3.494$; $df = 6$; $P = 0.293$). El ANOVA también mostró que el efecto de interacción casta x olor x dosis ($F = 0.147$; $df = 12$; $P = 1$) no es significativo.

Para olores (figura 55 y tabla 8), la prueba *post-hoc* de Tukey mostró que las respuestas EAG producidas por los tres olores son significativamente diferentes ($P < 0.001$), siendo la 2-heptanona el olor que produce las respuestas EAG mayores en todas las castas comparada con las respuestas producidas por la esencia de flores y el ácido oleico ($P < 0.001$). En el caso de efecto de castas (figura 56 y tabla 9), un análisis *post-hoc* de Tukey para comparaciones múltiples mostró que la respuesta EAG para todos los olores de las forrajeras ($EAG_{\text{forrajeras}}: 0.3 \pm 0.01$ mV) es similar ($P = 0.530$) a la de las sepultureras ($EAG_{\text{sepultureras}}: 0.25 \pm 0.02$ mV).

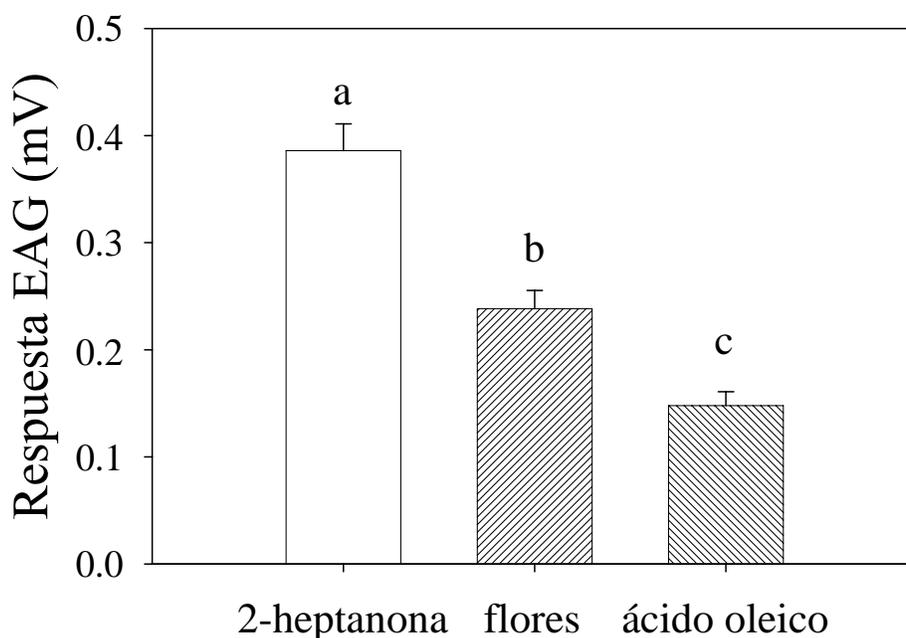


Figura 55. Amplitud media de EAG \pm SE de todos los insectos en respuesta a los tres odorantes graficada por odorante ($n = 128$ por cada odorante). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tabla 8. Respuestas EAG promedio por olor

Olor	Medias de EAG (mV)	Desviación estándar (mV)	Error estándar (mV)
2- heptanona (n = 128)	0.386	0.287	0.025
Ácido oleico (n = 128)	0.147	0.148	0.013
Esencia de rosas (n = 128)	0.238	0.192	0.016

Tabla 9. Respuestas EAG promedio por castas

Casta	Medias de EAG (mV)	Desviación estándar (mV)	Error estándar (mV)
Forrajeras (n = 216)	0.300	0.262	0.018
Sepultureras (n = 60)	0.254	0.206	0.026
Soldados (n = 108)	0.174	0.173	0.016

Por su parte, las respuestas EAG de los soldados ($EAG_{\text{soldados}}: 0.17 \pm 0.01$ mV) fueron significativamente diferentes ($P < 0.001$) de las respuestas de las forrajeras ($EAG_{\text{forrajeras}}: 0.3 \pm 0.01$ mV) y de las sepultureras ($EAG_{\text{sepultureras}}: 0.25 \pm 0.02$ mV). Las desviaciones estándar de los soldados fueron las menores, sugiriendo que constituyen un grupo más homogéneo conductual y fisiológicamente: presentan respuestas sensoriales bajas y poco variables.

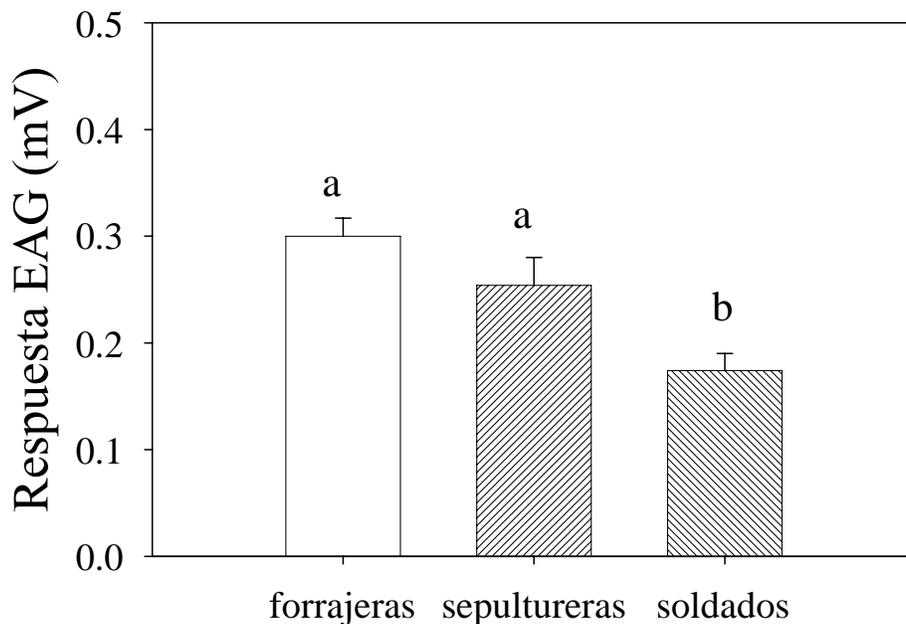


Figura 56. Medias \pm error estándar de las respuestas EAG a todos los olores graficados por casta EAG ($n_{\text{forrajeras}} = 216$; $n_{\text{sepultureras}} = 60$; $n_{\text{soldados}} = 108$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

2.4. Respuestas EAG de las castas a los olores: comparación entre coeficientes de correlación

Debido a que el análisis ANOVA no reveló interacción estadísticamente significativa de casta x olor x dosis, se realizó un análisis adicional para comparar los coeficientes de correlación dosis-respuesta EAG entre castas por olor y entre olores por cada casta.

Los soldados mostraron una alta correlación ($r = 0.784$) entre la amplitud del EAG producida por la 2-heptanona y la dosis; una correlación menor ($r = 0.287$) entre la amplitud de la respuesta EAG producida por la esencia de flores y la dosis y nula ($r = 0.03$) entre el ácido oleico y la dosis. En las forrajeras, el coeficiente de correlación entre respuesta EAG y la dosis para la 2-heptanona ($r = 0.64$) también fue el más alto; un poco menor para la esencia de flores ($r = 0.42$) y para el ácido oleico ($r = 0.275$) fue el más bajo. En las sepultureras, el coeficiente de correlación para la 2-heptanona también fue el más alto ($r = 0.556$); para el ácido oleico ($r = 0.335$) es menor, y el más bajo fue para la esencia de flores ($r = 0.28$).

Interesantemente, comparando los coeficientes de correlación por olor entre castas, las castas especializadas en la tarea relacionada con dicho olor presentaron los mayores coeficientes de correlación (figura 57), por ejemplo, para la 2-heptanona el coeficiente de correlación mayor lo presentaron los soldados ($r = 0.784$); para el ácido oleico, el coeficiente de correlación mayor lo presentaron las sepultureras ($r = 0.335$), y para la esencia de flores, las forrajeras presentaron el mayor coeficiente de correlación ($r = 0.42$). Sin embargo, comparando los coeficientes de correlación entre olores por casta, en todas las castas los mayores coeficientes siempre fueron para la 2-heptanona. Sólo los soldados presentaron un coeficiente de correlación mayor al olor relacionado con su especialización conductual de defensa (2-heptanona). Por el contrario, forrajeras y sepultureras no mostraron los mayores coeficientes de correlación para el olor relacionado con su “especialización conductual”. Sin embargo, el análisis de comparación de coeficientes de correlación no detectó diferencias significativas entre las castas ($P > 0.05$).

Los resultados de la comparación de coeficientes de correlación entre castas para cada olor son consistentes con los resultados del ANOVA. Debido a que no se detectaron diferencias entre los coeficientes de correlación entre castas para cada olor, se calculó el coeficiente de correlación común (Zar, 1999) para cada olor en el que se combinan los coeficientes de correlación de las tres castas (tabla 10), donde el coeficiente de correlación mayor es para la 2-heptanona y el menor para el ácido oleico.

Al comparar los coeficientes de correlación entre olores para cada casta, se pueden observar algunas evidencias de especialización sensorial relacionada con la especialización conductual. Para sepultureras, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas en el coeficiente de correlación entre olores ($X^2 = 1.11$; $P > 0.05$), por lo que se calculó el coeficiente de correlación común ($z_w = 0.42$; $r_w = 0.397$). En las forrajeras, los coeficientes de correlación para los tres olores, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($X^2 = 7.98$; $P < 0.02$). La prueba *post-hoc* de Tukey reveló diferencias significativas entre los coeficientes de correlación de las forrajeras para la 2-heptanona y para el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 3.94$), pero no entre la 2-heptanona y la esencia de flores ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 > q = 2.56$), ni entre los coeficientes de correlación para la esencia de flores y el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 1.37$). En los soldados, también se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de correlación de los olores ($X^2 = 18.7$, $P < 0.001$). La prueba *post-hoc* de Tukey reveló diferencias entre los coeficientes de correlación para la 2-heptanona y el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 > q = 5.89$), y entre la 2-heptanona y la esencia de flores ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 > q = 4.37$), pero no detectó diferencias entre la esencia de flores y el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 > q = 1.52$).

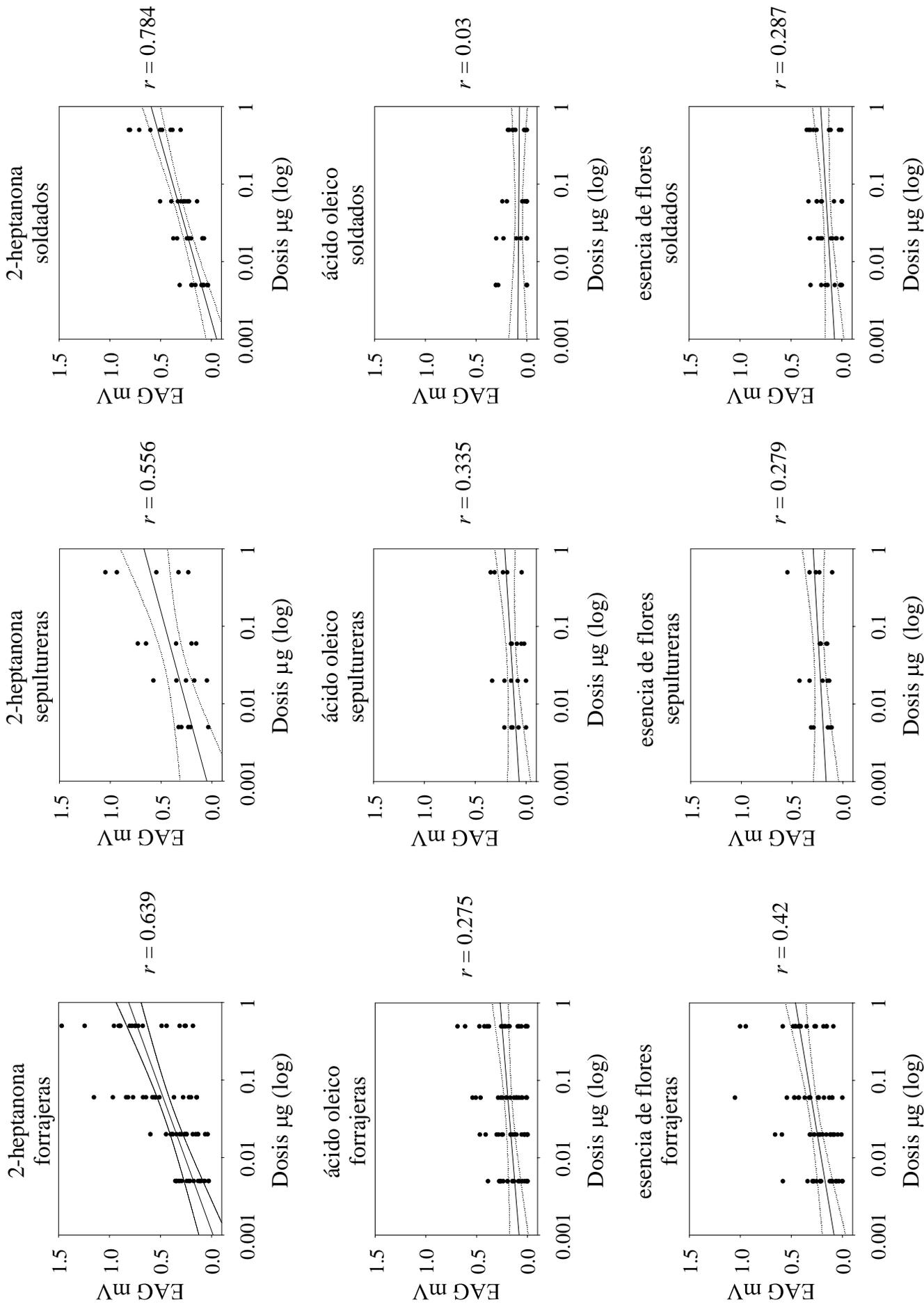


Figura 57. Gráficas de regresión lineal con sus coeficientes de correlación (r) para cada casta y odorante. Nótese la clara relación logarítmica entre la dosis y la amplitud electroantenográfica en todas las castas en respuesta a la 2-heptanona. También nótese que cada casta tiene una r mayor para el olor relacionado con su especialización conductual (ver texto).

Tabla 10. Coeficientes de correlación comunes para los tres olores

Olor	z_w	r_w (coeficiente de correlación común)
2-heptanona ($n = 128$)	0.820	0.675
Acido oleico ($n = 128$)	0.221	0.218
Esencia de flores ($n = 128$)	0.382	0.364

2.5. Subpoblaciones de forrajeras

Las respuestas EAG de las forrajeras a la 2-heptanona y a la esencia de flores pueden ser divididas en dos grupos de acuerdo con la magnitud de la respuesta: i) Forrajeras de baja respuesta (FBR; $n = 6$), y ii) Forrajeras de alta respuesta (FAR; $n = 12$). Para la 2-heptanona, la amplitud promedio de la respuesta EAG de las FBR fue de 0.192 ± 0.024 mV; mientras que para las FAR fue de 0.545 ± 0.046 mV. El ANOVA detectó efecto de subgrupo ($F = 84.86$; $df = 1$; $P < 0.001$) (figura 58), dosis ($F = 25.81$; $df = 3$; $P < 0.001$) e interacción subgrupo x dosis ($F = 10.27$; $df = 3$; $P < 0.001$).

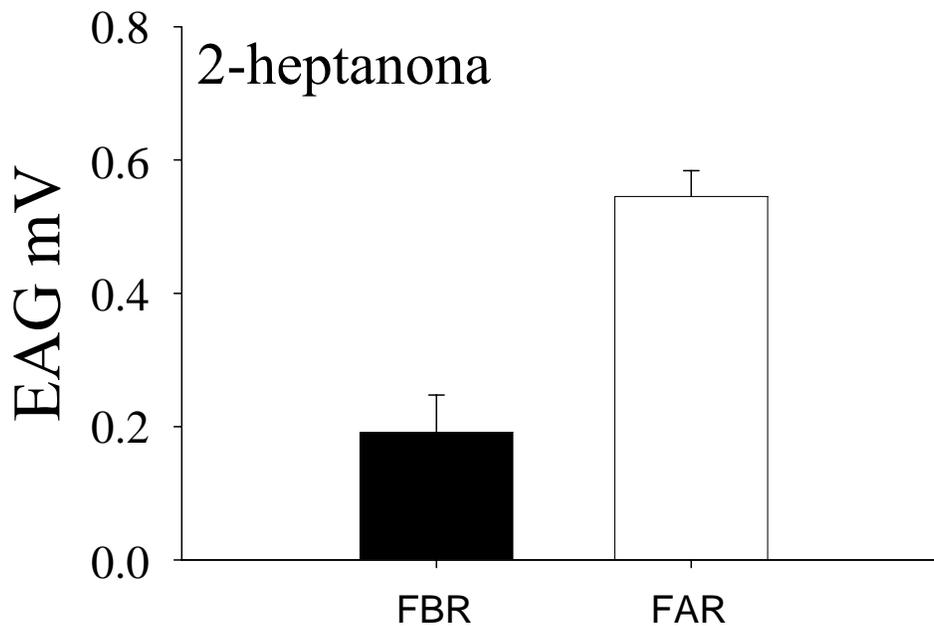


Figura 58. Diferencia en la respuesta EAG a la 2-heptanona entre las forrajeras de alta respuesta (FAR; $n = 24$) y las forrajeras de baja respuesta (FBR; $n = 48$). ANOVA detectó efecto de subgrupo ($F = 84.86$; $df = 1$; $P < 0.001$). Barras representan el error estándar.

La prueba *post-hoc* de Tukey mostró que hay diferencias ($P = 0.0001$) entre la respuesta EAG de las FBR y la de las FAR a la concentración $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\text{EAG}_{\text{FBR}} = 0.226 \pm 0.034$ mV; $\text{EAG}_{\text{FAR}} = 0.716 \pm 0.057$ mV) y a la concentración $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\text{EAG}_{\text{FBR}} = 0.272 \pm 0.039$ mV; $\text{EAG}_{\text{FAR}} = 0.903 \pm 0.067$ mV) de la 2-heptanona (figura 59 y tabla 11).

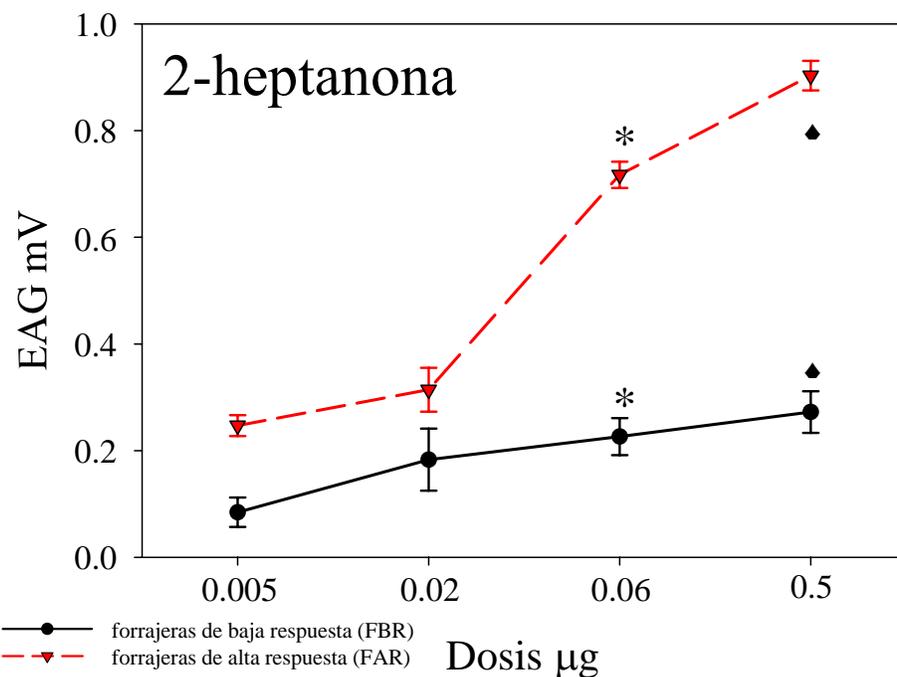


Figura 59. Curva dosis-respuesta EAG de los subgrupos de forrajeras ($n_{\text{FBR}} = 6$; $n_{\text{FAR}} = 12$) en respuesta a la estimulación con 2-heptanona. ANOVA detectó efecto de interacción subgrupo x dosis ($F = 10.27$; $df = 3$; $P < 0.001$); símbolos indican diferencias significativas ($P = 0.0001$). Barras representan el error estándar.

En el caso de las respuestas EAG a la esencia de flores, la amplitud promedio del EAG para las FBR fue de 0.129 ± 0.017 mV; mientras que para las FAR fue de 0.364 ± 0.032 mV (figura 60).

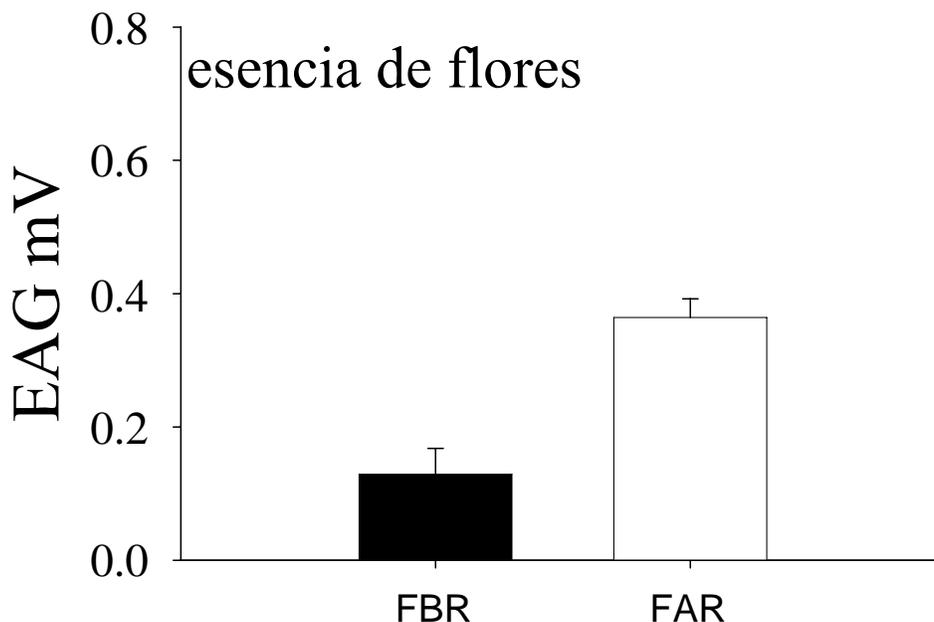


Figura 60. Diferencia de la respuesta EAG a la esencia de flores entre las forrajeras de baja respuesta (FBR; $n = 6$) y las forrajeras de alta respuesta (FAR; $n = 12$). ANOVA detectó diferencias significativas ($F = 30.5$; $df = 1$; $P < 0.001$). Barras representan el error estándar.

Tabla 11. Respuesta EAG promedio a la 2-heptanona de los subgrupos de forrajeras (mV)

Dosis	Forrajeras de Baja Respuesta (FBR)		Forrajeras de Alta respuesta (FAR)	
	Media EAG _{FBR}	Desv. Stndr.	Media EAG _{FAR}	Desv. Stndr.
0.005	0.845	0.067	0.246	0.093
0.02	0.183	0.142	0.314	0.126
0.06	0.226	0.085	0.716	0.197
0.5	0.272	0.095	0.903	0.233

El ANOVA detectó efecto de subgrupo ($F = 30.5$; $df = 1$; $P < 0.001$) (figura 60) y dosis ($F = 4.74$; $df = 3$; $P < 0.001$), pero no detectó efecto de interacción subgrupo x dosis ($F = 1.17$; $df = 3$; $P = 0.326$) (figura 61). En la tabla 12 se presentan los valores de EAG promedio para los subgrupos de forrajeras en respuesta a la esencia de flores.

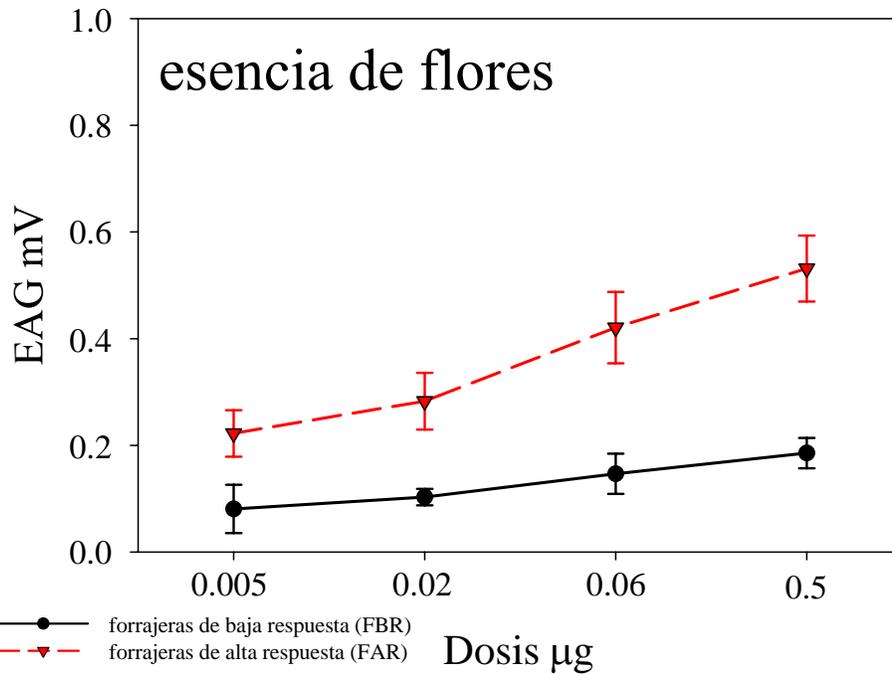


Figura 61. Curva dosis-respuesta EAG de los subgrupos de forrajeras ($n_{FBR} = 6$; $n_{FAR} = 12$) en respuesta a la estimulación con esencia de flores. No hay diferencias significativas. Barras representan el error estándar.

Tabla 12. Respuesta EAG promedio a la esencia de flores de los subgrupos de forrajeras (mV)

Dosis	Forrajeras de Baja Respuesta (FBR)		Forrajeras de Alta respuesta (FAR)	
	Media EAG _{FBR}	Desv. Stndr.	Media EAG _{FAR}	Desv. Stndr.
0.005	0.080	0.111	0.222	0.151
0.02	0.103	0.037	0.282	0.184
0.06	0.146	0.091	0.420	0.321
0.5	0.185	0.070	0.531	0.214

2.6. Respuestas EAG de las castas a los olores: ANOVA del Índice I_{EAG} ($EAG_{0.5} - EAG_{0.005}$)

El Índice I_{EAG} muestra la diferencia que hay entre el promedio de la amplitud EAG en respuesta a la máxima dosis (0.005 μg) de un olor y el promedio de la amplitud EAG en respuesta a la mínima dosis (0.5 μg) para cada casta, de manera que representa la sensibilidad de la antena ante los cambios en la concentración del estímulo. La tabla 13 muestra los datos del Índice I_{EAG} .

Tabla 13. Medias del Índice $I_{EAG} = (EAG_{0.5 \mu\text{g}} - EAG_{0.005 \mu\text{g}})$ y desviaciones estándar (mV)

Castas	2-heptanona		Ácido oleico		Esencia de rosas	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras ($n = 18$)	0.516	0.295	0.121	0.212	0.241	0.170
Sepultureras ($n = 5$)	0.397	0.254	0.109	0.064	0.099	0.163
Soldados ($n = 9$)	0.424	0.173	0.008	0.113	0.095	0.118

La figura 62 muestra los datos del Índice I_{EAG} graficados por casta y para cada olor. Puede apreciarse que la mayor sensibilidad a los cambios en la concentración de tres olores corresponde a las forrajeras, mientras que los soldados presentan las menores diferencias entre la respuesta EAG a la mayor concentración y la menor concentración para el ácido oleico y la esencia de flores. Los soldados mostraron los índices menores, excepto para la 2-heptanona.

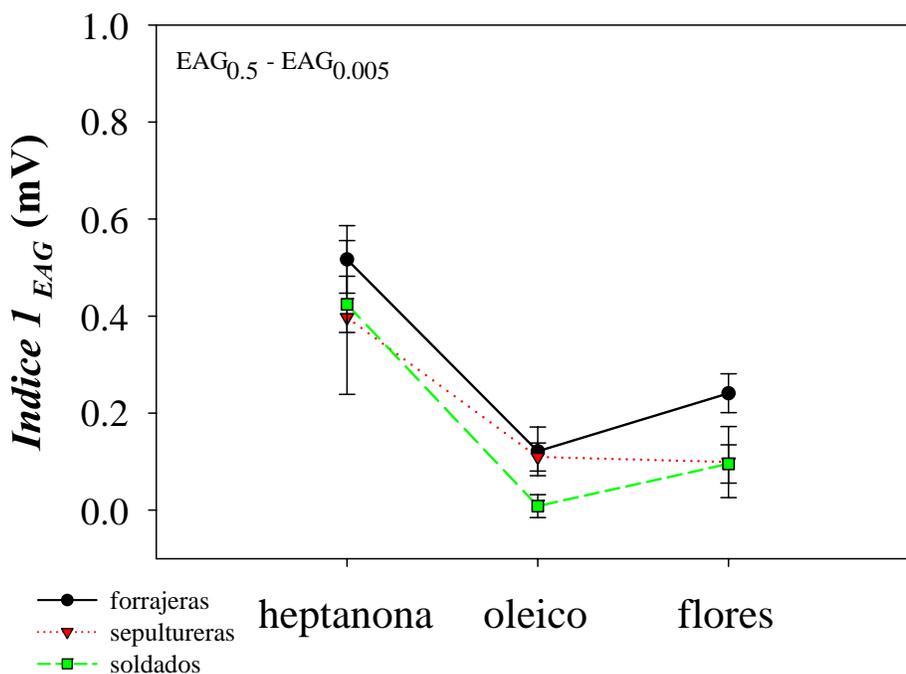


Figura 62. Índice I_{EAG} graficado para cada casta por odorante.

ANOVA detectó que el efecto de olor ($F = 21.83$; $df = 2$; $P < 0.001$) y el efecto de casta ($F = 4.72$; $df = 2$; $P = 0.011$) son estadísticamente significativos, mientras que la interacción casta x olor ($F = 1.07$; $df = 4$; $P = 0.377$) no es significativo. La prueba *post-hoc* de Tukey para comparaciones múltiples detectó que el Índice I_{EAG} para todos los olores para las forrajeras (0.293 ± 0.03 mV) y el índice para los soldados (0.176 ± 0.04 mV) son significativamente diferentes ($P = 0.01$) (figura 63), así como el Índice I_{EAG} para sepultureras (0.202 ± 0.066 mV) también es diferente del de los soldados.

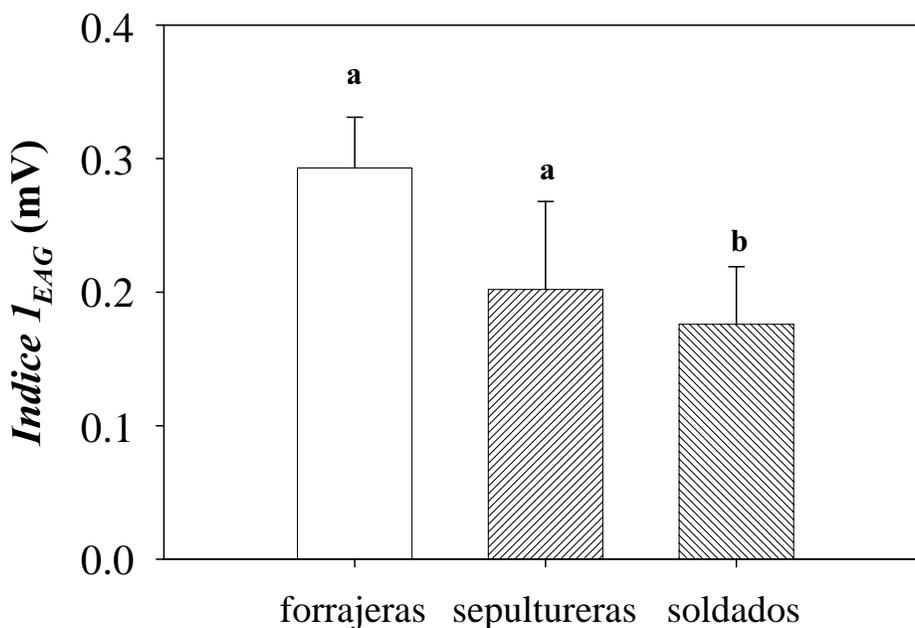


Figura 63. Medias \pm error estándar del Índice I_{EAG} a todos los odorantes graficados por casta EAG ($n_{\text{forrajeras}} = 54$; $n_{\text{sepultureras}} = 15$; $n_{\text{soldados}} = 27$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

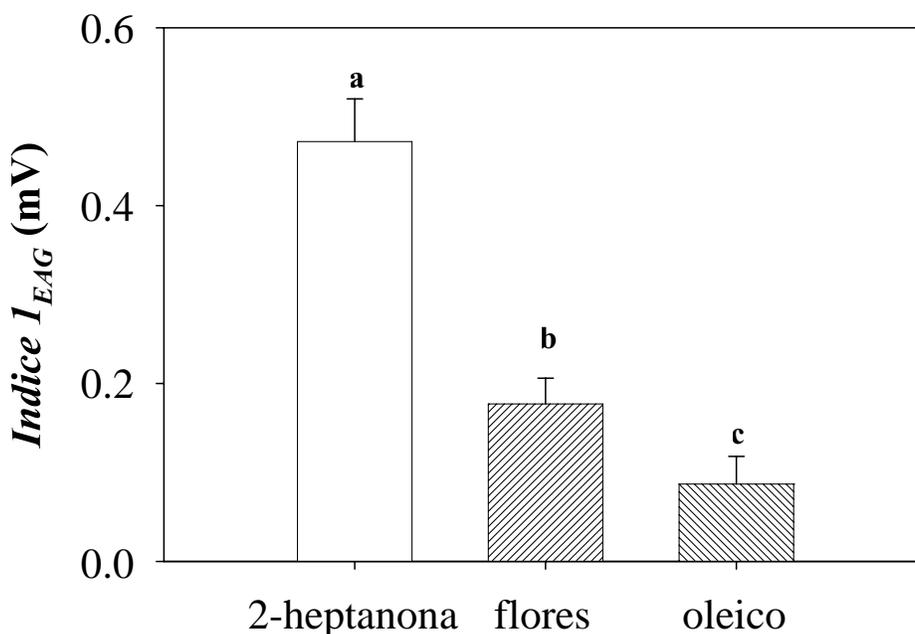


Figura 64. Índice $I_{EAG} \pm$ SE de todos los insectos en respuesta a los tres odorantes graficada por odorantes ($n = 128$ por cada odorante). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Para el efecto de olor (figura 64), la prueba de Tukey reveló diferencias significativas entre todos los olores: entre 2-heptanona (0.472 ± 0.048 mV) y ácido oleico (0.087 ± 0.031 mV) ($P < 0.001$); entre 2-heptanona y esencia de flores (0.177 ± 0.029 mV) ($P < 0.001$), y entre ácido oleico y esencia de flores ($P = 0.03$).

2.7. Respuestas EAG de las castas a los olores: ANOVA de datos normalizados

Aunque los resultados presentados en las secciones anteriores son confiables debido al control de las condiciones experimentales, es posible que la respuesta absoluta antenal en mV varíe de un individuo a otro y es posible que sea afectada por la temperatura, la velocidad del flujo de aire, la yuxtaposición del tubo de aire a la antena, etc. De cualquier manera, se realizó una normalización al obtener respuestas relativas a una medición estándar para contrastarlos con los análisis de los resultados de los datos crudos.

Al comparar las curvas dosis-respuesta de los datos crudos contra los datos normalizados para la 2-heptanona ($\text{Índice } 2_{EAG} = EAG/EAG_{\max}$, para cada dato) puede apreciarse que la relación logarítmica de las curvas para cada obrera se conserva muy similar, aunque se sobrelapan en mayor grado en los datos normalizados: las posiciones relativas se conservan (figura 65). En la tabla 14 se presentan las medias y las desviaciones estándar del $\text{Índice } 2_{EAG}$ para las diferentes dosis de la 2-heptanona. De manera interesante, las sepultureras muestran los mayores índices a las dosis menores.

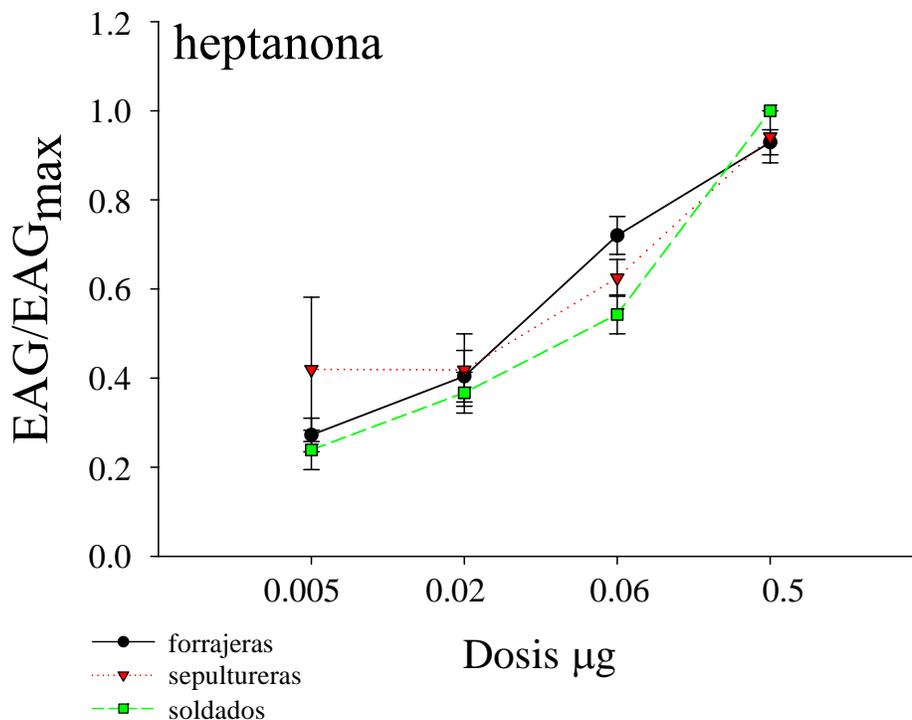


Figura 65. Curva dosis-respuesta (en la forma del $(\text{Índice } 2_{EAG}) = EAG/EAG_{\max}$). Nótese la clara relación logarítmica entre la dosis y la respuesta. Cada línea representa una casta ($n_{\text{forrajeras}} = 18$; $n_{\text{sepultureras}} = 5$; $n_{\text{soldados}} = 9$). Las barras representan el error estándar.

Tabla 14. Medias del Índice EAG/EAG_{max} y desviaciones estándar (en mV) a la 2-heptanona de las tres castas

Castas	Dosis: 0.005 µg		Dosis: 0.02 µg		Dosis: 0.06 µg		Dosis: 0.5 µg	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras (n = 18)	0.272	0.159	0.404	0.245	0.720	0.180	0.929	0.119
Sepultureras (n = 5)	0.419	0.362	0.418	0.181	0.622	0.092	0.911	0.130
Soldados (n = 9)	0.238	0.132	0.367	0.137	0.542	0.130	1	0

Para el ácido oleico, las curvas dosis-respuesta (figura 66) de las diferentes castas también conservan su forma así como sus posiciones relativas entre sí, aunque las medias de las sepultureras para cada dosis (excepto para la dosis 0.06 µg), se colocan muy ligeramente sobre las medias de las forrajeras. Las desviaciones estándar aumentan un poco en todas las castas, principalmente en las sepultureras. Como ocurre con los datos crudos, forrajeras y sepultureras presentan una relación logarítmica entre dosis y respuesta, mientras que los soldados no presentan cambio alguno al incremento en dosis. En la tabla 15 se muestran los datos de las tres castas para el ácido oleico.

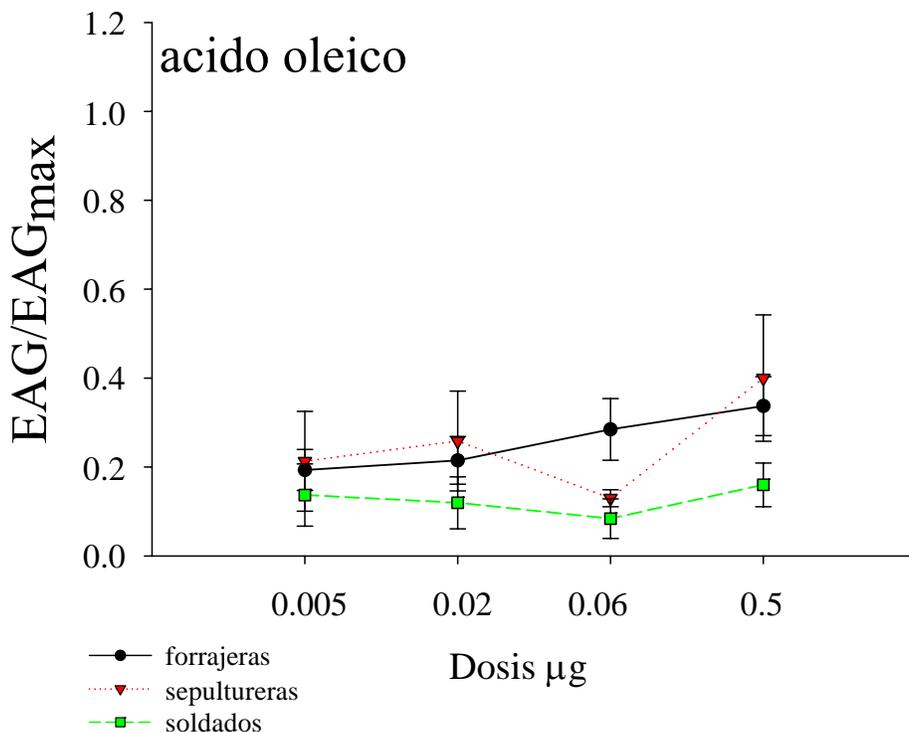


Figura 66. Curva dosis-respuesta construida a partir del Índice 2_{EAG} de las tres castas ($n_{\text{forrajeres}} = 18$; $n_{\text{sepultureras}} = 5$; $n_{\text{soldados}} = 9$) en respuesta al ácido oleico. Las barras representan el error estándar.

Tabla 15. Medias de la respuesta EAG/EAG_{max} y desviaciones estándar (mV) al ácido oleico de las tres castas

Castas	Dosis: 0.005 µg		Dosis: 0.02 µg		Dosis: 0.06 µg		Dosis: 0.5 µg	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras (<i>n</i> = 18)	0.193	0.195	0.214	0.227	0.284	0.294	0.337	0.281
Sepultureras (<i>n</i> = 5)	0.212	0.251	0.258	0.251	0.129	0.042	0.400	0.317
Soldados (<i>n</i> = 9)	0.137	0.209	0.119	0.175	0.083	0.133	0.159	0.147

Para la esencia de flores (figura 67), la forma de las curvas dosis-respuesta para el Índice 2_{EAG} cambian un poco, con las sepultureras con las mayores respuestas en las primeras dos dosis, aunque las desviaciones estándar también aumentaron, principalmente en las sepultureras. Para las tres castas se mantiene la relación logarítmica entre la dosis y la respuesta. En la tabla 16 se presentan los datos obtenidos para el Índice 2_{EAG} en respuesta a la esencia de flores.

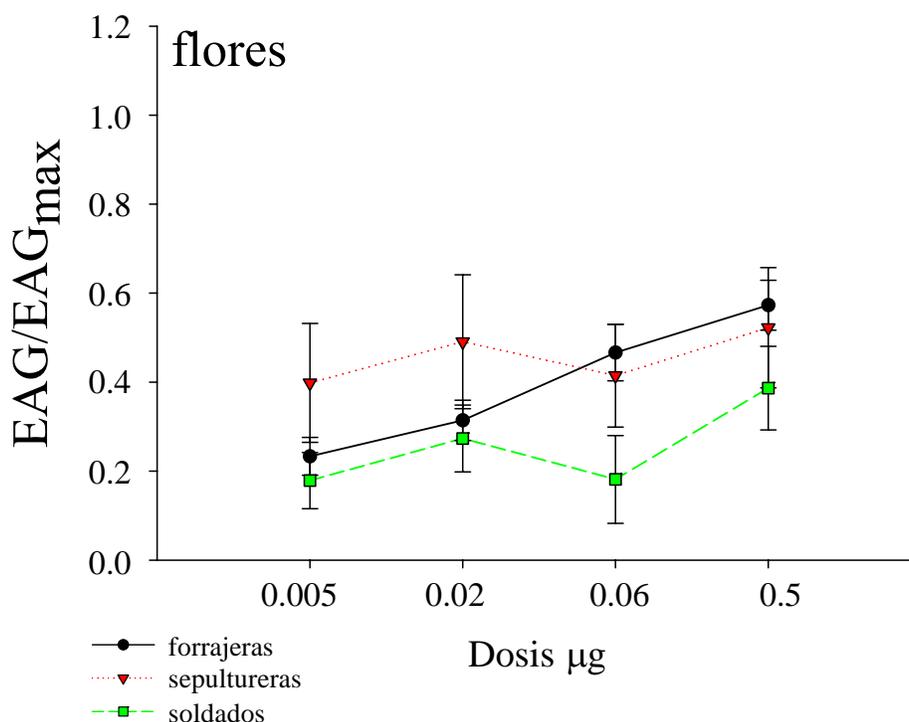


Figura 67. Curva dosis-respuesta construida a partir del Índice 2_{EAG} de las tres castas ($n_{\text{forrajeres}} = 18$; $n_{\text{sepultureras}} = 5$; $n_{\text{soldados}} = 9$) en respuesta a la esencia de rosas. Las barras representan el error estándar.

Tabla 16. Medias de la respuesta EAG/EAG_{max} y desviaciones estándar (mV) para esencia de rosas de las tres castas

Castas	Dosis: 0.005 µg		Dosis: 0.02 µg		Dosis: 0.06 µg		Dosis: 0.5 µg	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras (n = 18)	0.233	0.180	0.314	0.192	0.466	0.268	0.573	0.238
Sepultureras (n = 5)	0.398	0.298	0.490	0.336	0.414	0.258	0.522	0.302
Soldados (n = 9)	0.178	0.189	0.273	0.225	0.281	0.295	0.386	0.281

El ANOVA de los datos normalizados (*Índice 2_{EAG}*) fue consistente con el ANOVA para los datos crudos, ya que reveló que existe efecto de olor ($F = 66.84$; $df = 2$; $P < 0.001$); casta ($F = 12.71$; $df = 2$; $P < 0.001$); dosis ($F = 23.73$; $df = 3$; $P < 0.001$), y efecto de la interacción de olor x dosis ($F = 4.18$; $df = 6$; $P < 0.001$).

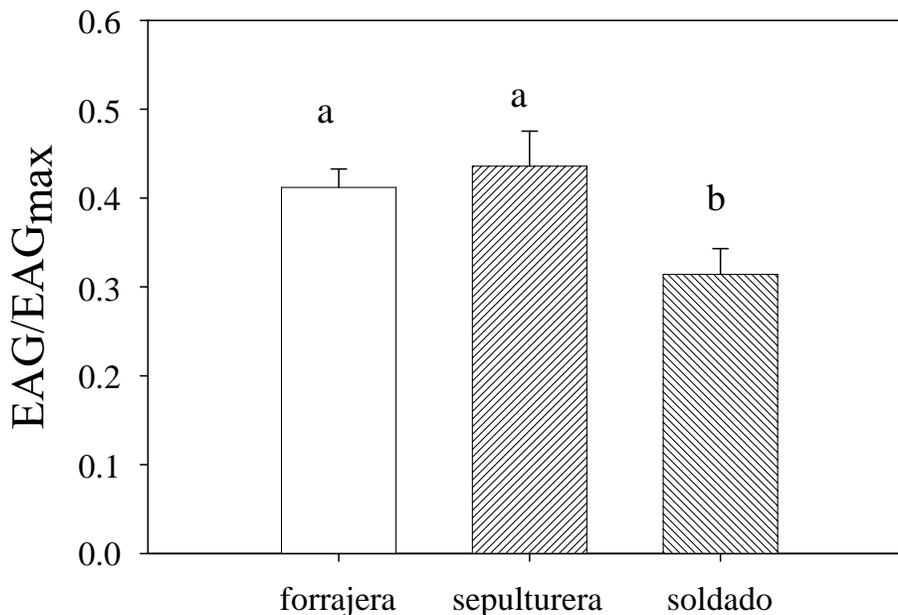


Figura 68. Medias \pm error estándar del *Índice 2_{EAG}* para todos los odorantes graficados por casta EAG ($n_{\text{forrajeras}} = 216$; $n_{\text{sepultureras}} = 60$; $n_{\text{soldados}} = 108$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.001$). Barras indican error estándar.

Sin embargo, como en el caso de ANOVA para los datos crudos, no se encontró efecto de interacción de olor x casta ($F = 1.73$; $df = 4$; $P = 0.142$), ni casta x dosis ($F = 1.153$; $df = 6$; $P = 0.331$), ni efecto de interacción de casta x olor x dosis ($F = 0.302$; $df = 12$; $P < 0.99$). Para el efecto de casta, nuevamente se encontró que los soldados presentan los valores más bajos del *Índice 2_{EAG}* para todos los olores y todas las dosis (0.314 ± 0.029). La prueba *post-hoc* de Tukey reveló que el *Índice 2_{EAG}* de los soldados es significativamente diferente del de las sepultureras (0.436 ± 0.04 ; $P < 0.001$) y del de las forrajeras (0.412 ± 0.021 ; $P < 0.001$). Aunque el valor del *Índice 2_{EAG}* de las sepultureras es un poco

mayor que el de las forrajeras, la prueba de Tukey no detectó diferencias significativas entre ambos ($P = 0.654$) (figura 68).

Para el efecto de olor (figura 69), la prueba de Tukey detectó diferencias entre el *Índice* 2_{EAG} para todos los olores: entre la 2-heptanona (0.572 ± 0.027) y el ácido oleico (0.219 ± 0.02) ($P < 0.001$); entre la 2-heptanona y la esencia de flores (0.373 ± 0.023) ($P < 0.001$), y entre el ácido oleico y la esencia de flores ($P < 0.001$).

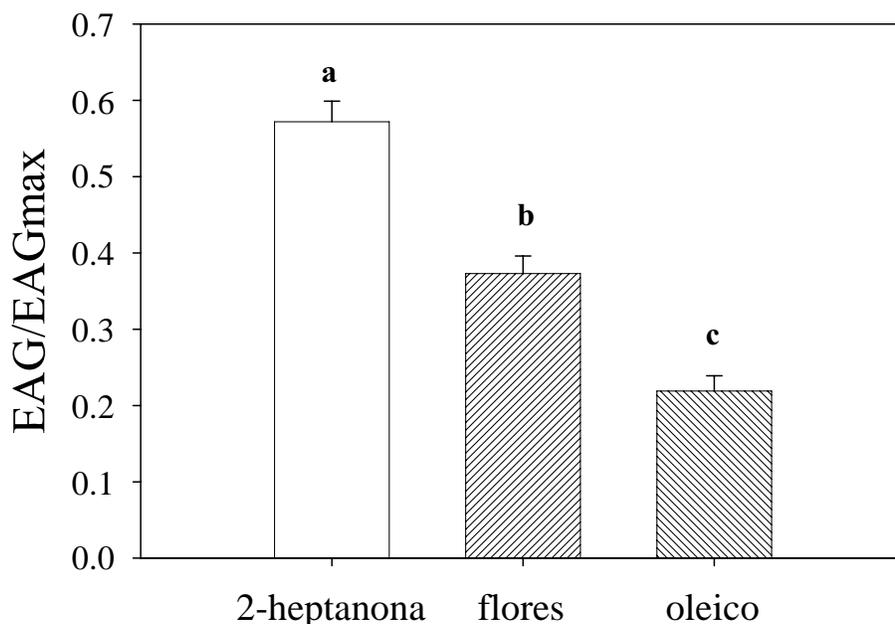


Figura 69. *Índice* $2_{EAG} \pm SE$ de todos los insectos en respuesta a los tres odorantes graficada por odorantes ($n = 128$ por cada odorante). Letras diferentes indican diferencias significativas.

2.8. Respuestas EAG de las castas a los olores: comparación entre coeficientes de correlación (datos normalizados)

Como se hizo para los datos crudos (figura 57), también para los datos normalizados se obtuvo el coeficiente de correlación y se realizó la comparación entre coeficientes de correlación entre castas por olor y entre olores por cada casta (figura 70). Los soldados presentaron el mayor coeficiente de correlación entre la respuesta y la dosis para la 2-heptanona ($r = 0.892$), las forrajeras presentaron un valor intermedio ($r = 0.816$), y las sepultureras el valor más bajo ($r = 0.684$). En el caso del ácido oleico, las forrajeras presentaron el mayor valor de coeficiente de correlación ($r = 0.222$), las sepultureras un valor intermedio ($r = 0.205$) (contrario a lo que se obtuvo para los datos crudos en donde las sepultureras presentaron el mayor coeficiente de correlación para el ácido oleico), y los soldados presentaron el valor más bajo ($r = 0.023$). Para la esencia de flores, las forrajeras presentaron el mayor coeficiente de correlación ($r = 0.516$), los soldados el intermedio ($r = 0.284$) y las sepultureras el menor ($r = 0.121$).

Con excepción de las sepultureras, con los datos normalizados los coeficientes de correlación para cada olor también fueron mayores en las castas especializadas en la tarea relacionada con dicho olor: para la 2-heptanona el mayor coeficiente de correlación lo presentaron los soldados ($r = 0.892$) y para

la esencia de flores, fueron las forrajeras la casta con el mayor coeficiente de correlación ($r = 516$). Para el ácido oleico, fueron las forrajeras ($r = 0.222$) y no las sepultureras ($r = 0.205$), las que obtuvieron el mayor coeficiente de correlación. Sin embargo y consistente con los resultados anteriores (de ANOVA y de comparación entre coeficientes de correlación de los datos crudos), el análisis estadístico de comparación entre coeficientes de correlación para los datos normalizados no detectó diferencias significativas entre las castas por olor ($P > 0.05$), por lo que se calculó el coeficiente de correlación común de las tres castas para cada olor (tabla 17), de los cuales, el de la 2-heptanona es el mayor, el de la esencia de flores intermedio y el del ácido oleico el menor, como ocurre con los resultados de la tabla 10.

Tabla 17. Coeficientes de correlación comunes para los tres olores (datos normalizados)

Olor	z_w	r_w (coeficiente de correlación común)
2-heptanona ($n = 128$)	1.180	0.827
Acido oleico ($n = 128$)	0.164	0.162
Esencia de flores ($n = 128$)	0.429	0.404

Se compararon los coeficientes de correlación entre olores para cada casta. Los resultados son consistentes con la comparación de coeficientes de correlación para los datos crudos. En las sepultureras, el análisis no detectó diferencias significativas entre coeficientes de correlación de los diferentes olores ($X^2 = 5.177$; $P > 0.05$; coeficiente de correlación común $r_w = 0.37$, a partir de la $z_w = 0.388$). Para las forrajeras se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de correlación para los diferentes olores ($X^2 = 29.71$; $P < 0.001$). La prueba *post-hoc* de Tukey detectó diferencias entre los coeficientes de correlación para la 2-heptanona y el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 7.63$); entre los coeficientes de correlación para la 2-heptanona y la esencia de flores ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 4.77$), a diferencia del análisis para los datos crudos. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los coeficientes de correlación para la esencia de flores y el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 2.87$). Para los soldados se encontró que existen diferencias significativas entre los coeficientes de correlación para los distintos olores ($X^2 = 37.56$; $P < 0.001$). La prueba de Tukey detectó diferencias entre los coeficientes para la 2-heptanona y el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 8.154$), y entre los coeficientes de correlación para la 2-heptanona y esencia de flores ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 6.55$), pero no entre los coeficientes para la esencia de flores y el ácido oleico ($q_{0.05, \infty, 3} = 3.314 < q = 1.6$).

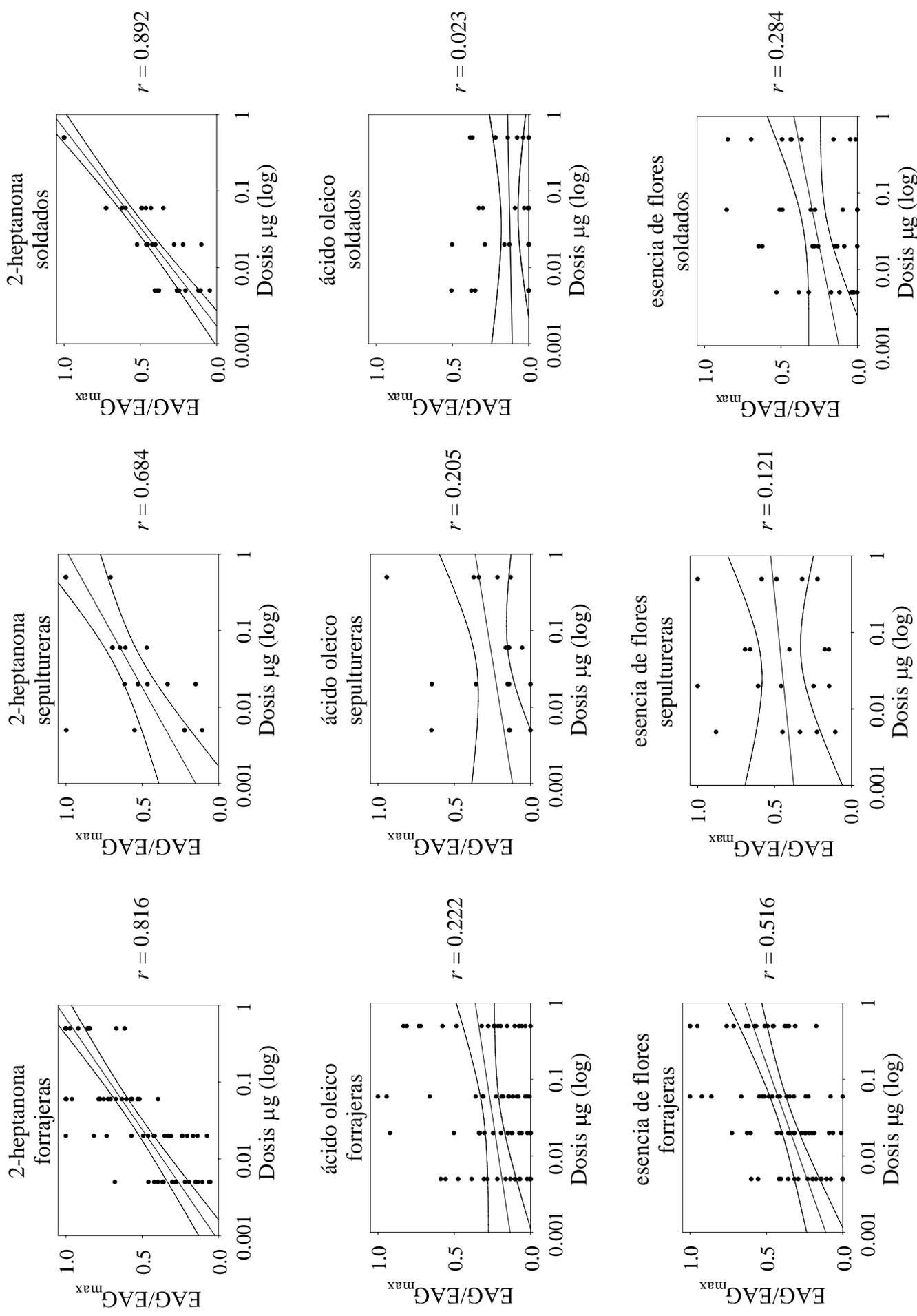


Figura 70. Gráficas de regresión lineal con sus coeficientes de correlación (r) para cada casta y odorante de los datos normalizados. Nótese la clara relación logarítmica entre la dosis y la respuesta en todas las castas en respuesta a la 2-heptanona (ver texto).

2.9. Respuestas EAG de las castas a los olores: ANOVA del Índice 3_{EAG}

Este índice indica la capacidad de respuesta de la antena (a mayor índice mayor incremento en la respuesta antenal a los cambios en la dosis). En la figura 71 se grafican estos mismos datos por casta y para cada olor. Como puede observarse, las posiciones relativas de las medias cambian con respecto a la figura 62. Para los soldados el valor del índice para la 2-heptanona es de 0.761 ± 0.044 (comparado con el de las forrajeras que es de 0.66 ± 0.047 ; mientras que para las sepultureras es de 0.518 ± 0.143). En el caso de ácido oleico, las sepultureras presentaron el valor promedio mayor: 0.187 ± 0.037 (comparado con el de las forrajeras: 0.144 ± 0.066 ; y el de los soldados: 0.055 ± 0.068). Para la esencia de flores, las forrajeras presentaron el mayor valor promedio 0.34 ± 0.05 (sepultureras: 0.123 ± 0.185 ; soldados: 0.207 ± 0.081) (tabla 18).

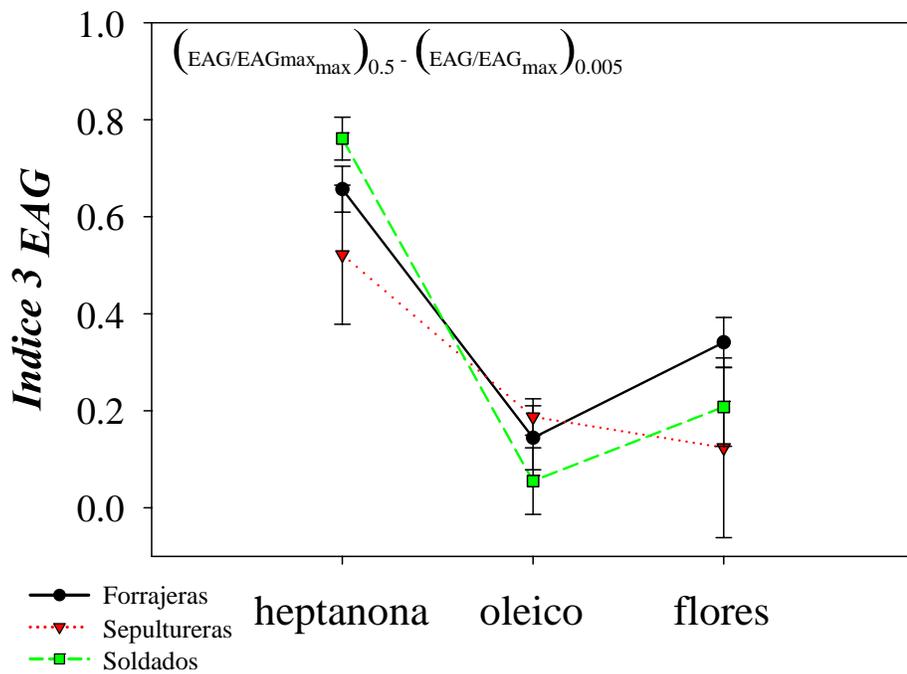


Figura 71. Índice 3_{EAG} graficado para cada casta por odorante. Las barras indican el error estándar. La gráfica superpuesta corresponde a la hipótesis. Ver texto.

Tabla 18. Medias y desviaciones del Índice $2_{EAG} = [(EAG/EAG_{max})_{0.5 \mu g} - (EAG/EAG_{max})_{0.005 \mu g}]$

Castas	2-heptanona		Ácido oleico		Esencia de rosas	
	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.	Media	Desv. Stndr.
Forrajeras ($n = 18$)	0.656	0.200	0.144	0.280	0.341	0.216
Sepultureras ($n = 5$)	0.521	0.320	0.187	0.084	0.123	0.414
Soldados ($n = 9$)	0.761	0.132	0.055	0.205	0.207	0.243

El análisis de ANOVA detectó efecto de olor ($F = 33.1$; $df = 2$; $P < 0.001$), pero no efecto significativo de casta ($F = 1.16$; $df = 2$; $P = 0.32$), ni interacción casta x olor ($F = 1.6$; $df = 4$; $P = 0.18$) (figura 72). Para el efecto de olor (figura 73), la prueba de Tukey detectó diferencias significativas entre todos los olores: entre 2-heptanona (0.655 ± 0.037) y ácido oleico (0.126 ± 0.042) ($P < 0.001$); entre 2-heptanona y esencia de flores (0.27 ± 0.047) ($P < 0.001$), y entre esencia de flores y ácido oleico ($P = 0.045$).

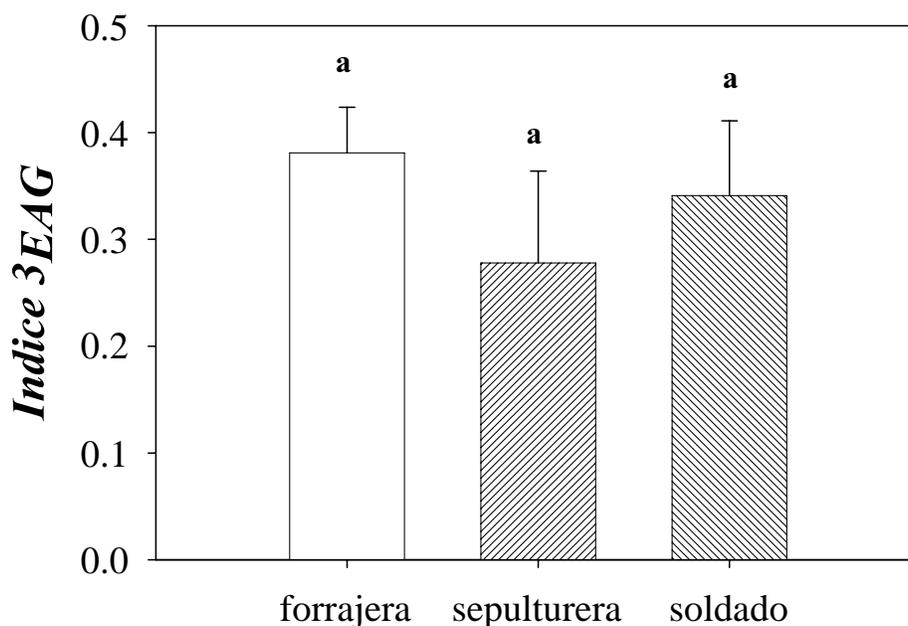


Figura 72. Medias \pm error estándar del $Índice\ 3_{EAG}$ a todos los odorantes, graficados por casta EAG ($n_{forrajeras} = 54$; $n_{sepultureras} = 15$; $n_{soldados} = 27$). Letras similares indican que no hay diferencias significativas. ($Índice\ 3_{EAG}$ forrajeras: 0.381 ± 0.03 ; $Índice\ 3_{EAG}$ sepultureras: 0.278 ± 0.06 ; $Índice\ 3_{EAG}$ soldados: 0.341 ± 0.04).

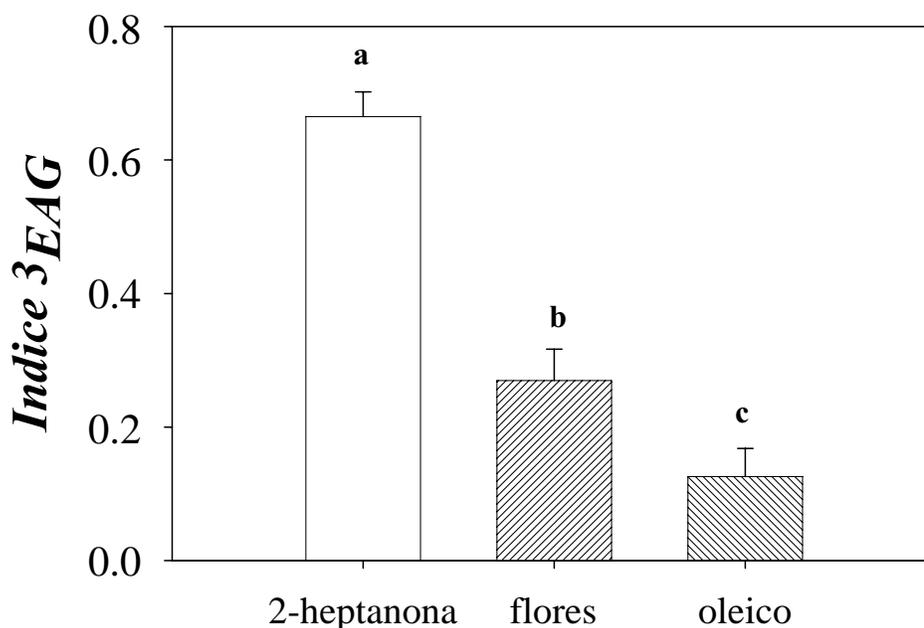
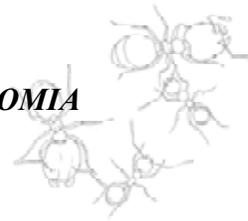


Figura 73. $Índice\ 3_{EAG} \pm SE$ de todos los insectos en respuesta a los tres odorantes graficada por odorantes ($n = 128$ por cada odorante). Letras diferentes indican diferencias significativas.

3· RESULTADOS III: NEUROANATOMIA



3.1. Estructura de lóbulos antenales

Los resultados neuroanatómicos, para determinar la estructura del LA y las conexiones hacia los CF, se obtuvieron a partir del procesamiento de 166 cerebros de *C. ocreatus* y 150 de *A. mexicana*.

A partir de las secciones ópticas se determinó la estructura general de los LA de las hormigas *Atta mexicana* y *Camponotus ocreatus*. Debido a que el procedimiento quirúrgico para colocar la neurobiotina en el nervio antenal (NA) requiere de exponerlo y sacarlo fuera del escapo de la antena, en muchas preparaciones el NA sufrió daños irreversibles que impidieron que el trazador entrara en los axones y llegara a las terminales nerviosas en el LA. Cuando se inmoviliza la hormiga en la cera caliente, las antenas también deben inmovilizarse para poder sacar el NA. Cualquier exceso de temperatura al calentar la cera o exceso de fuerza en la manipulación de las antenas o durante su inmovilización o durante el corte de la cutícula del escapo puede romper el NA en su parte más proximal (hacia el LA), de manera que, aún logrando inmovilizar la antena y aún logrando colocar los cristales de neurobiotina, estos podrían ingresar en el NA si continúa vivo, pero su transportación interna hacia las terminaciones nerviosas se vería interrumpida antes de llegar al LA, por lo que no se lograría tinción en los glomérulos del LA. Si esto ocurre, sólo puede saberse hasta que los cerebros son procesados en su totalidad. Es por esto que no se pudo determinar la estructura del LA de obreras de menor tamaño que las soldados, mucho menos de las obreras *minor*, las cuales fueron consideradas como individuos importantes en la comparación neuroanatómica con las obreras de mayor tamaño. Debido a que sus antenas son tan delgadas y frágiles, no pudo mantenerse el NA vivo que transportara exitosamente el trazador hasta el cerebro. Así, la descripción de la estructura del LA se realizó sólo para soldados.

La inmersión de los cerebros deshidratados en metil salicilato produjo cerebros con una alta transparencia, ideales para el “seccionado” óptico por microscopía confocal a partir de los cerebros completos y sin necesidad del seccionado tradicional. Sin embargo, se ha reportado que este procedimiento podría encoger el tejido en un 10-20% (Galizia et al., 1999a). Para la determinación de la estructura del LA, este encogimiento no es relevante, ni siquiera cuando se practica morfometría ya que esta se realizaría con cerebros procesados de la misma manera. En este trabajo no se realizó morfometría debido a la baja resolución de muchas series de las imágenes confocal.

La aplicación de neurobiotina al NA y su posterior marcaje o revelado con avidina conjugada con rojo Texas proporcionó una fuerte tinción de todos los glomérulos del LA y de la región del CMMA. En todas las preparaciones, el NA estuvo fuertemente marcado y con apariencia muy brillante. Debido a que el marcaje proviene de los axones de las NRO, en algunas preparaciones sólo la corteza de los glomérulos presenta fluorescencia ya que las terminales sinápticas llegan a la corteza y es ahí donde se conectan con las neuronas centrales. En las imágenes puede observarse claramente la corteza de los glomérulos teñida y el centro oscuro, sin tinción fluorescente (figura 74).

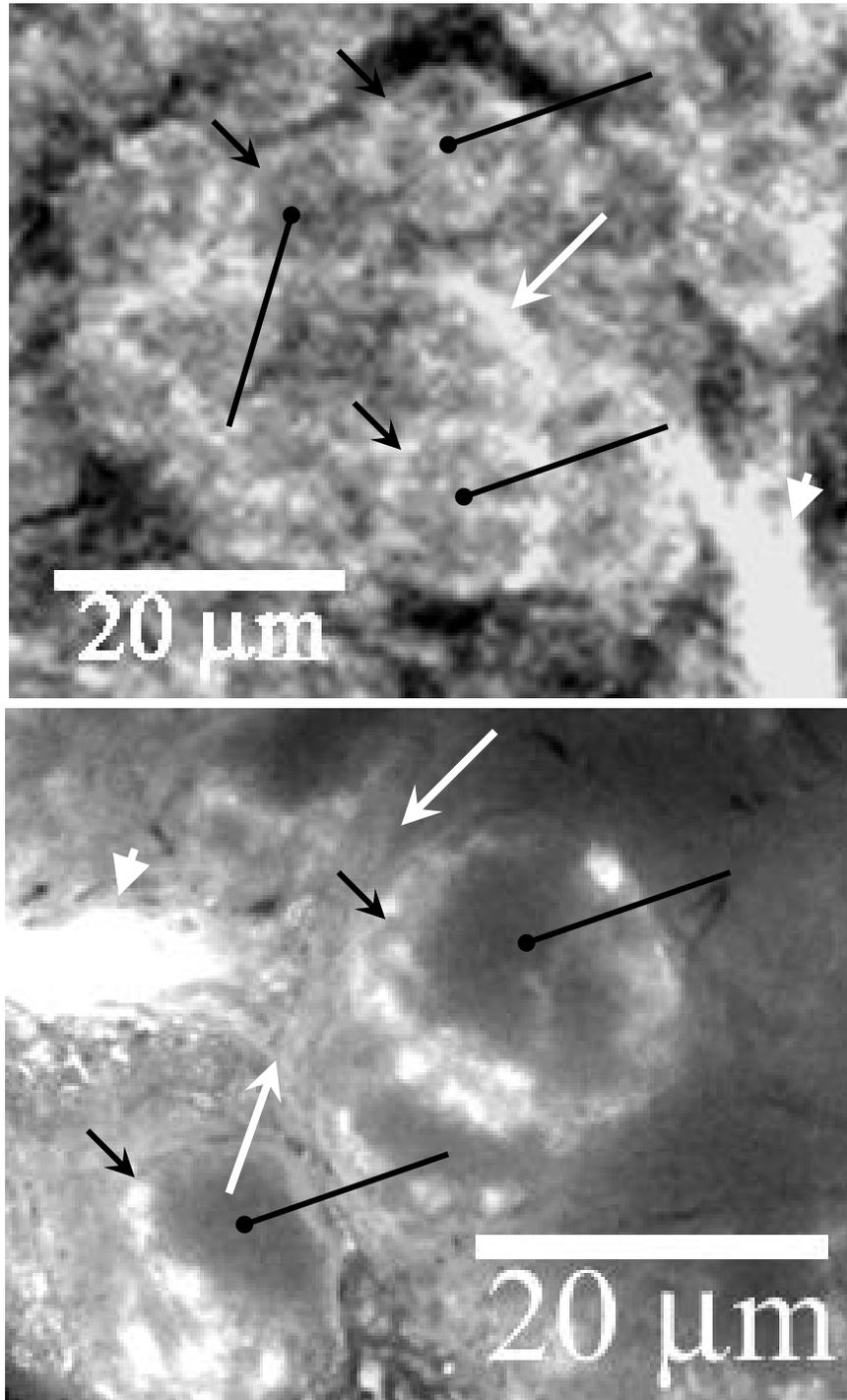


Figura 74. Detalle de la vista de los glomérulos en secciones ópticas obtenidas mediante microscopía confocal. En la parte superior se muestran glomérulos de *A. mexicana*, mientras que en la parte inferior para *C. ocreatus*. Las cabezas de flecha blancas indican uno de los tractos en los que se divide el NA. Las flechas negras indican la zona de la corteza de los glomérulos. Las flechas negras con terminaciones en punto indican el centro de los glomérulos. Las flechas blancas indican axones que salen del tracto y que pasan rodeando los glomérulos hasta que mandan terminaciones hacia ellos.

Los glomérulos individuales están rodeados de una capa de procesos gliales que no puede observarse en las preparaciones realizadas con trazadores fluorescentes pues sólo las terminales de las NRO han sido teñidas. Sin embargo, la tinción y la resolución de las imágenes permite identificar a los glomérulos como unidades discretas de neuropilo así como al patrón de inervación: los centros de los

glomérulos permanecieron sin tinción y oscuros (en la mayoría de las preparaciones), pero la corteza, que puede tener 5-10 μm de grosor, se marcó intensamente debido a las ramificaciones de las neuronas marcadas (las NRO). Como se observa en la figura 74, de los tractos que se forman a partir del NA emergen axones que pasan entre los glomérulos hasta llegar a alguno de ellos.

En *A. mexicana* el patrón de tinción es variable de un individuo a otro. Probablemente esto se deba a algún artefacto del procedimiento experimental, por lo que podría no haber relación con la arquitectura del glomérulo (figura 75) ya que la tinción que proporciona el procedimiento de trazado a partir de la colocación de cristales de neurobiotina en el NA proviene de las terminaciones axónicas de las NRO que se dirigen hacia la corteza de los glomérulos en donde establecen sinapsis con neuronas centrales (NP y NL). Las imágenes también muestran los tractos en los que se divide el NA y que inervan distintos grupos de glomérulos. Estos tractos, al provenir del NA, también se marcaron fuertemente y, en la mayoría de las preparaciones, se observan muy brillantes.

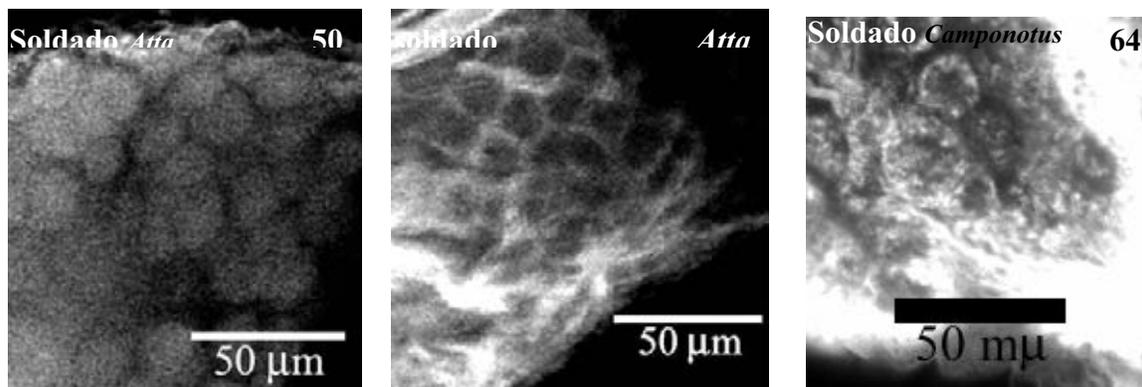


Figura 75. Detalle del patrón de tinción de los glomérulos del LA de *A. mexicana* y *C. ocreatus*. Aunque todos los individuos de *C. ocreatus* mostraron el mismo patrón de tinción, en *A. mexicana* este patrón presentó variaciones con los individuos, por lo que podría deberse a un artefacto del procedimiento y no de la arquitectura neural de los glomérulos.

3.1.1. Organización general de los LA

A pesar de pertenecer a subfamilias distantes, *Atta mexicana* y *C. ocreatus* presentan una organización similar de los LA (distribución de fibras desde las NRO, distribución e inervación de los glomérulos, etc.), lo cual sugiere una importante homogeneidad estructural en Formicidae e incluso en los himenópteros aculeatos (ver más adelante).

Los axones aferentes sensoriales de las NRO llegan juntos al LA a través del NA. Una vez que ha llegado al deutocerebro, el NA se divide en tractos que se distribuyen hacia diferentes regiones del LA, inervando diferentes grupos de glomérulos. Tanto en *A. mexicana*, como en *C. ocreatus*, el NA se divide en 8 tractos principales que llegan al LA desde las antenas, dos de los cuales se dirigen hacia el CMMA y al protocerebro y, probablemente como en las abejas, hacia el ganglio subesofágico (aunque estos tractos no se pudieron observar en las imágenes obtenidas), mientras que los otros 6 se distribuyen por todo el LA. La figuras 76 y 77 muestran el centro motor y mecanosensorial (CMMA) tanto de *C. ocreatus*, como de *A. mexicana*. El CMMA se encuentra en la parte más posterior del LA y es inervado por su propio tracto, el cual se encuentra separado del tracto que forman los axones de las

NRO desde el escapo. En *A. mexicana*, este tracto se separa del NA inmediatamente después de entrar al LA rodeándolo por la parte lateral y terminando en el lóbulo dorsal. En *C. ocreatus*, el tracto hacia el CMMA se encuentra hacia la parte central del LA y aparentemente es mucho más grueso.

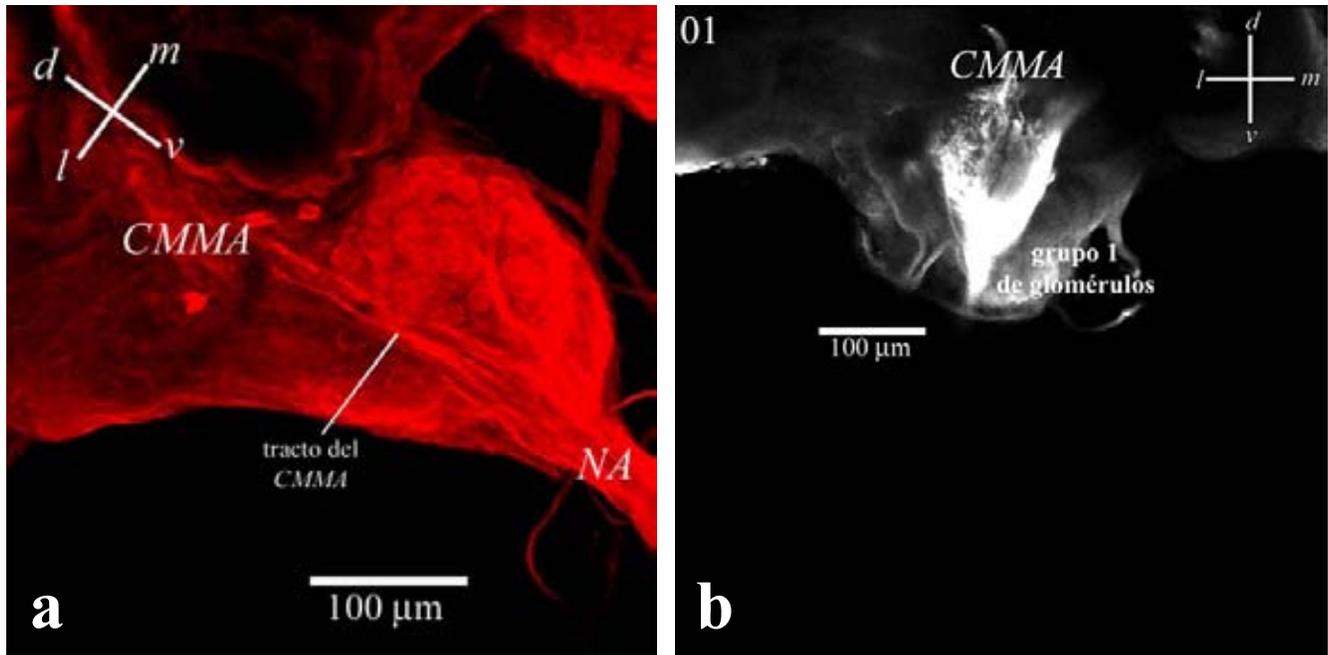


Figura 76. a) Composición de imágenes confocal del LA de *A. mexicana*. Se muestra el CMMA y el tracto que lo inerva y que proviene del NA. Se indican los ejes de orientación: *d*, dorsal; *v*, ventral; *l*, lateral; *m*, medial. En *A. mexicana*, el tracto del CMMA, termina en 4-6 estructuras de tipo glomerular que presentan una marcada tinción. b) Sección óptica confocal del LA de *C. ocreatus* el nivel del CMMA.

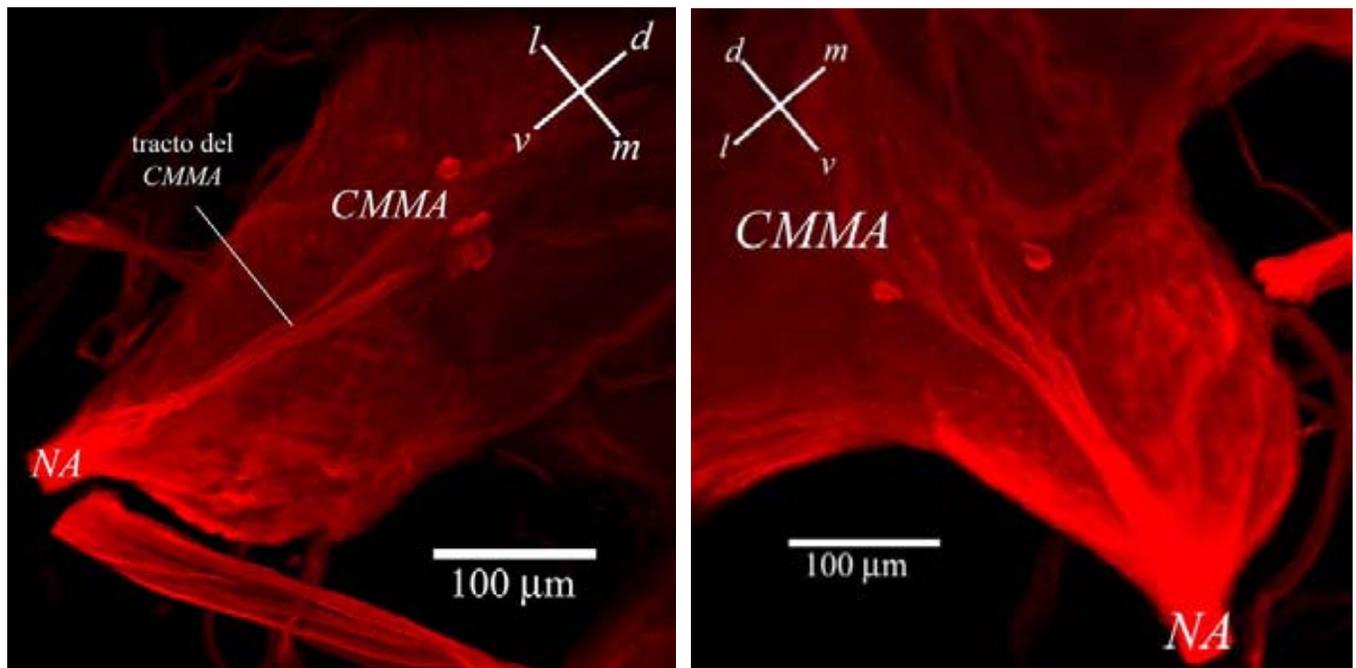


Figura 77. Composición de imágenes confocal del LA de soldados de *A. mexicana*. Se observa el CMMA y su tracto. Nótese la particular estructura de este centro en esta especie comparado con *C. ocreatus* (fig 76).

El CMMA en las hormigas está bien desarrollado, como en todas las especies con antenas grandes, largas y altamente móviles. El neuropilo de este centro está separado en dos partes, una más dorsal que es sensorial, y una hacia ventral que es el área motora (Bullock & Horridge, 1965). En *A. mexicana* el neuropilo del CMMA presenta algunas estructuras de tipo glomerular brillantemente teñidas, pero sin las características de los glomérulos (corteza fluorescente y centro oscuro). En *C. ocreatus*, el neuropilo del CMMA presenta una apariencia de tipo glomerular, pero de mucho menor tamaño, probablemente estas estructuras correspondan a los microglomérulos descritos para otras especies (Rospars, 1988) y que podrían corresponder a las terminales sinápticas mecanosensoriales y motoras.

El LA de las hormigas estudiadas tiene un centro fibroso sin glomérulos, un área ocupada por los procesos neurales de las neuronas centrales (NP, NL, NC) y por los axones de las NRO que forman los tractos que provienen del NA. Rodeando a esta región, se encuentra el neuropilo sináptico que forma los glomérulos. Finalmente, en la periferia del LA se encuentra la capa de somas neuronales y gliales.

Los soldados de *A. mexicana* presentaron un promedio de 305 ± 4 glomérulos ($n = 3$) en el LA, mientras que los soldados de *C. ocreatus* presentaron 380 ± 4 glomérulos ($n = 3$). Estos glomérulos se distribuyen en 6 grupos de glomérulos inervados por los 6 tractos en los que se divide el NA en el LA. Los grupos de glomérulos se han definido en términos, no sólo de posición, sino principalmente en términos del tracto que los inerva. Así, un grupo de glomérulos es aquel grupo inervado por su propio tracto nervioso derivado directamente del NA cuando entra al LA.

En la figura 78 se esquematiza la posición de los grupos de glomérulos. La numeración de estos grupos de glomérulos y sus respectivos tractos en las hormigas *A. mexicana* y *C. ocreatus* se ha realizado basándose en la nomenclatura de los LA de las abejas (Suzuki, 1975; Arnold et al., 1985; Arnold et al., 1988; Galizia et al., 1999a).

Sin embargo, en las abejas sólo se han descrito 4 grupos de glomérulos y 4 tractos que los inervan (T1-T4), y en las hormigas estudiadas en esta tesis se encontraron 6 grupos y 6 tractos (T1-T6). Probablemente la organización del LA en abejas sea homóloga a la de las hormigas, sugiriendo una homogeneidad estructural entre los himenópteros aculeatos. Los tractos T1-T4 de las abejas pueden reconocerse en las hormigas aproximadamente en las mismas posiciones relativas, pero además, en las hormigas dos tractos más se reconocieron: un quinto gran tracto (T5) que se forma en la parte más frontal y ventral del LA, justo cuando el NA entra al LA, y que recorre la parte central del LA dividiéndolo en porción izquierda y porción derecha e inervando un gran grupo frontal y lateral de glomérulos; y un sexto tracto (T6) más delgado que se forma al entrar el NA en su parte más posterior, o caudal, y ventral y que inerva un grupo posterior de glomérulos. En esta región caudal y ventral, el NA se divide en dos tractos, el T1 y el T3. El T3 se dirige frontalmente para inervar al grupo 3 de glomérulos que se encuentra en la parte intermedia y frontal medial del LA. En las abejas, Arnold et al. (1985; 1988) distinguieron diferentes regiones en el LA que corresponden con los tractos aferentes del NA.

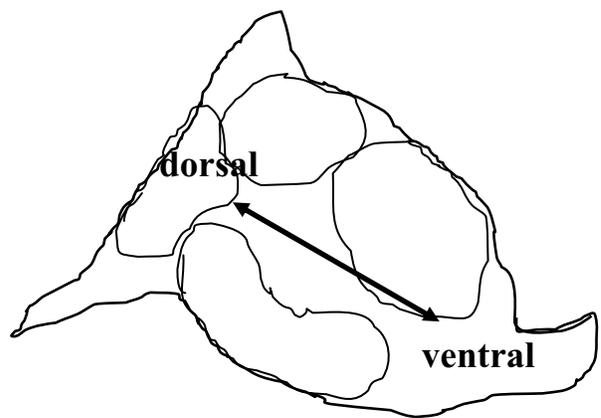
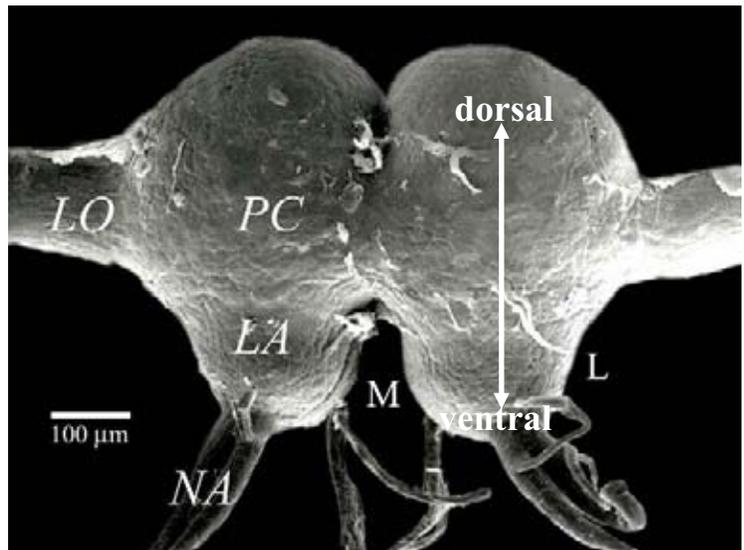
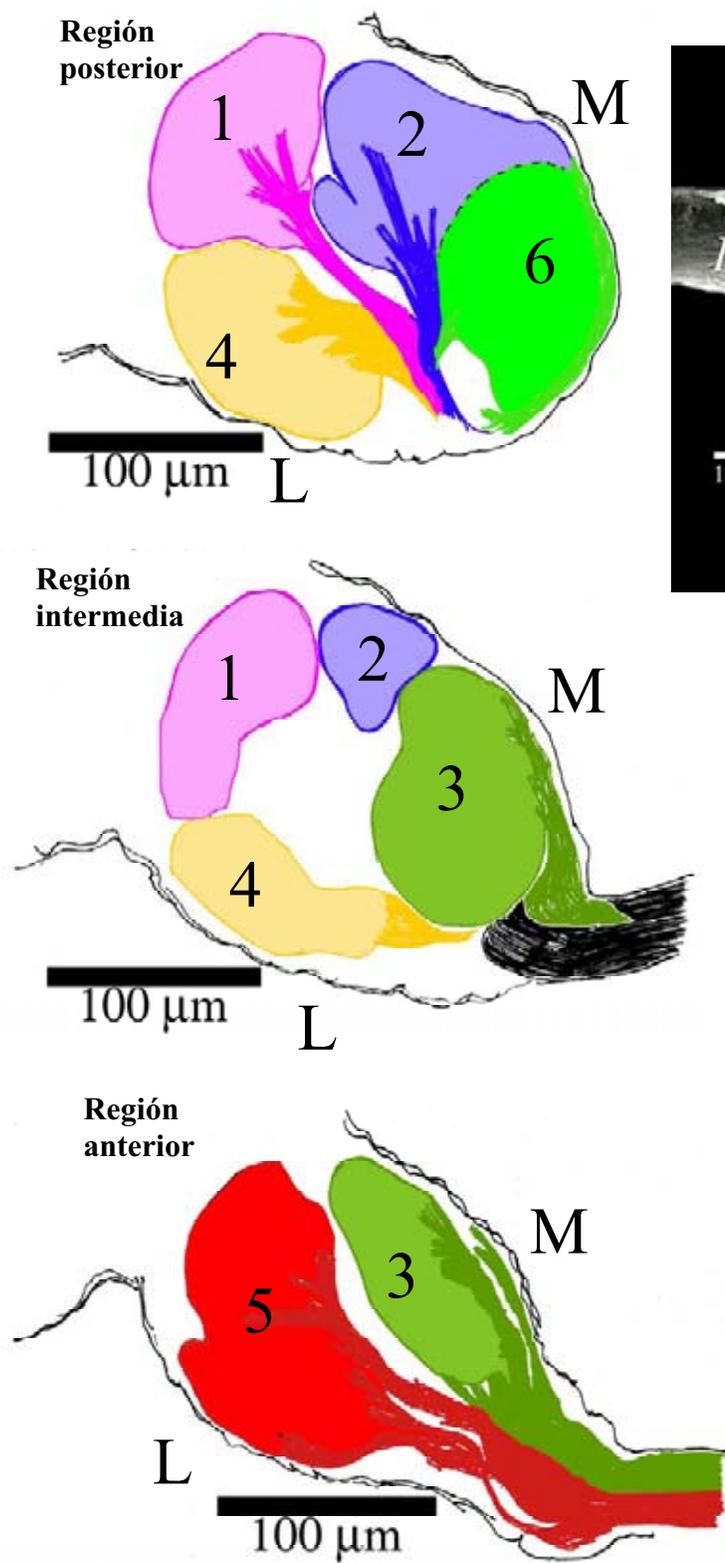


Figura 78. *Izquierda.* Dibujos realizados a partir de las secciones ópticas, en las que se muestran los grupos principales de glomérulos y sus respectivos tractos en códigos de color. En el recuadro de la izquierda, se indica la posición de los grupos de glomérulos (anterior = frontal; posterior = caudal). Se han descrito, tanto en *A. mexicana* como en *C. ocreatus*, 6 grupos principales de glomérulos. L = región lateral del cerebro; M = región medial. *Derecha y arriba.* La microfotografía de microscopía electrónica de barrido de la derecha muestra un cerebro de *Camponotus* con la finalidad de ubicar las regiones medial y lateral, y anterior y posterior (modificado de Gronenberg, 1996b). El esquema abajo de la fotografía, indica el plano dorsal y ventral de los dibujos de la izquierda (ventral = hacia el NA; dorsal = hacia el protocerebro).

Sin embargo, en las hormigas estas regiones no corresponden adecuadamente con los grupos y tractos debido a la presencia de dos tractos y dos grupos de glomérulos más. Además, las regiones encontradas en los LA de las hormigas están relacionadas con las conexiones hacia el protocerebro, por lo que, en las hormigas se definieron las siguientes regiones:

1. Región posterior. Es la región más caudal, y puede dividirse en:
 - a) Región posterior y medial. Comprende el tracto T6 y al grupo 6 de glomérulos.
 - b) Región posterior intermedio-medial. Comprende el tracto T2 y el grupo glomerular 2.
2. Región anterior. Está compuesta por dos regiones:
 - a) Región intermedio-dorsal y central. Contiene los tractos T1 y T4, y los grupos glomerulares 1 y 4. El grupo 1 está situado dorsalmente, mientras que el grupo 4 está se encuentra hacia lateral.
 - b) Región anterior y ventral. Esta es la región más anterior, donde los tractos T3 y T5, así como los grupos glomerulares 3 y 5 se encuentran ubicados.

3.1.2. Grupos de glomérulos y tractos

Los grupos de glomérulos del LA tienen diferente tamaño y número de glomérulos. Sin embargo, el número de glomérulos por grupo no se logró contabilizar debido a la baja resolución de muchas de las secuencias de imágenes confocal. Sin embargo, la posición de los grupos glomerulares y la trayectoria de los tractos pudieron determinarse claramente. Exclusivamente por criterios morfológicos y topográficos, los grupos de glomérulos y los tractos que los inervan pueden clasificarse en dos: 1) Grupos de glomérulos inervados por tractos que atraviesan el LA por el centro de neuropilo: T1, T2 y T4; y 2) Grupos de glomérulos inervados por tractos que rodean el centro de neuropilo y a los glomérulos: T3, T5 y T6. Las características de los tractos y grupos de glomérulo son las siguientes:

1. Tracto T1 y grupo 1. Aunque no es el primer tracto anterior ni posterior, tiene esta nomenclatura debido a los trabajos previos realizados por otros autores en abejas ya mencionados. El tracto T1 es un tracto muy grande y grueso que atraviesa diagonalmente el LA por su centro de neuropilo y en la región intermedia, desde su origen en la parte ventral y lateral, hasta llegar al grupo 1 de glomérulos que es el grupo más dorsal y más grande. Tanto el T1 como el grupo 1 son tan grandes que pueden distribuirse en gran parte del volumen del LA. En su parte más frontal y ventral, el T1 se localiza junto con el T4, formando parte de un grueso tracto que se forma a partir del NA después de entrar al LA. Inmediatamente después de ingresar al LA, este grueso tracto se divide para formar los tractos T1 y T4.
2. Tracto T2 y grupo 2. El tracto T2 se encuentra también en la región intermedia, pero más posterior al T1. Es un tracto también grueso y largo que también atraviesa

diagonalmente el LA por su centro de neuropilo desde su origen ventral y ligeramente lateral, que se forma a partir del NA cuando este entra al LA. En esta parte del LA, el T2 forma un paquete mayor muy corto compuesto también por el tracto que se dirige hacia el CMMA y que se separa inmediatamente después de que el NA entra al LA. El T2 recorre diagonalmente el LA hasta inervar al grupo 2 que se encuentra hacia la parte dorsal y medial. Este grupo de glomérulos también es grande y se encuentra distribuido en gran parte del LA.

3. Tracto T3 y grupo 3. El tracto T3 se forma en la región frontal y medial a partir del NA cuando ingresa al LA, y se encuentra en la región anterior y ventral del LA. Aunque en su porción más distal se encuentra unido a la base del tracto T5, se separa inmediatamente de él y se dirige hacia la parte medial del LA y corre en la periferia rodeando e inervando al grupo 3 de glomérulos (no atraviesa el centro del LA), el cual es un grupo muy pequeño, localizado en la región frontal y medial del LA.
4. Tracto T4 y grupo 4. Como se mencionó antes, el T4 se encuentra unido en su base con el T1 justo cuando el NA entra al LA en la región intermedia. Es un corto pero grueso tracto claramente distinguible del T1 que se separa rápidamente de este último y que recorre una corta distancia por el centro neuropilar del LA en su región intermedia lateral que pronto distribuye axones a los glomérulos del grupo 4. Este grupo de glomérulos también es grande y se ubica en la región intermedia lateral, frontalmente al grupo de neuronas centrales lateral (*GNC lateral*; véase más adelante).
5. Tracto T5 y grupo 5. Tanto el tracto T5 como el grupo 5 no han sido descritos en abejas, por lo que es probable que sea exclusivo de las hormigas. En su origen, cuando el NA entra al LA, está unido al T3, el cual se separa y se dirige hacia la periferia de la región medial del LA. Por el contrario, el T5 continúa en línea recta y se separa en pequeños tractos, el principal de ellos recorre la parte central del LA dividiéndolo en mitades izquierda y derecha; la otra porción del T5 se dirige hacia la periferia de la región lateral. Las dos porciones del T5 inervan al grupo 5 de glomérulos, el cual es el más frontal de los grupos y se localiza en la región anterior y ventral.
6. Tracto T6 y grupo 6. Tampoco han sido descritos en abejas. Es un delgado tracto que se forma a partir del NA y se dirige hacia la región más posterior y recorre la periferia del LA en su región medial. Inerva al pequeño grupo 6 que se localiza en la región ventral y posterior y hacia medial, muy cerca del CMMA.

3.1.3. Grupos de neuronas centrales del LA

Se encontraron cinco principales grupos de somas neuronales en el LA de *A. mexicana* y de *C. ocreatus* (figura 79, 80 y 81): 1) Grupo de Neuronas Centrales Medial-posterior; 2) Grupo de Neuronas Centrales lateral; 3) Grupo de Neuronas Centrales medial; 4) Grupo de Neuronas Centrales dorsal (el más grande), y 5) Grupo de Neuronas Centrales anterior (el más pequeño).

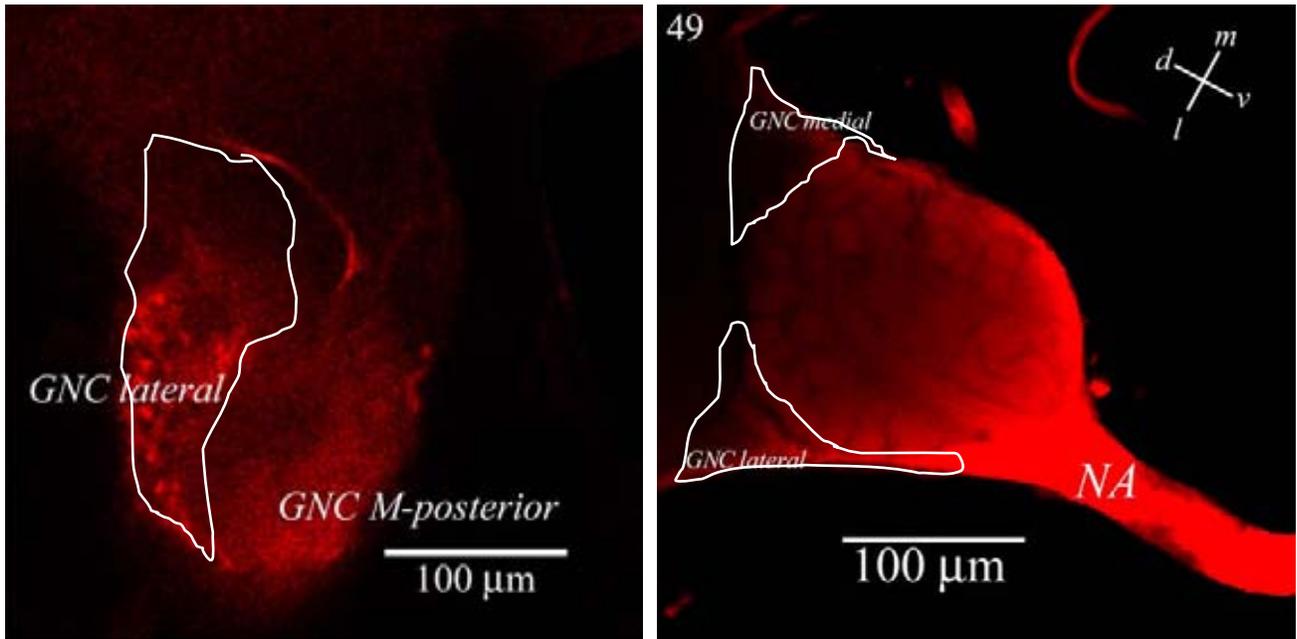


Figura 79. Secciones ópticas confocal mostrando los grupos de neuronas centrales (GNC) indicados por los contornos de líneas blancas en el LA de soldados de *A. mexicana*. NA, nervio antenal; d, dorsal; v, ventral; l, lateral; m, medial.

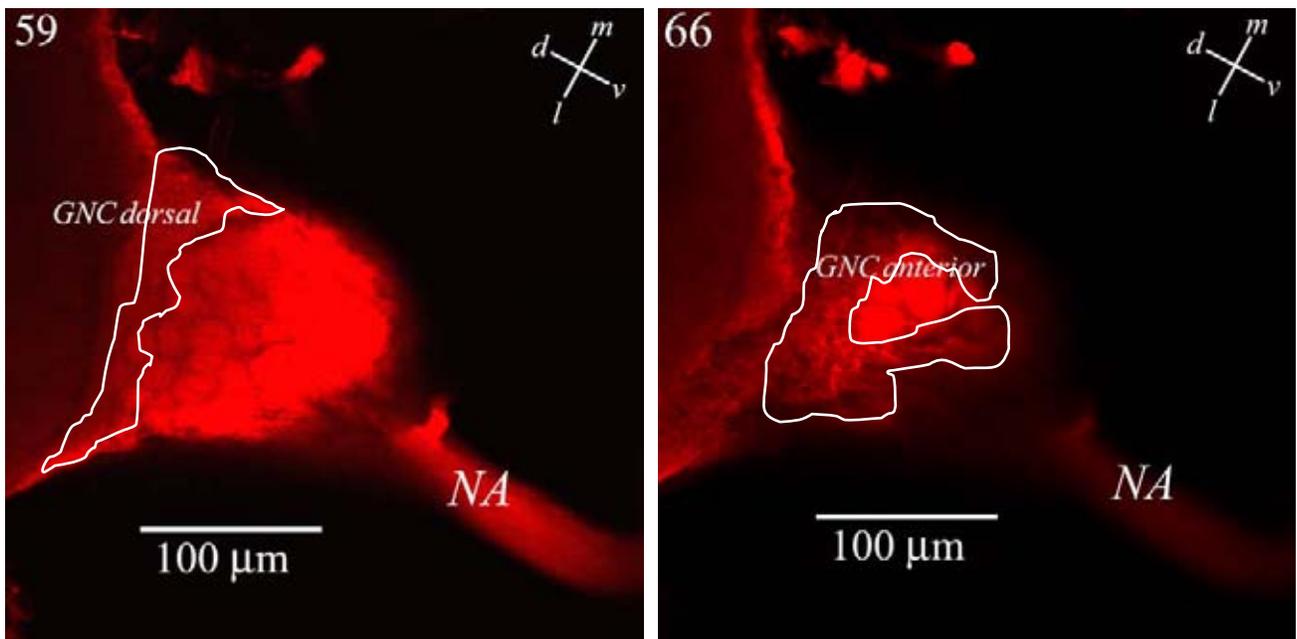


Figura 80. Secciones ópticas confocal donde se muestran los grupos de neuronas centrales (GNC) más frontales de soldados de *A. mexicana*. NA, nervio antenal; d, dorsal; v, ventral; l, lateral; m, medial.

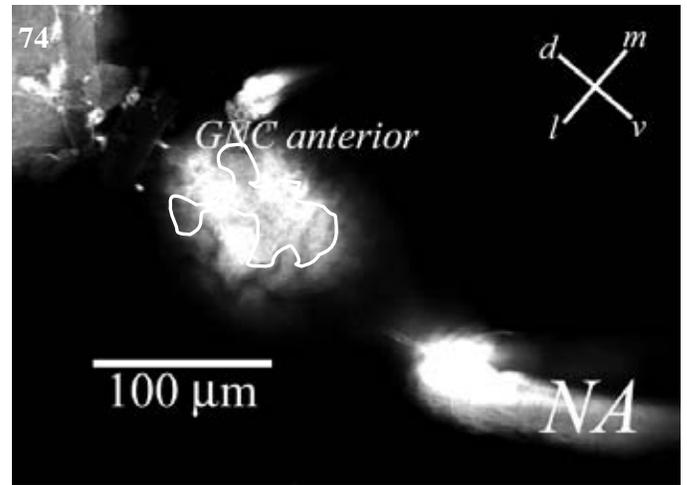
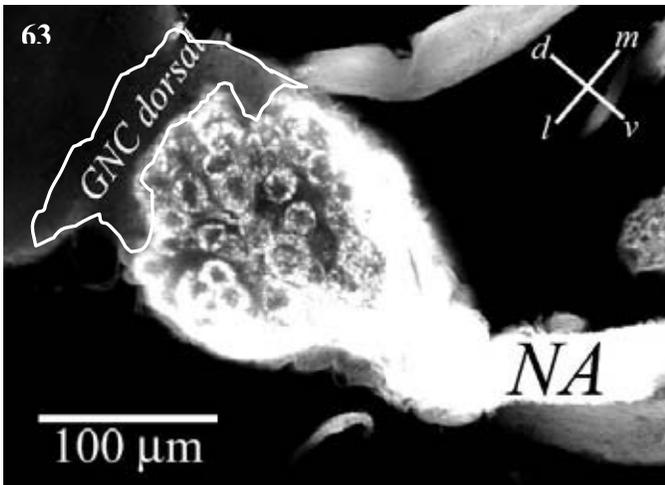
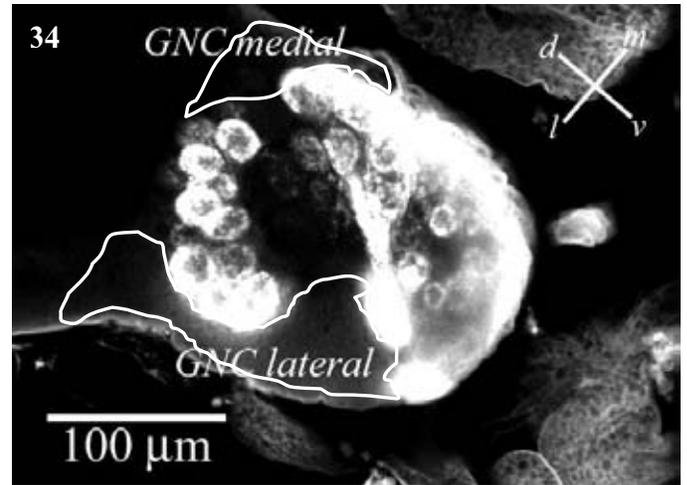
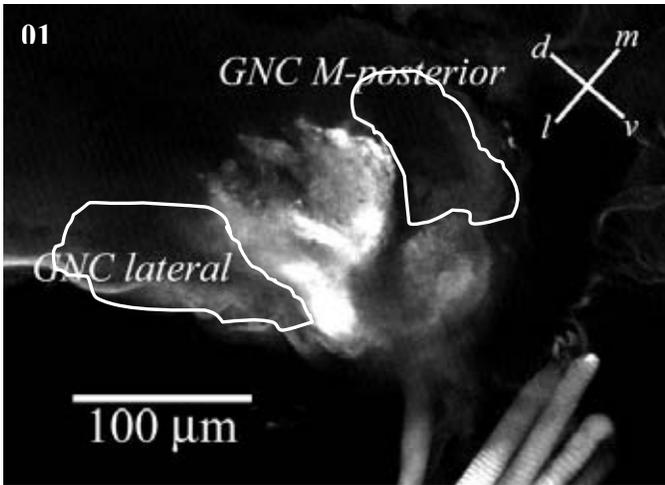


Figura 81. Secciones ópticas confocal del LA de un soldado de *C. ocreatus*. Se muestran los grupos de neuronas centrales (GNC). *M*, medial; *L*, lateral.

3.1.4. Lóbulos antenales de soldados de *Atta mexicana*

Aunque la organización de los LA en *A. mexicana* y *C. ocreatus* es muy similar, existen diferencias importantes. En *A. mexicana* hay menos glomérulos y estos son menos uniformes, con glomérulos pequeños y glomérulos grandes, mientras que en *C. ocreatus* los glomérulos son más uniformes.

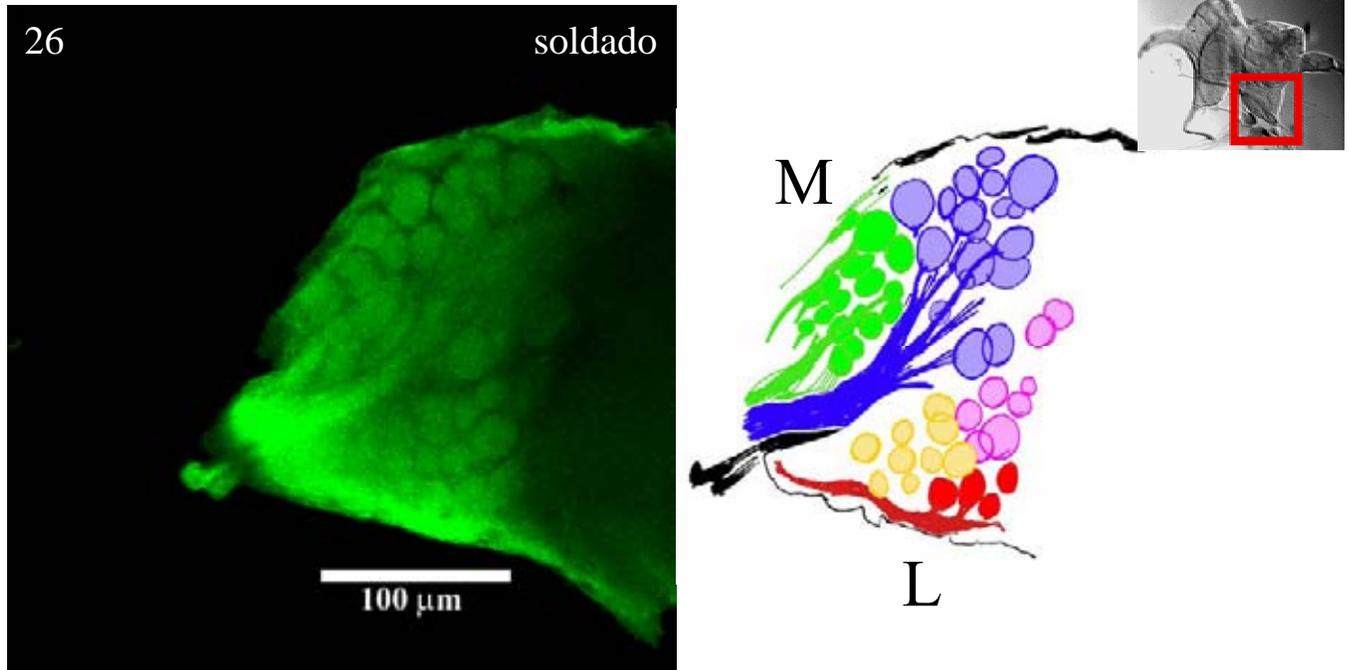


Figura 82. LA de obreras de *A. mexicana*. Se trata del LA izquierdo. La posición relativa de los grupos de glomérulos se mantiene constante entre los soldados. En esta figura se observan los grupos 2 y 3 y algunos glomérulos del grupo 1, 4 y 5.

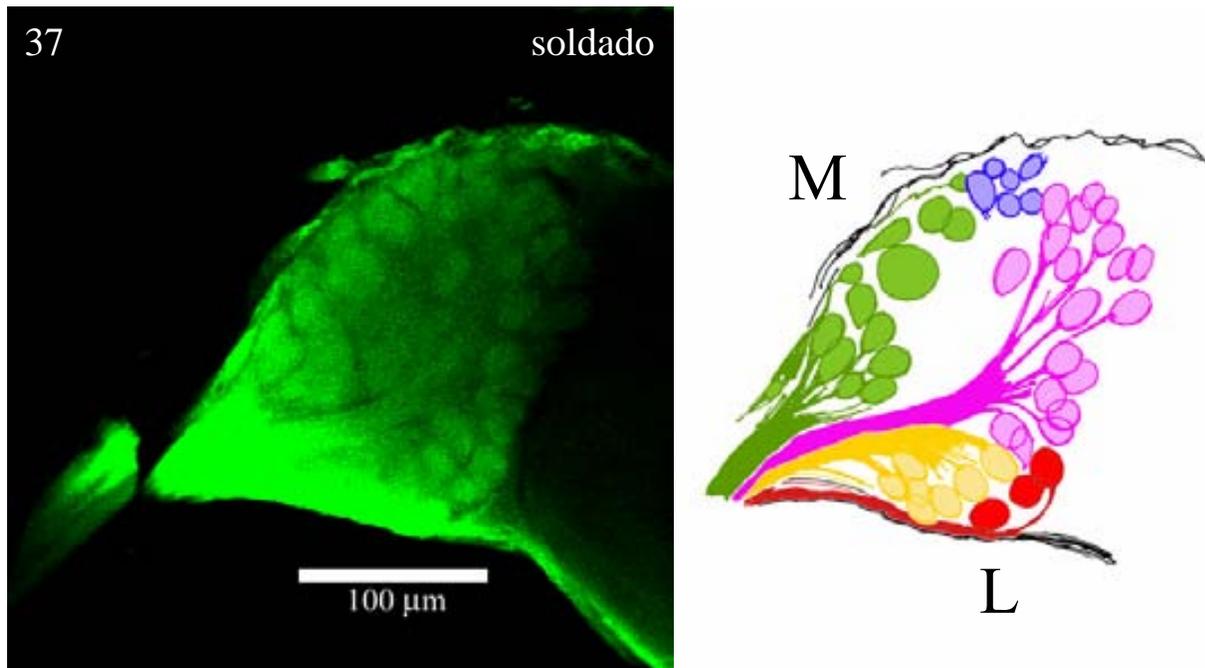


Figura 83. Grupo 4. En esta figura se muestra el grupo glomerular 4 (en amarillo). Puede apreciarse que, como en *C. ocreatus*, en su base hacia la parte anterior, el tracto 3, en su parte más ventral, se une al tracto 1, y al 4 y que innerva al grupo 4.

Además, como se observa en las figuras 84 y 85 en los soldados de *A. mexicana* se observó la presencia de 3-4 glomérulos aparentemente más grandes en los grupos 3 y 5.

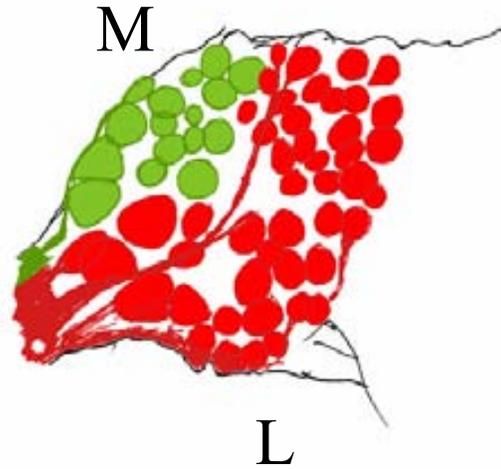
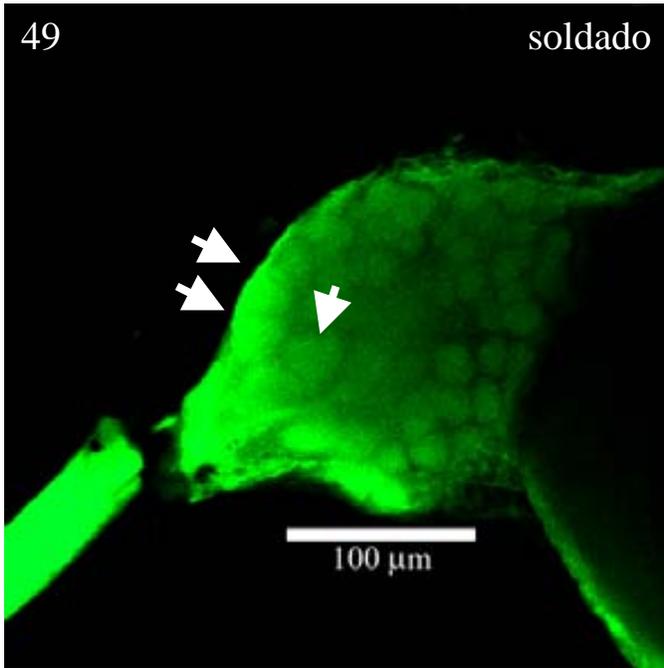


Figura 84. En esta figura se muestra el principio del último grupo de glomérulos, el grupo 5, con su tracto correspondiente, el tracto T5. Este tracto y el tracto 3, se separan inmediatamente al entrar al LA y se dirigen más hacia la parte anterior, innervando grupos de glomérulos diferentes. El tracto 5 innerva a un grupo anterior de glomérulos que pueden verse en la parte central del LA. El tracto 3 se divide para dar lugar a una parte que se dirige hacia la región medial e innerva al grupo 3. Las flechas indican los macroglomérulos.

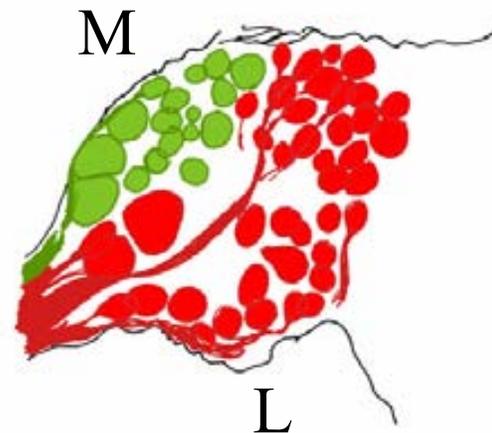
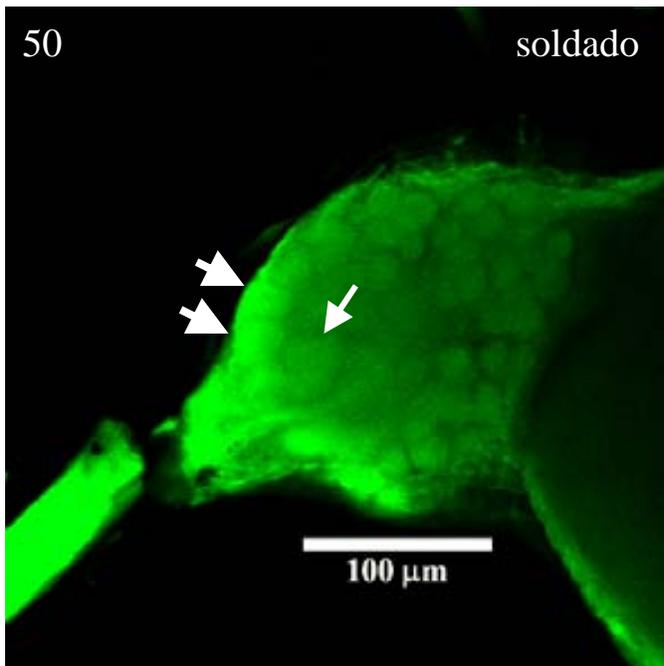


Figura 85. Se observan los grupos 3 y 5. Comparando el tamaño aparente de la mayoría de los glomérulos en *A. mexicana*, se observan algunos glomérulos más grandes (flechas) en el grupo 3 y 5. No se consideran macroglomérulos *sensu stricto* sino, probablemente que los otros glomérulos se encuentran ligeramente atrofiados, mientras que estos se encuentran bien desarrollados y agrandados probablemente debido al procesamiento de señales especializadas relacionadas con la tarea de defensa.

3.1.5. Lóbulos antenales de soldados de *Camponotus ocreatus*

Los glomérulos del LA de *C. ocreatus* son ven más uniformes y los tractos más gruesos y brillantes. Además, hay mayor número de glomérulos, los cuales se ven más uniformes, excepto por un gran glomérulo en el grupo glomerular 4 y otro en el 5 (figura 87 y 89).

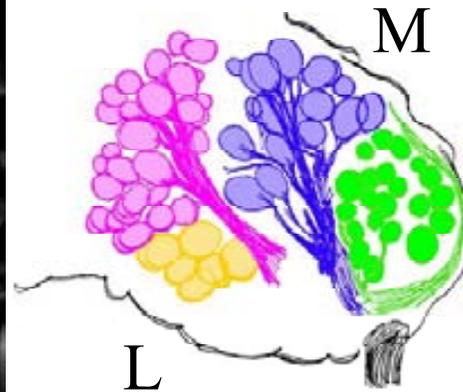
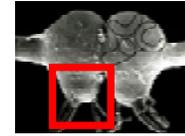
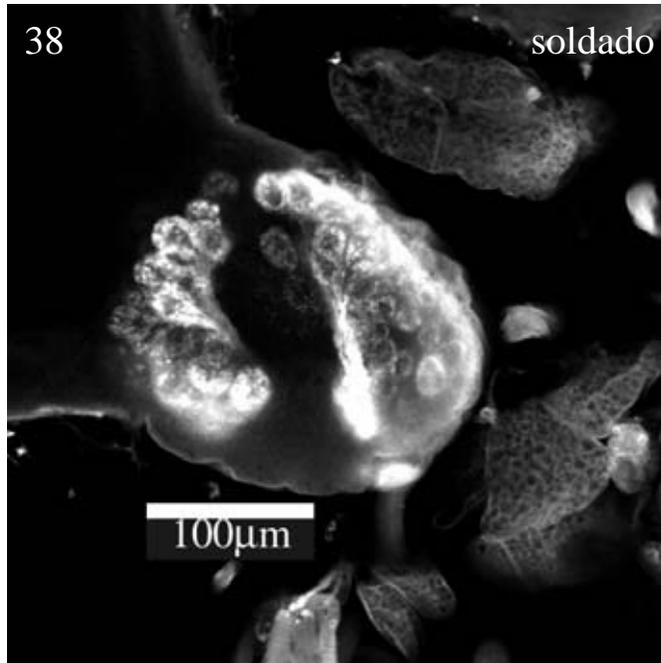


Figura 86. Sección óptica y dibujo donde pueden apreciarse los grupos glomerulares 1, 2, 6 con sus respectivos tractos T1, T2 y T6. Se observan, además, algunos glomérulos del grupo 4 cuyo tracto T4 no se distingue en este nivel.

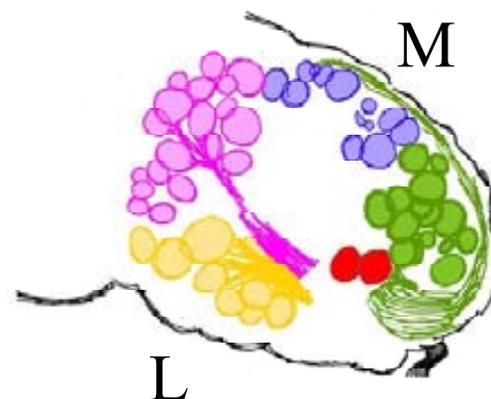
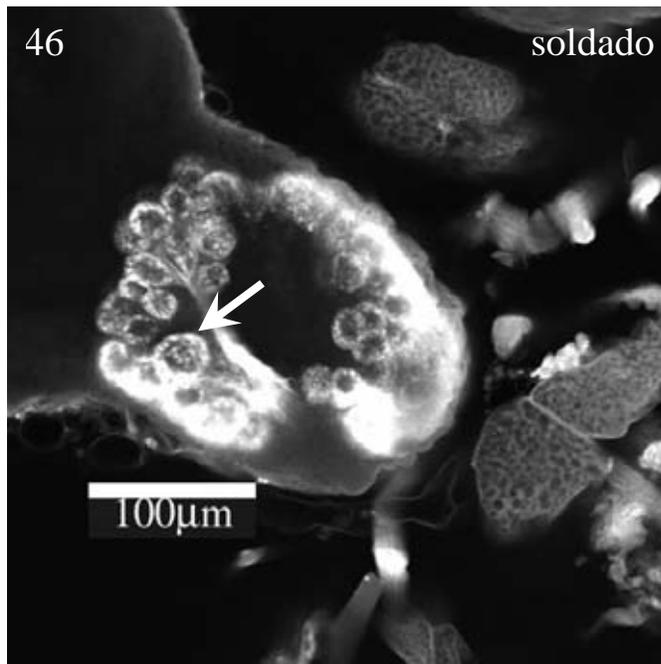


Figura 87. En esta figura se observa el grupo 3 y comienzan a observarse glomérulos del grupo 5. El grupo 3 es innervado por un tracto que se separa del resto de las fibras del NA inmediatamente después de haber entrado al LA. La base del tracto T1 está unida al tracto T4, el cual se observa, aunque corto, grueso y brillante. Se observan los glomérulos del grupo 4 y un glomérulo más grande (flecha).

Debe tenerse en cuenta que los resultados neuroanatómicos presentados para *C. ocreatus* provienen de soldados, los cuales también presentan un grado de especialización conductual, pero no de la misma magnitud que la de los soldados de *A. mexicana*.

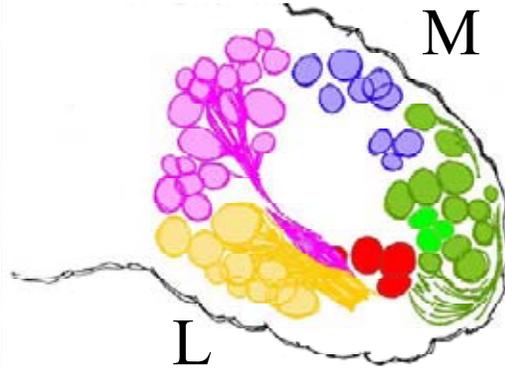
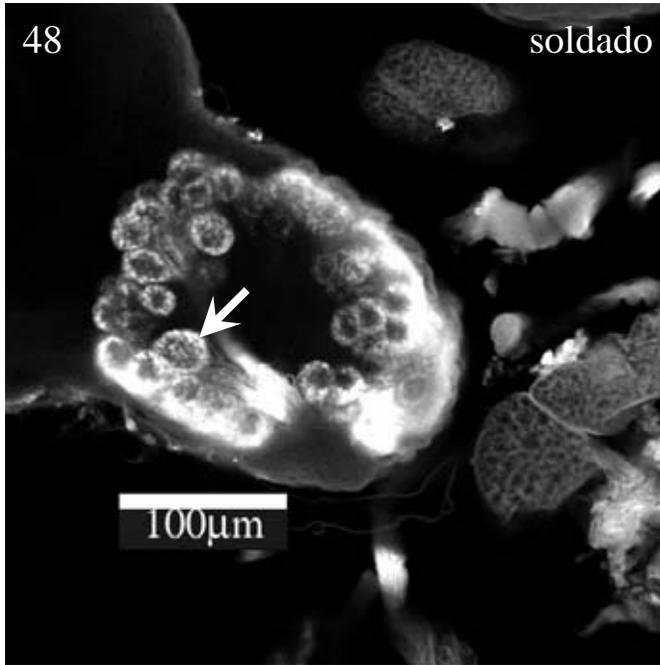


Figura 88. En esta figura se muestra los grupos 1 y 4. Se observa la unión de los tractos T1 y T4. En el grupo 4 se observa un gran glomérulo (flecha) cerca del tracto T1 y del grupo 1.

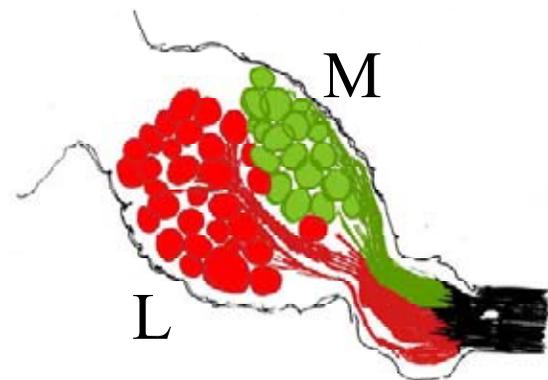
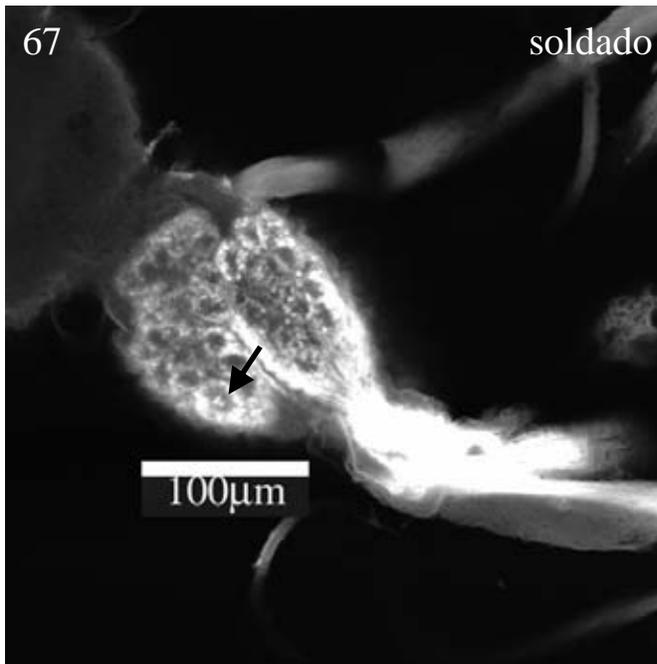


Figura 89 En esta figura se muestra grupo de glomérulos número 5, con su tracto correspondiente, el tracto T5. Este tracto el tracto T3, se separan inmediatamente al entrar al LA. El tracto 5 innerva a un grupo anterior de glomérulos que pueden verse en la parte central del LA. El tracto 3 se dirige hacia medial e innerva al grupo 3. El grupo 5 muestra un glomérulo más grande hacia la parte lateral (flecha).

3.2. Conexiones desde los LA hacia los CF

3.2.1. Vías eferentes desde los LA hacia los CF en *A. mexicana* y *C. ocreatus*

La mayoría de las vías eferentes del LA terminan en el protocerebro, y aunque se conocen tractos que proyectan hacia el LA contralateral (Arnold, 1985), no se encontraron en este trabajo. A partir de los estudios con trazadores desde los LA, se encontró que los axones eferentes del LA se dirigen hacia el protocerebro ipsilateral a través de diferentes tractos, de los cuales 3 son los principales: 1) TACI; 2) TACE, y 3) TACM. De estos, los dos primeros contienen la mayor cantidad de axones por lo que su apariencia es más gruesa y brillante (adquirieron más fluorocromos), además de que son los principales tractos que inervan los CF. Además, se encontró que las eferentes del LA hacia los CF se segregan y terminan en diferentes regiones particulares de los cálices. Por lo tanto:

- a)** En el labio existen al menos tres capas o subcompartimientos donde terminan las aferencias desde el LA.
- b)** Pueden distinguirse al menos dos rutas de los axones que entran al cáliz y se dirigen hacia el labio.

En las figuras 90 y 91, se observa una sección frontal del cerebro de una hormiga soldado *C. ocreatus* a través de microscopía de fluorescencia. Se ha colocado el trazador en el deutocerebro y se observan marcados los principales tractos que relevan la información desde el LA hacia el protocerebro. Se observa el TACI hacia la parte medial de la sección, y el TACE hacia la parte lateral. Ambos tractos consisten de axones de NP cuyos somas se encuentran distribuidos en grupos dentro del LA. La parte receptora dendrítica de estas neuronas de proyección hace contacto sináptico, en los glomérulos, con las terminaciones axónicas de las NRO que provienen de las sensilas ubicadas en las antenas.

Las neuronas de proyección que dejan el LA, se dirigen hacia el protocerebro y terminan en el labio (que recibe aferencias exclusivamente olfatorias) pasando por el anillo basal (que recibe aferencias tanto olfatorias como visuales). Como se observa en esta figura, las NP mandan axones ya sea por el TACE o por el TACI. Si lo hacen por el TACI, los axones se dirigen directamente hacia el labio del cáliz de los CF y de ahí envían colaterales hacia el PL, mientras que si lo hacen por el TACE, se dirigen primero hacia el PL y después de hacer un relevo ahí, se dirigen hacia el labio protocerebral. Además, en la figura 90 también se observan las tres capas que componen al labio. Estas tres capas reciben aferencias segregadas desde el LA (ver más adelante). Este es el primer reporte en el que se describe la segregación de las aferencias olfativas provenientes de los LA en los CF. En las mismas fotografías se muestran las tres capas bien distinguibles en las que las aferencias olfativas terminan: 1) capa externa; 2) capa media, y 3) capa interna. Aunque el procedimiento de trazado es bastante grueso, se pudo marcar diferencialmente cada una de las capas en distintas preparaciones.

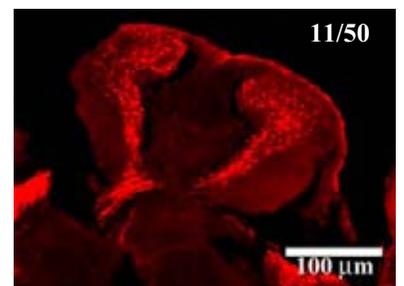
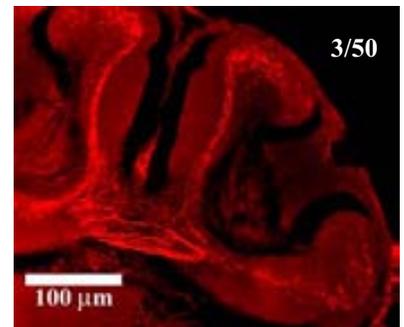
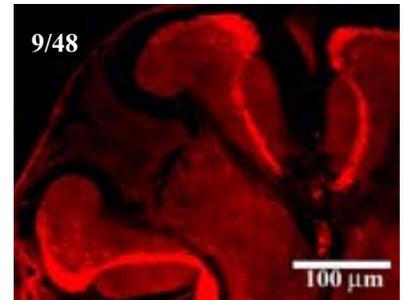
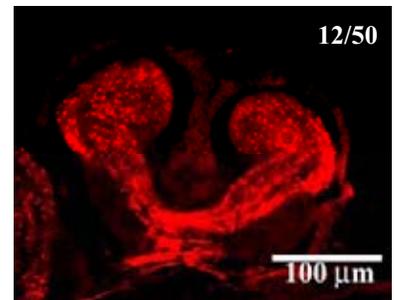
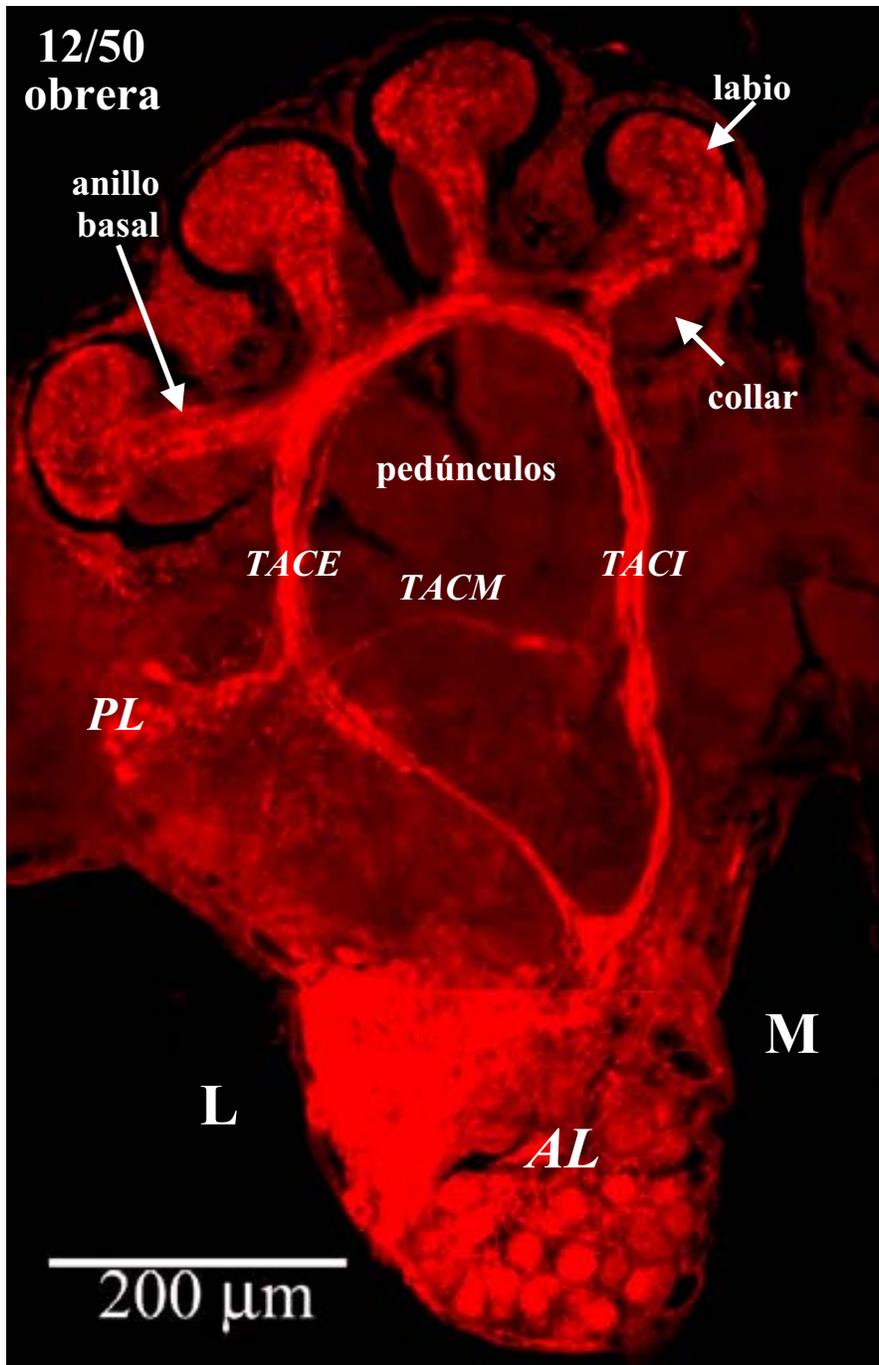


Figura 90. Fotomicrografía de la mitad derecha del cerebro de un soldado *C. ocreatus*. Se ha marcado anterógradamente la vía sensorial desde los LA hasta el labio del cáliz de los CF. Pueden verse los tractos antencerebrales que conectan los LA con los CF. En la imagen pueden apreciarse también las tres capas en las que se divide el labio, recibiendo aferencias segregadas desde los LA, indicando un procesamiento diferencial en dicha parte del cerebro. El grosor de la sección es de 20 μm . Las fotografías de la derecha muestran los cálices de los CF marcados anterógradamente desde los LA. Pueden apreciarse tres distintas capas o subcompartimientos en el labio que constituyen las aferencias desde los LA. El grosor de la sección es de 20 μm .

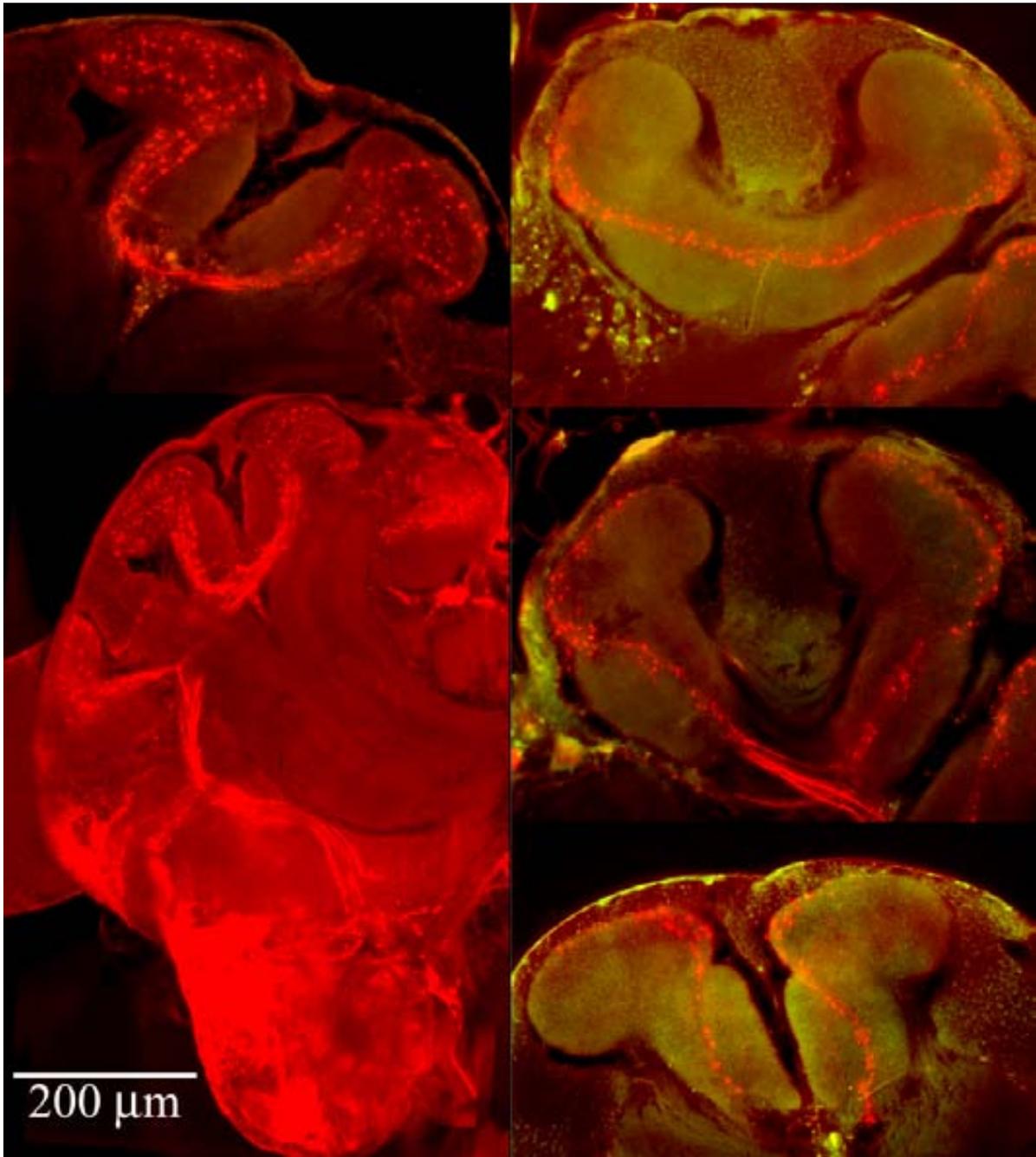


Figura 91. Micrografías de epifluorescencia de secciones de cerebro de soldados de *C. ocreatus* teñidas con trazadores desde el LA en donde se aprecian las diferentes capas en donde terminan las eferentes de los LA.

De las tres capas, la más gruesa es la interna, seguida por la capa externa, mientras que la más delgada es la capa media, la cual es difícil de marcar por separado de la capa interna (figura 91), lo cual sugiere que los grupos de glomérulos que envían aferentes desde el LA hasta estas dos capas del labio, se encuentran muy próximos espacialmente. De esta manera, como no pudo determinarse el origen de la capa media por separado de la interna, en lo sucesivo se considerarán como una sola capa, la capa interna (o la capa interna + media). Por el contrario, la capa interna + media es fácil de separar de la capa externa, lo cual sugiere que los grupos de glomérulos que envían aferentes ya sea hacia la capa

interna + media o hacia la capa externa del labio se encuentran menos próximos. Estos resultados tienen implicaciones importantes en el entendimiento de la formación del código olfativo y su posterior procesamiento en los CF (véase más adelante). En la misma figura 90 también se observa el TACM que se dirige directamente hacia el protocerebro lateral sin pasar por los CF como lo hacen los otros dos tractos. Este delgado tercer tracto, el TACM, recorre la parte medial junto al TACI dividiéndose en dos ramas, una de las cuales se dirige hacia el PL por la parte ventral a los pedúnculos, mientras que la otra se dirige hacia los CF, tal y como ocurre en las abejas (Rospars, 1988).

3.2.2. Relación grupo glomerular-tracto antencerebral-capa labial en el cáliz: el mapa odotópico

Colocando el trazador (dextranes acoplados con rojo Texas) en diferentes lugares del LA, se encontró que la segregación de los axones de las NP en las capas del labio de los CF tiene una relación con los grupos de glomérulos.

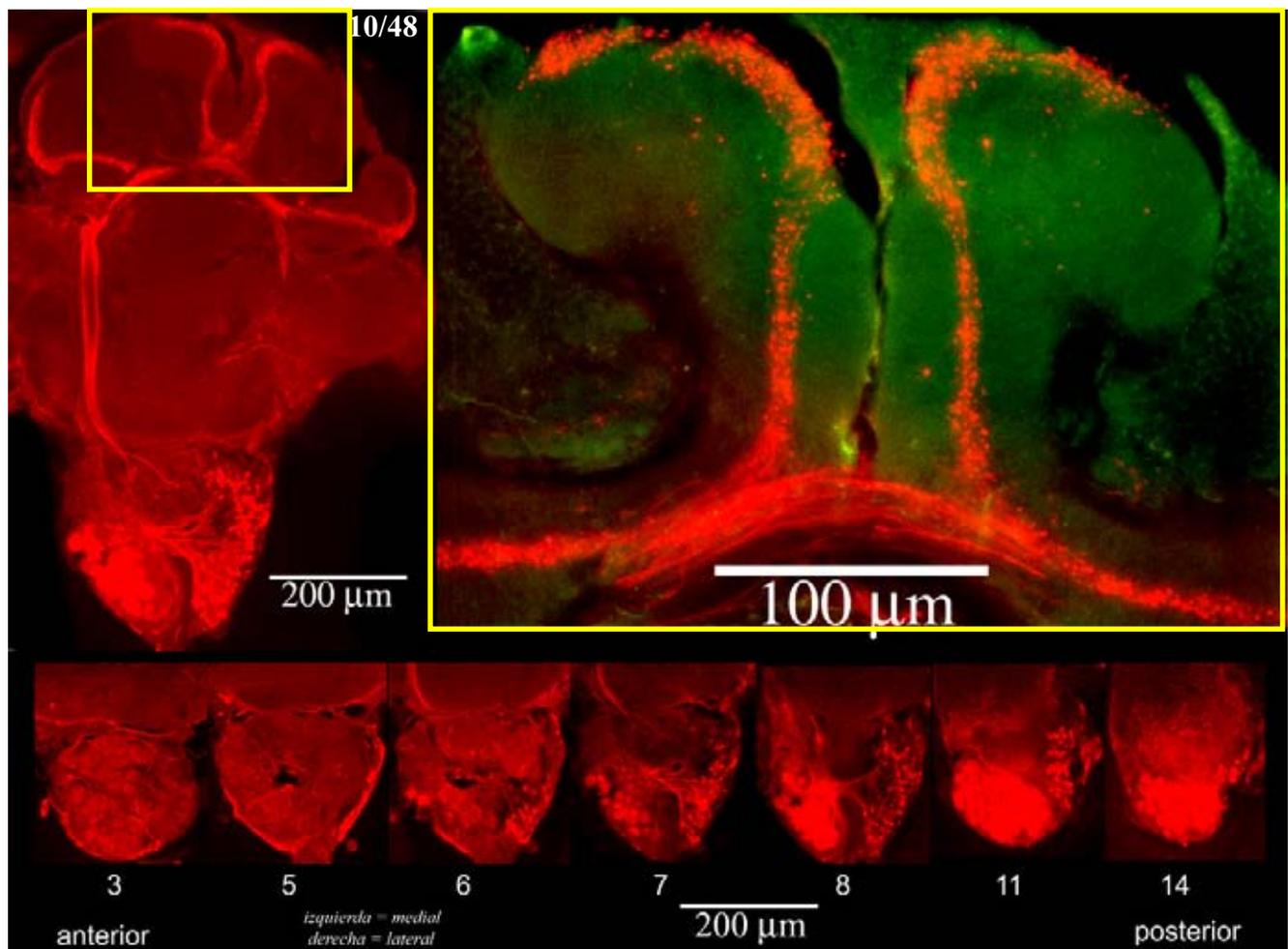


Figura 92. Izquierda. Micrografía del cerebro de *C. ocreatus* en la que se muestra la capa externa del labio de los CFs marcada con la fluorescencia y el TACI. Derecha: se muestra un detalle de la zona marcada con el recuadro amarillo de la capa externa con fluorescencia en rojo. Abajo, se muestran los grupos glomerulares 2 y 6 con fluorescencia. Los otros grupos 1, 3, 4 y 5 no se encuentran teñidos. Ver texto.

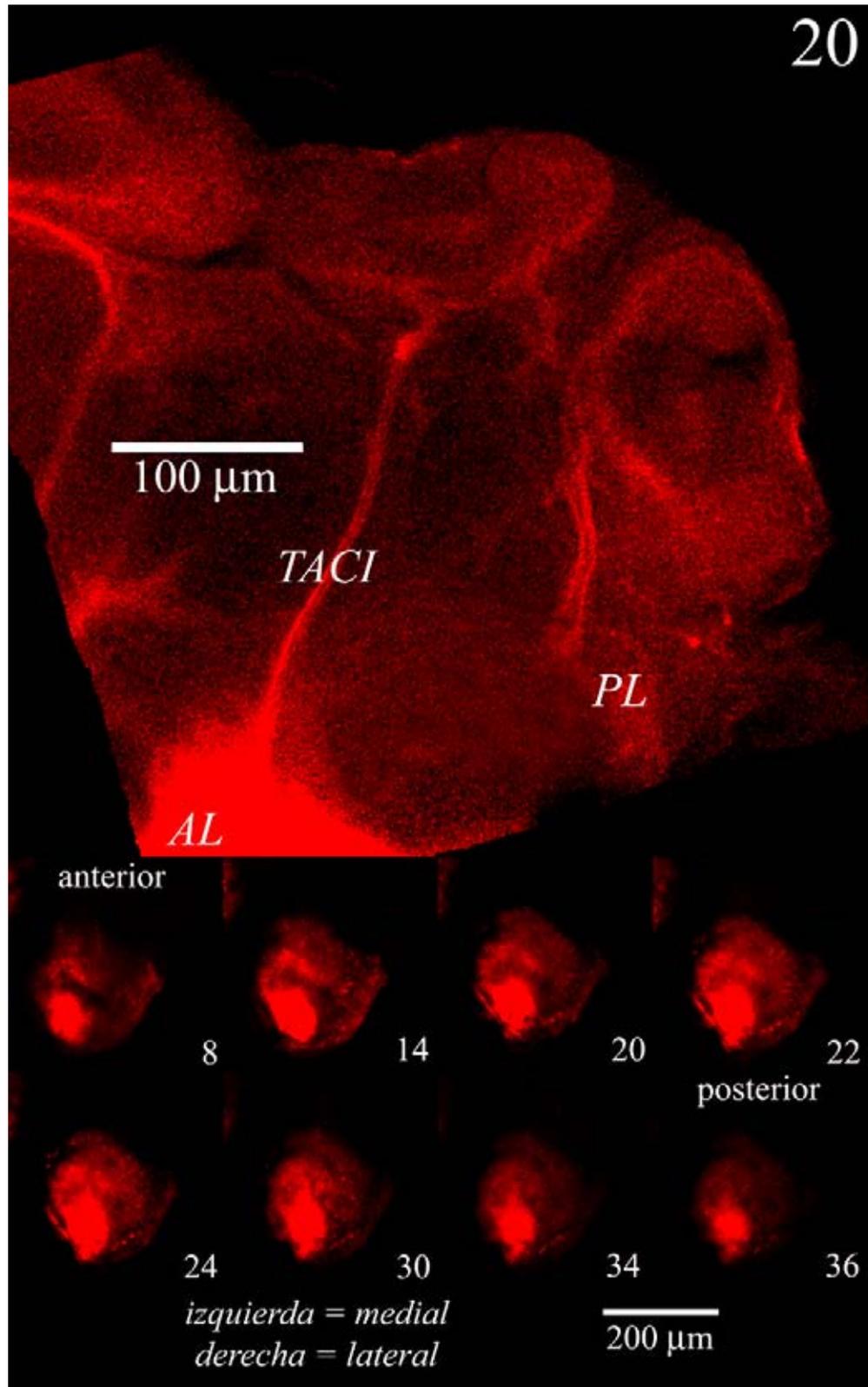


Figura 93. Micrografía de secciones ópticas del cerebro de un soldado de *A. mexicana*. Se muestra la relación entre la capa externa del cáliz y los grupos glomerulares 2 y 6. Se observa el TACI que llega a los CF y de ahí hacia el PL.

Además, las vías eferentes desde el LA hasta los CF también están separadas, dirigiéndose a los cálices por uno de los diferentes tractos que conectan los LA con los CF.

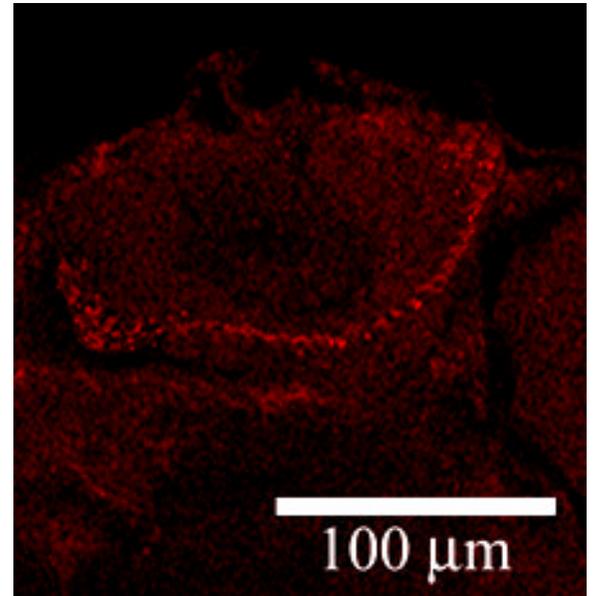
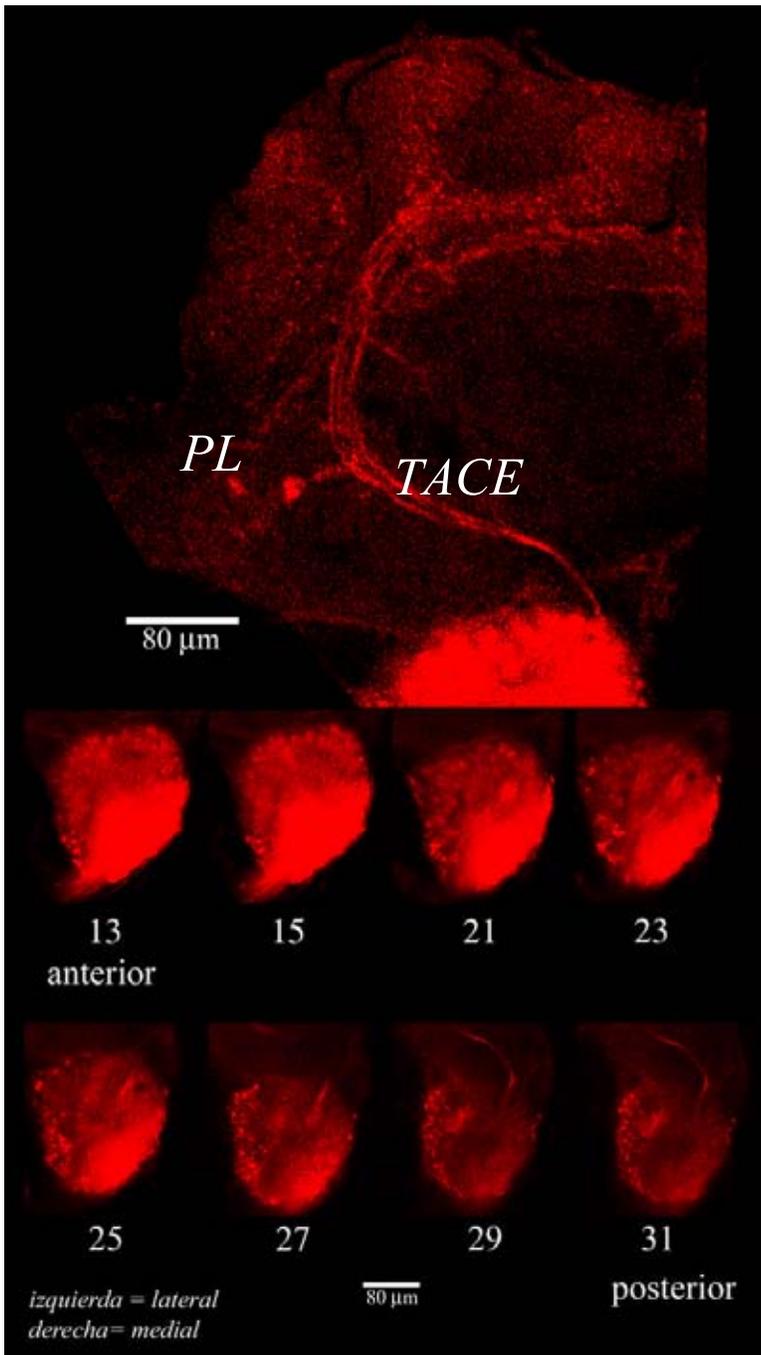


Figura 94. Los CFs de *A. mexicana* presentan también una organización en capas de las aferencias provenientes del LA. *Izquierda.* Sección óptica del cerebro de una hormiga *A. mexicana* en donde se muestra la capa medial y la interna del labio de los CF teñidas. Además, también se observa que los grupos de glomérulos 1, 3, 4 y 5 están teñidos, pero no los grupos 2 y 6. Comparar con **figura 95** de *C. ocreatus*. *Arriba.* Detalle del cáliz de los CF de *A. mexicana* en donde se muestra la capa externa.

A partir de los estudios con trazadores, podemos hacer una síntesis:

- a) Los grupos glomerulares 2 y 6 (región posterior) mandan axones a través del tracto antencerebral interno (TACI) y terminan en la capa externa del labio y anillo basal del cáliz (figuras 92 y 93).
- b) Los grupos 1, 3, 4 y 5 (región anterior) mandan axones a través del tracto antencerebral externo (TACE) y terminan en las capas medial e interna y medial del labio y anillo basal del cáliz (figuras 94 y 95).

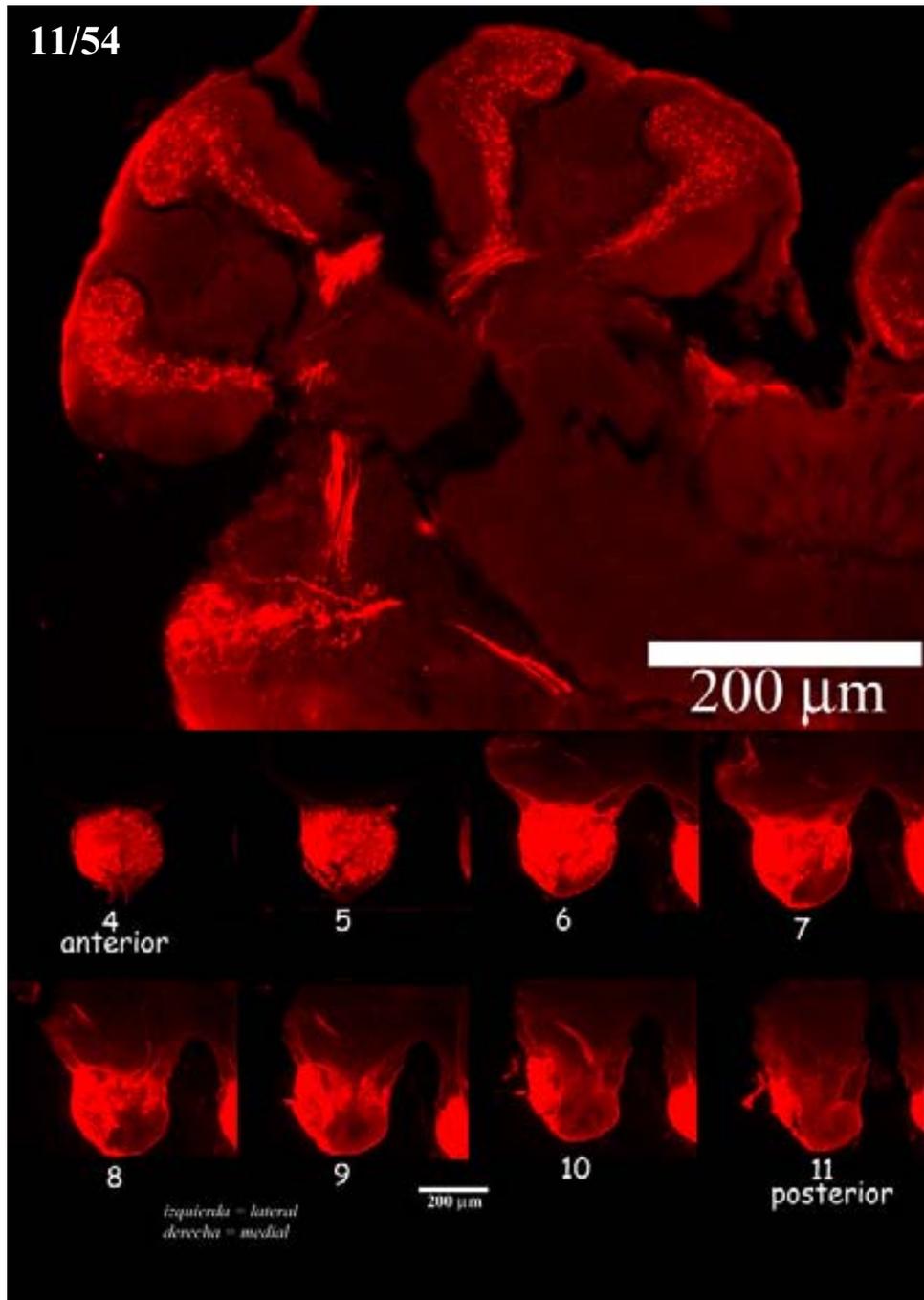


Figura 95. Se muestra la capa interna, la medial y el TACE teñidos de *C. ocreatus*. Se observa cómo el TACE inerva primero el PL. Abajo se muestran los grupos de glomérulos 1, 3, 4 y 5 teñidos, pero no los grupos 2 y 6.

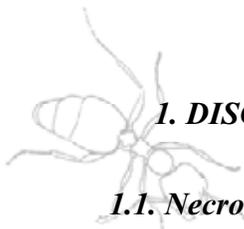
En las figuras 92 y 93 se muestra la relación entre los grupos glomerulares mediales 2 y 6 y sus conexiones hacia la capa externa del labio del cáliz de los CF en *C. ocreatus* y *A. mexicana*. Muchas neuronas del *GNC-lateral* y del *GNC M-posterior* han sido teñidas lo que sugiere que envían dendritas que hacen contacto con los glomérulos de los grupos 2 y 6. Los axones de estas neuronas se dirigen hacia los CF vía el TACI y llegan primero al cáliz medial donde mandan terminaciones primero a la capa externa del labio del cáliz medial. De ahí, se dirigen hacia el cáliz lateral donde también mandan terminaciones a la capa externa del labio, de donde salen colaterales que terminan en el PL. Nótese que

los glomérulos más anteriores (de los grupos 1, 3, 4 y 5) no están teñidos, así como tampoco los grupos de neuronas centrales *GNC dorsal*, *GNC anterior* y *GNC medial*.

En la figura 94 y 95, se muestra la relación entre los grupos de glomérulos 1, 3, 4 y 5 del LA y sus conexiones hacia los CF. Muchas neuronas del *GNC-lateral*, *GNC medial*, *GNC dorsal* y *GNC anterior*, se encuentran teñidas con los fluorocromos, lo cual sugiere que estas neuronas mandan sus dendritas hacia los grupos de glomérulos 1, 3, 4 y 5; mientras que sus axones son enviados a través del TACE innervando primero el PL. De ahí, los axones continúan hacia los cálices terminando en la capa interna (capa interna + media) del labio de ambos cálices, primero al lateral y luego al medial. Nótese cómo ni los grupos 2 y 6, ni el grupo de neuronas centrales *GNC M-posterior* se observa fluorescente. Para ambas especies, *A. mexicana* y *C. ocreatus*, el patrón de conexiones es el mismo.

Estos resultados demuestran, de manera general y por primera vez, que la organización en grupos de glomérulos de los LA, se encuentra representada de manera gruesa en las capas del labio mediante la segregación de las aferencias provenientes de las NP, formando una clase de mapa odotópico.

VIII. DISCUSSION



1. DISCUSION I: LIBERADOR QUIMICO Y ESPECIALIZCION EN LA NECROFORESIS

1.1. Necromonas: olores para la identificación de los muertos

Desde el trabajo de Wilson et al. (1958) en el que se postuló que la necroforesis y los liberadores de la necroforesis se encuentran ampliamente distribuidos entre las hormigas, pocos trabajos se han realizado desde entonces sobre la remoción de cadáveres a pesar de ser uno de los patrones conductuales más conspicuos y estereotipados entre los himenópteros sociales (Hölldobler & Wilson, 1990). Los estudios acerca del comportamiento necroforético se han realizado principalmente en abejas (Trumbo & Robinson, 1997; Trumbo et al., 1997; Masterman et al., 2001) y en algunas hormigas (Wilson et al., 1958; Howard & Tschinkel, 1976; Gordon, 1983; Julian & Cahan, 1999).

En el presente trabajo se ha demostrado que los cadáveres de hormigas *A. mexicana* contienen ácido oleico y que este compuesto actúa como un indicador de compañeros de nido muertos y como un efectivo liberador de la conducta necroforética. Después de que Wilson et al. (1958) demostraran que en *Pogonomyrmex badius* y en *Solenopsis saevissima* el ácido oleico actúa como liberador de la necroforesis, Blum (1970a) confirmó que de la fracción rica en ácidos grasos de los extractos de cadáveres de hormigas *Solenopsis saevissima*, los ácidos miristoleico, palmioleico, oleico y linoleico son los que tienen efectos necroforéticos. Howard & Tschinkel (1976) encontraron que el ácido oleico también actúa en la necroforesis en *Solenopsis invicta*. Haskins & Haskins (1974) demostraron que incluso en las hormigas primitivas *Myrmecia vindex* el ácido oleico también actúa como estímulo liberador de la necroforesis. Posteriormente, Gordon (1983) demostró que en *P. badius*, el comportamiento necroforético liberado por el ácido oleico depende del contexto, es decir, si el estímulo es situado dentro o fuera del nido y dependiendo de qué tareas se encuentren realizando las obreras: mantenimiento o forrajeo. Por su parte, Rollo et al., (1994) encontraron ácido oleico, linoleico, palmítico y esteárico en extractos de cucarachas muertas, y demostraron que los primeros dos compuestos tienen un efecto repelente en las cucarachas vivas.

Los ácidos grasos presentes en los cadáveres podrían ser señales de reconocimiento de la muerte ampliamente distribuidas entre los insectos y explotados principalmente en las sociedades de insectos ya que incluso los ácidos grasos de una especie pueden tener efectos sobre otra (Wilson et al., 1958). Estos compuestos tienen importantes propiedades que los hacen efectivos indicadores de cadáveres debido a su estabilidad y baja volatilidad, lo cual permite que se acumulen sobre los insectos muertos (Wilson et al., 1958). La baja volatilidad de estos ácidos grasos ha llevado a sugerir que el reconocimiento de los cadáveres se lleva a cabo por medio de quimiorrecepción por contacto (Howard & Tschinkel, 1976). No obstante, en este trabajo se ha encontrado que las sepultureras orientan sus antenas hacia los cadáveres (figura 37) y hacia los trozos de papel filtro tanto con extracto de cadáveres como con ácido oleico. Así pues, es posible que la baja volatilidad de los ácidos grasos involucre una quimiorrecepción a una distancia muy próxima a la fuente. El espacio activo del ácido oleico, aunque reducido, se extendería a una cierta distancia del cadáver, y debido a su baja volatilidad, actuaría como un atrayente de larga duración. Además, existe evidencia de que la detección antenal del ácido oleico puede ocurrir a través de moléculas transportadas por el aire: en los experimentos de EAG (ver sección

de resultados), se encontró que las forrajeras y las sepultureras muestran una relación logarítmica entre la amplitud de la respuesta EAG y el incremento en la concentración del ácido oleico usado como estímulo, lo cual indica que los receptores responden a los incrementos en la concentración del ácido oleico en el aire (figuras 50, 52 y 53). Sin embargo, aunque las antenas respondan a las moléculas de ácido oleico transportadas por el aire, es posible que tanto otros compuestos volátiles que emanan de los cadáveres, como la quimiorrecepción por contacto, puedan también estar involucrados en la detección de las hormigas muertas. Sería importante determinar el efecto fisiológico y conductual de los otros compuestos volátiles encontrados en los extractos de cadáveres (figura 40b).

En los experimentos conductuales realizados se ha demostrado que la efectividad del ácido oleico como liberador de la necroforesis en *A. mexicana* es equivalente a la de los extractos de cadáveres tanto en tiempo como en el destino final (figuras 41, 42 y 43). Aunque se cree que los ácidos grasos involucrados en la necroforesis comienzan a generarse después de la muerte, aún se desconocen los procesos por medio de los cuales se generan estas sustancias. Howard & Tschinkel (1976) demostraron, al calentar a 100°C las hormigas muertas usadas como estímulo experimental, que el incremento de los niveles de la señal necroforética es independiente de la actividad enzimática endógena de las hormigas. Sin embargo, se ha reportado que las cucarachas *P. americana* pueden convertir enzimáticamente ácido oleico en ácido linoleico (Rollo et al., 1994), el cual es diez veces más repelente que el ácido oleico. En las hormigas, aun no se ha determinado si el incremento en ácidos grasos en los cadáveres se debe al catabolismo autolítico que acompaña a la necrobiosis o a la actividad hidrolítica de bacterias que abundan en los cadáveres de los insectos y que podrían rápidamente hidrolizar triglicéridos generando altas concentraciones de ácidos grasos (Blum, 1970a). Muchos triglicéridos de plantas y animales contienen uno o varios tipos de ácidos grasos de cadena larga en sus tres residuos, y su hidrólisis puede liberar estos residuos incrementando la concentración de ácido oleico (Voet & Voet, 2004). Además, muchos lípidos, hidrocarburos y ácidos grasos se encuentran presentes en la cutícula de los insectos (Hackman, 1974). De estos, los hidrocarburos pueden llegar a comprender hasta el 50-90% de los lípidos cuticulares, aunque los triglicéridos y los esteroides también son comunes. Los ácidos grasos libres más comunes son aquellos con una longitud de cadena de entre 14 y 20 carbonos (C₁₄ – C₂₀) tanto saturados como insaturados (Gilby, 1980), y los principales son el ácido palmítico y el ácido oleico (Gilmour, 1961). En cualquier caso, la señal necroforética requiere de tiempo para aparecer, ya que las hormigas recién muertas no son llevadas a los basureros sino hasta que han transcurrido algunas horas durante las cuales se generan los ácidos grasos que proporcionan a las obreras una señal olfativa que inicia una serie de respuestas que resultan en el transporte de la hormiga muerta hacia la pila de desperdicios (Blum, 1970a; Howard & Tschinkel, 1976).

Probablemente las sustancias que desencadenan el comportamiento necroforético están restringidas en mayor grado a los ácidos grasos ya mencionados (Blum, 1970a). Si estas sustancias son el producto de la descomposición bacteriana de los cadáveres, serían el indicativo de la aparición o proliferación de microorganismos, por lo que el estereotipado comportamiento de sacar del nido la fuente de ácido oleico tiene como consecuencia eliminar el centro de proliferación de microorganismos. Esto significa que los ácidos grasos liberados por los cadáveres son señales ubicuas de detección de la muerte entre

los insectos sociales, lo cual podría tener un significado adaptativo ya que constituirían parte de un mecanismo para evitar las enfermedades infecciosas.

Aunque el ácido oleico puede ser suficiente como para evocar la necroforesis (figura 41), incluso sobre hormigas vivas embadurnadas con este ácido graso (Wilson et al., 1958), el contexto social puede jugar un papel importante en las respuestas al ácido oleico que emana de los cadáveres. Además, es posible que existan otras señales que informen a la sepulturera en qué sitio levantar cadáveres y en que otro sitio dejarlos. El comportamiento necroforético, entonces, es un comportamiento que podría ser desencadenado por un estímulo (el ácido oleico), pero siempre en un contexto social particular (probablemente el olor del nido, el estado de la colonia, etc.), en donde la combinación de señales químicas con señales de otras modalidades sensoriales pueden ajustar el comportamiento de los individuos. Por ejemplo, Haskins & Haskins (1974) demostraron que, aunque las obreras de *Myrmica vindex* responden al ácido oleico transportando aquello que lo contenga hacia los basureros incluyendo las pupas, esto no ocurre cuando las larvas son embadurnadas con ácido oleico. La señal necroforética, en este caso, es enmascarada, o la respuesta conductual inactivada por el olor de la larva.

Es posible que existan otros componentes en los cadáveres que participen en el reconocimiento de los cadáveres. Sin embargo, el ácido oleico es un componente mayoritario que es suficiente para que los cadáveres sean transportados hacia los basureros. No obstante, dentro del análisis químico, aun es necesario determinar la proporción de ácido oleico en el extracto de cadáveres y, además, determinar, a través de cromatografía de gases acoplada con electroantenografía (GC-EAD), la presencia de otros compuestos bioactivos que pueden estar involucrados en el comportamiento necroforético.

1.2. Sepultureras: especialización conductual en la necroforesis

Howard & Tschinkel (1976), en su estudio sobre la necroforesis en *Solenopsis invicta*, concluyeron que este comportamiento no es realizado por obreras de una clase de tamaño particular. Sin embargo, para las hormigas *Atta sexdens*, Wilson (1980b) encontró que el polimorfismo está correlacionado con la ejecución de tareas determinadas, y las sepultureras constituyen un grupo de obreras de mediano tamaño clasificadas como parte de las generalistas del interior (Wilson, 1980b).

En este trabajo, se encontró que algunas obreras, definidas como sepultureras, presentan una tendencia a realizar la necroforesis más frecuentemente que otras obreras. Existe evidencia que sugiere que, en las abejas, el genotipo está involucrado en la determinación de la casta sepulturera (Giray & Robinson, 1996; Page et al., 1989; Page et al., 1998; Pankiw & Page, 2001a; Robinson, 1991; Robinson & Page, 1988; Robinson & Page, 1989; Robinson & Page, 1995; Robinson et al., 1989; Rothenbuhler & Page, 1989). Cada vez hay más reportes en los que se presentan evidencias de que en las hormigas los genotipos tienen influencia sobre el comportamiento de las obreras y su propensión a la realización de ciertas tareas o incluso en el desarrollo de castas físicas (Stuart & Page, 1991; Snyder, 1993; Fraser, et al., 2000; Hughes et al., 2003; Sirviö et al., 2006). De cualquier manera, la evidencia presentada en los estudios conductuales de esta tesis sugiere que la necroforesis no es realizada por cualquier obrera, aun cuando todas tengan oportunidad de hacerlo: sólo el 0.6% del total de las obreras de la colonia de laboratorio de *A. mexicana* realizó al menos una vez el comportamiento necroforético

completo, mientras que sólo el 0.25% lo realizó más de dos ocasiones de un total de 30 observaciones. Esto revela que algunos individuos tienen una alta predisposición para realizar la necroforesis, mientras que la mayoría (el restante 99.4%) no participa en esta tarea aún cuando tenga la oportunidad de hacerlo, por lo que la necroforesis es una tarea especializada en *Atta mexicana* (figura 38 y tabla 1), como ocurre en otras especies: en las hormigas *Lasius niger* entre un 3 y 6% se dedican repetidamente a la remoción de cadáveres, aunque, en general, un 37% de los individuos puede realizar el acarreo de cuerpos al menos una vez en su vida (Ataya, citado en Passera, 1984). Sin embargo, aunque todos los comportamientos necroforéticos fueron realizados por las sepultureras marcadas con códigos de color, no fue posible determinar si su repertorio conductual involucraba otras tareas.

El comportamiento sepulturero en las hormigas es plástico, ya que si todas las sepultureras son retiradas, algunas obreras no-sepultureras se vuelven sensibles a los estímulos que provienen de los cadáveres y, entonces, ellas toman el lugar de las sepultureras en la remoción de los individuos muertos. Así pues, el comportamiento necroforético es una especialización, pero las sepultureras así como muchas otras obreras, son lo suficientemente plásticas como para cambiar de acuerdo a las situaciones sociales y demográficas de la colonia. Sin embargo, la especialización conductual es importante ya que, por ejemplo, Hart & Ratnieks (2001, 2002) encontraron que en *Atta colombica* existe una estricta división del trabajo entre forrajeras y obreras manejadoras de desperdicios sin posibilidades de cambio de sepulturera a forrajera o a nodriza. Incluso, el sistema de manejo de desperdicios se encuentra organizado espacial (por rutas diferentes) y temporalmente (la remoción de desperdicios es constante y arrítmica, pero el forrajeo es circadiano), de manera que el forrajeo (y otras actividades) se encuentra separado del manejo de desperdicios, reduciendo las probabilidades de que las forrajeras se contaminen, disminuyendo, a su vez, la probabilidad de transmisión de enfermedades.

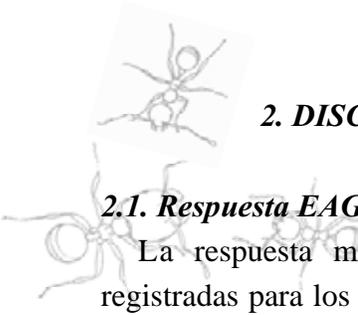
A diferencia del trabajo realizado por Julian y Cahan (1999) en el que se consideró necroforesis al acarreo de cadáveres por al menos 3 centímetros, en este trabajo se consideró como necroforesis el comportamiento completo que involucra desde el encuentro con el cadáver hasta su abandono en la pila de desperdicios y no sólo el acarreo temporal. Esto es importante ya que los individuos que realizan la necroforesis completa más veces de lo que se esperaría por azar (distribución de Poisson), han sido considerados en esta tesis como sepultureras especializadas que deben cumplir varios requisitos:

- a. Patrullar el nido con lo que aumentan la probabilidad de encontrarse con los estímulos relacionados con la necroforesis.
- b. Detectar dichos estímulos al pasar a cierta distancia, de tal manera que puedan dirigirse a la fuente aun cuando no hayan realizado contacto físico con ella.
- c. Óptimo desplazamiento dentro del nido antes y después de haber encontrado el cadáver. Esto es muy importante ya que desplazarse dentro del nido puede resultar difícil en colonias con varios miles de obreras en las cámaras y en los túneles. Las sepultureras deben, pues, ignorar a las otras obreras y dirigirse hacia la salida. Si además las forrajeras traen alimento hacia el nido, esto dificulta aun más la tarea de las sepultureras ya que las entradas pueden estar saturadas de hormigas que entran acarreamo material vegetal. Además, la orientación

dentro del nido es fundamental, ya que para optimizar el gasto energético, las sepultureras deben dirigirse lo antes posible hacia el sitio adecuado.

Las hormigas que realizaron más de 2 veces la tarea, se dirigieron directo hacia la salida y de ahí, directo hacia el basurero, depositaron el cadáver y de inmediato regresaron al interior del nido y comenzaron de nuevo a patrullar las cámaras y túneles. Aquellas hormigas que realizaron una sola vez la necroforesis, tardaron más tiempo en dirigirse hacia las pilas de desperdicios, incrementando la probabilidad de soltar el cadáver dentro del nido (figura 39). Esto sugiere que, en cuanto la sepulturera encuentra el estímulo liberador, sólo se dedica, entre este momento y el momento en que suelta el cadáver, a desplazarse hacia la pila de desperdicios y la variación temporal entre una ocasión y otra (tabla 3) depende del sitio del nido en el que encuentra al cadáver, la actividad del nido, etc., por mencionar algunos factores que podrían estar involucrados. Así, aunque una sepulturera especializada no sea más rápida que las otras en encontrar un cadáver, sí es más rápida que las otras al transportarlo hacia fuera del nido (figura 39), lo cual sugiere que las sepultureras podrían ser más eficientes desplazándose dentro del nido. En resumen, las obreras más especializadas en la remoción de cadáveres son aquellas hormigas que realizan dos o más veces la necroforesis, esto es, más frecuentemente de lo esperado que si las obreras realizaran dicha conducta por azar (distribución de Poisson).

Estos resultados sugieren que la predisposición a la realización del comportamiento necroforético no es la misma entre los individuos ya que muchos de los miembros de la colonia (más de 2000 obreras) tuvieron la misma probabilidad de encontrar los cadáveres. Esto puede indicar que la especialización sepulturera puede estar determinada, al menos en gran medida, por causas internas como sucede en las abejas (Robinson & Page, 1988, 1995; Trumbo & Robinson, 1997; Trumbo et al., 1997; Visscher, 1983, 1988). El comportamiento necroforético en las hormigas parece ser una tarea especializada, quizá principalmente en aquellas especies en las que es muy importante evitar la proliferación de microorganismos, como en el caso de las hormigas cultivadoras de hongos, ya que estas hormigas deben mantener el cultivo de hongos libre de agentes patógenos (Currie, 2001).



2. DISCUSION II: ESPECIALIZACION OLFATIVA EN LOS SOLDADOS

2.1. Respuesta EAG de las obreras al aire

La respuesta mecanorreceptiva puede constituir un gran porcentaje de las respuestas EAG registradas para los diferentes olores empleados (figura 47), el cual ha sido sustraído de las respuestas EAG a los olores para obtener la respuesta quimiosensorial (figura 31). Esto sugiere que las hormigas tienen una alta capacidad de respuesta mecánica al incremento en la presión del aire introducido en la corriente principal del montaje experimental cuando se acciona el mecanismo de estimulación para entregar el estímulo oloroso. Para muchos insectos la detección de corrientes de aire es muy importante. Sin embargo, la importancia biológica de las corrientes de aire depende del nicho ecológico y los hábitos del insecto ya que el efecto es diferente en insectos voladores y terrestres. Las corrientes de aire generadas cuando una hormiga obrera corre sobre el sustrato no son considerables como para generar un estímulo sobre sus mecanorreceptores, pero resultan muy importantes cuando una reina o un macho vuelan durante el vuelo nupcial. Sin embargo, esto es muy relativo entre las diferentes formas de vida de los insectos ya que insectos como algunos escarabajos, requieren de una mínima velocidad del viento de 0.15 metros/segundo para generar una respuesta de orientación (Schwartzkopff, 1974). Las sensilas responsables de esta mecanorrecepción se encuentran sobre la antena, principalmente en su base y en el pedicelo, y en otras regiones del cuerpo del insecto (Schwartzkopff, 1974; Romoser & Stoffolano, 1994). En las hormigas *Atta*, la elevada sensibilidad a las corrientes de aire podría estar relacionada con las corrientes de aire generadas dentro de los nidos a manera de sistema de ventilación que mantienen tanto la temperatura como las concentraciones de diferentes gases (como el CO₂) en niveles estables. Estas corrientes de aire son generadas por la manera en que las hormigas construyen sus túneles y las aberturas de estos hacia el exterior (Wilson, 1971; Kleineidam et al., 2001). La elevada sensibilidad a los estímulos mecánicos podría constituir información valiosa para las obreras que excavan y construyen los túneles y las salidas de los nidos. Las termitas, insectos sociales que también construyen nidos complejos en los que se generan corrientes de aire que mantienen temperatura y gases en niveles constantes, son muy sensibles a las débiles corrientes de aire que se presentan dentro de las galerías (Wilson, 1971). El mantenimiento de los niveles de temperatura y gases es parte fundamental de la homeostasis social (Hölldobler & Wilson, 1990). Además, otros estímulos importantes que generan cambios de presión en el aire son aquellos generados por la perturbación de los nidos y la respiración de vertebrados depredadores que, además contiene CO₂, gas al cual las hormigas son también altamente sensibles (Kleineidam & Tautz, 1996).

2.2. Respuestas EAG de las castas a los olores

Los estudios sobre los sistemas de comunicación en las hormigas se han enfocado principalmente en la identificación de feromonas, así como en la determinación de los efectos conductuales de diversos semioquímicos. Hasta ahora, este trabajo es el primer estudio sistemático realizado en hormigas de la especie *Atta mexicana* en el que se compara la respuesta olfativa antenal de diferentes castas a estímulos relacionados con tareas casta-específicas. Aunque existen investigaciones en las que se han

realizado estudios electrofisiológicos del sistema olfativo en diferentes especies de hormigas (Payne, 1975; Glancey & Dickens, 1988; Andryszak et al., 1990; Kern & Bestman, 1993; Sheridan et al., 1995; Kleineidam et al., 2005), en ninguno de ellos se realizaron comparaciones entre castas de obreras a pesar de que en repetidas ocasiones se ha sugerido que podrían existir diferencias casta-específicas en la sensibilidad a estímulos relacionados con la especialización conductual (Topoff et al., 1973; Passera, 1988; Wilson, 1985c; Robinson, 1987, 1992; Schulz & Robinson, 1999).

2.2.1. Respuestas al olor de alarma

Aunque la detección de feromonas sociales es especie-específica, las feromonas de alarma parecen ser los menos específicos de las clases de liberadores químicos, lo cual se debe a que muchas especies pueden emplear la misma feromona o compuestos relacionados (Blum, 1970). Sin embargo, cuando esto ocurre, la respuesta a la feromona de otra especie siempre presenta una sensibilidad diferente. Cuando son excitadas, las obreras de la hormiga *Atta texana*, liberan dos alcanonas, la 4-metil-3-heptanona y la 2-heptanona en proporción 4:1 de sus glándulas mandibulares. Mientras que la 4-metil-3-heptanona es altamente excitadora de la respuesta de alarma, la 2-heptanona lo es en menor proporción (Moser et al., 1968). De acuerdo con Moser (1970) y Moser et al. (1968), la respuesta a la 2-heptanona en *Atta texana* es similar a la respuesta a la verdadera feromona de alarma, 4-metil-3-heptanona, pero con un umbral de detección mayor: el umbral de alarma para la 4-metil-3-heptanona es 3.3×10^8 moléculas/cm³ mientras que el umbral para la 2-heptanona es de 5.3×10^8 moléculas/cm³.

Así pues, la 2-heptanona puede ser usada confiablemente como un indicador de la respuesta de alarma de *Atta mexicana* debido a la cercanía molecular entre estos compuestos. De hecho, la 2-heptanona ha sido usada como sustancia de alarma en experimentos conductuales y electrofisiológicos de sensibilidad olfativa en especies en las que no había identificado la verdadera feromona de alarma (Moser et al., 1968; Andryszak et al., 1990) Aunque la composición química de la feromona de alarma en *Atta mexicana* no se ha identificado, las hormigas de esta especie respondieron bien, tanto en el nivel sensorial antenal (figura 49) como en el conductual (figura 44), a la 2-heptanona un compuesto muy cercano a muchas feromonas de alarma que presentan muchas especies de hormigas y de abejas.

Las tres castas estudiadas presentaron una relación logarítmica dosis-amplitud del EAG típica de los sistemas sensoriales de alta resolución (figura 49). Estos sistemas tienen una relación amplia entre alta sensibilidad de detección y amplio rango de detección, de manera que son capaces de discriminar de forma fina a bajas intensidades del estímulo, y responder aún a altas intensidades del estímulo en la saturación (en la saturación, los receptores son incapaces de discriminar entre estímulos). Esta propiedad, “comprime” el extremo de altas intensidades, ampliando el rango de discriminación. Así, estos sistemas sensoriales proporcionan una constante sensibilidad relativa a pesar de la intensidad del estímulo, además de tener altas intensidades de saturación. Aunque algunos receptores sensoriales se apartan de esta relación logarítmica, las intensidades de estímulo que se dan normalmente en el medio ambiente se encuentran generalmente dentro de la porción logarítmica de la relación entrada-salida (Randall, 2002).

Lo anterior parece indicar que las obreras de las tres castas de *Atta mexicana* son capaces de discriminar entre cambios mínimos en la concentración de la 2-heptanona, como lo indica el *Índice I_{EAG}*, el cual representa el incremento en la respuesta EAG que hay en la curva dosis-respuesta entre la estimulación con la menor dosis y la mayor (figuras 62, 65 y tabla 13), y como también lo indican los altos coeficientes de correlación entre la dosis de la 2-heptanona y la amplitud de la respuesta EAG (figuras 57 y 70). Y ya que las respuestas EAG representan la respuesta de un gran número de neuronas receptoras, es decir, la integración de las señales sensoriales de muchas sensilas sobre la antena, la relación señal/ruido se optimiza, con lo que se logra una mayor discriminación del estímulo. Esto se observa claramente con los resultados del análisis del *Índice IEAG*. Como se observa en las curvas dosis-respuesta de la figura 62, las tres castas presentan incrementos significativos en la respuesta EAG con los aumentos en la dosis de la 2-heptanona en comparación con los otros olores. Esto resulta muy importante en las colonias de hormigas, ya que estos insectos comunican rápidamente las perturbaciones del nido mediante la secreción de feromonas de glándulas exocrinas. Estas feromonas de alarma siempre son moléculas pequeñas y altamente volátiles de manera que generan rápido una señal de alarma sin ser altamente persistentes, lo cual se refleja en el hecho de que la 2-heptanona haya producido las significativamente mayores respuestas EAG en comparación con los otros olores (figuras 55 y 64). Así pues, aunque las feromonas de alarma son poco o nada especie-específicas, las hormigas tienen un grado de agudeza olfativa que las capacita para responder con el comportamiento de alarma aún en bajas concentraciones y seguir respondiendo con el incremento en la concentración (Blum, 1970a). Esto es muy importante porque las feromonas de alarma producen diferentes respuestas a diferentes concentraciones.

Es importante que los sistemas sensoriales para las feromonas de alarma tengan la capacidad de discriminar cambios de concentración aun cuando se encuentren dentro de una nube de feromonas, por lo que este sistema de detección debe ser de adaptación lenta. Esto correspondería con las fases conductuales de respuesta a diferentes concentraciones que Moser et al. (1968) describieron para la hormiga *Atta texana*: 1) detección a concentraciones subumbrales; 2) atrayente a concentraciones un poco mayores; 3) agresión a concentraciones altas (con el comportamiento típico de agresión: mandíbulas abiertas, abdomen levantado, etc., como el observado en los soldados al estimular con los trozos de papel filtro con 2-heptanona, figura 44); 4) repelente a muy altas concentraciones.

Aunque se esperaba que los soldados presentaran la amplitud de EAG más alta en respuesta a la 2-heptanona, ya que algunos autores han propuesto que los soldados de las hormigas en general serían más sensibles a las señales de alarma (Topoff et al., 1973), no es un hallazgo raro que las sepultureras y forrajeras también presentaran respuestas altas a este compuesto y que no se detectaran diferencias significativas, ya que, aunque la respuesta antenal sea similar, la respuesta conductual a las feromonas de alarma varía entre las diferentes castas (Blum, 1970b). Esto separaría el nivel de detección periférico del integrador-efector, por lo que las diferencias conductuales tendrían como sustrato el SNC ya que, además, la respuesta conductual a las feromonas de alarma también puede variar según el contexto (Blum, 1970b). No obstante que los soldados mostraron una tendencia a presentar un coeficiente de correlación mayor entre la dosis de la 2-heptanona y la respuesta EAG, no se encontraron diferencias

significativas en las respuestas a la 2-heptanona entre las tres castas, lo cual podría indicar que todos los individuos están equipados con la misma capacidad sensorial, quizá mismos tipos sensoriales expresando los mismos receptores a las feromonas de alarma en las membranas de las NRO.

De esta manera, las hormigas de las tres castas detectarían igualmente las señales químicas de alarma. Esto es muy importante ya que resulta ventajoso que todas las obreras reaccionen ante las señales de alarma debido a que es necesario movilizar las diferentes fuerzas laborales no sólo hacia el sitio donde se ha originado la perturbación o donde se encuentra el peligro (donde se encuentra más concentrada la feromona), sino también lejos de ella ya sea movilizándolo los recursos, como las crías o la reina misma, hacia cámaras más profundas o lejos del peligro. Mientras tanto, otras obreras se dirigen hacia el sitio bajo perturbación comenzando un ataque masivo en contra del enemigo. Generalmente, las obreras pequeñas actúan en contra de enemigos pequeños como artrópodos y otras hormigas, mientras que las obreras soldado gigantes generalmente atacan a enemigos grandes como vertebrados (Whitehouse & Jaffe, 1996). Así pues, la eficiencia que proporciona la división del trabajo incluso es ventajosa en situaciones en las que pareciera que el caos impera durante el ataque de un depredador. Por lo tanto, es posible que el olor que elicitte respuestas sensoriales antenales diferentes en los soldados comparados con otras castas, no sea la feromona de alarma, sino otros, tal vez el CO₂.

En las diferentes especies de hormigas se ha observado que las reacciones conductuales ante la presencia de feromonas de alarma naturales o sintéticas incluyen tanto el ataque como el transporte de la cría, e incluso el comportamiento de excavación, por lo que tanto la concentración, como el contexto aportarían el significado de la señal de alarma (Blum, 1970b). A bajas concentraciones las respuestas conductuales pueden ser sutiles sólo alertando a las hormigas o incrementando la velocidad de su marcha, mientras que en altas concentraciones las respuestas generadas pueden ser de pánico generalizado en donde los miembros de la colonia completa huyen del estímulo o corren por todos lados de manera errática con la posibilidad de que llegue a ser evacuado el nido. Así, la proximidad y similitud entre las curvas de las tres castas, sugieren mecanismos periféricos similares de detección, pero no necesariamente un procesamiento central similar de las señales sensoriales.

Las respuestas a las señales de alarma dependen de la concentración, del contexto, de la casta, etc. Muchas señales de alarma son multicomponentes y típicamente consisten de una o más feromonas además de incluir señales acústicas como la estridulación que refuerza la atracción. Así pues, aunque las diferentes castas respondan de manera similar en el nivel sensorial periférico, la misma señal podría liberar diferentes comportamientos, como ha sido reportado para otros insectos sociales (Robinson, 1987), lo cual podría depender de diferencias en el procesamiento central de la información sensorial, como ocurre en las abejas, en las que la respuesta olfativa es modulada por aminas biogénicas (Robinson, 1987; Schulz & Robinson, 1999, 2001; Wagener-Hulme et al., 1999). En las hormigas *Pheidole dentata*, una especie altamente polimórfica, los niveles de aminas biogénicas incrementan conforme las obreras envejecen, estas obreras de mayor edad se dedican principalmente al forrajeo, por lo que niveles altos de aminas biogénicas se correlacionan con el forrajeo (Seid et al., 2005).

2.2.2. Respuestas al ácido oleico

La pequeña magnitud del EAG en respuesta al ácido oleico registrado en las tres castas podría deberse a la baja volatilidad de este ácido graso. De hecho, el ácido oleico produjo las más bajas respuestas EAG en todas las castas y en todas las dosis (figuras 55 y 64), así como los menores cambios en la respuesta EAG con los incrementos en la dosis (figuras 62 y tabla 13). Aunque se ha sugerido que las sepultureras identifican a los cadáveres sólo por quimiorrecepción por contacto (Howard & Tschinkel, 1976), los resultados de esta tesis muestran que, tanto las forrajeras como las sepultureras presentan una débil relación logarítmica entre la amplitud del EAG (para los datos crudos, para los normalizados y para los coeficientes de correlación) y la concentración del ácido oleico, lo cual indica la detección antenal de moléculas de ácido oleico transportadas por el aire (figuras 50, 57 y 66). En otros estudios (Sheridan et al., 1996) no se encontraron respuestas EAG a los estímulos lipídicos de semillas, pero sí encontraron efectos cuando estos estímulos se aplicaron directamente sobre las antenas. En esta tesis, los resultados de los estudios conductuales y de los electrofisiológicos, sugieren que las moléculas de ácido oleico volatilizadas pueden ser detectadas por las antenas. En los bioensayos se observó que las obreras, primero orientan sus antenas hacia los cadáveres, después de lo cual se aproximan a él y finalmente hacen contacto con él (figura 37). Las hormigas mostraron un comportamiento similar en los bioensayos en los que se emplearon trozos de papel filtro embebidos con ácido oleico o con extracto de cadáveres. Por lo tanto, los resultados conductuales y electrofisiológicos demuestran que las antenas de las hormigas responden a las moléculas de ácido oleico transportadas por el aire.

Los resultados sugieren una cierta sensibilidad al ácido oleico en las forrajeras, lo que confiere a esta casta una amplia capacidad de discriminación. Si no existen diferencias entre la sensibilidad antenal al ácido oleico entre forrajeras y sepultureras a nivel periférico, es posible que las diferencias conductuales entre castas se deban a diferencias en el nivel central y que algún olor particular evoque respuestas conductuales diferentes en distintos individuos y en distintas situaciones, como ocurre en el caso de la hormiga *Pogonomyrmex badius* y su respuesta conductual al ácido oleico según el contexto (Gordon, 1983). Una de estas diferencias conductuales es la tendencia de las sepultureras a desplazarse dentro del nido (observación personal) con lo que ellas buscan activamente la oportunidad de enfrentarse con el estímulo liberador de la necroforesis. Ya a cierta distancia, las sepultureras detectan el estímulo liberador, el cual las atrae hacia la fuente, y posteriormente desencadena la secuencia de patrones conductuales que culminan con el abandono del cadáver en la pila de desperdicios (figuras 36 y 37). Así pues, las sepultureras no sólo se caracterizan por la sensibilidad al olor, sino también por la ejecución de la tarea. Aunque los resultados de esta tesis no permiten afirmar que las sepultureras tienen su sistema sensorio-perceptual especializado en la detección de estímulos necroforéticos o que su sensibilidad es mayor que la de otras obreras, sí ha quedado demostrado que conductualmente hay algunos individuos con una alta especialización y eficiencia en la localización y el transporte de compañeros del nido muertos hacia la pila de desperdicios.

No obstante que las curvas dosis-respuesta EAG de las sepultureras y forrajeras en respuesta al ácido oleico muestran un comportamiento logarítmico y casi idéntico, los soldados no mostraron un

incremento en la respuesta EAG al incremento en la concentración del ácido oleico. Esto demuestra que no son capaces de detectar esta sustancia, ni, mucho menos, de discriminar los cambios de concentración de este compuesto (figuras 50, 54, 57, 62 y 66).

Es interesante el hecho de que las forrajeras también respondan al ácido oleico, pues parece confirmar que, aunque la división del trabajo implica especialización, también es plástica. Las proporciones de obreras que realizan diferentes tareas cambian continuamente de acuerdo con las condiciones sociales (Hölldobler & Wilson, 1990; Wilson, 1985a,b) y gracias a la flexibilidad conductual de los individuos. Por lo tanto, si las sepultureras especializadas en la remoción de cadáveres desaparecen en un momento dado, los cadáveres no se acumularán dentro del nido, sino que otras obreras ocuparán el lugar de las obreras desaparecidas y realizarán tal labor, tal y como ocurre en las abejas (Robinson, 1992). Así, una obrera, dependiendo de las restricciones impuestas por la anatomía y/o fisiología, puede cambiar de tareas conforme las circunstancias lo requieren.

2.2.3. Respuestas al olor de forrajeo

Las curvas dosis-respuesta de las forrajeras y sepultureras en respuesta a la esencia de flores (figura 51) muestran un comportamiento logarítmico, lo cual indica una discriminación entre las diferentes concentraciones de este olor. Sin embargo, la curva que muestra una mayor pendiente es la de las forrajeras. Los soldados, por su parte, presentan una curva dosis-respuesta plana con una pendiente no significativa al ácido oleico, y casi nula a la esencia de flores. Para los datos normalizados, la única curva dosis-respuesta con una relación logarítmica entre la concentración y la respuesta EAG fue la de las forrajeras. A pesar de que, como con los otros olores, no se detectaron diferencias significativas entre las respuestas EAG de las tres castas en respuesta a la esencia de flores, las forrajeras mostraron una tendencia a presentar los mayores valores de respuesta a este olor, lo que sugiere la existencia de ciertas variaciones en la respuesta a este estímulo entre las castas (figura 62).

2.3. Diferencias significativas no, tendencias sí

Aunque el ANOVA no detectó diferencias significativas por olor entre las castas para los datos crudos, los datos normalizados, los índices, y aunque tampoco se detectaron diferencias significativas entre los coeficientes de correlación, puede apreciarse una tendencia tanto en los coeficientes de correlación, los cuales indican la intensidad de la asociación entre dos variables (figuras 57 y 70), como en las curvas dosis-respuesta y los resultados estadísticamente significativos de ANOVA para el efecto de casta: las forrajeras y sepultureras presentaron las mayores respuestas a todos los olores, mientras que los soldados tuvieron siempre las menores respuestas para los olores, excepto para el olor de alarma (figuras 56 y 63).

En los coeficientes de correlación de los datos crudos, no obstante que el análisis de comparación no reveló diferencias significativas entre castas por olor, se aprecia que para la 2-heptanona, los soldados tuvieron el mayor coeficiente de correlación ($r = 0.784$); para el ácido oleico, las sepultureras tuvieron el coeficiente de correlación mayor ($r = 0.335$), y para la esencia de flores, las forrajeras presentaron el mayor coeficiente de correlación ($r = 0.42$). Además, la de soldados fue la única casta en la que el

coeficiente de correlación para el olor relacionado con la especialización conductual, la 2-heptanona, fue significativamente mayor con respecto a los otros olores.

2.4. Forrajeras: generalistas disponibles para cualquier tarea

Contrario a lo que ocurre con los soldados (ver mas adelante), las forrajeras constituyen una casta de generalistas que pueden participar en una amplia gama de tareas. Esto se ve reflejado en las respuestas EAG a los diferentes olores, presentando para todos los olores respuestas mayores EAG (figuras 56, 63, 57 y 70) y una relación logarítmica entre la concentración y la amplitud de la respuesta EAG, lo cual sugiere que estas obreras son muy sensibles a los cambios en la concentración de cualquiera de los tres olores usados como estímulo. Estas obreras de tamaño intermedio pueden cambiar de tarea a cualquiera de las que realizan las obreras de diferentes tamaños (Wilson, 1980b). Se ha señalado que estas hormigas deben poseer una capacidad olfativa muy desarrollada ya que es necesario que evalúen la calidad de las hojas que colectan por medio del olfato y el gusto, proceso en el que interviene una forma de condicionamiento olfativo (Roces, 1990), además de la capacidad de seguir rastros olorosos dejados por otras obreras (Hölldobler & Wilson, 1990). Es posible que este condicionamiento esté involucrado en la rápida respuesta al forrajeo observada en los experimentos conductuales, ya que las obreras consideradas como forrajeras fueron aquellas que acudieron a la cámara de forrajeo sin reclutamiento. Sin embargo, las respuestas sensoriales antenales de las forrajeras siempre fueron las mayores para todos los olores y con una tendencia a ser las mayores para el olor de flores comparada con las respuestas de las otras castas a este mismo olor. De esta manera, el hecho de que se haya encontrado que las forrajeras responden bien a todos los olores, sugiere que estas obreras, al menos las seleccionadas para los experimentos electrofisiológicos, constituyen un grupo heterogéneo de generalistas disponibles para la realización diversas tareas cuando sea requerido.

2.4.1. ¿Subpoblaciones de forrajeras?

Como puede observarse en las gráficas de regresión de las figuras 57 y 70, la dispersión de los datos de las forrajeras en respuesta a los tres olores es considerable, comparada con los de las otras castas. Así, basados en los valores de las medias del EAG en respuesta a la 2-heptanona y a la esencia de flores, las forrajeras de *Atta mexicana* pueden clasificarse en dos diferentes subgrupos, uno de alta respuesta (FAR) y otro de baja respuesta (FBR). Para ambos olores las obreras de cada grupo son las mismas (figuras 58, 59, 60 y 61). Las respuestas diferentes entre forrajeras podrían sugerir que existen subpoblaciones que responden a diferentes clases de estímulos y que podrían estar relacionadas con algún tipo de especialización conductual como ocurre con otros insectos (Pankiw & Page, 2000). Pankiw & Page (2000) encontraron variación fisiológica sensorial en la percepción de las abejas de 1 día de edad a la sacarosa correlacionada con su comportamiento de forrajeo 2-3 semanas después. Ellos pudieron demostrar que las forrajeras pueden ser clasificadas en subgrupos especializados (como forrajeras de agua, néctar o polen) por medio de sus umbrales de respuesta a la sacarosa. Por su parte, Wilson (1980c) pudo demostrar que la eficiencia del forrajeo esta correlacionada con el tipo de material recolectado y la eficiencia energética. Así, pudo clasificar dos tipos de forrajeras, uno más

especializado en la colecta de material vegetal suave y otro en la colecta de material vegetal más duro. La eficiencia energética descrita por Wilson, indica que aquellas obreras con un rango de ancho de cabeza más estrecho (centrado aproximadamente a los 2.2 mm de ancho de cabeza), son energéticamente más eficientes en cortar material vegetal duro, mientras que en general, casi todas las obreras podrían cortar material vegetal suave. Sólo las obreras con un tamaño de cabeza superior a 1.6 mm son capaces de cortar material vegetal duro. Esto, evidentemente, depende del tamaño de las mandíbulas, cuyo tamaño está correlacionado con la talla de la hormiga.

Además, debe considerarse que las FAR que tienen respuestas EAG altas a la 2-heptanona, también tienen altas respuestas a la esencia de flores, mientras que las FBR a la 2-heptanona también tienen bajas respuestas a la esencia de flores. En *Atta texana* se ha reportado que las obreras que acarrear hojas o desperdicios o que atienden al hongo responden poco a la presencia de altas concentraciones de feromona de alarma. Probablemente exista una relación entre la respuesta a los olores y la partición de tareas, ya que el forrajeo puede incluso dividirse en aquellas forrajeras que cortan hojas dejándolas caer al suelo, mientras que son otras las que las transportan hasta el nido (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990; Ratnieks & Anderson, 1999). Es posible que las FBR sean aquellas que acarrear el material vegetal hacia el nido y que su baja respuesta a la feromona de alarma se deba a que fuera del nido hay muy poco que proteger salvo la vida misma (las abejas forrajeras, por ejemplo, también presentan un comportamiento defensivo bajo cuando están colectando alimento lejos del nido). Por otra parte, la baja respuesta a la esencia de flores probablemente se deba a una subespecialización del forrajeo: tal vez estén especializadas en la colecta de flores u otro material que sirva de sustrato al hongo. En contraste, las FAR podrían estar especializadas en la detección de nuevas fuentes de alimento y en la evaluación de su calidad como sustrato. Aunque es posible clasificar las forrajeras de *A. mexicana* en diferentes subgrupos de acuerdo a las respuestas EAG, sólo es posible especular sobre el significado conductual y social de esas diferentes respuestas antes de que alguna hipótesis sea confirmada en experimentos conductuales y de EAG.

2.5. Soldados: la casta más especializada

El patrón de las curvas dosis-respuesta de los soldados (figura 54), principalmente aquellas para el ácido oleico, así como el hecho de que mostraran respuestas EAG significativamente menores a las respuestas de las forrajeras y las sepultureras (figura 56) podría deberse a las propiedades de las antenas de los soldados. Esto determinaría su baja capacidad para detectar compuestos no relacionados con la tarea que ellos realizan, lo que indica especialización en el sistema sensorial periférico. Sin embargo, esta casta mostró una alta relación dosis-respuesta en el caso de la 2-heptanona, lo que significa una alta resolución sensorial (figuras 57 y 70). El ANOVA reveló efecto de casta entre los soldados y las otras dos castas, con las menores respuestas EAG para los primeros. Estos resultados fueron consistentes tanto para los datos crudos como para los datos normalizados, así como para el *Índice* I_{EAG} . Sin embargo, para el *Índice* 3_{EAG} no se detectó efecto significativo de casta, probablemente debido al procedimiento para obtener dicho índice. La consistencia de los resultados de todos los

análisis, así como la baja variabilidad de las respuestas EAG de los soldados, hace confiables las interpretaciones sobre las respuestas EAG.

Además, aunque cada casta presentó coeficientes de correlación mayores para el olor relacionado con sus tareas específicas, el análisis de comparación de los coeficientes no detectó diferencias significativas para los coeficientes de correlación entre castas por olor. Lo mismo se encontró para los coeficientes de correlación de los datos normalizados, excepto para las sepultureras. Sin embargo, comparando los coeficientes de correlación entre olores por casta, se encontró evidencia de que los soldados presentan especialización sensorial ya que el coeficiente de correlación para la 2-heptanona, tanto para los datos crudos como para los datos normalizados, fue significativamente mayor que los coeficientes de correlación para el ácido oleico y para la esencia de flores. Esto indica una alta correlación entre la concentración de la feromona de alarma y la respuesta EAG, demostrando que los soldados discriminan muy bien los cambios en las concentraciones de la 2-heptanona, mientras que no discriminan bien los cambios en concentración de los otros dos olores (ácido oleico y esencia de flores), cuyos coeficientes de correlación son estadísticamente similares (figuras 57 y 70). Esto coincide con los resultados de ANOVA del *Índice I_{EAG}* en el cual se compara el rango de respuesta EAG para los diferentes olores, es decir, el rango de discriminación de cambios en la concentración de los olores. Los resultados del rango (*Índice I_{EAG}*, figura 62), al igual que los de ANOVA (figura 63 y 68) demuestran que los soldados constituyen la casta con las menores respuestas EAG a todos los olores y dosis. Además, en todos los análisis realizados, los soldados presentaron las menores variaciones, sugiriendo que constituyen un grupo fisiológicamente homogéneo. Juntos, estos resultados sugieren que los soldados son una casta altamente especializada, con una pobre capacidad para detectar otros olores diferentes que aquellos relacionados con la tarea que tienden a realizar. Estas señales no serían las únicas que los soldados de *Atta* no pudieran detectar, ya que se ha encontrado que los soldados muestran una muy baja respuesta a las vibraciones producidas por la estridulación que realizan las obreras en combinación o no de otras señales (Markl, 1983, citado en Hölldobler, 1999). Esto resulta interesante ya que la estridulación constituye una señal de atracción durante el forrajeo y de excavación anexa a las señales químicas de alarma que producen las obreras de *Atta*.

Esta limitada discriminación a los olores podría estar basada en la proporción de diferentes clases de sensilas presentes sobre las antenas de los soldados. Jaisson (1972) reportó que diferentes clases de sensilas varían de acuerdo con el tamaño de las obreras en *Atta laevigata*: la sensila celocónica disminuye en número sobre las antenas conforme disminuye el tamaño de las obreras; de la misma manera, la sensila ampulácea aumenta en número con el tamaño corporal, por lo que existe un mayor número de sensilas del tipo ampulácea en los soldados. Diferencias en la proporción de otras sensilas también han sido reportadas para otras especies de hormigas (Renthal et al., 2003). Es posible, pues, que los soldados no respondan más a la feromona de alarma porque tengan mayor sensibilidad a estas sustancias, ni porque tengan mayor cantidad de sensilas responsables de la detección de dichas feromonas, sino, tal vez responden preferentemente a estos olores porque tienen menos sensilas de otros tipos en sus antenas, lo cual los haría menos sensibles a otros olores diferentes a los de alarma. Si esto es así, estaría relacionado con los resultados neuroanatómicos descritos en esta tesis en los que se

encontró que una gran parte de los glomérulos del LA de los soldados parecen pequeños o atrofiados, quizá debido a la reducida aferencia de axones de las NRO del pequeño número de sensilas antenales.

El presente trabajo presenta evidencia de que el sistema sensorial periférico de *Atta mexicana* podría estar involucrado en la división del trabajo, al menos con relación a la reducida capacidad de los soldados para detectar otras señales diferentes a aquellas relacionadas con la defensa de la colonia. Así pues, los soldados podrían constituir una adaptación tanto morfológica como fisiológica cuya tarea principal es la defensa. Por lo tanto, aunque muchos autores habían supuesto que los soldados presentarían una sensibilidad mayor a las feromonas de alarma (Wilson, 1985c, Topoff et al., 1973) comparadas con otras obreras, en realidad, los soldados presentan una mayor sensibilidad a las feromonas de alarma en comparación con otros olores: no es que los soldados respondan a las feromonas de alarma más que otras obreras, sino que responden menos a otros olores. El reducido espectro olfativo de los soldados está relacionado con su reducido repertorio conductual, el cual está limitado exclusivamente a la defensa del nido, aunque la defensa del nido no es una actividad exclusiva de los soldados ya que la mayoría de las obreras puede participar para proteger al nido. Sin embargo, cuando una sociedad presenta polimorfismo, las obreras realizan las tareas para las que están mejor adaptadas en tamaño, forma y conducta. Los especializados soldados son costosos de producir por lo que en las sociedades polimórficas, sólo son producidos en estados avanzados de desarrollo y no son tan numerosos como otras obreras ya que a mayor tamaño de los soldados, menor es su número en la colonia (Weber, 1972). De acuerdo con el concepto de superorganismo, los soldados constituirían los componentes más especializados del sistema cuya forma, fisiología y conducta sólo tienen significado en relación con la sobrevivencia de la colonia. La mayoría de las obreras en una sociedad forman parte del grupo de generalistas que realizan la mayoría de las tareas pudiendo cambiar de una a otra conforme sea requerido. De esta manera, los individuos generalistas son necesarios, mientras que los especialistas son valiosos pues su especialización morfológica y fisiológica ayuda en la construcción de la sociedad, aunque depende de la reducción de ciertas capacidades generales individuales. Aunque los soldados constituyen una casta muy especializada morfológica, conductual y fisiológicamente, es probable que no sea la única casta que muestre especialización en su fisiología sensorial periférica. Las cuidadoras de hongos podrían ser otra casta especializada, pero esto aun necesita ser probado.

2.6. Sepultureras

Las obreras sepultureras no presentaron tendencias claras en los experimentos electrofisiológicos, de manera que, aunque fueron identificadas como especialistas, probablemente constituyan un grupo heterogéneo en el que podrían estar incluidos individuos con predisposiciones para la necroforesis e individuos que han tenido mayor experiencia realizando esta tarea. Esto se debe a que esta casta es difícil de identificar pues, como puede deducirse a partir de el número de sepultureras sometidas al EAG y de las que se obtuvieron resultados, las obreras especializadas en la necroforesis (aquellas que realizan la necroforesis dos o más veces) se encuentran en reducidas cantidades en las colonias de hormigas. Así pues, se requieren de más estudios que involucren otras aproximaciones para determinar las causas o correlatos de la especialización necroforética en las sociedades de hormigas.

3. DISCUSION III: ESTRUCTURA DE LOS LA Y CONEXIONES HACIA LOS CF

3.1. Lóbulos antenales

3.1.1. Organización de los lóbulos antenales

En este trabajo se describe por primera vez la organización del LA para las hormigas *A. mexicana* y *C. ocreatus*. Las principales aferencias que provienen de las antenas están constituidas por los axones de las NRO que terminan en los glomérulos, y de mecanorreceptores que terminan en el CMMA. Juntos, los axones quimio y mecanosensoriales, además de los axones de las motoneuronas que se dirigen hacia los músculos antenales, forman el nervio antenal (NA).

La organización espacial gruesa del LA descrita en este trabajo es muy similar a la descrita en las abejas (Arnold et al., 1985, 1988; Galizia et al., 1999a), otros himenópteros y la pollilla *Manduca sexta* (Homberg et al., 1989): glomérulos rodeando una zona aglomerular de neuropilo, con grupos de somas neuronales en la periferia del LA. En otras especies de insectos, como en las cucarachas *Periplaneta americana*, los glomérulos se encuentran distribuidos por todo el LA (Homberg et al., 1989). En la distribución espacial del arreglo glomerular, los LA son más parecidos a los de las abejas, en las cuales se han descrito 4 grupos de glomérulos inervados por 4 tractos (T1-T4) provenientes del NA (Arnold et al., 1985, 1988; Galizia et al., 1999a). Otros dos tractos (T5 y T6) han sido descritos en las abejas que se separan del resto dirigiéndose hacia el CMMA (Galizia et al., 1999a). En este trabajo, en los soldados de *A. mexicana* y de *C. ocreatus*, se encontraron 6 grupos de glomérulos, cada uno inervado por una ramificación del NA llamada tracto (T1-T6). En las hormigas estudiadas dos tractos (T7 y T8) aparte de los 6 que inervan los grupos de glomérulos se dirigen hacia el CMMA, por lo que en total, en hormigas se encontraron 8 tractos, comparados con los 6 que se conocen en las abejas. En esta tesis se han denominado T5 y T6 a los otros dos tractos que arriban al LA provenientes del NA, por lo que no deben confundirse con los tractos que, en las abejas, se dirigen hacia el CMMA. Sin embargo, de acuerdo con características morfológicas y topográficas, tanto los tractos T1-T4, como los grupos de glomérulos 1-4, parecen ser homólogos en abejas y hormigas. El tracto T5 de los LA de las hormigas parece formarse, en su base, a partir de la unión con el T3 en la región más anterior del deutocerebro (figuras 78, 85 y 89). El T6 de los LA en hormigas parece separarse inmediatamente del NA al entrar en él, y dirigirse rápidamente hacia la región posterior (figuras 82 y 86). Estos dos tractos (T5 y T6) inervan los grupos de glomérulos 5 y 6 respectivamente y es importante notar que parte de la importante diferencia entre los LA de abejas y hormigas es su tamaño relativo y número de glomérulos presentes, ya que las abejas son insectos “visuales”, y las hormigas son insectos “más olfativos”. Mientras que en las hormigas *Atta* los LA pueden llegar a representar hasta el 12 % del total del cerebro y en *Camponotus* hasta el 10%; en las abejas, los LA apenas alcanzan un 3% y está compuesto por entre 156 y 166 glomérulos (Gronenberg & Hölldobler, 1999). En este trabajo, se encontró que los LA de los soldados de *A. mexicana* pueden llegar a tener entre 305-313 glomérulos, mientras que los de *C. ocreatus* entre 376-385. Esto hace una diferencia importante, ya que se ha considerado a las hormigas como insectos altamente olfativos, comparados con las abejas. Además, en las abejas se han descrito tres grupos de somas de neuronas centrales (Rospars, 1988; Homberg et al., 1989), mientras

que en las hormigas estudiadas en este trabajo se encontraron cinco grupos de neuronas. Es muy probable que si existe mayor número de glomérulos en los LA de las hormigas, también haya más neuronas centrales que establezcan las conexiones entre glomérulos y entre estos y el protocerebro.

La organización de los seis grupos de glomérulos dos regiones, anterior y posterior, cada una conectada al cáliz por NP ya sea a través del tracto antenocerebral interno (TACI) o el tracto antenocerebral externo (TACE), podría tener algún significado funcional en el que las regiones pueden representar especialización en el procesamiento diferencial de olores.

Además, existe una gran similitud entre los LA de las abejas y los de las hormigas, lo cual sugiere una considerable homología estructural en los himenópteros aculeatos. Es posible que esta conservada organización tenga un significado funcional, relacionado a la generación del código olfativo y la vida social. Cada glomérulo recibe aferencias de uno o muy pocos tipos de NRO, las cuales, a su vez, expresan un sólo gen receptor olfativo, es decir, presentan un tipo de proteína receptora. Por lo tanto, cada glomérulo responde con una mayor actividad a determinados olores, aquellos a los que sus NRO son sensibles, es decir, al RRM de las NRO (Galizia & Menzel, 2000b). Pero el código olfativo comprende el patrón de actividad glomerular del LA: un olor es codificado en la actividad de varios glomérulos, y varios glomérulos pueden participar en la codificación de diferentes olores (Sachse et al., 1999). Los glomérulos vecinos, frecuentemente tienen perfiles de respuesta similares, de manera que es posible que los grupos de glomérulos respondan a familias de olores o que participen en la codificación de olores. Esto es posible ya que, en las abejas, se ha encontrado que algunas familias de olores sólo son detectadas por determinados grupos de glomérulos, aunque estos mismos grupos de glomérulos puedan ser activados por otros olores (Sachse et al., 1999). Si cada tracto del LA inerva un grupo de glomérulos, posiblemente este reciba las aferencias de NRO con patrones de respuesta similares y que expresen proteínas receptoras sensibles a dichas familias de olores. Posiblemente, la importancia y número de las aferencias sensoriales de las NRO esté representada en el tamaño de los glomérulos, mientras que el número de glomérulos por grupo glomerular sea un reflejo de las proporciones de los tipos de NRO en las antenas, como en el caso de los 3-4 macroglomérulos encontrados en los soldados de *A. mexicana* (figuras 84 y 85), o los dos encontrados en *C. ocreatus* (figuras 87-89). Por lo tanto, la organización del LA contendría una representación funcional de las diferentes poblaciones de NRO sobre la antena, aunque no sería el único aspecto de su significado organizacional. Se ha sugerido que la importancia de la cercanía de glomérulos que responden a olores similares, se basa en la posibilidad de que esta vecindad refleje un arreglo espacial óptimo para un mecanismo de inhibición lateral que permitiría aumentar la resolución de perfiles de respuesta (Galizia & Menzel, 2001). Sin embargo, debido a que no siempre los glomérulos activados son vecinos, el significado de la organización en grupos de glomérulos del LA y la formación del código olfativo requiere de más investigación fisiológica y morfológica. En cualquier caso, estudios de imagen en vivo de la actividad del LA demuestran que la organización fisiológica básica es similar en hormigas y abejas (Galizia et al., 1999b), lo cual ha sido confirmado con los resultados neuroanatómicos presentados aquí.

3.1.2. Comparación entre lóbulos antenales de *Atta mexicana* y *Camponotus ocreatus*

La homología entre los LA de *Atta mexicana* y *Camponotus ocreatus*, especies pertenecientes a subfamilias distintas (separadas por más de 60 millones de años de evolución), sugiere que la estructura general de los LA se ha conservado, por lo que debe tener alguna importancia en la vida social basada en el olfato, ya que otros insectos no-sociales pero olfativos (Homberg et al., 1989; Laissue et al., 1999) no presentan una organización glomerular como la de los himenópteros. En los himenópteros sociales, los estímulos químicos son los más importantes ya que la comunicación ocurre dentro de los oscuros nidos y está basada en la emisión y recepción de mezclas complejas de feromonas que regulan el comportamiento del superorganismo.

En las dos especies de hormigas estudiadas, tanto los tractos T1-T6 como los grupos de glomérulos mantienen la misma distribución topográfica (figuras 82-85 y 86-89). Sin embargo, *A. mexicana* tiene unos 80 glomérulos menos que *C. ocreatus* (cuyo LA tiene unos 380). Esto sugiere una mayor especialización de los soldados en el sistema de castas de *A. mexicana* en comparación con los soldados en el sistema de castas de *C. ocreatus*, es decir, que el sistema de castas de *A. mexicana* produce individuos más especializados y adaptados a funciones más específicas dentro de la sociedad. Esto es posible tomando en cuenta los conteos realizados para otras especies de hormigas de la tribu Attini como *Acromyrmex octospinosus* que presenta 120 glomérulos (Rospars, 1988); obreras *minor* de *Atta vollenweideri* presentan 178 mientras que las obreras *mayor* presentan 243; obreras *minor* de *Atta sexdens* presentan 223, y obreras *mayor* presentan 189 (Kleineidam et al., 2005). Por el contrario, los conteos para otras especies del género *Camponotus*, indican en general un mayor número de glomérulos, por ejemplo en *Camponotus vagus* hay 200 glomérulos (Rospars, 1988) y en *C. floridanus* los soldados presentan un promedio de 452 (Kleineidam et al., 2008). De esta manera, es posible que la especialización del sistema de castas de *Atta* se refleje en el reducido número de glomérulos en el LA, lo cual estaría relacionado con la especialización conductual, morfológica y fisiológica.

Debe considerarse que *Atta mexicana* y *Camponotus ocreatus*, son especies con formas de vida muy disímiles, ya que en la primera, el sistema de castas está basado en el polimorfismo como una adaptación al cultivo de hongos a partir de sustrato vegetal (aunque también existe polietismo temporal), mientras que en *Camponotus ocreatus*, aunque existen obreras mayor con enormes cabezas que son llamadas soldados y obreras de diferentes tamaños, en realidad, el género *Camponotus*, es considerado dimórfico (Wilson, 1953, 1954, 1974; Hölldobler & Wilson, 1990) más que polimórfico, cuya división del trabajo está basada en el polietismo temporal con individuos con desarrolladas capacidades de aprendizaje y memoria como otras *Camponotus* (Gronenberg et al., 1996; Hölldobler & Wilson, 1990). Las hormigas *Camponotus* dependen más de la visión que las hormigas *Atta*, las cuales son consideradas como hormigas olfativas. Lo anterior no quiere decir que las *Camponotus* tengan atrofiado su sistema olfativo, sino que las *Atta* tienen atrofiado su sistema visual, de manera que su principal sistema sensorial es el olfato. A primera vista esto parece contradecir los resultados de esta tesis ya que *C. ocreatus* presenta más glomérulos en el LA que *A. mexicana*. Sin embargo, la clasificación de “hormigas visuales” versus “hormigas olfativas”, se refiere a la relación que existe entre las regiones del cerebro que procesan señales visuales u olfativas. De esta manera, en

Camponotus, los LO y la región del collar (que recibe aferencias visuales) de los CF son grandes, mientras que en *Atta*, estas regiones están reducidas, pero los LA y la región del labio (que recibe aferencias olfativas de los LA) de los CF son relativamente más grandes (Gronenberg & Hölldobler, 1999). Además, la población de glomérulos de los LA de los soldados de *A. mexicana* es heterogénea: la mayoría de los glomérulos se observan pequeños comparados con los 3-4 glomérulos desproporcionadamente grandes de los grupos 3 y 5. En contraste, en los soldados de *C. ocreatus* existe una relativa uniformidad en los glomérulos del LA.

Debido a que el neuropilo de los glomérulos está compuesto por las aferencias de las NRO (además de neuritas y axones de las neuronas centrales), es posible que el aparente tamaño reducido de la mayoría de los glomérulos se deba a la relativa baja densidad de aferencias de las NRO que responden a diversos olores, es decir, estos glomérulos presentarían un grado de atrofia; mientras que los macroglomérulos podrían presentar una mayor cantidad de aferencias provenientes de una población alta de NRO sensibles a olores casta-específicos presentes sobre la antena. Lo anterior puede estar relacionado con las diferentes proporciones de sensilas que describió Jaisson (1972). Esto significaría que los macroglomérulos de las obreras *mayor* de *A. mexicana* podrían estar especializados en el procesamiento de olores particulares, probablemente feromonas de alarma u otros olores importantes para los soldados. De hecho, Yamagata et al., (2006) han encontrado un pequeño subgrupo de glomérulos en los LA de *Camponotus obscuripes* especializados en el procesamiento de feromonas de alarma. Probablemente este grupo de glomérulos especializados en el procesamiento de feromonas de alarma pertenezcan al grupo de glomérulos número 1. Kleineidam et al., (2005) describieron un glomérulo agrandado en forrajeras de *Atta vollenweideri*, que participa en la detección de la feromona de rastro. Estos macroglomérulos pueden influir directamente en el patrón generalizado de activación del LA y, por supuesto, también del protocerebro, es decir, en la codificación de los olores y así, determinar el comportamiento dependiente del olfato.

Estas interpretaciones requieren de otros experimentos conductuales, morfológicos, morfométricos, electrofisiológicos, así como de la comparación de la estructura del LA entre las diferentes castas de *A. mexicana* (principalmente las obreras *minor*), para ser probadas. En cualquier caso, el reducido número de glomérulos en el LA, la aparente atrofia de la mayoría de los glomérulos, la presencia de algunos glomérulos desproporcionadamente grandes, y los resultados electrofisiológicos de sensibilidad antenal descritos en este trabajo, sugieren fuertemente una alta especialización morfofisiológica de los soldados relacionada con su comportamiento. Recuérdese que tanto el número como el tamaño de los glomérulos podría estar relacionado con la capacidad de discriminación olfativa.

Es posible que la vida social imponga restricciones y requerimientos a la maquinaria neural y al procesamiento de feromonas sociales. Las variaciones en la estructura de los LA estarían relacionadas con las particulares formas de vida de ambas especies. Así, las hormigas *Atta* representan un gradiente de complejidad social incrementada respecto al tamaño de las colonias, a su polimorfismo y el sistema de comunicación química, con individuos que tienen sistemas olfativos mejor desarrollados: LA más grandes que los LO (Jaffe & Perez, 1989; Gronenberg & Hölldobler, 1999). Las especies del género *Atta* presentan sociedades altamente complejas, en las que las habilidades de aprendizaje y otras

capacidades “mentales” individuales parecen estar reducidas o atrofiadas, quizá como una consecuencia del extremo polimorfismo en el que los individuos están especializados morfológica y fisiológicamente para construir una sociedad compleja a expensas de las capacidades generales de los individuos: el superorganismo. De esta manera, la diferenciación neural de las castas de obreras no es uniforme, por lo que la presencia de estos macroglomérulos indica un desarrollo alométrico diferencial en el LA de las castas de *A. mexicana*, quizá regulado en el nivel social. Así pues, es muy posible que en la sociogénesis de cada especie haya evolucionado un patrón particular de diferenciación y especialización neural entre sus castas de obreras (Jaffe & Perez, 1989).

3.2. *Un mapa olfativo en los cuerpos fungiformes: la odotopía*

Contrario al sistema visual, el mapa de las señales primarias olfatorias hacia el SNC se encuentra organizado de manera discontinua y puntuada. Los LA son el primer centro de procesamiento olfativo en los insectos; y los CF, con los cuales se conecta, son sitios de procesamiento multimodal involucrados en el control y generación del comportamiento complejo y en el aprendizaje y memoria.

Determinar la estructura general de los LA, y de sus conexiones eferentes hacia el cáliz de los CF ha sido la meta de muchos investigadores (por ejemplo, Müller et al., 2002). Los resultados presentados en este trabajo son un primer paso para entender la lógica de la distribución topográfica de las vías olfativas, y, como una consecuencia, comprender la generación del código olfativo. Las eferentes de los LA se conectan con al menos tres capas diferentes en la región del labio del cáliz de los CF de acuerdo con el grupo glomerular. Cada capa labial es inervada por diferentes tractos y recibe axones de diferentes grupos de glomérulos y de diferentes poblaciones de neuronas centrales. Estos resultados sugieren que los grupos de glomérulos están representados topográficamente en la región labial de los CF (figura 90). A pesar de las capas encontradas y descritas en este trabajo, podría haber una segregación más fina de las NP hacia el labio de los CF, como lo sugiere el número de capas encontradas en otros estudios con trazadores (Gronenberg, 2001; Gronenberg & López-Riquelme, 2006). Yamagata et al. (2007), de hecho, han demostrado que los glomérulos que procesan olores de alarma, están conectados por NP hacia el cáliz en donde los axones terminan en el labio, pero ellos no se dieron cuenta de que dichas terminaciones se encuentran en la capa externa.

Si consideramos que durante la introducción del electrodo cargado con el colorante se está causando daño principalmente a las neuronas de una región particular, entonces son esas neuronas las que principalmente están incorporando el colorante y son esas neuronas las que aparecen teñidas en sus sitios de aferencia o eferencia. Si se están dañando diferentes NP que tienen dendritas en diferentes glomérulos, entonces, esto podría significar que el patrón de tinción en el labio corresponde a grupos de glomérulos, tal y como lo muestran los resultados (figuras 92, 93, 94 y 95). Esto es muy probable, ya que en muchos estudios se ha demostrado que muchas NP envían dendritas a un solo glomérulo (Galizia & Menzel, 2000; Wang et al., 2001) Así, glomérulos vecinos tienen dendritas de NP que mandan axones a uno de los subcompartimientos del labio, en donde el LA podría estar representado en, al menos, tres capas o subcompartimientos. Lo anterior estaría de acuerdo con el hecho de que glomérulos vecinos con perfiles similares de respuesta están representados en la misma capa del labio

del cáliz protocerebral (Galizia & Menzel, 2000b). Si la codificación de los olores en el LA se basa en el patrón de actividad de diferentes glomérulos, el labio podría codificar de manera convergente y abstracta este patrón de actividad glomerular en actividad diferencial de las tres o más capas de las que está constituido. Si vemos al labio como una unidad estructural y funcional, la codificación de la actividad glomerular podría ser descrita como ondas de actividad conformadas por la actividad de las diferentes capas que constituyen al labio. De hecho se ha reportado que existen oscilaciones de actividad de alrededor de los 20 Hz en los CF evocadas por la estimulación olfativa en el nivel antenal (Laurent, 1996), así como oscilaciones similares en los LA (Galizia & Menzel, 2000b). Este mapa odotópico caracterizado por la convergencia espacial, permitiría la integración de las señales olfativas, desde las antenas, hasta el protocerebro.

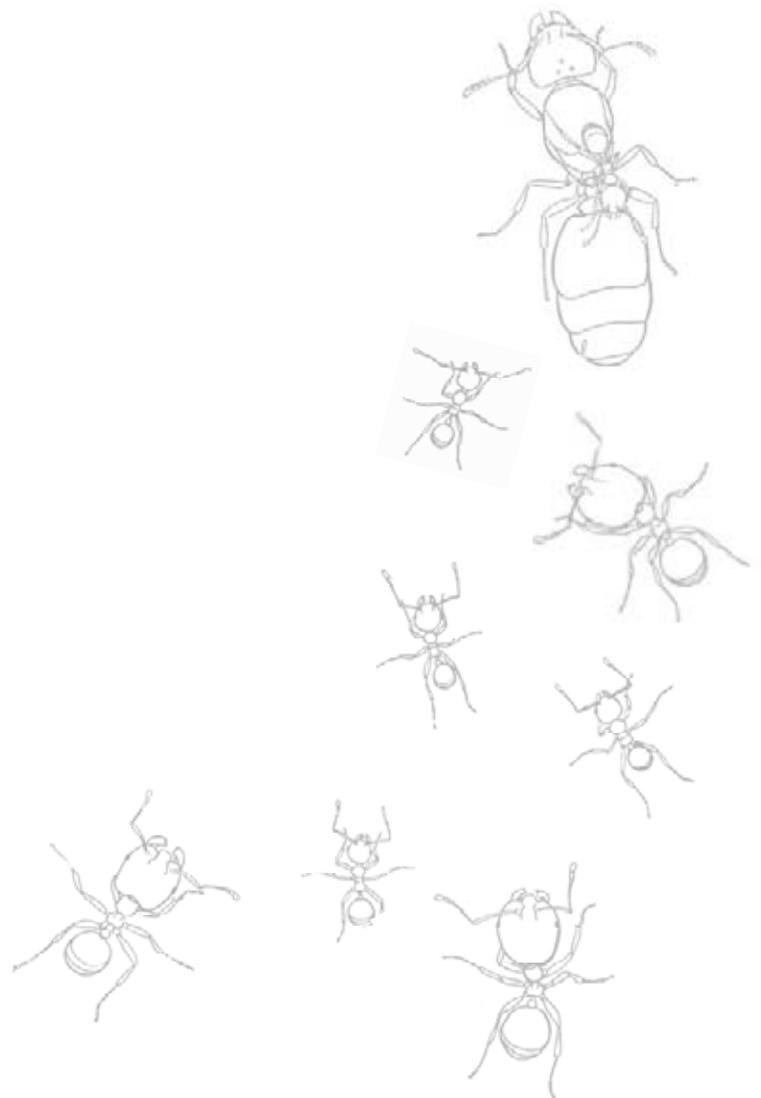
Así pues, en esta tesis se reporta la existencia de una representación espacial del LA en insectos, no obstante que existen otros reportes de algún tipo de representación espacial del LA en el protocerebro en otros insectos: *Drosophila melanogaster* (Marin et al., 2002; Wong et al., 2002) y en *Apis mellifera* (Abel et al., 2001).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, parece que la información procesada por los CF podría ser más compleja y específica, pues como no había evidencia de que existiera segregación, se suponía que la distribución de las terminaciones provenientes del LA era amplia y sin patrón aparente, por lo que se asumía que estos centros antenales no estaban necesariamente involucrados en la discriminación olfativa, aunque ya se había demostrado por medio de experimentos funcionales y morfológicos que los CF constituyen centros de procesamiento múltiple en paralelo (Strausfeld, 1991). Estos resultados sugieren que los grupos de glomérulos están representados topográficamente en la región labial de los CF, probablemente estableciendo alguna clase de gruesa odotopía. Esto, probablemente signifique que las subpoblaciones de células Kenyon están especializadas en la recepción de aferencias de grupos particulares de glomérulos, y, de, por lo tanto, información olfativa diferencial, la cual es posteriormente integrada y las señales adecuadas dirigidas hacia los lóbulos α y β . Es posible que diferentes clases de olores activen las diferentes capas que componen el labio de los CF, implicando, primero, una modulación más compleja de las neuronas eferentes de los CF y segundo, que cada capa procesa una clase de información importante según el contexto. La relación de conexiones sería: NRO especializadas convergen en glomérulos particulares probablemente de un grupo glomerular específico y estos grupos convergen, a su vez, en alguna o algunas de las capas del labio del cáliz. En *Drosophila melanogaster*, se ha reportado que diferentes olores activan subgrupos de somas de neuronas intrínsecas de los CF, lo cual sugiere que las neuronas de tercer orden, células Kenyon, están espacialmente segregadas en su respuesta a diferentes olores (Marin et al., 2002; Wong et al., 2002). Los grupos de NP están segregadas inervando grupos de glomérulos por separado y enviando axones por vías separadas, ya sea a través del TACI, el TACE o el TACM. Esto es importante ya que se ha encontrado evidencia de que, en *Camponotus obscuripes*, determinadas NP sensibles a feromonas de alarma inervan un sólo glomérulo (Yamagata et al., 2006).

Esto podría jugar un papel importante en el aprendizaje y la memoria y en el procesamiento de información multimodal. Faber & Menzel (2001) encontraron en registros optofisiológicos que la

región del labio se activa al estimular olfativamente a las abejas, y que esta activación se incrementa con el condicionamiento. Además, debido a las diferencias en los LA encontradas entre especies, es posible que existan diferencias morfométricas (volumen de las regiones labiales, número y forma de dendritas y sinapsis, etc.), de arquitectura neural así como funcionales en esta representación del LA en los CF que deben comprobarse en experimentos futuros, y que estarían relacionadas con los estímulos que son importantes en el ambiente y organización social de cada especie.

No obstante que aún se desconoce cómo es codificada la información olfativa en los centros superiores del cerebro, el hallazgo de este mapa odotópico puede representar un paso importante en esa dirección debido a la importancia de la segregación de aferencias olfativas en los CF, los cuales son el centro fundamental de procesamiento de información multimodal. El significado de este mapa odotópico sólo puede ser explicado con futuros experimentos neuroanatómicos, morfométricos, funcionales y conductuales apropiados.



IX. CONCLUSIONES



· CONCLUSIONES

1.1. Análisis químico y bioensayos

1. El comportamiento necroforético de la hormiga *Atta mexicana*, descrito en este trabajo, es altamente estereotipado y dependiente de liberadores químicos, los cuales, de acuerdo con las observaciones realizadas, producen orientación olfativa: las sepultureras orientan sus antenas hacia los cadáveres de compañeras del nido antes de hacer contacto con ellos.
2. Hay obreras, llamadas sepultureras, que tienden a realizar el comportamiento necroforético más frecuentemente que otras obreras.
3. Los cadáveres de hormigas de *A. mexicana* presentan ácido oleico, sustancia que actúa como indicador de hormigas muertas y como liberador de la necroforesis (necromonas).
4. Los soldados de la hormiga *A. mexicana* responden con comportamiento agresivo a la 2-heptanona, compuesto que forma parte de la secreción de alarma de otras especies de hormigas del género *Atta*, y de muchos himenópteros sociales.

1.2. Fisiología sensorial

1. El olor de alarma (2-heptanona) produce las mayores respuestas EAG en las obreras de las tres castas seleccionadas, forrajeras, sepultureras y soldados; la esencia de flores produce respuestas intermedias, y el ácido oleico, las menores.
2. Forrajeras y sepultureras presentaron las mayores respuestas EAG, mientras que los soldados presentaron respuestas significativamente menores a las respuestas de las otras castas.
3. Ninguna casta estudiada presentó respuestas significativamente mayores al olor relacionado con su especialización conductual.
4. Las diferencias conductuales a los olores probablemente se deban a diferencias en el procesamiento de las señales olfativas en el SNC, probablemente en los LA, en el protocerebro o en ambos.
5. Se encontraron dos subgrupos de forrajeras según sus respuestas EAG a la 2-heptanona y a la esencia de flores: un grupo con altas respuestas y el otro con bajas respuestas. Es posible que existan subpoblaciones de forrajeras especializadas en la colecta de diferentes sustratos vegetales o que realicen diferentes funciones durante el forrajeo.
6. Las altas respuestas de las forrajeras a todos los olores sugieren que esta casta es heterogénea, pudiendo estar constituida por individuos generalistas capaces de cambiar de tarea cuando es necesario.
7. Los soldados presentaron un coeficiente de correlación entre la dosis de la 2-heptanona y la respuesta EAG significativamente mayor que el coeficiente de correlación entre la dosis de los otros dos olores y sus respectivas respuestas EAG.
8. Las respuestas significativamente menores de los soldados a los olores, excepto a la 2-heptanona, sugieren que esta casta tiene una capacidad olfativa disminuida a los olores no relacionados con la defensa, haciendo de esta, la casta más especializada.

9. Aunque las sepultureras son las obreras que realizan más frecuentemente la necroforesis, y aunque el número de ocasiones que la realizan es mayor que si este comportamiento fuera realizado por azar al encontrar los estímulos relacionados con esta tarea (los cadáveres), las sepultureras no presentaron mayores respuestas EAG que las otras dos castas, lo cual sugiere que las diferencias conductuales con las otras dos castas se deban a diferencias en el nivel central.

1.3. Neuroanatomía: estructura de los LA y conexiones hacia los CF

1. Los somas de las neuronas centrales se encuentran distribuidas en 5 grupos en la periferia del LA.
2. *A. mexicana* presenta en promedio 305 ± 4 glomérulos, mientras que *C. ocreatus* presenta 380 ± 4 glomérulos.
3. Los soldados de *A. mexicana* y *C. ocreatus* presentan la misma organización general del LA: existen 6 grupos principales de glomérulos en los LA de las hormigas *A. mexicana* y *C. ocreatus*, y 6 tractos (T1-T6) en los que el NA se divide al entrar al LA. Cada tracto inerva a un grupo de glomérulos.
4. Los soldados de *A. mexicana*, presentan glomérulos menos uniformes, con la mayoría de los glomérulos de tamaño reducido y con 3-4 glomérulos agrandados en los grupos glomerulares 4 y 5.
5. Los soldados de *C. ocreatus* presentan glomérulos de tamaño más uniforme con un glomérulo agrandado en el grupo 4 y uno en el grupo 5.
6. Las eferentes de los LA se conectan con al menos tres capas diferentes en la región del labio del cáliz de los CF.
7. Existe una segregación en las vías eferentes del LA hacia los CF, de manera que cada capa labial recibe axones de diferentes grupos de glomérulos, por lo que los grupos de glomérulos están representados topográficamente en la región labial de los CF estableciendo un mapa odotópico del LA en el protocerebro:
 - a) Los grupos 2 y 6 (posteriores) están innervados por neuronas de proyección de los grupos de neuronas centrales *GNC-lateral* y *GNC M-posterior* que envían sus axones a través del TACI hacia la capa externa del labio y del anillo basal, y de ahí hacia el PL.
 - b) Los grupos 1, 3, 4 y 5 (anteriores) están innervados por neuronas de proyección de los grupos de neuronas cenrales *GNC-lateral*, *GNC medial*, *GNC dorsal* y *GNC anterior* que envían sus axones a través del TACE hacia el PL y de ahí hacia la capa interna (interna + medial) del labio y del anillo basal.
- 8) No existen diferencias entre las especies *A. mexicana* y *C. ocreatus* en las vías generales de conexión de los LA con los CF.

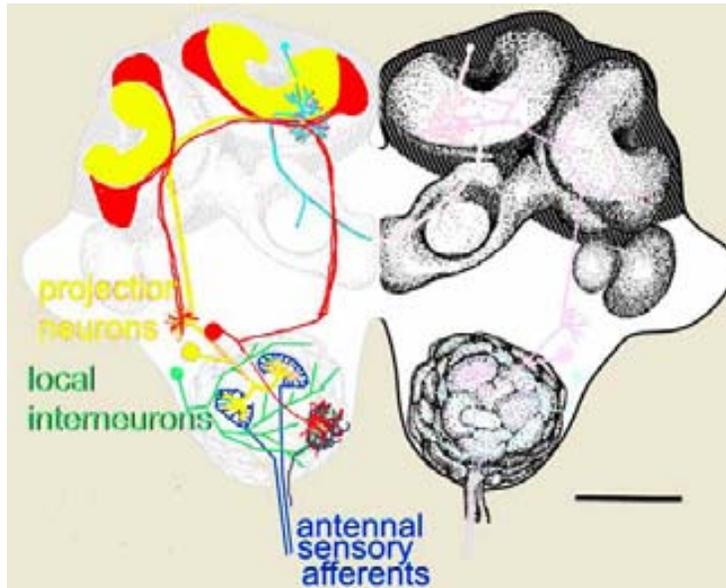


Figura 96. El LA representa un mapa olfativo de las diferentes familias de odorantes, y este mapa olfativo está representado a manera de un mapa odotópico en el labio de los CF (Modificado de Gronenberg, 1996b).

1.4. Discusión general

El sistema nervioso y sensorial de las hormigas parece estar bien adaptado a la vida social ya que gran parte de su maquinaria neural ha sido liberada de los compromisos de la vida en solitario, es decir, la búsqueda de pareja, la construcción de nido, la evasión de depredadores, la oviposición, el cuidado de la cría, etc. Con la liberación de tales tareas de la vida en solitario debido a la división del trabajo y a la cooperación, el sistema nervioso de las hormigas fue sometido a las presiones de la vida en sociedad. Ya que el éxito y sobrevivencia de cada hormiga depende de su capacidad de funcionar coordinadamente en el superorganismo para lograr la reproducción de la reina, es fundamental que su susceptibilidad a responder a estímulos sociales esté bien desarrollada. Probablemente la evolución del sistema nervioso en insectos sociales haya conducido hacia la complejificación y especialización de los centros cerebrales que participan en la comunicación: 1) sistemas sensorio-perceptuales que involucran a los órganos sensoriales periféricos y/o a las áreas involucradas en el procesamiento de las señales comunicativas (antenas y lóbulos antenales), y 2) áreas de asociación y procesamiento de información multimodal y de generación, coordinación y control de patrones motores y conductuales complejos (cuerpos fungiformes). De hecho, se ha sugerido que la tendencia evolutiva general hacia la complejidad social implica una tendencia hacia el mayor tamaño de los lóbulos antenales y los CF (Jaffe & Perez, 1989; Cole, 1985; Gronenberg & Hölldobler, 1999). Esto se debe principalmente a la dependencia de la vida social de las hormigas en la comunicación química por lo que es posible que las estructuras neurales implicadas en estos procesos sociales se hayan visto sujetas a fuertes presiones de selección dentro de la sociedad. Ya que el olfato es la principal modalidad sensorial en las hormigas y aquella en la que está basada la organización social, las adaptaciones neurofisiológicas podrían estar basadas principalmente en especializaciones de las vías olfativas, por lo que es posible que algunas partes de esta vía estén más o menos desarrolladas en diferentes castas y especies.

1.5. Conclusión general

El ácido oleico parece ser una señal de identificación de los cadáveres distribuida entre las hormigas. Quizá haya evolucionado por su relación con la proliferación de microorganismos durante la descomposición de las hormigas muertas, por lo que probablemente actuaron fuertes presiones selectivas en favor de la detección de dichos productos de la descomposición bacteriana.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, en la división del trabajo de la hormiga *Atta meciana* los soldados parecen ser una de las castas más especializadas ya que presentaron respuestas EAG mayores al olor de alarma en comparación con las respuestas a los otros olores. Por otra parte, todas las obreras estudiadas presentaron respuestas similares a este olor, por lo que las diferencias conductuales entre castas podrían deberse a diferencias en el procesamiento central de la información sensorial, ya sea en los LA o en los CF (en la arquitectura neural o en niveles de hormonas o neurotransmisores). Forrajeras y sepultureras no presentaron respuestas mayores a los olores relacionados con sus respectivas tareas, por lo que las diferencias conductuales, así como la especialización conductual de las sepultureras, también deben ocurrir en el SNC.

La organización de los LA, así como las vías antenocerebrales han sido descritas en este trabajo. Los resultados muestran que la organización del LA en las hormigas, e incluso en los himenópteros, es conservada, por lo que esto podría tener un significado funcional en la generación del código olfativo y, quizá, con la organización social. Además, es posible que en las castas de hormigas especializadas, como *A. mexicana*, algunas estructuras y funciones nerviosas se encuentren hipertrofiadas, mientras que otras atrofiadas, y que estas características estén relacionadas con la especialización conductual.

Los resultados de los estudios de las vías antenocerebrales, muestran una convergencia de las señales olfativas, desde las antenas hasta los CF del protocerebro, las cuales están segregadas de manera que existe una representación o mapa funcional de la información olfativa en cada relevo neural. Este mapa odotópico también podría estar relacionado con el procesamiento central del código olfativo y respuestas apropiadas según las mezclas de feromonas y olores y de acuerdo con el contexto, así como en la memoria y aprendizaje olfativos. La profundización en el conocimiento de la arquitectura neural y función de este mapa, permitirá la comprensión del proceso de percepción olfativa.

Con las descripciones neuroanatómicas presentadas en este trabajo, pueden diseñarse experimentos conductuales, fisiológicos y morfológicos comparativos entre especies de hormigas y entre castas de una misma especie, con la finalidad de comprender la neurobiología del comportamiento guiado por el olfato de las obreras individuales y su relación con la división del trabajo y la elección de tareas.

• REFERENCIAS

1. Abel, R., Rybak, J. & R. Menzel. 2001. Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol*, 437:363-383.
2. Adler, V. 1971. Physical conditions important to the reproducibility of electroantennograms. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(1):300-302.
3. Andryszak, N.A., Payne, T.L., Dickens, J.C., Moser, J.C. & R.W. Fisher. 1990. Antennal olfactory responsiveness of the Texas leaf cutting ant (Hymenoptera:Formicidae) to trail pheromone and its two alarm substances. *J Entomol Sci*, 25(4):593-600.
4. Arnold, G., Masson, C. & S. Budharugsa. 1984. Demonstration of a sexual dimorphism in the olfactory pathways of the drones *Apis mellifica* L. (Hymenoptera. Apidae). *Experientia*, 40:723-725.
5. Arnold, G., Masson, C., & S. Budharugsa. 1985. Comparative study of the antennal lobes and their afferent pathway in the worker bee and the drone. *Cell Tissue Res*, 242:593-605.
6. Arnold, G., Budharugsa, S. & C. Masson. 1988. Organization of the antennal lobe in the queen honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae). *J Morphol Embriol*, 17(3):185-195.
7. Alten v H. 1910. Zur Phylogenie des Hymenopterengehirns. *Jena Z Naturwiss*, 46:511-590.
8. Begon, M., Harper, J.L. & C.R. Townsend. 1988. *Ecología*. Omega.
9. Ben-Shahar, Y. 2005. The *foraging* gene, behavioral plasticity, and the honeybee division of labor. *J Comp Physiol A*, 191:987-994.
10. Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M.B. & G.E. Robinson. 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science*, 296:741-744.
11. Ben-Shahar, Y., Leung, H.T., Pak, W.L., Sokolowski, M.B. & G.E. Robinson. 2003. cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the *foraging* gene in honey bee division of labor. *J Exp Biol*, 206:2507-2515.
12. Bernstein, S. & R.A. Bernstein. 1969. Relationships between foraging efficiency and the size of the head and component brain and sensory structures in the red wood ant. *Brain Res*, 16:85-104.
13. Bjostad, L.B. & W.L. Roelofs. 1980. An inexpensive electronic device for measuring electroantennogram responses to sex pheromone components with voltmeter. *Physiological Entomology*. 5:309-314.
14. Blanchard, G.B., Orledge, G.M., Reynolds, S.E. & N.R. Franks. 2000. Division of labour and seasonality in the ant *Leptothorax albipennis*: worker corpulence and its influence on behaviour. *Anim Behav*, 59:723-738.
15. Bloch, G. & G.E. Robinson. 2001. Reversal of honey bee behavioural rhythms. *Nature*, 410:1048.
16. Bloch, G., Toma, D.P., & G.E. Robinson. 2001. Behavioral rhythmicity, age, division of labor and period expression in the honey bee brain. *Journal of Biological Rhythms* 16(5):444-456.
17. Bloch, G., Sullivan, J.P. & G.E. Robinson. 2002. Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*, 48:1123-1131.
18. Blum, M.S. 1970(a). The chemical basis of insect sociality. En: *Chemicals controlling insect behavior*. Editor: M. Berzosa, Academic press.
19. Blum, M.S. 1970(b). Behavioral responses of Hymenoptera to pheromones and allomones. En: Shorey, H.H. *Chemical control of insect behavior: Theory and application*. Wiley.
20. Blum, M.S., Padovani, F. & E. Amante. 1968. Alkanonas and terpenes in the mandibular glands of *Atta* species (Hymenoptera:Formicidae). *Comp Biochem Physiol B.*, 26(1):291-299.
21. Bolton, B. 1995. *A new general catalogue of the ants of the World*. Harvard University press.
22. Bourke, A.F.G. & N.R. Franks. 1995. *Social evolution in ants*. Princeton University press. 529 pp.
23. Breandle, C., Hockley, N., Brevig, T., Shingleton, A.W. & L. Keller. 2003. Size-correlated division of labour and spatial distribution of workers in the driver ant, *Dorylus molestus*.

- Naturwissenschaften*, 90:277-281.
24. Brockmann, A. & D. Brückner, 1998. The EAG response spectra of workers and drones to queen honeybee mandibular gland components: the evolution of a social signal. *Naturwissenschaften*, 85:283-285.
 25. Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 1990. *Invertebrates*. Sinauer. 922 pp.
 26. Bruyne, M., Foster, K., & J.R. Carlson. 2001. Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 30:537-552.
 27. Bullock, T. H., & G. A. Horridge. 1965. *Structure and function in the nervous system of invertebrates*, Vol. I y II. Freeman. 1246 pp.
 28. Burling-Thompson, C. 1913. A comparative study of the brains of three genera of ants, with special reference to the mushroom bodies. *J Comp Neurol*, 23:515-572.
 29. Burrows, M. 1996. *The neurobiology of an insect brain*. Oxford University press.
 30. Cahan, S.H. & L. Keller. 2003. Complex hybrid origin of genetic caste determination in harvester ants. *Nature*, 424:306-309.
 31. Carlin, N.F. & B. Hölldobler. 1987. The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus* spp.) II. Larger colonies. *Ecol Sociobiol*, 20:209 - 217.
 32. Chauvin, R. 1969. *The world of ants. A science-fiction universe*. Hill and Wang. 216 pp.
 33. Chapman, R.F. 1998. *The Insects. Structure and function*. Cambridge University press. 770 pp.
 34. Cole, B.J. 1985. Size and behavior in ants: Constraints on complexity. *PNAS*, 82:8548-8551.
 35. Coss, R.G., Brandon, J.G. & A. Globus. 1980. Changes in morphology of dendritic spines on honeybee calycal interneurons associated with cumulative nursing and foraging experiences. *Brain Res*, 192:49-59.
 36. Croizer, R.H. & P. Pamilo. 1996. *Evolution of social insect colonies. Sex allocation and kin selection*. Oxford University press. 306 pp.
 37. Devaud, J.M., Acebes, A. & A. Ferrús. 2001. Odor exposure causes central adaptation and morphological changes in selected olfactory glomeruli in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 21(16):6274-6282.
 38. Dobrzanski, J. 1971. Manipulatory learning in ants. *Acta Neurobiol Exp*, 31:111-140.
 39. Dujardin, F. 1850. Mémoire sur le système nerveux des insectes. *Ann Sci Nat Zool*, 14:195-206.
 40. Durst, C., Eichmüller, S. & R. Menzel. 1994. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. *Behav Neural Biol*, 62:259-263.
 41. Ehmer, B. & W. Gronenberg. 1997(a). Proprioceptors and fast antennal reflexes in the ant *Odontomachus* (Formicidae, Ponerinae). *Cell Tissue Res*, 290:153-165.
 42. Ehmer, B. & W. Gronenberg. 1997(b). Antennal muscles and fast movements in ants *J Comp Physiol B*, 167:287-296.
 43. Elmore, T. & D.P. Smith. 2001. Putative *Drosophila* odor receptor OR43b localizes to dendrites of olfactory neurons. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31:791-798.
 44. Erber, J., Masuhr, T. & R. Menzel. 1980. Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Physiol Entomol*, 5:343-358.
 45. Faber, T. & R. Menzel. 2001. Visualizing mushroom body response to a conditioned odor in honeybees. *Naturwissenschaften*, 88:472-476.
 46. Fahrback, S.E. 2006. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annu Rev Entomol*, 51:209-132.
 47. Fahrback, S.E., Giray, T. & G.E. Robinson. 1995. Volume changes in the mushroom bodies of adult honeybee queens. *Neurobiol. Learning & Memory*, 63:181-191.
 48. Fahrback, S.E., Giray, T., Farris, S.M. & G.E. Robinson. 1997. Expansion of the neuropil of the mushroom bodies in male honey bees is coincident with initiation of flight. *Neurosc Letters* 236:135-138.

49. Fahrbach, S.E., Moore, D., Capaldi, E.A., Farris, S.M. & G.E. Robinson. 1998. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Learning and Memory* 5:115-123.
50. Fahrbach, S.E., Farris, S.M., Sullivan, J.P. & G.E. Robinson. 2003. Limits on volume changes in the mushroom bodies of the honey bee brain. *J Neurobiol*, 57(2):141-151.
51. Forel, A.H. 1874. Neue Denkschrift Allgem Schweizer Gesellsch Gesamt. *Naturwissenschaften*, 26:1- 452.
52. Fraser, V.S., Kaufmann, B., Oldroyd, B.P. & R.H. Croizer. 2000. Genetic influence on caste in the ant *Camponotus consobrinus*. *Behav Ecol Sociobiol.*, 47:188-194.
53. Galizia, C.G., Nägler, K., Hölldobler, B. & R. Menzel. 1998. Odour coding is bilaterally simetrical in the antennal lobes of honeybees (*Apis mellifera*). *European Journal of Neuroscience*, 10:2964-2974.
54. Galizia, C.G., McIlwarth S.L. & R. Menzel. 1999(a). A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Res*, 295:383-394.
55. Galizia, C.G., Menzel, R. & B. Hölldobler. 1999(b). Optical imaging of odor-evoked glomerular activity patterns in the antennal lobes of the ant *Camponotus rufipes*. *Naturwissenschaften*, 86:533-537.
56. Galizia, C.G., Sachse, S., Rappert, A. & R. Menzel. 1999. The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Neuroscience*, 2(5):473-478.
57. Galizia, C.G. & R. Menzel. 2000(a). Odour perception in honeybees: coding information in glomerular patterns. *Current Opinion in Neurobiology*, 10:504-510.
58. Galizia, C.G. & R. Menzel. 2000(b). Probing the olfactory code. *Nature Neuroscience*, 3(9):853-854.
59. Galizia, C.G., Sachse, S. & H. Mustaparta. 2000(a). Calcium responses to pheromones and plant odours in the antennal lobe of the male and female moth *Heliothis virescens*. *J Comp Physiol A*, 186:1049-1063.
60. Galizia, C.G., Küttner, A., Joerges, J. & R. Menzel. 2000(b). Odour representation in honeybee olfactory glomeruli shows slow temporal dynamics: an optical recording study using voltage-sensitive dye. *J Insect Physiol*, 46:877-886.
61. Galizia, C.G. & R. Menzel. 2001. The role of glomeruli in the neural representation of odours: results from optical recording studies. *J Insect Physiol*, 47:115-130.
62. Gauld, I. & B. Bolton. 1988. *The hymenoptera*. Oxford University press.
63. Gilby, A.D. 1980. Transpiration, temperature and lipids in insect cuticle. En: *Advances in insect physiology*. Vol 15. (Editores: Berridge, M.J., Treherne, J.E. & V.B. Wigglesworth) Cap. 1 pp. 1-33. Academic press.
64. Gilmour, D. 1961. *The biochemistry of insects*. Academic press. 343 pp.
65. Giray, T. & G.E. Robinson. 1996. Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bee and the evolution of division of labour. *PNAS*, 93:11718-11722.
66. Giray, T., Huang, Z.Y., Guzmán-Novoa, E. & G.E. Robinson. 1999. Physiological correlates of genetic variation for rate of behavioral development in the honeybee, *Apis mellifera*. *Behav Ecol Sociobiol*, 47:17-28.
67. Glancey, B.M. & J.C. Dickens. 1988. Behavioral and electrophysiological studies with live larvae and larval rinses of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *J Chem Ecol*, 14(2):463-473.
68. Goll, W. 1967. Strukturuntersuchungen am Gehirn von Formica. *Z Morph Ökol Tiere* 59:143-210.
69. Gordon, D. 1983. Dependence of necrophoric response to oleic acid on social context in the ant, *Pogonomyrmex badius*. *J Chem Ecol*, 9(1):105-111.

70. Gordon, D.M.. 1996. The organization of work in social insect colonies. *Nature*, 380:121-124.
71. Gordon, D. 1999. *Ants at work. How an insect society is organized*. Norton.
72. Gronenberg, W. 1986. Physiological and anatomical properties of optical input fibers to the mushroom body in the bee brain. *J Insect Physiol*, 32:695-704.
73. Gronenberg, W. 1987. Anatomical and physiological properties of feedback neurons of the mushroom bodies in the bee brain. *J Exp Biol*, 46:115-125.
74. Gronenberg, W. 1995. The fast mandible strike in the trap-jaw ant *Odontomachus*: temporal properties and morphological characteristics. *J Comp Physiol A*, 176:391-398.
75. Gronenberg, W. 1996. Neuroethology of Ants. *Naturwissenschaften*, 86:15-27.
76. Gronenberg, W. 1999. Modality-specific segregation of input to ant mushroom bodies. *Brain Behav Evol*, 54:85-95.
77. Gronenberg, W. 2001. Subdivisions of Hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *J Comp Neurol*, 430:474-489.
78. Gronenberg, W. & C. Peeters. 1993. Central projections of the sensory hairs on the gemma of the ant *Diacamma*: substrate for behavior-al modulation? *Cell Tissue Res*, 273:401-415
79. Gronenberg, W., Heeren, S. & B. Hölldobler. 1996. Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *J Exp Biol*, 199:2011-2019.
80. Gronenberg, W. & J. Liebig. 1999. Smaller brains and optic lobes in reproductive workers of the ant *Harpegnathos*. *Naturwissenschaften*, 86:343-345.
81. Gronenberg, W. & B. Hölldobler. 1999. Morphologic representation of visual and antennal information in the ant brain. *J Comp Neurol*, 412:229-240.
82. Gronenberg, W. & G.O. López-Riquelme. 2006. Multisensory convergence in the mushroom bodies of ants and bees. *Acta Biologica Hungarica*, 55(1-4):31-37.
83. Grünewald, B. 1999. Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol*, 404:114-126.
84. Hackman, R.H. 1974. Chemistry of the insect cuticle. En: *The physiology of insecta Vol. VI*. (Editor Morris, R.) pp. 215-270. Academic press.
85. Hanson, B.S. & S. Anton. 2000. Function and morphology of the antennal lobe: new developments. *Annu Rev Entomol*, 45:203-231.
86. Hamilton, W.D. 1964. The genetical evolution of social behavior, I y II. *J theor Biol*, 7:1-52.
87. Hanström, B. 1926. Untersuchungen über die relative Grösse der Gehirnzentren verschiedener Arthropoden unter Berücksichtigung der Lebensweise. *Z Mikr Anat Zellforsch*, 7:135-190.
88. Hart, A.G. & F.L.W. Ratnieks. 2001. Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. *Behav Ecol Sociobiol*, 49:387-392.
89. Hart, A.G. & F.L.W. Ratnieks. 2002. Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Behavioral Ecology*, 13(2):224-231.
90. Hasan, G. & M. Rosbash. 1992. *Drosophila* homologs of two mammalian intracellular Ca²⁺-release channels: identification and expression patterns of the inositol 1,4,5-triphosphate and the ryanodine receptor genes. *Development*, 116:967-975.
91. Haskins, C.P. 1970. Researches in the biology and social behavior of primitive ants. En: *Development and evolution of behavior*. Editor: L.R. Aronson, E. Tobach, D.S. Lehrman & J.S. Rosenblatt. W.H Freeman and Company.
92. Haskins, C.P. & E.F. Haskins. 1974. Notes on necrophoric behavior in the archaic ant, *Myremcia vindex* (Formicidae: Myrmiciinae). *Psyche*, 81:258-267.
93. Heinze, J., Hölldobler, B. & C. Peeters. 1994. Conflict and cooperation in ant societies. *Naturwissenschaften*, 81:489-497.

94. Heisenberg M & KG Götz. 1975. The use of mutations for the partial degradation of vision in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol*, 98:217-241.
95. Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S. & D. Byers. 1985. *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet*, 2:1-30.
96. Hildebrand, J.G. 1995. Analysis of chemical signals by nervous systems. *PNAS*, 92: 67-74.
97. Hildebrand, J.G. & G.M. Shepherd. 1997. Mechanisms of olfactory discrimination: Convergence evidence for a common principles across phyla. *Annu Rev Neurosci*, 20:595-631.
98. Hodgson, E.S. 1974. Chemoreception. En: *The physiology of insecta*. Vol. II. Editor: Rockstein, M. Academic press. Pags. 127-164.
99. Hogan, J.A. 1994. The concept of cause in the study of behavior. En: *Causal mechanisms of behavioural development* (Editores: Hogan, J.A. & J.J. Bolhuis). Cambridge. Capítulo 1. pags. 3-15.
100. Hölldobler, B. 1980. Canopy orientation: a new kind of orientation in ants. *Science*, 210:86-88.
101. Hölldobler, B. 1995. The chemistry of social regulation: multicomponent signals in ant societies. *PNAS*, 92:19-22.
102. Hölldobler, B. 1999. Multimodal signals in ant communication. *J Comp Physiol A*, 184:129-141.
103. Hölldobler, B. & E.O. Wilson. 1990. *The Ants*. Belknap Press of the Harvard University Press. 732 pp.
104. Hölldobler, B. & E.O. Wilson. 1994. *Journey to the Ants: A story of scientific exploration*. Belknap Press of the Harvard University Press. 228 pp.
105. Homberg, U. 1984. Processing of antennal information in extrinsic mushroom body neurons of the bee brain. *J Comp Physiol A*, 154:825-836.
106. Homberg, U., Montague, R.A. & J. Hildebrand. 1988. Anatomy of antenno-cerebral pathways in the brain of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res*, 254:255-281.
107. Homberg, U., Christensen, T.A. & J.G. Hildebrand. 1989. Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Ann Rev Entomol*, 34:477-501.
108. Howard, D.F. & W.R. Tschinkel. 1976. Aspects of necrophoric behavior in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behaviour*, 56:157-180.
109. Huang, Z-Y., Robinson, G.E. & D. Borst. 1994. Physiological correlates of division of labor independent of age in honey bee colonies. *J Comp Physiol A*, 174:731-739.
110. Huber, F. 1960. Untersuchungen über die Funktion des Zentralnervensystems und insbesondere des Gehirns bei der Fortbewegung und Lauterzeugung der Grillen. *Z Vergl Physiol*, 44:60-132.
111. Hughes, W.O.H., Howse, P.E., Vilela, E.F. & D. Goulson. 2001. The response of grass-cutting ants to natural and synthetic versions of their alarm pheromone. *Physiological Entomology*, 26:165-172.
112. Hughes, W.O.H., Summer, S., Van Borm, S. & J.J. Boomsma. 2003. Worker caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *PNAS*, 100(16):9394-9397.
113. Ingram, K., Oefner, P. & D.H. Gordon. 2005. Task-specific expression of the foraging gene in harvester ants. *Molecular Ecology*, 14:813-818.
114. Jacquin-Joly, E., François, M.C., Burnet, M., Lucas, P., Bourrat, F. & R. Maida. 2002. Expression pattern in the antennae of a newly isolated lepidopteran Gq protein a subunit cDNA. *Eur J Biochem*, 269:2133-2142.
115. Jaffe, K. 1993. *El mundo de las hormigas*. Equinoccio, Universidad Simón Bolívar. 183 pp.
116. Jaffe, K. & E. Perez. 1989. Comparative study of brain morphology in ants. *Brain Behav Evol*, 33:25-33.
117. Jaisson, P. 1972. Sobre el determinismo del comportamiento en las hormigas del género *Atta*. *Folia Entomologica Mexicana*, 23-24:108-110.
118. Jaisson, P. 1975. L'imprégnation dans l'ontogenèse des comportements de soins aux cocons chez

- la jeune fourmi rousse (*Formica polyctena* Först.). *Behaviour*, 52:1-37
119. Jaisson, P. Fresneau, D. & J.P. Lachaud. 1988. Individual traits of social behavior in ants. En: *Interindividual behavioural variability in social insects*. Editor: Jeannie, R.L. Westview press. Pp. 1-51.
 120. Jander, R. 1957. Die optische Richtungsorientierung der Roten Waldameise (*Formica rufa* L.). *Z Vgl Physiol*, 40:162-238.
 121. Jander, R. & C. Voss. 1963. Die Bedeutung von Streifenmustern für das Formensehen der Roten Waldameise (*Formica rufa* L.). *Z Tierpsychol*, 20:1-9
 122. Janet, C. 1900. *Recherches sur l'anatomie de la fourmi et essai sur la constitution morphologique de la tête de l'insecte*. Georges Carré & Naud Editeurs.
 123. Janet C. 1905. *Anatomie de la tête du Lasius niger*. Limoges, Ducourtieux et Gout.
 124. Jhaveri, D., Sen, A., Reddy, V. & V. Rodrigues. 2000. Sense organ identity in the *Drosophila* antenna is specified by the expression of the proneural gene atonal. *Mechanisms of Development*, 99:101-111.
 125. Jonescu, C.N. 1909. Vergleichende Untersuchungen ueber das Gehirn der Honigbiene. *Jena Zeitung Naturwiss*, 45:111-180.
 126. Julian, G.E. & S. Cahan. 1999. Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant, *Acromyrmex versicolor*. *Anim Behav*, 58:437-442.
 127. Kaisling, K-E. 2001. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model. *Chem senses*, 26:125-150.
 128. Kaulen, P; Erber, J; & P. Mobbs. 1984. Current source-density analysis in the mushroom bodies of the honeybee *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A*, 154: 569-582.
 129. Kenyon, F.C. 1896. The brain of the bee. A preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the Arthropoda. *J Comp Neurol*, 6:133-210.
 130. Kern, F. & H.J. Bestmann. 1993. Antennal electrophysiological responsiveness of the Ponerine ant *Leptogenys diminuta* to trail and recruitment pheromones and its structure analogs. *Naturwissenschaften*, 80:424-427.
 131. Kleineidam, C.J. & J. Tautz. 1996. Perception of carbon dioxide and other "air condition" parameters in the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. *Naturwissenschaften*, 83:566-568.
 132. Kleineidam, C.J., Ernst, R. & F. Roces. 2001. Wind-induced ventilation of the giant nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. *Naturwissenschaften*, 88:301-305.
 133. Kleineidam, C.J., Obermayer, M., Halbich, W. & W. Rössler. 2005. A macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. *Chem Sens*, 30:1-10.
 134. Kramer, J.J. & J. Hemberger. 1987. The neurobiology of pheromone reception. En: *Pheromone biochemistry*. Editado por: G.D. Prestwich & G.J. Blomquist. Academic press. pp. 433-472.
 135. Krishnan, B., Dryer, S.E. & P.E. Hardin. 1999. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 400:375-378.
 136. Kuehl, R.O. 2001. *Diseño de experimentos*. Thomson. 666 pp.
 137. Kühn-Bulmann, S. & R. Whener. 2006. Age-dependent and task-related volume changes in the Mushroom bodies of visually guided desert ants, *Cataglyphis bicolor*. *Journal of Neurobiology*, 66:511-521.
 138. Laissue, P.P., Reiter, C., Hiesinger, P.R., Halter, S., Fischbach, K.F. & R.F. Stocker. 1999. Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*, 405:543-552.
 139. Laue, M., Maida, R. & A. Redkozubov. 1997. G-protein activation, identification and immunolocalization in pheromone-sensitive sensilla trichodea of moths. *Cell Tissue Res*, 288:149-158.

140. Laurent, G. 1996. Dynamical representation of odours by oscillating and evolving neural assemblies. *TNS*, 19:489-496.
141. Laurent, G., McLeod, K., Stopfer, M. & Wehr, M. 1998. Spatiotemporal structure of olfactory inputs to the mushroom bodies. *Learning and Memory*, 5:124-132.
142. Li, Y. & N.J. Strausfeld. 1997. Morphology and sensory modality of mushroom body extrinsic neurons in the brain of the cockroach, *Periplaneta americana*. *J Comp Neurol*, 387:631-650.
143. Li, Y. & N.J. Strausfeld. 1999. Multimodal efferent and recurrent neurons in the medial lobes of cockroach mushroom bodies. *J Comp Neurol*, 409:647-663.
144. López-Riquelme, G.O. & M.L. Fanjul-Moles. 2006. The ant *Camponotus atriceps* shows electroretinogram circadian rhythms. *Biological Rhythm Research*, 37(2):111-115.
145. Macmillan, C.S. & A.R. Mercer. 1987. An investigation of the role of dopamine in the antennal lobes of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A*, 160:359-366.
146. Malo, E.A., Renou, M. & A. Guerrero. 2000. Analytical studies of *Spodoptera littoralis* sex pheromone components by electroantennography and coupled gas chromatography-electroantennography detection. *Talanta*, 52:525-532.
147. Malo, E.A., Medina_Hernández, N., Virgen, A., Cruz-López, L. & J.C. Rojas. 2002. Electroantennogram and field responses of *Spodoptera frugiperda* males (Lepidoptera:Noctuidae) to plant volatiles and sex pheromone. *Folia Entomol Mex*, 41(3):329-338.
148. Marin, E.C., Jefferis, G.S.X.E., Komiyama, T., Zhu, H. & L.Luo. 2002. Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell*, 109:243-255.
149. Martin, J.-R., Ernst, R. & M. Heisenberg. 1998. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learning and Memory*, 5:179-191.
150. Masterman, R., Ross, R., Mesce, K. & M. Spivak. 2001. Olfactory and behavioural response thresholds to odours of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A*, 187:441-452.
151. Mauelshagen, J. 1993. Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *J Neurophysiol*, 69(2):609-625.
152. Menzel, R., Durst, C., Erber, J., Eichmüller, S., Hammer, M., Hildebrandt, H., Mauelshagen, J., Müller, U., Rosenboom, H., Rybak, J., Schäfer, S. & A. Scheidler. 1994. The mushroom bodies in the honeybee: from molecules to behaviour. *Fortschr Zool*, 39:81-102.
153. Metzler, D.E. 2001. *Biochemistry. The chemical reactions of living cells*. Vol I. Harcourt – Academic press.
154. Mizunami, M., Okada, R., Li, Y. & N.J. Strausfeld. 1998a. Mushroom bodies of the cockroach: activity and identified neurons recorded in freely moving animals. *J Comp Neurol*, 402:501-519.
155. Mizunami, M., Weibrecht, J.M. & N.J. Strausfeld. 1998b. Mushroom bodies of the cockroach: their participation in place memory. *J Comp Neurol*, 402:520-537.
156. Mobbs, P.G. 1982. The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Phil Trans R Soc Lond B*, 298:309-354
157. Mobbs, P.G. 1984. Neural networks in the mushroom bodies of the honeybee. *J Insect Physiol*, 30(1):43-58.
158. Mortiz, R.F.A. & E.E. Southwick. 1992. *Bees as superorganisms, An evolutionary reality*. Springer-Verlag.
159. Moser, J.C. 1970. Pheromones of social insects. In: *Control of Insect Behavior by Natural Products*. Edit: Wood, D.L., Silverstein, R.M. & M. Nakajima. Academic press.
160. Moser, J.C., Brownlee, J.C. & R.M. Silverstein. 1968. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *J Insect Physiol*, 14:529-535.

161. Müller, D., Abel, R., Brandt, R., Zöckler, M. & R. Menzel. 2002. Differential parallel processing of olfactory information in the honeybee, *Apis mellifera* L. *J Comp Physiol A*, 188:359-370.
162. Nagai, T. 1983. On the relationship between the electroantennogram and simultaneously recorded single sensillum response of the European cornborer *Ostrinia nubilalis*, *Arch Insect Bioch Physiol*, 1:85-91.
163. Oster, G.F. & E.O. Wilson. 1978. Caste and ecology in the social insects. Princeton University press.
164. Page, R.E., Robinson, G.E. & M.K. Fondrk. 1989. Genetic specialists, kin recognition and nepotism in honey-bee colonies. *Nature*, 338:576-579.
165. Page, R.E., Erber, K. & M.K. Fondrk. 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honeybees. *J Comp Physiol A*, 182: 489-500.
166. Pandazis, G. 1930. Über die relative Ausbildung der Gehirnzentren bei biologisch verschiedenen Ameisenarten. *Z Morph Ökol Tiere*, 18:114-169.
167. Pankiw, T. & R.E. Page. 1999. The effect of genotype, age, sex and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees. *J Comp Physiol A*, 185:207-213.
168. Pankiw, T. & R.E. Page. 2000. Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honey bees. *Behav Ecol Sociobiol*, 47:265-267.
169. Pankiw, T. & R.E. Page. 2001a. Genotype and colony environment affect honeybee development and foraging behavior. *Behav Ecol Sociobiol*, 51:87-94.
170. Pankiw, T. & R.E. Page. 2001b. Brood pheromone modulates honeybee (*Apis mellifera* L.) sucrose response thresholds. *Behav Ecol Sociobiol*, 49:206-213.
171. Parker, J. D. 2004. A major evolutionary transition to more than two sexes? *Trends Ecol Evol*, 2:83-86.
172. Passera, L. 1988. *L'organisation sociale des fourmis*. Privat.
173. Payne, T.L., Blum, M.S. & R.M. Duffield. 1975. Chemoreceptor responses of all castes of a carpenter ant to male-derived pheromones. *Annals of the Entomological Society of America*, 68:385-386.
174. Pietschker, H. 1911. Das Gehirn der Ameise. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaften*, 47:43-117.
175. Pophof, B. & W.M. Van der Goes van Nater. 2002. Activation and inhibition of the transduction process in silkworm olfactory neurons. *Chem Senses*, 27:535-443.
176. Randall, D.; Burggren, W. & K. French. 2002. *Animal physiology*. Freeman & Co.
177. Ratnieks, F.L.W. & C. Anderson. 1999. Task partitioning in insect societies. *Insectes Sociaux*, 46:95-108.
178. Renthal, R., Velásquez, D. & D. Olmos. 2003. Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*, 34:405-413.
179. Robinson, G.E. 1987. Modulation of alarm pheromone perception in the honey bee: evidence for division of labor based on hormonally regulated response thresholds. *J Comp Physiol A*, 160:613-619.
180. Robinson, G.E. 1991. Hormonal and genetic control of honeybee division of labour. En *The behaviour and physiology of bees* Edit. L.J. Goodman. CAB.
181. Robinson, G.E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Ann Rev Entomol*, 37:637-665.
182. Robinson, G.E. 1997. Integrative animal behaviour and sociogenomics. *Trends Ecol Evol*, 14:202-205.
183. Robinson, G.E. 2002. Sociogenomics takes flight. *Science*, 297:204-205.
184. Robinson, G.E. & R.E. Page. 1988. Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature*, 333:356-361.

185. Robinson, G.E. & R.L. Page. 1989. Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol*, 24:317-323.
186. Robinson, G.E. & R.E. Page. 1995. Genotypic constraints on plasticity for corpse removal in honey bee colonies. *Anim Behav*, 49:867-976.
187. Robinson, G.E., Page, R.E., Strambi, C. & A. Strambi. 1989. Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. *Science*, 246:109-112.
188. Robinson, G.E., Fahrbach, S.E. & M.L. Winston. 1997. Insect societies and the molecular biology of social behavior. *BioEssays*, 19(12):1099-1108.
189. Roces, F. 1990. Olfactory conditioning during the recruitment process in a leaf-cutting ant. *Oecologia*, 83:261-262.
190. Roces, F. 1993. Both evaluation of resource quality and speed of recruited leaf-cutting ants (*Acromyrmex lundii*) depend on their motivational state. *Behav Ecol Sociobiol*, 33:183-189.
191. Roces, F. 1994. Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. *Insectes Sociaux*, 41:235-239.
192. Rodrigues, V. & L. Pinto. 1989. The antennal glomerulus as a functional unit of odor coding in *Drosophila melanogaster*. En: *Neurobiology of sensory systems*. Editores: Singh, R.N. & N.J. Strausfeld. Plenum. Pp 387-393.
193. Roelofs, W.L. 1979. Electroantennograms. *Chemtech*, 9:222-227.
194. Roelofs, W.L. 1984. Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. En: *Techniques in pheromone research*. (Eds Hummel H.E. & Miller T.A.), pp. 131-159. Springer-Verlag, New York.
195. Romoser & Stoffolano. 1994. *The science of entomology*. WCB publishers. 532 pp.
196. Rollo, C.D., Czyzewska, E. & J.H. Borden. 1994. Fatty acid necromones for Cockroaches. *Naturwissenschaften*, 81:409-410.
197. Rosengren, R. 1971. Route fidelity, visual memory and recruitment behaviour in foraging wood ants of the genus *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Zool Fennica*, 133:1-106.
198. Rospars, J.P. 1988. Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *Int J Insect Morphol & Embriol*, 17(3):243-294.
199. Rospars, J.P. & I. Chambille. 1989. Identified glomeruli in the antennal lobe of insects: invariance, sexual variation and postembryonic development. En: *Neurobiology of sensory systems*. Editores: Singh, R.N. & N.J. Strausfeld. Plenum. Pp 355-375.
200. Rospars, J.P. & J.G. Hildebrand. 1992. Anatomical identification of glomeruli in the antennal lobes of the male sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res*, 270:205-227.
201. Rothenbuhler, W.C. & R.E. Page. 1989. Genetic variability for temporal polyethism in colonies consisting of similarly-aged worker honey bees. *Apidology*, 29: 433-437.
202. Rybak, J. & R. Menzel. 1998. Integrative properties of the Pe1 neuron, a unique mushroom body output neuron. *Learning and Memory*, 5:133-145.
203. Sachse, S., Rappert, A. & C.G. Galizia. 1999. The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees : steps towards the olfactory code. *European Journal of Neuroscience*, 11:3970-3982.
204. Schatz, B., Beugnon, G. & J.P. Lachaud. 1994. Time-place learning by an invertebrate, the ant *Ectatomma ruidum* Roger. *Anim Behav*, 48:236-238.
205. Schatz, B., Chameron, S., Beugnon, G. & T.S. Collett. 1999. The use of path integration to guide route learning in ants. *Nature*, 399:769-772.
206. Schildberger, K. 1984. Multimodal interneurons in the cricket brain: properties of identified extrinsic mushroom body cells. *J Comp Physiol A*, 154:71-79.
207. Schneider, D. 1957. Electrophysiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. *Experientia*, 13:89-91.

208. Schneirla, T.C. 1929. Motivation and efficiency in ant learning. *J Comp Psychol*, 15:243-266.
209. Schneirla, T.C. 1933. Some important features of ant learning. *Z Vgl Physiol*, 19:439-452.
210. Schultz, T.R. 2000. In search of ant ancestors. *PNAS*, 97(26):14028-14029.
211. Schulz, D.J. & G.E. Robinson. 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age related changes in the mushroom bodies. *J Comp Physiol A*, 184:481-488.
212. Schulz, D.J. & G.E. Robinson. 2001. Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol A*, 184:53-61.
213. Schulze-Schencking, M.S. 1970. Untersuchungen zur visuellen Lerngeschwindigkeit und Lernkapazität bei Bienen, Hummeln und Ameisen. *Z Tierpsychol*, 27:513-522.
214. Schwartzkopff, J. 1974. Mechanorreception. En: *The physiology of insecta Vol. II*. Editado por: M. Rockstein. Academic press. pp. 273-352.
215. Seid, M.A. & J.F.A. Traniello. 2005. Age-related changes in biogenic amines in individual brains of the ant *Pheidole dentata*. *Naturwissenschaften*, 92:198-201.
216. Sharma, V.K., Lone, S.R., Goel, A. & M.K. Chandrashekar. 2004. Circadian consequences of social organization in the ant species *Camponotus compressus*. *Naturwissenschaften*, 91:386-390.
217. Shepherd, G.M. 1991. Computational structure of the olfactory system. En: *Olfaction: a model system for computational neuroscience*. Editores: Davis, J.L & H. Eichenbaum. MIT press. Pags. 1-36.
218. Sigg, D., Thompson, C. & A. Mercer. 1997. Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *J Neurosci*, 17:7148-7156.
219. Sirviö, A., gadau, J., Rueloff, O., Lamatsch, D., Boomsma, J.J., Pamilo, P. & R.E. Page. 2006. High recombination frequency creates genotypic diversity in colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*. *J European Society for Evolutionary Biology*, 19:1475-1485
220. Snyder, L.E. 1993. Non-random behavioral interactions among genetic subgroups in a polygynous ants. *Anim Behav*, 46:431-439.
221. Solé, R. & B. Goodwin. 2000. *Signs of life*. Basic Books.
222. Stengl, M., Zintl, R., De Vente, J. & A. Nighorn. 2001. Localization of cGMP immunoreactivity and of soluble guanylyl cyclase in antennal sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res*, 304:409-421.
223. Stocker, R.F. 2001. *Drosophila* as a Focus in Olfactory Research: Mapping of Olfactory Sensilla by Fine Structure, Odor Specificity, Odorant Receptor Expression, and Central Connectivity. *Microscopy Research and Technique*, 55:284-296.
224. Stratton, L.O. & W.P. Coleman. 1973. Maze learning and orientation in the fire ant (*Solenopsis saevissima*). *J Comp Physiol Psych*, 83:7-12.
225. Strausfeld, N.J. 1989. Insect vision and olfaction: common design principles of neuronal organization. En: *Neurobiology of sensory systems*, Editores: Naresh-Singh, R. & N.J. Strausfeld. Plenum. Pags. 319-350.
226. Strausfeld, N.J. & Y. Li. 1999. Organization of olfactory and multimodal afferent neurons supplying the calyx and pedunculus of the cockroach mushroom bodies. *J Comp Neurol*, 409:603-625.
227. Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S. & K. Ito. 1998. Evolution, discovery, and interpretation of arthropod mushroom bodies. *Learning and Memory*, 5:11-37.
228. Stuart, R.J. & R.E. Page. 1991. Genetic component to division of labor among workers of a Leptothoracine ant. *Naturwissenschaften*, 78:375-377.
229. Sudd, J.H. & N.R. Franks. 1987. *The behavioural ecology of ants*. Chapman and Hall. 206 pp.
230. Suzuki, H. 1975. Antennal movements induced by odour and central projection of the antennal

- neurones in the honey-bee. *J Insect Physiol A*, 21:831-847.
231. Talluri, S., Bhatt, A. & D.P. Smith. 1995. Identification of a *Drosophila* G protein α subunit (dG α -3) expressed in chemosensory cells and central neurons. *PNAS*, 92:11475-11479.
 232. Tofts, C. & N.R. Franks. 1992. Doing the right thing: ants, honeybees and naked mole-rats. *TREE*, 7(10):346-349.
 233. Toma, D.P., Bloch, G., Moore, D. & G.E. Robinson. 2000. Changes in *period* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. *PNAS*, 97(12):6914-6919.
 234. Topoff, H., Lawson, K. & P. Richards. 1973. *Ann Ent Soc Am*, 66:109-111.
 235. Trumbo, S.T. & G.E. Robinson. 1997. Learning and task interference by corpse-removal specialists in honey bee colonies. *Ethology*, 103:966-975.
 236. Trumbo, S.T., Huang, Z.Y. & G.E. Robinson. 1997. Division of labour between undertakers specialists and other middle-aged worker in honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol*, 41:151-163
 237. Visscher, P.K. 1983. The honey bee way of death: necrophoric behavior in *Apis mellifera*. *Anim Behav*, 31:1070-1076.
 238. Visscher, P.K. 1988. Undertaker specialists in honey bee colonies. En: *Interindividual behavioural variability in social insects*. Editor: Jeannie, R.L. Westview press. Pp. 359-383.
 239. Visscher, P.K., Vetter, R.S. & G.E. Robinson. 1995. Alarm pheromone perception in honey bee is decreased by smoke. *J Insect Behav*, 8(1):11-18.
 240. Voet, D. & J.G. Voet. 2004. *Biochemistry*. Wiley press. 1591 pp.
 241. Vogt, R.G. 1987. The molecular basis of pheromone reception: its influence on behavior. En: *Pheromone biochemistry*. Editores: Prestwich, G.D. & G.J. Blomquist. Academic press. Pags. 385-431.
 242. Vosshall, L.B. 2000. Olfaction in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 10:498-503.
 243. Vosshall, L.B. 2001. The molecular logic of olfaction in *Drosophila*. *Chem Sens*, 26:207-213.
 244. Vowles, D.M. 1955. The function of the corpora pedunculata in bees and ants. *Brit J Anim Behav*, 2:116.
 245. Vowles, D.M. 1964. Olfactory learning and brain lesions in the wood ant (*Formica rufa*). *J Comp Physiol Psychol*, 58:105-111.
 246. Vowles DM. 1967. *Chemistry of learning: Invertebrate research*. East Lansing, Mich. New York, Plenum Press: 425-451.
 247. Wagener-Hulme, C., Kuehn, J.C., Schulz, D.J. & G.E. Robinson. 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol A*, 184:471-479.
 248. Wang, Y., Wright, N.J., Guo, H., Xie, Z., Svodoba, K., Malinow, R., Smith, D.P. & Y. Zhong. 2001. Genetic manipulation of the odor-evoked distributed neural activity in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron*, 29:267-276.
 249. Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B. & R. Axel. 2003. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell*, 112:271-282.
 250. Weber, N.A. 1972. *Gardening ants, the Attines*. The American Philosophical Society.
 251. Wegner, J.W., Boekhoff, I., Tareilus, E. & H. Breer. 1993. Olfactory signalling in antennal receptor neurons of the locust (*Locusta migratoria*). *J Insect Physiol*, 39:153-163.
 252. Wehner, R. 1992. Sensory systems and behaviour. En: *Behavioural Ecology: an evolutionary approach*, 4a edición (Editores: J.R. Krebs & N.B. Davies), pp. 19-41. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 253. Wehner, R. & S. Wehner. 1986. Path integration in desert ants. Approaching a long-standing puzzle in insect navigation. *Monitore Zool Ital (NS)* 20:309-331.
 254. Wetzel, C.H., Behrendt, H.J., Gisselman, G., Störtkuhl, K.F., Hovemann, B. & H. Hatt. 2001. Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous

- cell system. *PNAS*, 98(16):9377-9380.
255. Wheeler, W.M. 1960. *The ants. Their structure, development and behavior*. Columbia University. 663 pp.
 256. Whitehouse, M.E.A. & K. Jaffe. 1996. Ant wars: combat strategies, territory and nest defence in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*, *Anim Behav*, 51:1207-1217.
 257. Wilson, E.O. 1953. The origin and evolution of polymorphism in ants. *Q Rev Biol*, 28(2):136-156.
 258. Wilson, E.O. 1954. A new interpretation of the frequency curves associated with ant polymorphism. *Insectes Sociaux*, 1(1):75-80.
 259. Wilson, E.O. 1963. The social biology of ants. *Annu Rev Entomol*, 8:345-368.
 260. Wilson, E.O. 1971. *The insect societies*. Belknap press of the Harvard University Press. 548 pp.
 261. Wilson, E.O. 1974. The soldier of the ant *Camponotus (Colobopsis) fraxinicola* as a trophic caste. *Psyche*, 81(1):182-188.
 262. Wilson, E. O. 1980(a). *Sociobiología. La nueva síntesis*. Omega. 701 pp.
 263. Wilson, E.O. 1980(b). Caste and division of labor in leaf-cutter ants. I. The overall pattern. *Behav Ecol Sociobiol*, 7:143-156.
 264. Wilson, E.O. 1980(c). Caste and division of labor in leaf-cutter ants. II. The ergonomic optimization of leaf cutting. *Behav Ecol Sociobiol*, 7:157-165.
 265. Wilson, E.O. 1983(a). Caste and division of labor in leaf-cutter ants. III. Ergonomic resiliency in foraging by *A. cephalotes*. *Behav Ecol Sociobiol*, 14:47-54.
 266. Wilson, E.O. 1983(b). Caste and division of labor in leaf-cutter ants. IV. Colony ontogeny of *A. cephalotes*. *Behav Ecol Sociobiol*, 14:55-60.
 267. Wilson, E.O. 1985(a). The sociogenesis of insect colonies. *Science*. 228(4707):1489-1495.
 268. Wilson, E.O. 1985(b). The principles of caste evolution. In: *Experimental and behavioral ecology and sociobiology*. Eds: Holldobler B. & M. Lindauer. Sinauer. 307-324 pp.
 269. Wilson, E.O. 1985(c). Between-caste aversion as a basis for division of labor in the ant *Pheidole pubiventris* (Hymenoptera:Formicidae). *Behav Ecol Sociobiol*, 17:35-37.
 270. Wilson, W.O., Durlach, N.I. & L.M. Roth. 1958. Chemical releasers of necrophoric behavior in ants. *Psyche*, 65:154-161.
 271. Wilson, E.O. & B. Hölldobler. 2005. The rise of the ants: a phylogenetic and ecological explanation. *PNAS*, 102(21):7411-7414.
 272. Winnington, A.P., Napper R.M. & A.R. Mercer. 1996. Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. *J Comp Neurol*, 365:479-490.
 273. Withers, P.C. 1992. *Comparative animal physiology*. Saunders.
 274. Withers, G.S., Fahrbach, S.E. & G.E. Robinson. 1993. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature*, 364: 238-240.
 275. Withers, G.S., Fahrbach, S.E. & G.E. Robinson. 1995. Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honeybees. *J. Neurobiol.*, 26: 130-144.
 276. Whitfield, C.W., Cziko, A.M. & G.E. Robinson. 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science*, 302(5643):296-299.
 277. Wong, A.M., Wang, J.W. & R.Axel. 2002. Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila protocerebrum*. *Cell*, 109:229-241.
 278. Yamada, M. 1970. Electrophysiological investigation of insect olfaction. En: *Control of insect behavior by natural products* (Eds Wood David L., Silverstein R.M. & Nakajima M.), pp. 317-330. Academic press, New York.
 279. Yamagata, N., Nishino, H. & M. Mizunami. 2006. Pheromone-sensitive glomeruli in the primary olfactory centre of ants. *Proc R Soc B*, 273:2219-2225.
 280. Young, J.Z. 1986. *Los programas del cerebro*. Fondo de Cultura Económica. 382 pp.
 281. Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall.

• **APENDICE 1: Perspectivas neuroanatómicas. Dimorfismo sexual en la organización de los lóbulos antenales de *Camponotus ocreatus***

En diversas especies de insectos existe dimorfismo sexual en el sistema olfativo, y esta especialización está relacionada con el procesamiento de feromonas sexuales involucradas en la detección de las hembras por parte de los machos durante el apareamiento (Rospars, 1988 y de Homberg et al., 1989). En las hormigas, el apareamiento o al menos la detección de la hembra, generalmente ocurre en el aire. Los machos detectan a las hembras por medio de señales visuales y químicas, siendo estas últimas las más importantes para el acoplamiento y la evitación de la hibridización (Hölldobler & Wilson, 1990). En diversas especies se conocen estructuras en el LA, llamadas macroglomerulos, que están especializadas en el procesamiento de señales feromonales detectadas por NRO que responden únicamente a feromonas sexuales (Rospars, 1988; Homberg et al., 1989; Hanson & Anton, 2000). En este trabajo se realizó una comparación de los LA entre sexos de la hormiga *C. ocreatus*, y con la perspectiva de completar este estudio realizando la misma comparación entre los sexos de *A. mexicana*, cuyos individuos sexuados sólo pueden colectarse cada año durante el vuelo nupcial de apareamiento.

• **Hipótesis**

H1: Se espera que exista dimorfismo sexual en la estructura del lóbulo antenal, con la presencia de alguna estructura glomerular hipertrofiada en los machos como ocurre en otras especies en la que estas estructuras están relacionadas con el procesamiento de feromonas sexuales.

• **Objetivos**

1.- Realizar un estudio anatómico comparativo entre los LA de reinas y machos de *C. ocreatus*.

Ap1.1. Resultados: lóbulos antenales de reinas de *C. ocreatus*

Las reinas usadas en los estudios neuroanatómicos fueron reinas vírgenes (figuras Ap1-1 – Ap1-5). La organización del LA y del CMMA de reinas es similar a la de las obreras. Las diferencias entre los LA de reinas y obreras no son tan obvias como las que existen entre hembras y machos.

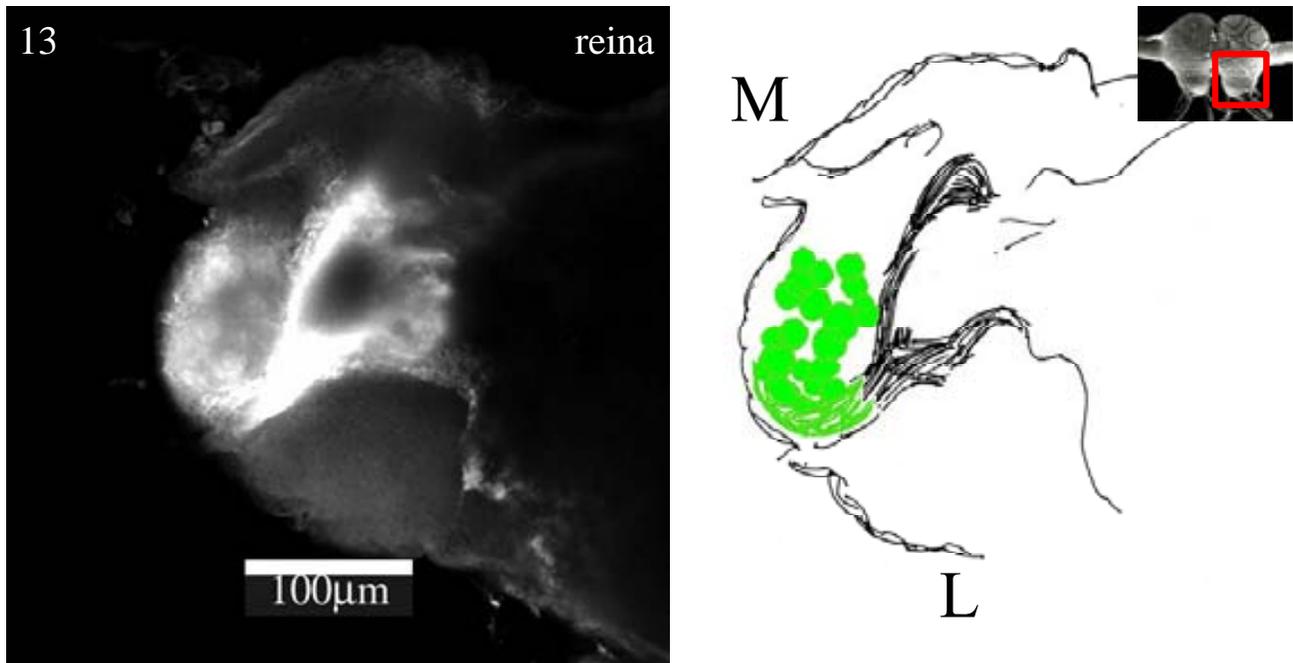


Figura Ap1-1. LA izquierdo de reina *C. ocreatus*. La fotografía y el dibujo corresponden a una sección muy posterior en donde aparece el grupo glomerular 6. La parte más fluorescente corresponde al a la parte del NA que se dirige directamente hacia el CMMA, que en el dibujo se representa en el trazo en negro (nótese la organización microglomerular del CMMA).

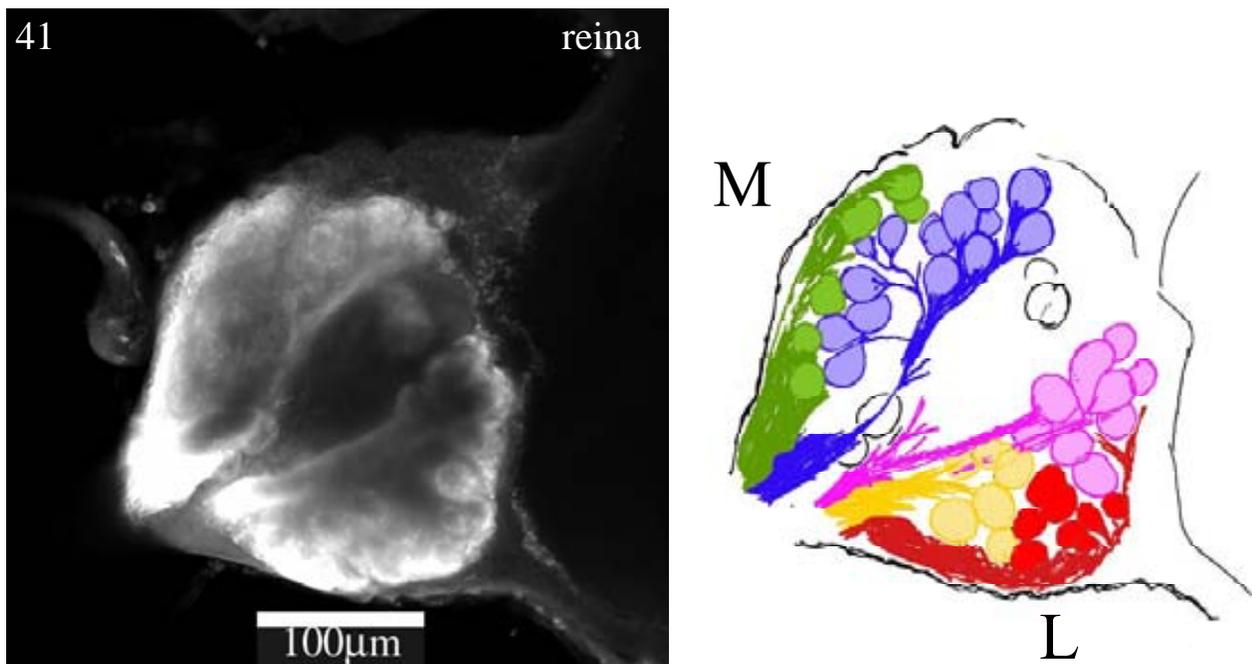


Figura Ap1-2. En esta fotografía y dibujo, pueden apreciarse los grupos 1, 2, 3, 4 y parte del 5. Recuerdese, al comparar estas imágenes con las de obreras, que las fotografías de los LA de las reinas corresponden al LA izquierdo. Para referencia es necesario tomar en cuenta las indicaciones de medial (M) y lateral (L) que indican la posición relativa de los grupos de glomérulos con respecto a la orientación del cerebro y el LA fotografiado.

Sin embargo, también existen diferencias entre reinas y obreras. Las reinas presentan un glomérulo agrandado en el grupo glomerular 5, el mismo grupo en el que los machos presentan macroglomérulos (figuras Ap1-3 y Ap1-4). Los grupos de neuronas centrales (*GNC*) son los mismos que en las obreras así como la organización general de los glomérulos en 6 grupos inervados por 6 tractos. Las reinas presentan más de 400 glomérulos.

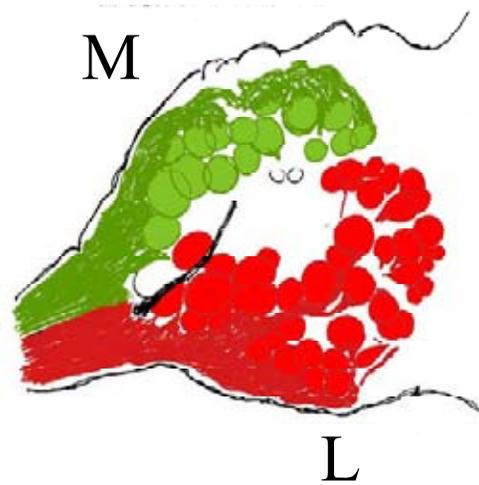
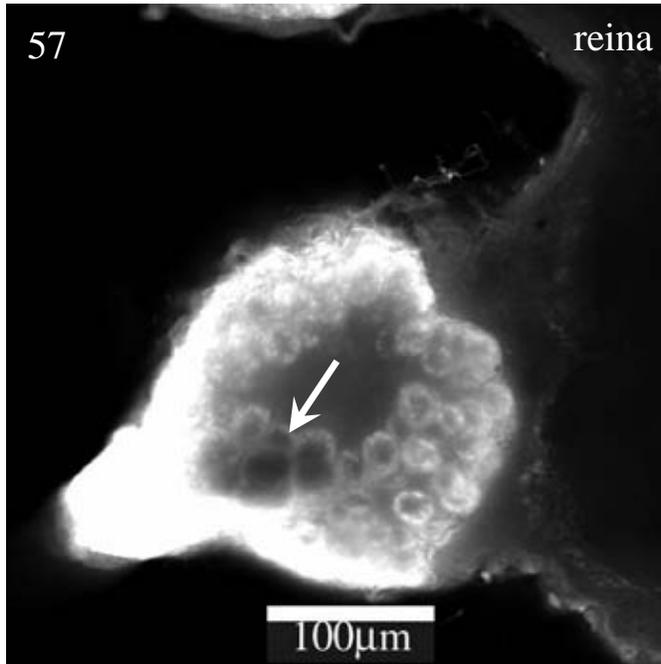


Figura Ap1-3. En esta figura se muestra el último grupo de glomérulos, el grupo 5, con su tracto T5. Este tracto, y el medial, el tracto 3, como se explicó ya antes para las obreras, se separan inmediatamente al entrar al LA. Obsérvese el gran glomérulo en el grupo 5 (flecha).

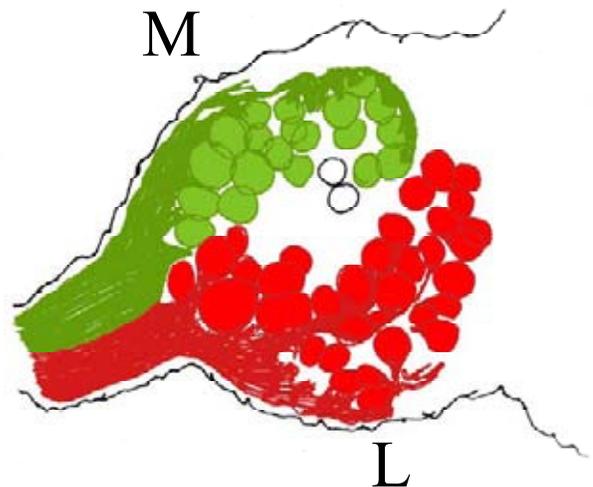
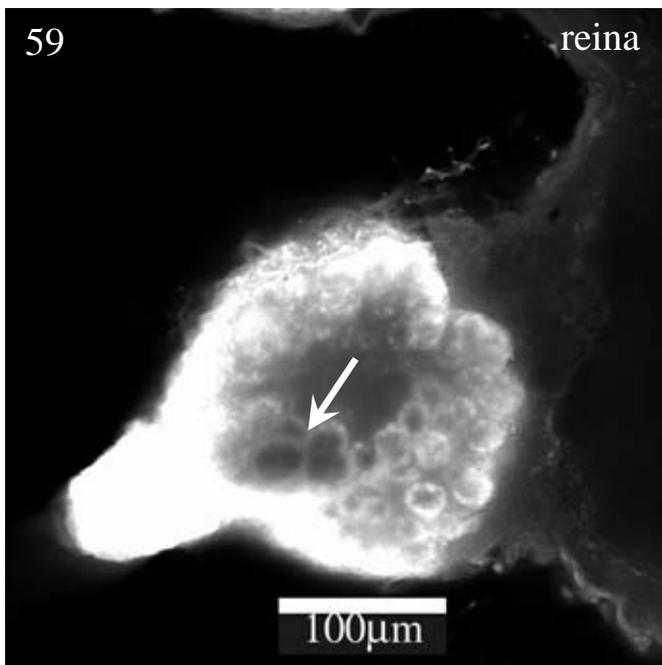


Figura Ap1-4. En esta figura se ve claramente el tracto 5 innervando al grupo 5, y al tracto 3 innervando al grupo 3. La flecha indica el glomérulo agrandado.

El patrón de tinción fue marcadamente diferente entre las reinas y machos, lo cual podría indicar diferencias en la arquitectura neural de los glomérulos, pero también podría ser un artefacto del procedimiento (figura Ap1-5).

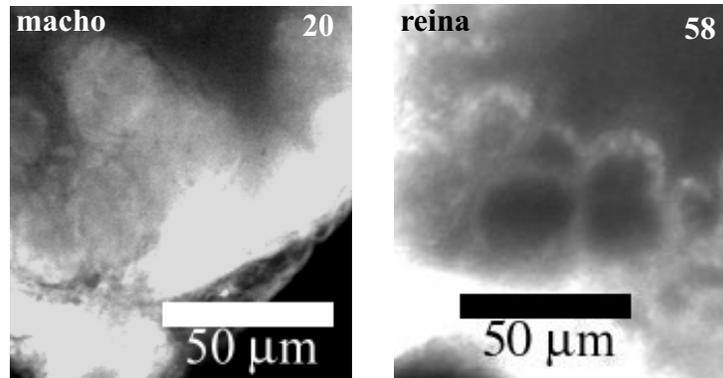


Figura Ap1-5. Patrón de tinción en los glomérulos del LA en *C. ocreatus*. En *A. mexicana* el patrón de tinción también es variable. El número de la derecha indica la sección óptica.

Ap1.2. Resultados: lóbulos antenales de machos

Los LA de los machos son más pequeños que los de las reinas y obreras. No obstante la organización glomerular es la misma con 6 grupos de glomérulos con 6 tractos que los inervan. Los grupos de neuronas centrales (*GNC*) son iguales que aquellos que presentan las obreras (figura Ap1-6). Se encontró dimorfismo sexual en la estructura de los LA: además de los 235-240 glomérulos, los machos presentan de 3-5 macroglomérulos en el grupo glomerular 5. Las secciones ópticas y sus dibujos correspondientes muestran el LA izquierdo un macho de *C. ocreatus* (figuras Ap1-7 – Ap1-10). La distribución de las NL es la misma que en las obreras y reinas: 5 grupos de somas en la periferia del LA.

Ap1.3. Resultados generales de los estudios de dimorfismo sexual en los LA

Existe dimorfismo sexual en los lóbulos antenales en las hormigas *Camponotus ocreatus*.

- a) Los machos presentan menos glomérulos que las obreras.
- b) Los machos presentan de 3 a 5 macroglomérulos.
- c) Las hembras (reinas y obreras) no presentan macroglomérulos.
- d) Las reinas tampoco presentan macroglomérulos, aunque presentan un glomérulo agrandado en el mismo grupo glomerular en el que los machos presentan macroglomérulos (grupo 5).

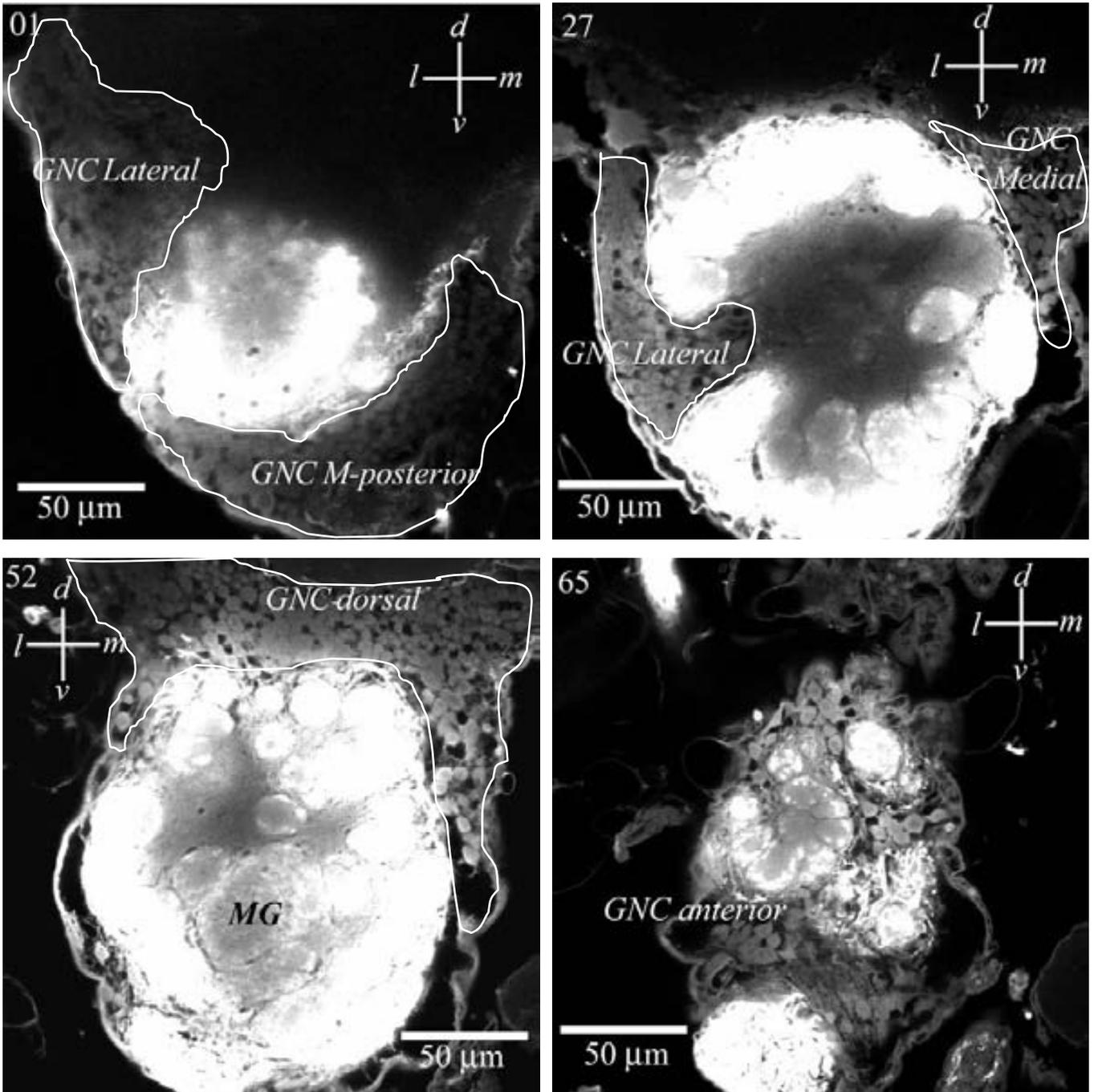


Figura Ap1-6. Secciones ópticas de microscopía confocal del LA de un macho de *C. ocreatus*. Se muestran los principales grupos de neuronas centrales (GNC) del LA. Se indica, además, el eje de orientación: *d*, dorsal; *v*, ventral; *l*, lateral; *m*, medial.

Ap1.4. Discusión: dimorfismo sexual en los LA

Los macroglomérulos encontrados podrían estar implicados en el procesamiento olfativo de feromonas sexuales importantes para la identificación de la hembra durante el vuelo nupcial. Aunque los machos presentan grandes ojos y grandes LO, es posible que la identificación y localización de la hembra dependa principalmente de señales químicas que podrían iniciar una serie de acontecimientos conductuales que desembocarían en la cópula. El número de glomérulos en los machos es muy

reducido en comparación con las hembras, tal y como ocurre en las abejas (Arnold et al., 1985). Las obreras de *C. ocreatus* presentan aproximadamente 145 glomérulos más en el LA, lo cual indica la alta especialización de los machos en su función reproductiva ya que no participan en la realización de tareas en el nido (Hölldobler & Wilson, 1990). Sin embargo, la organización general de los glomérulos es similar: en 6 grupos de glomérulos inervados cada uno por su propio tracto.

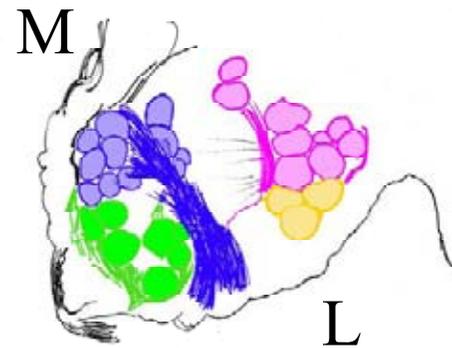
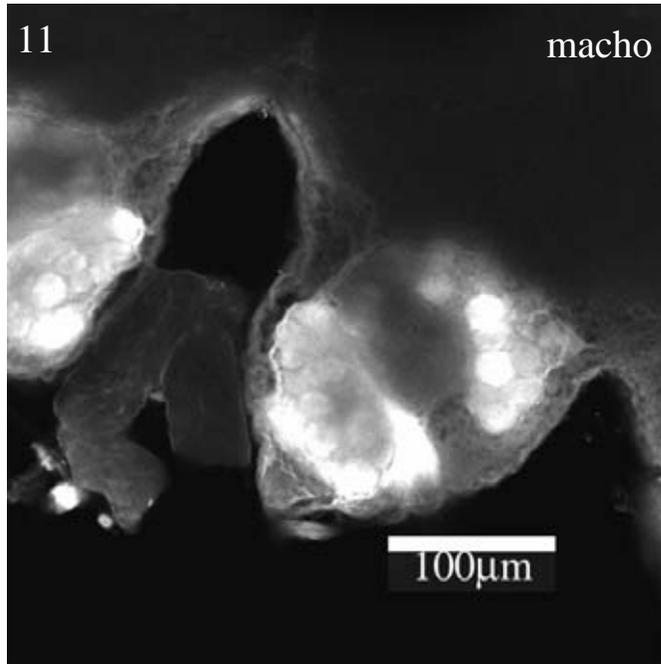


Figura Ap1-7. LA izquierdo de un macho de *C. ocreatus*. La posición relativa de los grupos de glomérulos se mantiene constante en obreras, reinas y machos, pero la presencia de macroglomérulos marca la diferencia entre sexos. En esta figura se observan los grupos 1, 2, 6 y algunos glomérulos del grupo 4.

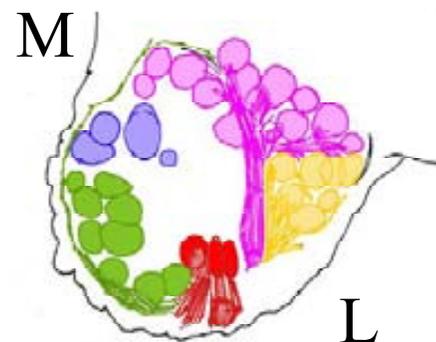
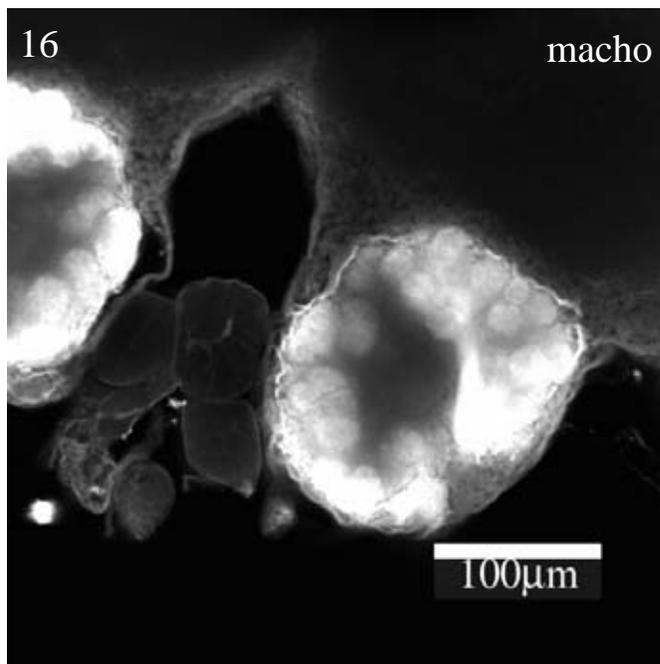


Figura Ap1-8. En esta figura se ve más claramente el grupo 1 y su tracto T1; el grupo 4 y parte de su tracto T4. También se observan algunos glomérulos del grupo 5 y parte del tracto T5 y algunos glomérulos del grupo 3.

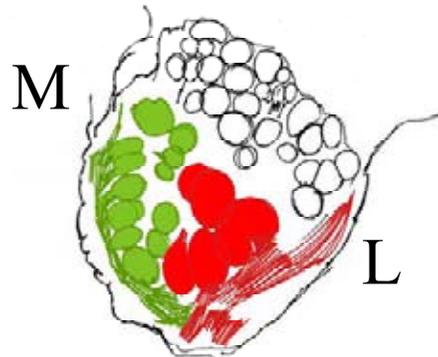
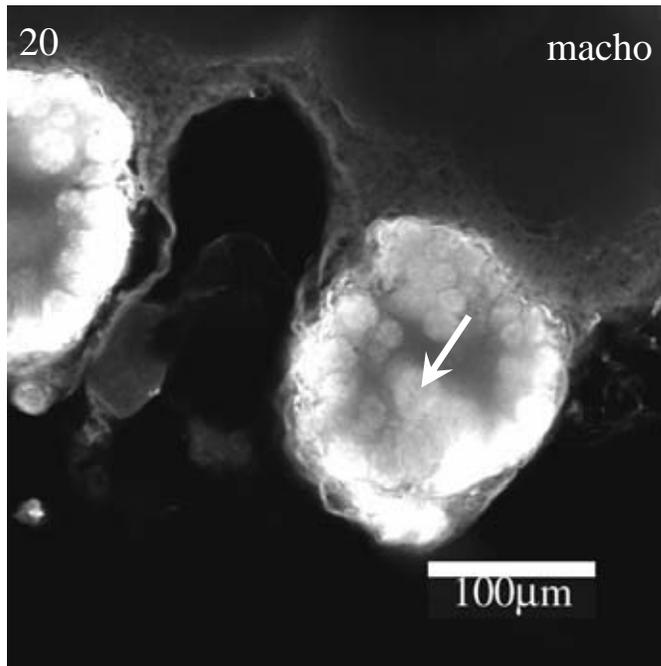


Figura Ap1-9. En esta figura puede verse más claramente el grupo 5 y parte de su tracto. Lo más interesante de esta figura y de la **Ap1-10**, es que se ven claramente, hacia el centro del LA izquierdo, los macroglomerulos (flecha) relacionados con el dimorfismo sexual.

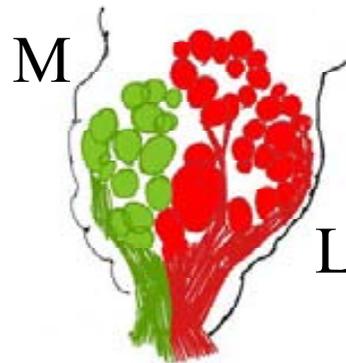
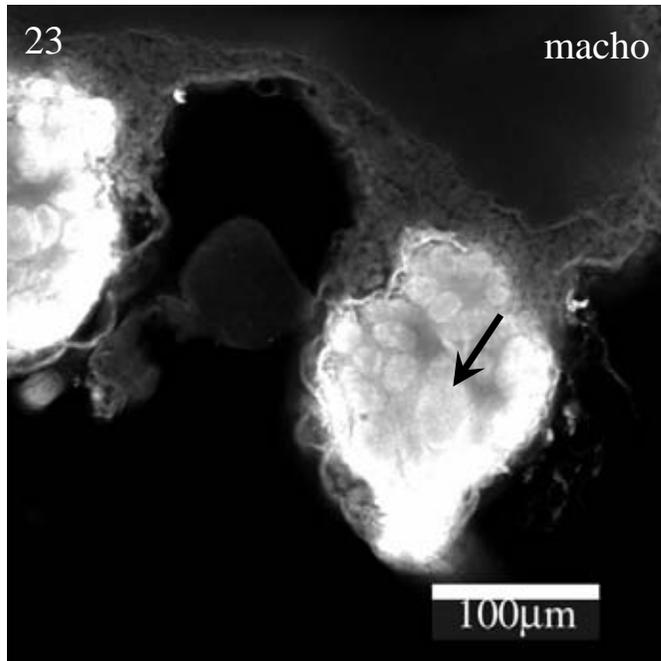


Figura Ap1-10. Se observa claramente el grupo 5 y su tracto innervando glomérulos individuales. Obsérvese el gran macroglomerulo (flecha) que ocupa gran parte del centro del LA.

Como se esperaba a partir de estudios con otros insectos, en los machos de hormigas existen estructuras glomerulares de gran tamaño comparables a los macroglomerulos de otras especies como las abejas (Arnold, 1984). A partir de las secciones, pueden contarse entre 3-5 estructuras similares a macroglomerulos. Aunque se esperaban estos resultados, no existen reportes acerca de la presencia de macroglomerulos en hormigas.

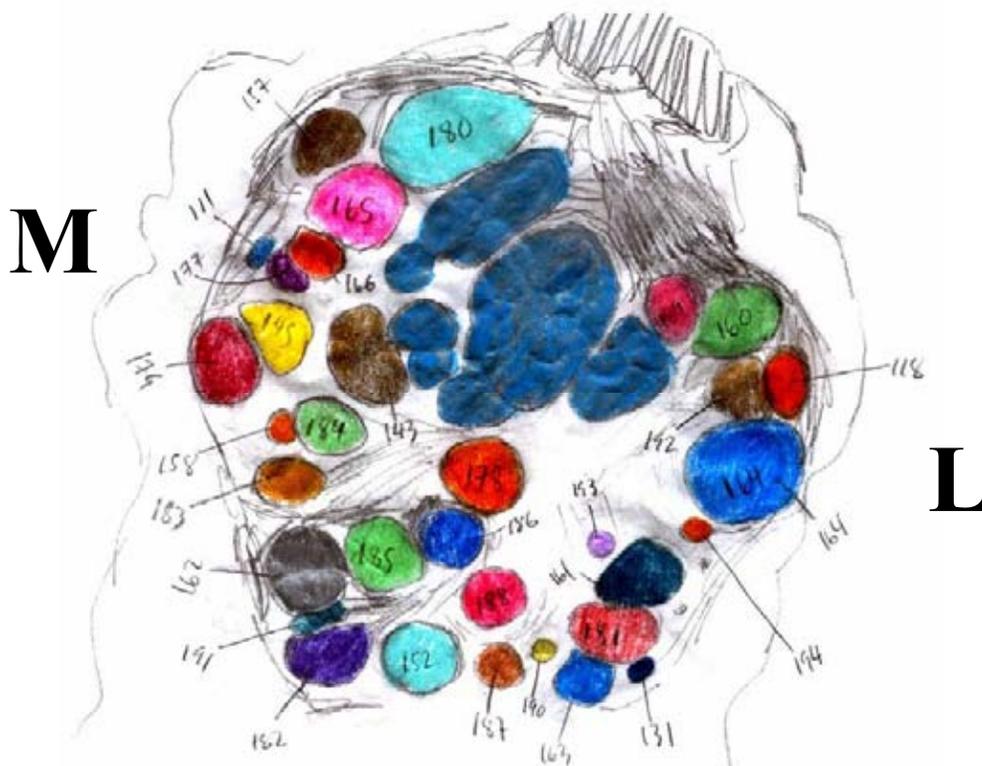
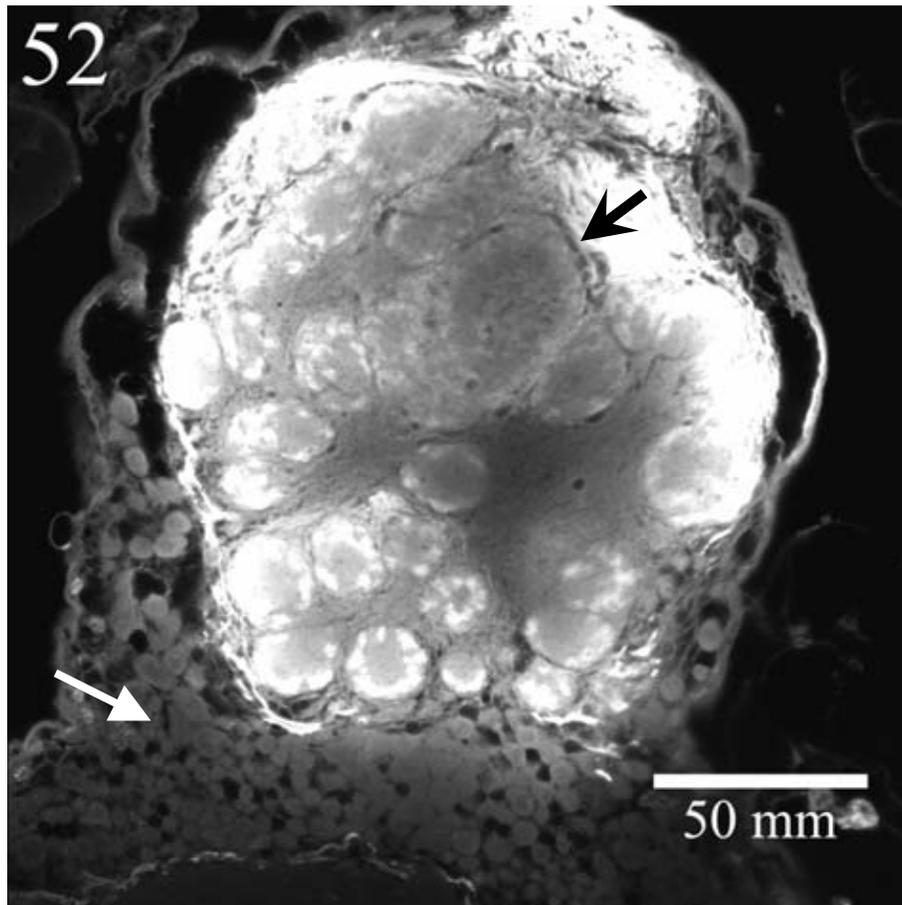


Figura Ap1-11. Fotografía confocal y dibujo donde se muestran los macroglomerulos del LA de machos de *C. ocreatus*. En la fotografía, la flecha negra indica el sitio donde se ubican los macroglomerulos, y la flecha blanca indica los somas de las neuronas centrales, pueden, incluso, observarse los núcleos neuronales del grupo neuronal dorsal. *NA*, nervio antenal

Además, se encontró un glomérulo desproporcionadamente grande en el LA de las reinas. Resultados similares han sido reportados en reinas de abejas (Arnold et al., 1988), en las cuales se presenta una estructura macroglomerular. En este trabajo se encontró un glomérulo más conspicuo que los otros en el LA de las reinas. Este macroglomerulo puede ser homólogo a aquellos de los machos ya que se encuentran en la misma posición. Es posible que este macroglomerulo esté implicado en el procesamiento de información sexual o en el procesamiento de otro tipo de señales olfativas de importancia biológica como el olor de la colonia por ejemplo.

• APENDICE 2: *Necroforesis. Remoción de los cadáveres*

Ap2.1. División del trabajo y la higiene dentro del nido

Aunque la construcción de nidos encerrados en cavidades contribuyó a la expansión geográfica de los insectos sociales debido al control ambiental, también implicó la necesidad de incrementar las conductas de limpieza como la remoción de los cadáveres con lo que se disminuye la probabilidad del surgimiento de enfermedades (Trumbo & Robinson, 1997; Visscher, 1988). La transmisión de enfermedades infecciosas (no transportadas por el viento) y parásitos depende del número de contactos entre los individuos de una población, y por lo tanto, de la densidad de esta (Begon, 1988). Las sociedades de insectos al vivir en grupos densos y en constante interacción, mantienen altas frecuencias de encuentros interindividuales, por lo que aumenta la probabilidad de dispersión de las enfermedades.

Los interiores de los nidos de los insectos sociales, y principalmente las cámaras de cría, son mantenidos limpios, ya que el suelo de casi cualquier lugar está infestado de una gran variedad de microorganismos. Así, la remoción de hormigas muertas y de otros materiales en descomposición juega un importante papel en la higiene de la colonia. El comportamiento de remoción de cadáveres es llamado necroforesis y las obreras que lo realizan son conocidas como sepultureras (Hölldobler & Wilson, 1990). Las hormigas *Atta* tienen varios basureros, una gran parte se encuentra bajo tierra en forma de cámaras y la otra parte se encuentra en el exterior, en los alrededores de las entradas al nido. En estos basureros se encuentran desperdicios de la materia vegetal que ha servido como sustrato para el crecimiento del hongo que cultivan, y cadáveres de hormigas (Weber, 1972).

Ap2.2. Necromonas

Aunque la identificación de la muerte no es considerada como comunicación, tiene características similares, particularmente respuestas estereotipadas disparadas por estímulos químicos específicos. Las hormigas reconocen a los muertos a través de señales químicas. Wilson et al. (1958) estudiaron la naturaleza del estímulo liberador del comportamiento necroforético en *Pogonomyrmex badius* y *Solenopsis saevissima*. Ellos encontraron que de las sustancias que actúan como señales químicas para la muerte son subproductos comunes de la descomposición de los cadáveres de insectos. De estos, sólo los ácidos grasos de cadena larga, principalmente el ácido oleico, están involucrados en el desencadenamiento de la respuesta necroforética. Estudios realizados en otras especies de hormigas, como *Solenopsis invicta* (Blum, 1970), *Myrmecia vindex* (Haskins, 1970; Haskins & Haskins, 1974), y *P. badius* (Gordon, 1983, 1999), y en cucarachas (Rollo et al., 1994) han confirmado que el ácido oleico también actúa como señal de la muerte. Estas sustancias liberadoras de la necroforesis comienzan a aparecer gradualmente tiempo después que las hormigas han muerto (Howard & Tschinkel, 1976). Gordon (1983, 1999) demostró, en *P. badius*, que la necroforesis depende del contexto y del estado conductual de los individuos. Estas sustancias que identifican a los cadáveres han sido llamadas necromonas (Rollo et al., 1994), y están ampliamente distribuidas y quizá hayan sido seleccionadas por su efectividad al evidenciar cadáveres en descomposición con la ventaja de evitar la proliferación de microorganismos.

• APENDICE 3: *Electroantenogramas*

Las técnicas electrofisiológicas han sido muy útiles en el aislamiento, identificación y elucidación de la función conductual y fisiológica de los semioquímicos así como de la función de los sistemas de quimiorrecepción de los insectos. Entre los métodos electrofisiológicos se encuentran:

- 1) El electroantenograma (EAG), empleado para el registro de las antenas completas de los insectos.
- 2) Registro de células unitarias, técnica empleada para registrar la actividad de neuronas receptoras individuales.
- 3) Técnica de registro para sensilas quimiorreceptoras olfatorias con electrodos de tungsteno.
- 4) Técnica de registro para sensilas quimiorreceptoras de contacto.

La técnica EAG fue desarrollada originalmente por Schneider (1957) para medir las respuestas electrofisiológicas de la antena de los machos de la polilla *Bombyx mori* a compuestos volátiles de la feromona sexual de las hembras. El EAG mide la respuesta de las células receptoras de la antena de los insectos en respuesta a compuestos biológicamente activos. El EAG es, como el electroolfatograma y el electrorretinograma, un registro de la respuesta de muchas neuronas receptoras a la presentación de un estímulo oloroso, que proporciona información acerca del espectro cualitativo y de la relación intensidad de estímulo-respuesta de un gran número de unidades sensoriales (Yamada, 1970). El EAG es un indicador útil para el bioensayo de sustancias biológicamente activas (Schneider, 1957), que mide la respuesta de las células receptoras, en la antena de los insectos, a tales compuestos. Schneider (1957) sugirió que el EAG es la suma de muchos potenciales receptores olfatorios registrados más o menos simultáneamente por un electrodo localizado en el epitelio sensorial. Él mismo interpretó el potencial negativo de esas reacciones eléctricas de las dendritas en las células olfatorias como una despolarización de la membrana receptora. En los registros EAG, una sola y gran despolarización se observa después de la estimulación. Las respuestas antenales típicamente se encuentran entre 1-10 mV. El potencial negativo, que inicia unos 100-300 ms después de la estimulación, se ha interpretado como una despolarización de la membrana receptora. La forma del EAG depende de los componentes odoríferos de la corriente de aire y la amplitud de la concentración o, si la concentración es constante, de la velocidad del movimiento de aire. Además, no sólo la amplitud de la respuesta, sino también la frecuencia de los impulsos nerviosos generados incrementa con aumentos en las concentraciones del estímulo químico hasta que el nivel de saturación es alcanzado (Roelofs, 1979, 1984).

Así, la respuesta EAG es una integración de potenciales de un gran número de quimiorreceptores. Un modelo de los receptores olfatorios incluye una vía de corriente transepitelial a través de las células sensoriales y otra a través de las células auxiliares de alrededor. Un estímulo oloroso causa una deflexión negativa del potencial transepitelial: el potencial receptor, el cual incrementa relativamente rápido y declina mas lentamente después del final del estímulo (Roelofs, 1984). El potencial receptor de cada unidad sensorial se dispersa electrotónicamente a través de las dendritas y el soma celular de las neuronas sensoriales olfatorias y producen PAs en las fibras nerviosas.

Pero no sólo los potenciales receptores de las sensilas determinan la amplitud y forma del EAG. Nagai (1983) propuso que el epitelio sensorial de una antena puede ser considerado como un centro conductor, es decir, un cilindro de fluido conductor (la hemolinfa) rodeado por una capa de medio conductor (la linfa del receptor) y separados unos de otros por una capa de alta resistencia eléctrica (la capa de células epiteliales con uniones septadas). Ahora bien, los espacios de la linfa receptora de sensilas vecinas se encuentran aislados de las demás, de manera que un gran potencial inducido a través de una sensila tiene sólo una pequeña influencia en el potencial de una sensila vecina. Así, el potencial inducido a lo largo del centro de hemolinfa de la antena podría ser inducido debido a que los componentes celulares de la sensila se encuentran organizados de manera que las membranas basolaterales están dirigidas proximalmente y las cavidades de la linfa receptora dirigidas distalmente (figura Ap3-1). De esta manera, cada sensila debería ser un dipolo local el cual influencia el potencial del centro de hemolinfa. No obstante, los potenciales de campo introducidos por la gran abundancia de axones en la parte proximal (comparada con la parte distal) de la antena, podrían contribuir también al gradiente de potencial en el centro de hemolinfa. El potencial del fluido subcuticular también es alterado por los cambios en el potencial de la linfa del receptor, es decir, por los potenciales receptores extracelulares de la sensila en la vecindad de los electrodos. La influencia de las sensilas lejanas depende de la constante de espacio del epitelio. Por lo tanto, la forma y amplitud del EAG depende tanto de los potenciales receptores de las sensilas como de otros parámetros como la constante de espacio del epitelio o la distribución de las sensilas especializadas.

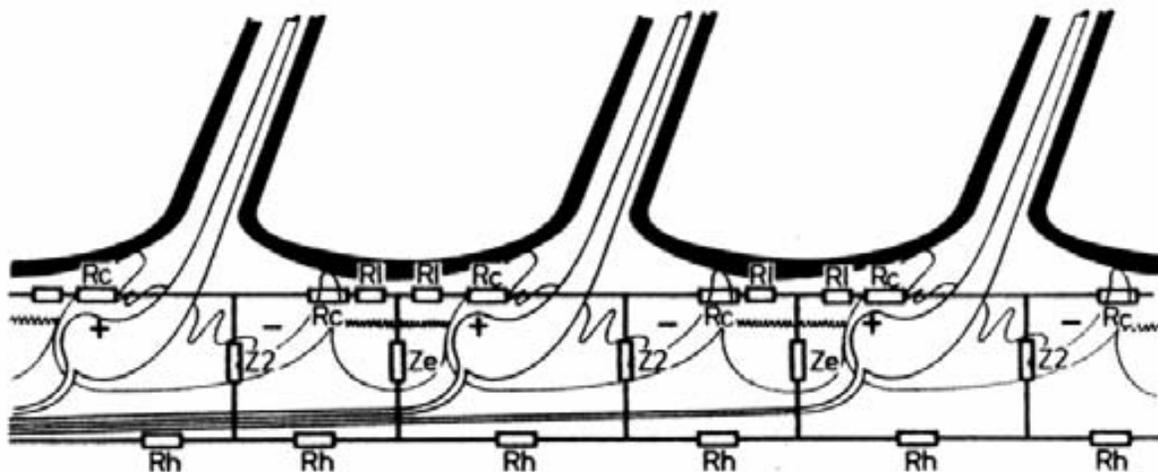


Figura Ap3-1. Estructura epitelial de la antena. Z2, impedancia a través de una sensila (debida a la combinación R2-C2); Rc, resistencia entre el espacio de la linfa del receptor y el fluido subcuticular; R1, resistencia del fluido subcuticular el cual, junto con la impedancia a través de las células no-sensilares en el epitelio (Ze) y la resistencia del centro de hemolinfa de la antena, determinan la constante de espacio y de tiempo epitelial. Tomado de Jan de Kramer & Hemberger, 1987.

El EAG registra una diferencia de potencial entre el electrodo de registro, ubicado en la parte distal de la antena, y el de referencia. Nagai (citado en Roelofs, 1984) encontró una relación casi lineal entre la rápida carga negativa inicial y la longitud de la antena; él sugirió que el potencial se suma sólo en la dirección proximal y es el resultado de una interacción de la rápida carga negativa inicial debida a los receptores sensoriales excitados y a los lentos potenciales electrofónicos en desarrollo que se dispersan

a partir de las células estimuladas hacia unidades vecinas a través de capas de células epiteliales de alta resistencia eléctrica. La dispersión electrotonica en la dirección proximal debería incrementar la amplitud total de la respuesta.

Son varios los parámetros que pueden proporcionar información según los objetivos de cada estudio, pero, como en este trabajo, generalmente la amplitud máxima del EAG es el único parámetro de interés (figura Ap3-2).

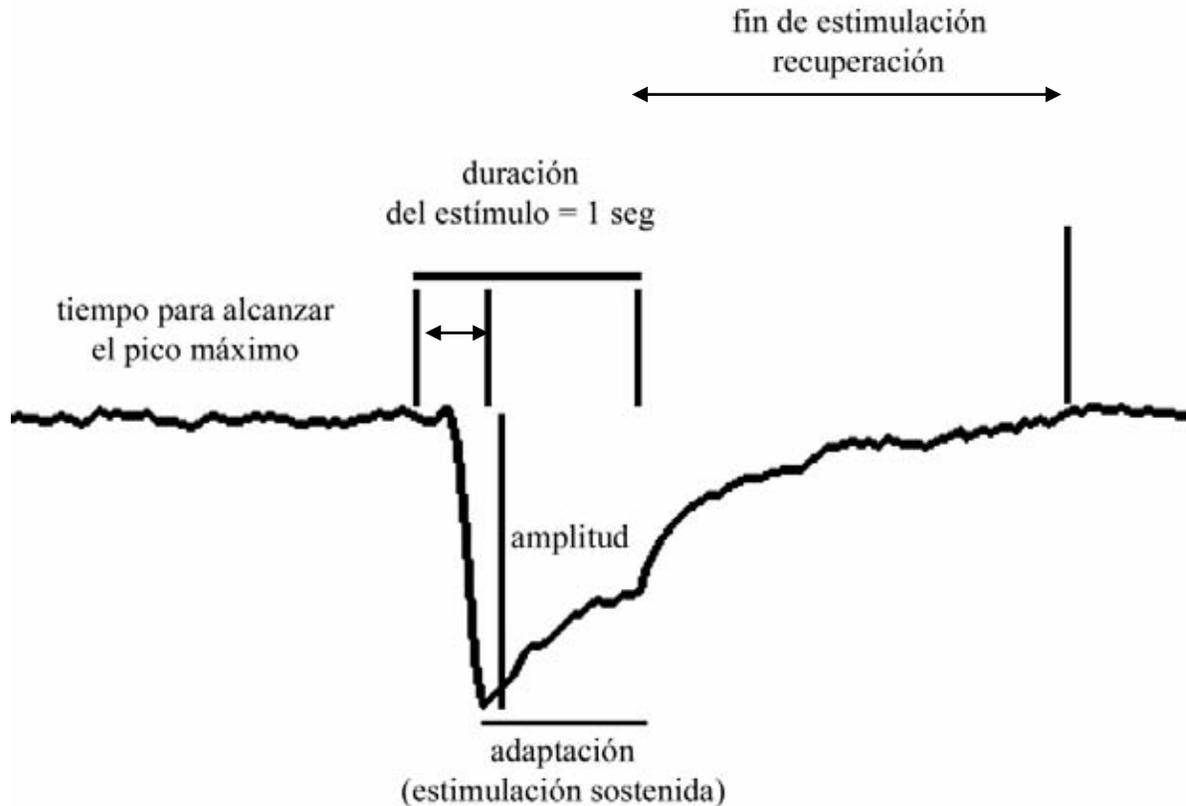


Figura Ap3-2. Ejemplo de un EAG registrado en una obrera *Atta mexicana* en respuesta a hexanol (1µg/ml). Se indican los parámetros que pueden ser medidos según el interés del estudio. Estos parámetros varían según el estímulo y la especie. Para este ejemplo la amplitud es de -1.927 mV.

Este máximo es alcanzado, si la estimulación es rápida, en unos pocos milisegundos después de que la nube del olor ha alcanzado la antena (Bjostad & Roelofs, 1980). Aunque el pico máximo de un EAG dura apenas unos milisegundos, el regreso a la línea basal después de la estimulación, es decir al estado de “reposo”, es muy lento (Roelofs, 1984; Schneider, 1957). Por ejemplo, la respuesta EAG de muchos lepidópteros alcanza el máximo en unos pocos milisegundos, pero el regreso a la línea basal puede tomar un segundo o más. Este regreso incluye componentes de frecuencia en el orden de 1 Hz (Bjostad & Roelofs, 1980).

El EAG ha sido empleado por diversos autores en los insectos sociales. En abejas, por ejemplo, están los trabajos de Brockmann & Brückner (1998), Adler et al. (1971); Thiery et al. (1990); Visscher (1995); Robinson (1987), y Masterman, et al. (2001). En estos dos últimos trabajos, el de Robinson (1987) y el de Mastermann et al. (2001), se realizaron pruebas EAG para determinar diferencias

sensoriales periféricas entre diferentes castas. En hormigas, trabajos como los de Glancey & Dickens, 1988; Kern & Bestman (1993), y el de Sheridan et al. (1995), utilizaron la respuesta EAG para determinar la respuesta sensorial periférica antenal a diferentes clases de estímulos olorosos como las larvas, feromonas de rastro o compuestos de semillas. Payne (1975) realizó experimentos EAG para determinar la sensibilidad de las castas de la hormiga *Camponotus pennsylvanicus* a las feromonas de los machos, mostrando que las reinas responden fuertemente a las feromonas de los machos, mientras que las obreras responden menos fuerte y los propios machos escasamente. Esto fue interpretado como la ausencia de receptores para esta feromona en las antenas de los machos. Además, estos autores encontraron que las antenas de obreras *mayor* y de machos son 10 veces más sensibles que las reinas. Andryszak et al., realizaron experimentos de EAG en hormigas *Atta texana*, probando feromonas de rastro y de alarma en machos, reinas y obreras. Estos autores encontraron que las obreras *mayor* presentan la mayor sensibilidad y menores umbrales EAG a las feromonas de alarma, mientras que las reinas mostraron ser más sensibles a la feromona de rastro. Por su parte, Kleineidam, et al., 2005, realizaron experimentos de EAG encontrando evidencia de que la sensibilidad a la feromona de rastro es diferente en diferentes especies de *Atta*.

• **APENDICE 4: *Abreviaciones empleadas***

- AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
- CF: Cuerpos fungiformes, cuerpos pedunculados
- CMMA: Centro motor y mecanosensorial antenal
- *d*: dorsal
- DAG: Diacil glicerol
- EAG: Electroantenograma
- EM: Espectrometría de masas
- GC: Cromatografía de gases, del inglés, *gas chromatography*
- GMPc: Guanina monofosfato cíclico
- *GNC*: Grupo de neuronas centrales del LA
- HJ: Hormona juvenil
- IP₃: Inositol trifosfato
- L (*l*): Lateral (región lateral del cerebro)
- LA: Lóbulo antenal o lóbulos antenales
- LO: Lóbulos ópticos
- M (*m*): Medial (región medial del cerebro)
- NA: nervio antenal
- NC: Neuronas centrífugas del LA
- NL: Neuronas locales del LA
- NP: Neuronas de proyección
- NRO: Neuronas receptoras olfativas
- OBP: Proteínas que unen odorantes; del inglés *odour binding proteins*
- PA: Potencial de acción
- PBP: Proteínas que unen feromonas, del inglés, *pheromone binding proteins*
- PL: Protocerebro lateral
- RRM: Rango receptivo molecular
- SNC: Sistema nervioso central
- SNP: Sistema nervioso periférico
- SNV: Sistema nervioso visceral
- TAC: tracto antenocerebral
- TACE: Tracto antenocerebral externo
- TACI: Tracto antenocerebral interno
- TACM: Tracto antenocerebral medial
- *v*: ventral

• APENDICE 5: *Publicaciones y congresos*

Ap5.1. Congresos

- Noviembre, 2005. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington, D.C., EEUU, con el trabajo en cartel: López-Riquelme, G.O., Malo-Rivera, E.A., Cruz-López, L. & M.L. Fanjul-Moles. “Antennal olfactory responsiveness to task related odors of three castes of the leaf cutting *Atta mexicana*”. Program No. 205.5.2005. Abstract Viewer/Itinerary planner. Washington, D.C.: Society for Neuroscience.
- Octubre, 2005. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, Ca., EEUU, con el trabajo en cartel: López-Riquelme, G.O., Gronenberg, W. & M.L. Fanjul-Moles. “Organization of the antennal lobes and their efferent connections to the mushroom bodies in the ants *Camponotus ocreatus* and *Atta mexicana*”. Program No. 414.18.2006. Abstract Viewer/Itinerary planner. Washington, D.C.: Society for Neuroscience.
- Febrero 18, 2005. Life Science Poster Session, Graduate Studies in Life Sciences, The University of Arizona, Tucson, Az., EEUU, con el poster: “Mushroom Bodies in Hymenoptera – Centers of Multisensory Convergence”. Autores: Gronenberg, W., López-Riquelme, G.O. & B. Ehmer.
- Agosto 2004. 7th International Congress of Neuroethology, Nyborg, Dinamarca, con el trabajo en cartel: Gronenberg, W., López-Riquelme, G.O. & B. Ehmer. 2004. “Mushroom bodies in Hymenoptera – Centers of multisensory convergence”.
- Agosto 2004. XLVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Boca del Río, Veracruz, México con el trabajo en cartel: “Diferente respuesta olfativa ante olores casta específicos en tres castas de la hormiga *Atta mexicana*”. Autores: López-Riquelme G.O., Fanjul-Moles, M.L. & Malo, E.
- Septiembre 2002. XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas Colima, México con el trabajo en cartel: “Estructura de los lóbulos antenales y conexiones eferentes hacia los cuerpos fungiformes en la hormiga *Camponotus ocreatus*”. Autores: López-Riquelme, G.O., Gronenberg, W. & M.L. Fanjul-Moles.

Ap5.2. Publicaciones

- López-Riquelme, G.O., Gronenberg, W. & M.L. Fanjul-Moles. 2008. Mushroom body odotopic afferent representation of the glomerular antennal lobe organization in ants (Hymenoptera: Formicidae). *En elaboración*.
- López-Riquelme, G.O. & W. Gronenberg. 2008. Sexually dimorphic olfactory glomeruli in the antennal lobe of the ant *Camponotus ocreatus* (Hymenoptera: Formicidae). *En elaboración*.
- López-Riquelme, G.O., Malo, E.A., Cruz-López, L. & M.L. Fanjul-Moles. 2006. Antennal olfactory sensitivity in response to task related odours of three castes of the ant *Atta mexicana* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Physiological Entomology*, 31:353-360.
- Gronenberg, W. & G.O. López-Riquelme. 2004. Multisensory convergence in the mushroom bodies of ants and bees. *Acta Biologica Hungarica*, 55(1-4):31-37.

MUSHROOM BODY ODOTOPIC AFFERENT REPRESENTATION OF GLOMERULAR ANTENNAL LOBE ORGANIZATION IN ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

(ARTICULO EN ELABORACION)

Germán Octavio López-Riquelme^{1*}, Wulfila Gronenberg², María Luisa Fanjul-Moles¹

¹Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, 11002, México, D.F., México.

²Division of Neurobiology, Arizona Research Laboratories, University of Arizona; 601 Gould-Simpson Building, Tucson, AZ 85721, USA

*Correspondence to: Germán Octavio López-Riquelme. Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 10-908, CP 11002, México DF, México. Tel/fax: +1 55 562 24830. E-mail: germanotto@correo.unam.mx

Running title: Antennal lobe odotopy in mushroom bodies

Key Words: olfaction, projection neurons, antennocerebral tracts, olfactory pathway, ants

Abstract

Olfaction is the mainly sensorial modality in ants because of their dependence on chemical signals for communication, social organization and orientation. Here we describe the organization of antennal lobes (AL), the first central region for processing olfactory information coming from antennae, as well as the neuronal pathway to the mushroom bodies (MB), central neuropils involved in processing multisensory information, that receive direct olfactory input in their calyx region. We found six clusters of glomeruli innervated by six antennal tracts (T1-T6) originated from the antennal nerve when arrives to the AL. This glomeruli clusters are grouped in two gross regions, anterior and posterior, each of which is connected to the calyx by projection neurons (PN) that leave the AL either via inner antenocerebral tract (IACT) or the outer antenocerebral tract (OACT). In addition, we found that soma of central neurons in the AL are grouped in 5 clusters of central neurons (CNC): a) CNC anterior, b) CNC dorsal, c) CNC medial, d) CNC lateral, and e) CNC medial posterior. We also found that olfactory input is layered in the lip of the calyx of the MB: several lip layers can be discriminated that correspond to six clusters of glomeruli and terminals from PN in the AL, perhaps corresponding to different classes of odors. Anterior glomeruli clusters (1, 3, 4 and 5) innervated by PN from CNC lateral and CNC medial posterior send their axons through IACT to the outer layers of the lip and from there to de lateral protocerebrum (LP), while posterior glomeruli clusters (2 and 6) innervated by PN from CNC lateral, CNC medial, CNC dorsal and CNC anterior send their axons through OACT to the LP, and then to the inner layer of the lip. These results suggest that glomeruli clusters, probably processing of different kinds of odors, are represented topographically in the MB lip region, probably establishing some kind of coarse odotopy.

SEXUALLY DIMORPHIC OLFACTORY GLOMERULI IN THE ANTENNAL LOBE OF THE ANT *CAMPONOTUS OCREATUS* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

(COMUNICACION CORTA EN ELABORACION)

Germán Octavio López-Riquelme^{1*} & Wulfila Gronenberg²

¹Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, 11002, México, D.F., México.

²Division of Neurobiology, Arizona Research Laboratories, University of Arizona; 601 Gould-Simpson Building, Tucson, AZ 85721, USA

*Correspondence to: Germán Octavio López-Riquelme. Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 10-908, CP 11002, México DF, México. Tel/fax: +1 55 562 24830. E-mail: germanotto@correo.unam.mx

Running title: Antennal lobe sexual dimorphism in ants

Key Words: ants, olfaction, macroglomerulus, sexual dimorphism

In insects, olfactory information detected by antennae is processed in the antennal lobe (AL), the first-order olfactory center in the brain which receives input directly from olfactory receptor neurons (ORN) housed in sensilla on antennae. ORN project their axons through the antennal nerve (AN) to a single spheroidal structure of neuropil called glomerulus in the ipsilateral AL (Rospars, 1988; Homberg et al., 1989). When AN enters to the AL, ORN axons segregate forming different tracts that innervate different glomeruli clusters (López-Riquelme et al., 2004) generating a topographic map of the peripheral receptor distribution and activity where odor quality is coded (Hanson & Anton, 2000; Galizia & Menzel, 2001).

In some insect species that use sex pheromones for sexual attraction during mating behavior, have been observed that exist sexual dimorphism in glomerular structure of antennal lobe: despite of isomorphic glomeruli, the male of these species contain one or several enlarged glomeruli, which receive input from olfactory receptor neurons on antennae that are pheromone-sensitive (Rospars, 1988; Homberg et al., 1989; Hanson & Anton, 2000).

Here we describe and compare the antennal lobe structure of males and queens of the ant *Camponotus ocreatus*, by applying neurobiotin directly to the cut antennal nerve. Neurobiotin-stained material was reacted with avidin (Vectorstain ABC kit) after fixation and processed according to López-Riquelme et al., 2004. Images of these preparations were taken with confocal laser scanning (Nikon PCM 2000) at 2 µm optical section thickness.

Organization of AL of workers of *C. ocreatus* has been previously described (López-Riquelme et al., 2004). We found that organization of AL is similar in queens and males. Like workers, AL of

queens and males are organized into 6 glomeruli clusters, each innervated by their own tract (T1-T6) and distributed into the next regions: 1) Posterior region (with tract T2 and T6 and the glomeruli cluster 2 and 6; 2) Anterior region, divided into: a) intermediate region, with tracts T1 and T4 and glomeruli clusters 1 and 4, and b) anterior region, with tracts T3 and T5 as well as glomeruli clusters 3 and 5. Also, as in workers, central neurons of AL are distributed in 5 groups: 1) medial-posterior; 2) lateral; 3) medial; 4) dorsal, and 5) anterior.

In AL of queens we counted more than 380 while males have 244 ± 5 ($n = 3$) In addition to ordinary glomeruli, we found that females have one enlarged glomerulus in the cluster number 5, which is situated in the anterior and ventral region, at the entrance of AN into the AL. In bees have been described the presence of one MG, but in a different position (Arnold et al., 1988). *C. ocreatus* soldiers lack of this enlarged glomerulus in such a position, although they present an enlarged glomerulus in the same glomerular group, but in lateral position, at the periphery of AL (López-Riquelme et al., 2004). Males have lesser and smaller glomeruli than queens and workers. However, 3-5 sexually dimorphic MG was found to be present at the anterior region of antennal lobe in the same glomeruli cluster number 5 forming a big complex in the center of AL. These MG are formed by the merging of several glomeruli. In addition, another MG, smaller than the central, was to be found situated at the medial region of the antennal lobe, which is part of the glomeruli cluster number 3.

MG found in males could be involved in olfactory processing of pheromonal sexual signals from queens, important in detection of females during nuptial flight. Although ant males have large eyes and optic lobes (Gronenberg & Hölldobler, 1999), detection and identification of females on air during nuptial flight mainly depends on sexual pheromones that could initiate a series of behavioral acts that culminate in mating and copulation (Hölldobler & Wilson, 1990).

Glomeruli number in AL of males is reduced compared with queens and workers, which could reflect the highly specialized function of males in reproduction: males do not participate in any task inside of the nest (Hölldobler & Wilson, 1990). The enlarged glomerulus in females is possible involved in some olfactory signals of social and biological importance like colony odor, but its function must to be studied in appropriate physiological and behavioral experiments.

Literature cited

- Arnold, G., Budharugsa, S. & C. Masson. 1988. Organization of the antennal lobe in the queen honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae). *J Morphol Embriol*, 17(3):185-195.
- Galizia, C.G. & R. Menzel. 2001. The role of glomeruli in the neural representation of odours: results from optical recording studies. *J Insect Physiol*, 47:115-130.
- Gronenberg, W. & B. Hölldobler. 1999. Morphologic representation of visual and antennal information in the ant brain. *J Comp Neurol*, 412:229-240.
- Hölldobler, B. & E.O. Wilson. 1990. *The Ants*. Belknap Press of the Harvard University Press. 732 pp.
- Homberg, U., Christensen, T.A. & J.G. Hildebrand. 1989. Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Ann Rev Entomol*, 34:477-501.

- Hanson, B.S. & S. Anton. 2000. Function and morphology of the antennal lobe: new developments. *Annu Rev Entomol*, 45:203-231.
- López-Riquelme, G.O., Gronenberg, W. & Fanjul-Moles, M.L. 2004. Organization of the antennal lobes and their efferent connections to the mushroom bodies of the ants *Camponotus ocreatus* and *Atta mexicana*. Program no. 414.18. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Society for Neuroscience, Washington, District of Columbia.
- Rospars, J.P. 1988. Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *Int J Insect Morphol & Embriol*, 17(3):243-294.

Antennal olfactory sensitivity in response to task-related odours of three castes of the ant *Atta mexicana* (hymenoptera: formicidae)

GERMÁN OCTAVIO LÓPEZ-RIQUELME¹, EDI A. MALO²,
LEOPOLDO CRUZ-LÓPEZ² and MARÍA LUISA
FANJUL-MOLES¹

¹Laboratorio de Neurofisiología Comparada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México and

²Departamento de Entomología Tropical, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas, México

Abstract. The relationship between scent composition and antennal sensitivity in different castes of *Atta mexicana* is investigated under laboratory conditions. Extracts of dead ants are analysed by gas chromatography-mass spectrometry to identify the compounds presumably responsible for the specific undertaking behaviour. Oleic acid is identified as one compound that triggers undertaking behaviour. To determine differences in odour reception between workers of different castes (i.e. foragers, undertakers and soldiers), further antennal sensitivity to task-related odours is tested using electroantennographic techniques. Soldiers are the most specialized caste because of their low response to all odours, except odourants related to alarm pheromones. The behavioural specialization of soldiers and their reduced behavioural repertoire are discussed.

Key words. Ants, caste specialization, division of labour, electroantennogram, odourants, olfaction.

Introduction

Atta mexicana is a fungus-growing ant, widely distributed in Mexico and, as with other fungus growers, its importance is based on a habit of collecting fresh vegetable material on which to grow the fungus. These ants cause serious damage to crop plants, and are an important economic pest (Weber, 1972). The fungus-growing habit makes these ants a key species to investigate division of labour and behavioural differentiation because, phylogenetically, they have the most advanced caste system and division of labour among ants (Wilson, 1980). Fresh leaves and petals require a series of special operations before they can be converted into substrate. The ants incorporate them into the fungus garden after cutting and chopping them into fine pieces, as well as chewing and treating them with enzymes. Thus, the *Atta* caste system is a specialization evolved to perform the successive

operations for fresh vegetation processing. The *Atta* genus is highly polymorphic and polyethic, and these traits are a morphological adaptation to collect fresh vegetation as a fungal substrate, but behavioural differentiation among middle size organisms also occurs (Wilson, 1980; Hölldobler & Wilson, 1990).

The major castes can be characterized broadly according to their roles as garden-nurses, within-nest generalists, foragers-excavators, and defenders or soldiers. Garden-nurses grow fungus in the fungus garden and care for the brood; within-nest generalists perform a variety of tasks, including degradation of vegetation, refuse disposal, and transport of other workers and the queen; foragers-excavators collect fresh vegetation and excavate the nest; and, finally, defenders include the largest individuals specialized in the defense of the nest when it is disturbed (Wilson, 1980). Because of this caste specialization, and based on new insights about genetic involvement of caste polymorphism in other fungus growers (Hughes *et al.*, 2003), it would be expected that, in spite of individual behavioural plasticity, different individuals that engage in particular specialized tasks differ not just in size and/or age, but also in the function and/or structure of the neural machinery that generates and controls behaviour.

Correspondence: María Luisa Fanjul-Moles Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 10-908, CP 11002, México DF, México. Tel./fax: +1 55 562 24830; e-mail: mlfm@hp.ciencias.unam.mx

Workers of different size probably differ in their behavioural repertoire because of caste-specific differences in sensory perception and/or behavioural responses to task-related stimuli (Robinson, 1992). Workers, which take care of the brood and the fungus, as well as those performing undertaking, should respond to different odourant stimuli than soldiers who perform colony defense and alarm each other of any danger. *Atta mexicana* foragers, using flowers petals (especially rose petals) to maintain the fungus should respond to floral odourants, whereas odourant releasers, such as dead nest-mates and alarm pheromones, should comprise the behavioural releasers of the undertakers and defenders, respectively.

The chemical composition of alarm pheromones in *A. mexicana* remains unknown. However, 4-methyl-3-heptanone is a major alarm pheromone in many *Atta* species, and the other components found in ants is 2-heptanone. Moser *et al.* (1968) found that 4-methyl-3-heptanone and 2-heptanone at a ratio 4 : 1 are the principal components in major workers of *Atta texana*. These ketones are also identified at species-specific ratios in the alarm pheromones of six other species of *Atta*, including *Atta bisphaerica* and *Atta capiguara* (Blum *et al.*, 1968; Hughes *et al.*, 2001). In this way, 4-methyl-3-heptanone and 2-heptanone are extremely common alarm compounds and are found in a number of other ant species (Hölldobler & Wilson, 1990). Hence, the present study aims to correlate the olfactory sensitivity of three castes of *A. mexicana* to three task-related odours: (i) foragers to rose essence; (ii) undertakers to oleic acid; and (iii) soldiers to 2-heptanone.

Materials and methods

Ants

Atta mexicana mature colonies were collected from Yecapixtla, Morelos State, Mexico in the dry season (May 2002) and kept in the laboratory in plastic containers (20 × 15 × 18 cm), interconnected by plastic tubes. Each laboratory nest had one or two fungus and nest chambers, one foraging chamber and one waste chamber where ants deposited the debris and the ant corpses. A layer of plaster to preserve nest moisture covered the bottom of each chamber. Nests were maintained under an LD 12 : 12 h photoperiod, at 60–70% relative humidity, at a temperature of 25 ± 2 °C. Fresh leaves or substitutes (e.g. oat meal) were offered to the colony in the foraging chamber.

Caste selection

Foragers, undertakers and soldiers of the laboratory colony were selected for study. The morphological polymorphism of *A. mexicana* results in ant soldiers larger than the rest of the workers performing the majority of the previously mentioned tasks. Thus, soldiers were selected by size criteria: workers with a head width > 3 mm (Wilson, 1980). To classify the division of labour of ant workers, which arises due to task specialization, behavioural criteria were employed (Howard

& Tschinkel, 1976; Hölldobler & Wilson, 1990; Cahan & Julian, 1999; Hart & Ratnieks, 2001) using a modified protocol based on that described by Julian & Cahan (1999). Briefly, the opportunity for undertaking behaviour was created by placing a dead nest-mate (frozen and thawed) within the fungus chamber. The identity of all workers that encountered the dead ant and/or performed undertaking was recorded for as long as it took the dead ant to be removed completely from the interior of the nest to the debris pile in the waste chamber. These ants were captured and marked with colour codes using nontoxic acrylic paint (Luella, Mega Grupo Industrial SA de CV, Mexico, DF, Mexico) and reintroduced to the nest when the paint was dry. Thus, for each marked individual, the number of times it encountered a dead ant was recorded, as well as how many times it picked up and removed a dead ant. The total time of each removal was recorded, starting from when a dead ant was placed in the chamber, until it was removed completely from the colony. Trials were performed three times a day over 10 days until 30 trials were completed. For each marked ant, the number of occasions in which undertaking behaviour was performed, and the duration of corpse transport to the refuse pile was recorded. Based on the statistical criteria used by Julian & Cahan (1999), the marked workers that performed the complete necrophoric behaviour at least twice were designated as undertakers. Foragers were identified also by behavioural criteria: the fresh vegetation supply was suspended for 2 weeks, and offered again within the foraging chamber. All workers that arrived to the vegetable material without recruitment were captured and marked, and then reintroduced into the colony. The protocol was repeated once more 1 week later, and the marked workers that performed foraging twice were considered as foragers. Soldiers were selected only by size criteria: workers with head width > 3 mm (Wilson, 1980). Based on these selection criteria, 18 foragers, five undertakers and nine soldiers were selected.

Odourants for electrophysiological experiments

On the basis of task-related odours, three commercially available odourants were chosen: (i) flower extract (roses) (Belmay Flavours & Fragrances Ltd., U.K.), which is an odour related to *A. mexicana* foraging behaviour; (ii) oleic acid (Sigma-Aldrich Chem. Co., St Louis, Missouri), which is related to necrophoric behaviour (see below); and (iii) 2-heptanone (Sigma-Aldrich Chem. Co.), which is a compound closely related to many alarm pheromones in other ant species (Hölldobler & Wilson, 1990). Serial dilutions were prepared from each odourant using paraffin oil (1 : 1000, 1 : 250, 1 : 75 and 1 : 10); this resulted in concentrations of 1, 4, 13 and 100 µg mL⁻¹, respectively. The odour related to necrophoric behaviour was determined by chemical analysis of dead ants.

Extracts of *A. mexicana* corpses

The necrophoric behaviour releaser is not known for *A. mexicana*, but reports for another species (Wilson *et al.*,

1958; Howard & Tschinkel, 1976; Gordon, 1983; Rollo *et al.*, 1994) suggest that oleic acid, a fatty acid, is a possible releaser of undertaking behaviour. To test this hypothesis in the case of *A. mexicana*, three separate extracts of corpses were analysed. Ten workers were frozen for 30–60 min, and these dead ants were placed into closed vials at room temperature for 5–10 h. After this time, the vials were filled with 4 mL of hexane and incubated at room temperature for 24 h to complete extraction.

Chemical analysis

Analysis of the extract of dead ants was performed in a Varian Star model 3400 CX GC (Palo Alto, California). A DB-5 column (inner diameter 30 m × 0.25 mm) was temperature programmed from 50 °C (held for 2 min) to 250 °C at 15 °C min⁻¹. At the end temperature (250 °C), the column was maintained for 10 min. The injection port temperature was maintained at 200 °C. The GC was coupled to a Varian Saturn 4D mass spectrometer and integrated data system. Ionization was performed by electron impact at 70 eV at 230 °C, and mass spectral identifications were confirmed, by comparison of retention times and mass spectra with an oleic acid standard.

Behavioural experiments to test the extract and oleic acid

Bioassays were conducted with ant corpse extract as well as with pure oleic acid. Square-shaped filter paper fragments (5 mm² in area) were soaked either with 2 µL of the extract of ant corpses or 1 µL of pure oleic acid. The solvent (hexane) was allowed to evaporate for few seconds. Filter paper squares with hexane were used as controls. Each could be identified by a capital letter written on them in pencil. After solvent evaporation, the filter paper fragments were placed into the nest queen chamber at the same time. The destination of each piece of paper during 1-h period in which the corpse was removed to the refuse pile was recorded in preliminary assays. The trial was considered to be positive when the paper was transported to the refuse pile and negative when it was not. The position of baited filter paper was rotated after each replication to avoid positional bias. Bioassays using corpse extracts or oleic acid with the respective control were replicated ten times each (20 trials).

Electroantennograms

Antennal sensitivity of *A. mexicana* workers of three different castes was determined by conventional electroantennographic (EAG) methods (Malo *et al.*, 2004). Intact insects provided long-lasting antennal preparations. The reference glass capillary electrode was inserted into a small hole on the occipital spine of the cephalic capsule; this immobilized and provided support for the ant. The distal end of the intact antennae was inserted into the recording glass capillary elec-

trode. Capillaries were filled with insect saline solution (Kern & Bestmann, 1993). Signals generated by antennae were passed through a high-impedance amplifier (Syntech NL 1200, the Netherlands) and displayed on a monitor using Syntech software. To test odourants, 5 µL aliquots of the dilutions of each compound (i.e. 1, 4, 13 and 100 µg mL⁻¹) were deposited on 5 mm² filter paper squares. The final compound loads on the stimulation cartridges were: 0.005, 0.02, 0.06 and 0.5 µg. Each filter paper square was placed in a Pasteur pipette, which was then used as an odourant cartridge. For each insect tested, a new cartridge was prepared. A current of humidified pure air (1.7 L min⁻¹) was directed constantly onto the antennae through a glass tube 10 mm in diameter. Each chemical compound was tested by blowing pure air (0.5 L min⁻¹ for 1 s), through the Pasteur pipette (containing the chemical). The tip of this pipette was placed into a hole located at the midpoint of the glass tube, which was placed approximately 10 mm from the end of the tube. In each experiment, the antennae were first given a control stimulus, consisting of a pipette containing a filter paper with paraffin oil alone. This was followed by stimulation with each odourant (oleic acid, 2-heptanone and rose essence) in an increasing order of concentration at 3-min intervals. Air was drawn continuously by vacuum and vented outside of the laboratory. Each ant was stimulated with all the dilutions of the three chemical compounds.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the computer package SPSS (SPSS Inc., Chigao, Illinois). When necessary, electrophysiological data were transformed to meet the assumptions of normality and homogeneity of variances. Bioassay results were analysed by the chi-square test (Zar, 1999).

Electrophysiological data were also analysed. From the EAG peaks, only the absolute values of the EAG amplitude (mV) were used. First, the absolute EAG value obtained from the control stimulation was subtracted, which represents the mechanoreceptor responses to the additional air pressure introduced into the main airstream. After subtracting this value, the real chemosensory response to the tested stimulus was obtained. Electroantennogram data were subjected to a three-way analysis of variance (ANOVA) (all factors were fixed) assuming a factorial design with three factors (caste, odour and dose) and different levels (caste = 3 levels; odour = 3 levels and doses = 4 levels) followed by a post-hoc Tukey test for multiple comparisons. For each odour, dose–response curves were constructed, and a regression model analysis used to render a visual display. Additional statistical analysis was undertaken by testing for statistically significant differences, between correlation coefficients, and a post-hoc Tukey test was employed for multiple comparisons among correlation coefficients. In this analysis, the correlation coefficient (*r*) was transformed into a Fisher's Z-value and then the chi-square value was calculated. Whenever the chi-square test revealed a difference, a *q* in the Tukey test of multiple

comparisons was obtained, which determines differences between correlation coefficients (Zar, 1999).

Results

Dead ant extract composition and behavioural bioassays

A typical gas chromatogram of the extract of dead ant is shown in Figure 1. *Atta mexicana* corpses contained oleic acid, and the gas chromatogram of the extract (Fig. 1b) showed a peak eluting at 17.2 min, which coeluted with oleic acid standard (Fig. 1a). The extract comprised mainly hydrocarbons (peaks 1, 2, 3 and 4) and oleic acid (peak 5).

In the bioassays, all the filter paper strips with the extract of corpse that were placed inside the nest were transported to the refuse chamber, meaning that corpse extract is 100% effective in releasing necrophoric behaviour and significantly different from controls ($\chi^2 = 16.2$, $P < 0.001$). Similar results were found for the filter paper strips immersed in oleic acid. Although only seven trials were positive using oleic acid as stimulus, significant differences were found compared with controls ($\chi^2 = 7.9$; $P < 0.005$). Controls (filter papers strips treated with hexane or clean filter paper strips) were not transported outside the nest. These results demonstrate that oleic acid released necrophoric behaviour in a similar way to that of the corpse extract, suggesting that oleic acid might be involved in the identification of dead nest-mates in different ant species.

Electroantennograms

Typical EAG recordings from individual ants of each caste in response to odourants at the highest load on the filter paper (0.5 μg) are shown in Figure 2(a). It appears that responses to each odourant differ between castes and by odourant in the same caste. The amplitude of EAG responses to odourants was, on average, higher in foragers than in other castes. Interestingly, in both foragers and undertakers, the three odourants used produced a logarithmic dose–response relationship characteristic of high-resolution sensory systems (Fig. 3a). However, in soldiers, this logarithmic relationship

was observed only in response to 2-heptanone and to flower essence but, in this case, a weak slope can be observed. By contrast, in soldiers, oleic acid did not produce this logarithmic relationship. ANOVA revealed a statistically significant effect of caste ($F = 20.8$; d.f. = 2; 348; $P < 0.001$), odour ($F = 48.1$; d.f. = 2, 348; $P < 0.001$) and doses ($F = 18.5$; d.f. = 3, 348; $P < 0.001$) and a nonsignificant caste \times odour, caste \times dose, odour \times dose and caste \times odour \times dose interaction ($P > 0.05$). In the case of castes, a post-hoc Tukey test showed that the EAG response of foragers (EAG foragers: 0.3 ± 0.01 mV) was similar to that of undertakers (EAG undertakers: 0.25 ± 0.02 mV). However, EAG responses of soldiers (EAG soldiers: 0.17 ± 0.01 mV) were significantly different ($P < 0.001$) from the responses of foragers (EAG foragers: 0.3 ± 0.01 mV) and undertakers (EAG undertakers: 0.25 ± 0.02 mV) (Fig. 2b, left). For odour, the statistical post-hoc test ($P < 0.001$) showed that 2-heptanone elicited the highest significant response ($P < 0.001$) in all workers compared with flower essence and oleic acid (Fig. 2b). All three castes tested for 2-heptanone showed a logarithmic dose–response relationship (Fig. 3a).

ANOVA analysis did not reveal a statistical interaction effect of caste \times odour \times dose. Thus, an additional regression analysis was performed comparing correlation coefficients between castes by odour and between odourants for each caste. Interestingly, soldiers showed a high logarithmic correlation between the EAG amplitude elicited to 2-heptanone and the dose ($r = 0.78$), but not between the EAG amplitude response elicited to flower essence and dose ($r = 0.28$) or oleic acid and dose ($r = 0.03$) (Fig. 3b). Although foragers and undertakers showed the highest correlation values between 2-heptanone dose and EAG amplitude ($r = 0.64$; $r = 0.55$, respectively), both castes showed higher values to oleic acid ($r = 0.27$ and $r = 0.33$, respectively) than soldiers ($r = 0.03$). In the case of flower essence, only foragers showed higher values ($r = 0.42$) than soldiers ($r = 0.28$) and undertakers ($r = 0.28$). This, as well as the differences between the average of the highest and lowest EAG amplitude values found for the three castes studied, indicated that soldiers showed the highest differential sensitivity to 2-heptanone (Table 1).

Statistical analysis for correlation coefficient comparisons did not detect any significant differences between castes for

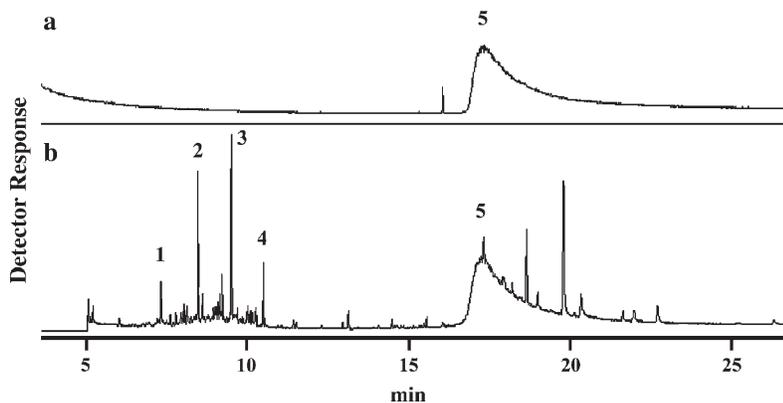


Fig. 1. (a) Chromatogram of 100 ng μL^{-1} external standard, oleic acid. (b) Typical gas chromatogram of the extract of dead ant. Peaks 1, 2, 3 and 4 probably correspond to hydrocarbon compounds. Peak 5 was eluted at same time as the oleic standard, suggesting that it is oleic acid.

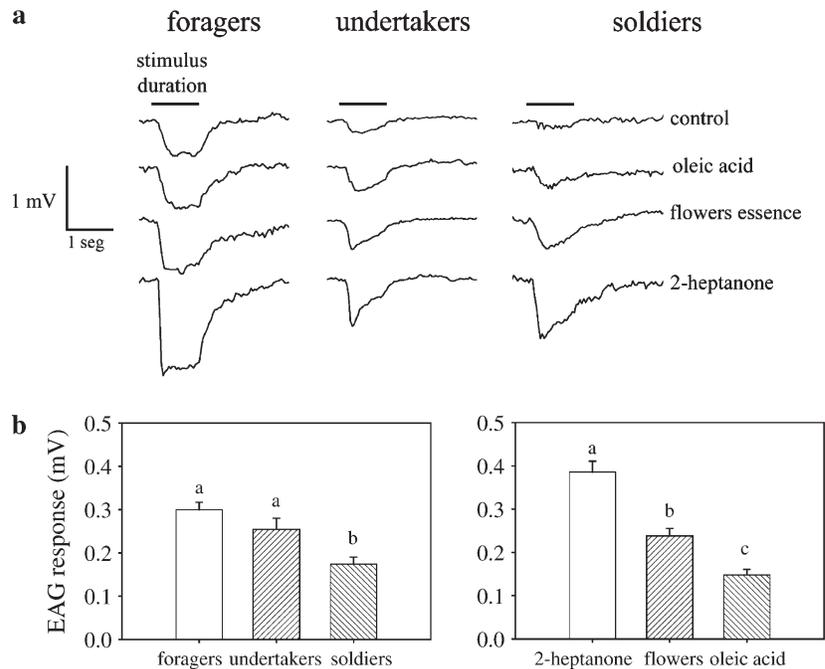


Fig. 2. (a) Typical electroantennographic (EAG) recordings from ants of each caste in response to odourants used at 0.5 μ g. The first recording for each worker corresponds to the EAG response to the control stimulus (paraffin oil on the strip of filter paper.) (b) Left: mean \pm SE EAG response to all odourants and doses plotted by castes ($n_{\text{foragers}} = 216$; $n_{\text{undertakers}} = 60$; $n_{\text{soldiers}} = 108$). Right: mean \pm SE EAG amplitude of all insects in response to the odourants, plotted by odours ($n = 128$ by each odourant). Similar letters indicate that there was no statistically significant difference. Further explanation is provided within the text.

each odourant (i.e. for 2-heptanone, oleic acid and flower essence) ($P > 0.05$). This corroborates the results of the ANOVA. Thus, the correlation coefficients between odourants for each caste were compared. In undertakers, statistical analysis did not reveal significant differences in correlation coefficients between odourants ($\chi^2 = 1.11$; $P > 0.05$). In foragers, the 2-heptanone correlation coefficient was higher than those for flower essence and oleic acid, showing a statistically significant difference ($\chi^2 = 7.98$, $P < 0.02$). Tukey's test revealed significant differences between 2-heptanone and oleic acid correlation coefficients ($q = 3.94$), but not between 2-heptanone and flower essence ($q = 2.56$), and between flower essence and oleic acid ($q = 1.37$). In soldiers, significant differences were found between each odourant ($\chi^2 = 8.7$, $P < 0.001$). The post-hoc Tukey test showed differences between 2-heptanone and oleic acid ($q = 5.89$), and between 2-heptanone and flower essence ($q = 4.37$), but not between flower essence and oleic acid ($q = 1.52$) (Fig. 3b).

The EAG responses of foragers could be divided into two groups according to the magnitude of the EAG amplitude response to 2-heptanone: (i) foragers with low responses (FLR) (0.84 ± 0.01 mV, $n = 6$) and (ii) foragers with high responses (FHR) (0.93 ± 0.01 , $n = 12$). Statistical analysis revealed an effect of subgroup ($F = 97.1$; d.f. = 1, 64; $P < 0.001$) and dose ($F = 30.6$; d.f. = 3, 64; $P < 0.001$), but no subgroup-dose interaction ($P > 0.05$). In addition, the EAG response of foragers to flower essence could also be divided into two groups: (i) foragers with low responses (0.32 ± 0.06 mV, $n = 6$) and (ii) foragers with high responses (0.57 ± 0.04 mV, $n = 12$). Statistical analysis revealed an effect of subgroup ($F = 35.7$; d.f. = 1, 64; $P < 0.001$) and dose ($F = 6.6$; d.f. = 3, 64; $P < 0.001$), but no subgroup-dose interaction ($P > 0.05$).

Discussion

The results of the present study demonstrate that *A. mexicana* workers are able to recognize dead nest-mates, demonstrating an undertaking behaviour that indicates oleic acid acts as a necrophoric releaser. This behaviour is one of the most conspicuous and stereotyped patterns of social behaviour (Hölldobler & Wilson, 1990). Although there are different reports on undertaking specialization, mainly in bees (Trumbo & Robinson, 1997; Trumbo *et al.*, 1997; Masterman *et al.*, 2001), and some in ants (Wilson *et al.*, 1958; Howard & Tschinkel, 1976; Gordon, 1983; Julian & Cahan, 1999), almost nothing is known about necrophoric releasers. Wilson *et al.* (1958) found that the necrophoric behaviour releaser in *Pogonomyrmex badius* is a fatty acid: oleic acid. In addition, Gordon (1983) demonstrated that necrophoric behaviour released by oleic acid in *P. badius* depends on the context, namely whether the stimulus is placed inside or outside of the nest depending on what the task of the workers: maintenance or feeding. Rollo *et al.* (1994) found oleic and linoleic acids in the extracts of roach corpses. They demonstrated that both compounds are repellent to live roaches. The present study is the first to show that *A. mexicana* corpses contain oleic acid, as reported in other ant species (Wilson *et al.*, 1958) and insects (Rollo *et al.*, 1994). Oleic acid may represent a major compound in dead ants that acts as an indicator of dead nest-mates, and is exploited by social insects as a necrophoric releaser.

The lowest EAG responses of all workers to oleic acid may be caused by the low volatility of oleic acid, an 18-carbon fatty acid with one double bond. Although it has been suggested that undertakers identify the corpses only by contact chemoreception (Howard & Tschinkel, 1976), the results

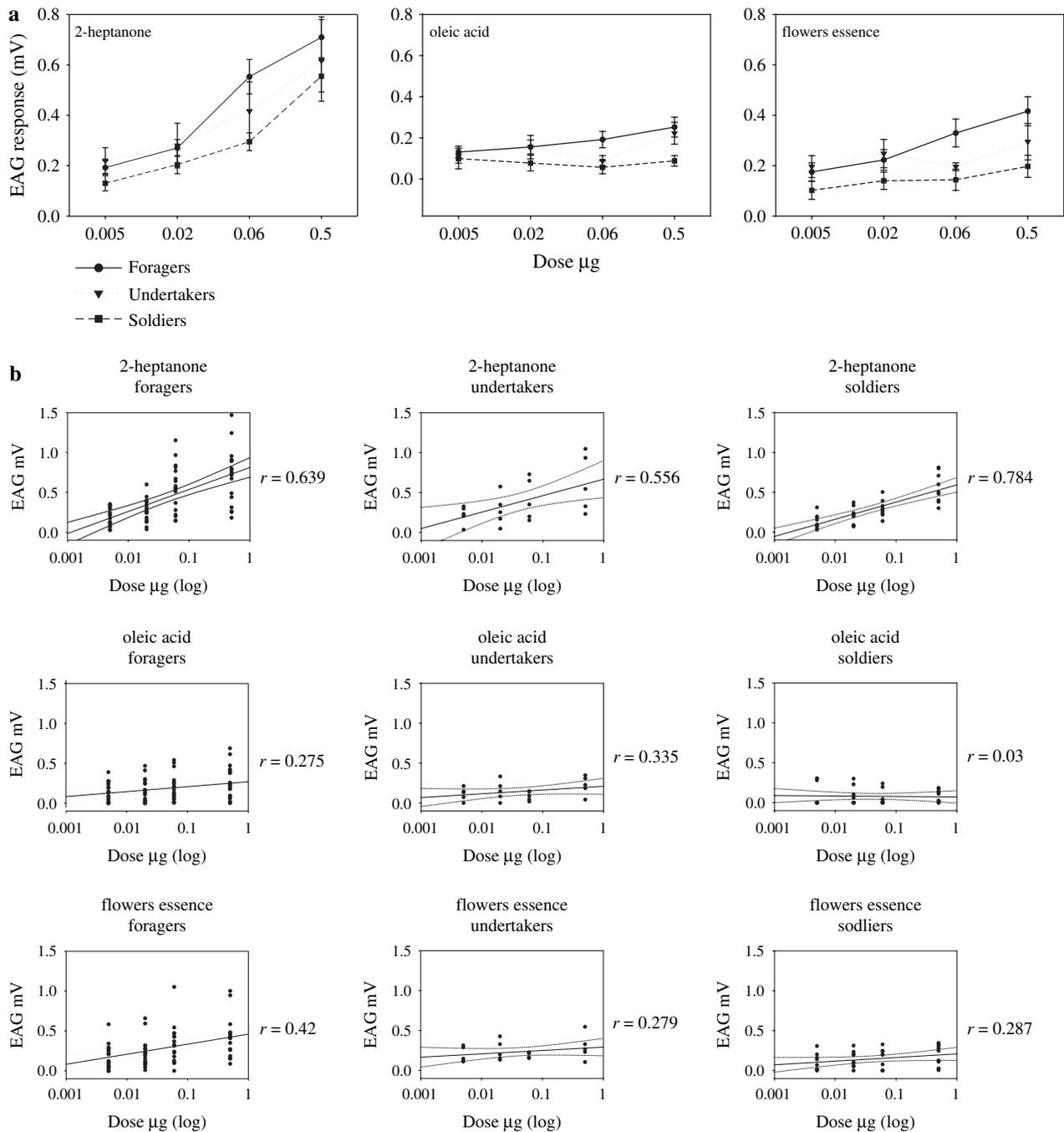


Fig. 3. (a) EAG amplitude as a function of odourant dose, plotted by odourant and caste ($n_{\text{foragers}} = 18$; $n_{\text{undertakers}} = 5$; $n_{\text{soldiers}} = 9$). Bars represent the standard error. (b) Insets show linear regressions and correlation coefficients for each caste and odourant. Note the clear logarithmic relationship between dose and electroantennographic amplitude of all castes in response to 2-heptanone (see text).

of the present study show, both in foragers and undertakers, a low logarithmic relationship between the EAG amplitude and oleic acid concentration introduced into the air mainstream air current, which indicates antennal detection of oleic acid molecules transported by air. Other studies (Sheridan *et al.*, 1996) find no differences between oleyl-based lipids as

introduced stimuli and controls in EAG experiments, but have found a direct effect on the antennae. In behavioural assays, workers first orientate their antennae to the corpse, and then they approach it and finally make contact with it (personal observation). The ants show similar behaviour to filter paper pieces soaked in oleic acid or corpse extract.

Table 1. Difference between mean electroantennographic response (mV) to the lowest and highest concentrations for each caste and odour.

Caste	MeanEAG _{0.5 µg} – MeanEAG _{0.005 µg}		
	2-Heptanone	Oleic acid	Flower essence
Foragers	0.517	0.122	0.241
Undertakers	0.397	0.11	0.099
Soldiers	0.425	0.009	0.095

Although the present study shows that ant antennae respond to oleic acid molecules transported by air, other volatile compounds that emanate from corpses, as well as contact chemoreception, could also participate in the identification of dead ants.

The chemical composition of alarm pheromones in *A. mexicana* is unknown. In the present study, 2-heptanone was used, a compound closely related to many alarm pheromones in other ant species and in some bees (Hölldobler & Wilson, 1990). Moser (1970) and Moser *et al.* (1968) demonstrated that the alarm pheromone in *A. texana* is 4-methyl-3-heptanone; this species also produces 2-heptanone and responds to it in the same way, but showing higher detection thresholds. In the present study, all three castes tested for 2-heptanone show a logarithmic dose–EAG amplitude relationship typical of high-resolution sensory systems. This indicates that *A. mexicana* has a higher ability to discriminate between minimal changes in pheromone concentration than similar changes in floral or oleic concentration. An EAG represents the response of a large number of receptor neurones; thus, it integrates the sensory input of many sensilla on the antenna (Schneider, 1957). The similarity and the proximity between the curves constructed for the three castes suggest similar peripheral detection mechanisms, but not necessarily a similar central regulation of sensory processes. Recent reports demonstrate differences in the antennal lobes related to sex in *A. mexicana* (López-Riquelme *et al.*, 2004) and nonsexual related differences in *A. vollenweideri* (Kleineidam *et al.*, 2005). Thus, although castes respond in similar ways at peripheral sensory level, the same signal could release different behaviours, as reported for other insect species (Robinson, 1987). The pattern of dose–response curves of soldiers, mainly those of oleic-acid, as well as the finding that they showed significantly lower EAG responses than foragers and undertakers both to floral and oleic odourants, may be due either to their antenna physical property or to their lower capacity to detect compounds unrelated to the tasks they perform, suggesting some specialization. The present results suggest a similar dose–response relationship in the case oleic acid and flower essence in soldiers. However, they always show a higher dose–response relationship in the case of 2-heptanone.

ANOVA analysis reveals a caste effect between soldiers and the two other castes, suggesting that soldiers are a specialized caste with a poor ability to detect odourants other than those related to the task that they tend to perform. This does not mean that soldiers cannot respond to different kinds

of odourants, but only that soldiers would be less sensitive in detecting odourants other than those related to their specialized task, with their reduced behavioural repertoire. In such a case, soldiers could constitute both a specialized morphological and physiological adaptation with limits in behavioural and sensorial physiology, meaning that their peripheral sensory system has less resolution in response to odourants unrelated to tasks that they tend to perform, as shown by the apparent different functions of the dose–response curves. The limited discrimination to odourants could be based on the proportion of different kinds of sensilla available on the antennae of soldiers, as proposed elsewhere for male and female workers in other species of ants (Renthal *et al.*, 2003).

Although speculative, the EAG differential responses between foragers implies that they are subpopulation of foragers who respond differently to diverse kinds of foraging stimuli, suggesting a behavioural specialization, as reported for other species of *Atta* (Hart & Ratnieks, 2001). Based on the mean values of the EAG, it is tempting to classify *A. mexicana* forager ants into different subgroups, but the small sample size, as well as the lack of behavioural data and social meaning of these different responses, does not support this classification prior to being confirmed in additional behavioural and EAG experiments.

An increasing number of studies indicate that individual differences [physiological (Bloch *et al.*, 2001), neurological (Farbach *et al.*, 2003) or genetic (Robinson & Page, 1989; Page *et al.*, 1998; Pankiw & Page, 1999; Hughes *et al.*, 2003; Whitfield *et al.*, 2003)] play a significant role in labour division. Because social insects live in densely populated colonies, they encounter many kinds of stimuli that elicit different behaviours. The present study presents evidence that the peripheral olfactory sensory system in *A. mexicana* could be involved in the division of labour, at least with respect to the reduced ability of soldiers to detect recognition cues other than those related to colony defense. It is probable that soldiers are not the only caste that shows sensory specialization.

Acknowledgements

We are grateful to Professor G. Goldsworthy for his editorial help. We thank Professor Rafael Madrid Rios from the Mathematics Department, Facultad de Ciencias, UNAM, for his statistical advice. This work is part of the doctoral thesis of German Octavio López Riquelme and was partially supported by PAPIT IN 208405-3 (M.L.F.M.) and CONACyT 158200 (G.O.L.R.).

References

- Bloch, G., Toma, D.P. & Robinson, G.E. (2001) Behavioural rhythmicity, age, division of labor and period expression in the honey bee brain. *Journal of Biological Rhythms*, **16**, 444–456.
- Blum, M.S., Padovani, F. & Amante, E. (1968) Alkanones and terpenes in the mandibular glands of *Atta* species (Hymenoptera: Formicidae). *Computer Biochemistry and Physiology*, **26**, 291–299.

- Cahan, S. & Julian, G.E. (1999) Fitness consequences of cooperative colony founding in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. *Behavioral Ecology*, **10**, 585–591.
- Farbach, S.E., Farris, S.M., Sullivan, J.P. & Robinson, G.E. (2003) Limits on volume changes in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Journal of Neurobiology*, **57**, 141–151.
- Gordon, D. (1983) Dependence of necrophoric response to oleic acid on social context in the ant, *Pogonomyrmex badius*. *Journal of Chemical Ecology*, **9**, 105–111.
- Hart, A.G. & Ratnieks, F.L.W. (2001) Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **49**, 387–392.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990) *The Ants*. Belknap Press, Cambridge, Massachusetts.
- Howard, D.F. & Tschinkel, W.R. (1976) Aspects of necrophoric behaviour in the red fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, **56**, 157–179.
- Hughes, W.O.H., Howse, P.E., Vilela, E.F. & Goulson, D. (2001) The response of grass-cutting ants to natural and synthetic versions of their alarm pheromone. *Physiological Entomology*, **26**, 165–172.
- Hughes, W.O.H., Sumner, S., Van Borm, S. & Boomsma, J.J. (2003) Worker caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9394–9397.
- Julian, G.E. & Cahan, S. (1999) Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. *Animal Behaviour*, **58**, 437–442.
- Kern, F. & Bestmann, H.J. (1993) Antennal electrophysiological responsiveness of the Ponerine ant *Leptogenys diminuta* to trail and recruitment pheromones and its structure analogs. *Naturwissenschaften*, **80**, 424–427.
- Kleineidam, C.J., Obermayer, M., Halbich, W. & Rössler, W. (2005) A Macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. *Chemical Senses*, **30**, 1–10.
- López-Riquelme, G.O., Gronenberg, W. & Fanjul-Moles, M.L. (2004) Organization of the antennal lobes and their efferent connections to the mushroom bodies of the ants *Camponotus ocreatus* and *Atta mexicana*. Program no. 414.18. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Society for Neuroscience, Washington, District of Columbia.
- Malo, E.A., Cruz-López, L., Castrejon, V.L. & Rojas, J.C. (2004) Antennal sensilla and electrophysiological response of male and female *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to conspecific sex pheromone and plant odors. *Annals of the Entomological Society of America*, **97**, 1273–1284.
- Masterman, R., Ross, R., Mesce, K. & Spivak, M. (2001) Olfactory and behavioural response thresholds to odours of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, **187**, 441–452.
- Moser, J.C. (1970) Pheromones of social insects. *Control of Insect Behaviour by Natural Products* (ed. by D.L. Wood, R.M. Silverstein and M. Nakajima), pp. 161–178. Academic Press, New York, New York.
- Moser, J.C., Brownlee, J.C. & Silverstein, R.M. (1968) Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *Journal of Insect Physiology*, **14**, 529–535.
- Page, R.E., Erber, J. & Fondrk, M.K. (1998) The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, **182**, 489–500.
- Pankiw, T., Page, R.E. Jr. (1999) The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, **185**, 207–213.
- Renthal, R., Velásquez, D., Olmos, D. et al. (2003) Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*, **34**, 405–13.
- Robinson, G.E. (1987) Modulation of alarm pheromone perception in the honey bee: evidence for division of labor based on hormonally regulated response thresholds. *Journal of Comparative Physiology A*, **160**, 613–619.
- Robinson, G.E. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, **37**, 637–665.
- Robinson, G.E. & Page, R.E. (1989) Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, **24**, 317–323.
- Rollo, C.D., Czyzewska, E. & Borden, J.H. (1994) Fatty acid necromones for cockroaches. *Naturwissenschaften*, **81**, 409–410.
- Schneider, D. (1957) Elektrophysiologische untersuchungen an chemo- und mechanorezeptoren der antenne des seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, **40**, 8–41.
- Sheridan, S.L., Iversen, K.A. & Itagaky, H. (1996) The role of chemical senses in seed-carrying behaviour by ants: a behavioural, physiological and morphological study. *Journal of Insect Physiology*, **42**, 149–159.
- Trumbo, S.T. & Robinson, G.E. (1997) Learning and task interference by corpse-removal specialists in honey bee colonies. *Ethology*, **103**, 966–975.
- Trumbo, S.T., Huang, Z.-Y. & Robinson, G.E. (1997) Division of labor between undertakers specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, **41**, 151–163.
- Weber, N.A. (1972) *Gardening Ants, The Atines. Memoir No 92*. American Philosophical Society, Philadelphia, Pennsylvania.
- Whitfield, C.W., Cziko, A.M. & Robinson, G.E. (2003) Gene expression profiles in the brain predict behaviour in individual honey bees. *Science*, **302**, 296–299.
- Wilson, E.O. (1980) Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, **7**, 143–156.
- Wilson, E.O., Durlach, N.I. & Roth, L.M. (1958) Chemical releasers of necrophoric behaviour in ants. *Psyche*, **65**, 108–114.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Accepted 6 April 2006

First published online 29 June 2006

MULTISENSORY CONVERGENCE IN THE MUSHROOM BODIES OF ANTS AND BEES*

W. GRONENBERG^{1**} and G. O. LÓPEZ-RIQUELME²

¹Division of Neurobiology, Arizona Research Laboratories, University of Arizona, 601 Gould-Simpson Building, Tucson, AZ 85721, USA

²Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico

(Received: August 31, 2003; accepted: December 1, 2003)

The mushroom bodies, central neuropils in the arthropod brain, are involved in learning and memory and in the control of complex behavior. In most insects, the mushroom bodies receive direct olfactory input in their calyx region. In Hymenoptera, olfactory input is layered in the calyx. In ants, several layers can be discriminated that correspond to different clusters of glomeruli in the antennal lobes, perhaps corresponding to different classes of odors. Only in Hymenoptera, the mushroom body calyx also receives direct visual input from the optic lobes. In bees, six calycal layers receive input from different classes of visual interneurons, probably representing different parts of the visual field and different visual properties. Taken together, the mushroom bodies receive distinct multisensory information in many segregated input layers.

Keywords: Neuroanatomy – learning – memory – insects – multimodal information

INTRODUCTION

Social Hymenoptera (social bees, social wasps and all ants) are characterized by division of labor and they feature remarkable behavioral performances. Extraordinary learning and memory abilities have been demonstrated in honeybees [6, 15], bumblebees [10] and ants [2, 17]. Behavioral abilities and plasticity are controlled by the mushroom bodies, a pair of higher brain centers [4, 18] that are particularly large in Hymenoptera.

Hymenopteran mushroom bodies are composed of many (ca. 170,000 in honey bees) intrinsic neurons (Kenyon cells) whose dendrites form a cup-like input region called the calyx. An axon extends from each dendritic tree through the peduncle to branch in two lobes (the vertical and medial lobes; [19]). Calyces receive collateral input from olfactory projection neurons originating from the antennal lobe on the same side of the brain [13]. Only in Hymenoptera, the calyces also receive substan-

* Presented at the 10th ISIN Symposium on Invertebrate Neurobiology, July 5–9, 2003, Tihany, Hungary.

** Corresponding author; e-mail: wulfi@neurobio.arizona.edu

tial input from the optic lobes on both sides of the brain [3, 7, 8, 16]. In honey bees, ants and paper wasps, the calyx is concentrically subdivided into three compartments: the lip receives input from the antennal lobes; the collar receives visual input; the basal ring is divided into two layers [7, 13, 16], one receiving visual and the other one antennal input [3]. The current study describes multimodal input to the calyx.

MATERIAL AND METHODS

Carpenter ant workers (*Camponotus ocreatus*) were collected locally and kept in the laboratory. Honey bee foragers (*Apis mellifera*) were collected from flowers. Animals' head capsules were cut open and particular parts of the optic lobes or antennal lobes were filled with Dextran-coupled fluorescent dyes (Texas Red and Fluorescein, MW 3000, Molecular Probes) or with biocytin (Fig. 1b) to label sensory afferents into the mushroom bodies. Glass capillary microelectrodes with broken tips were used to inject tracers or to deposit tiny tracer crystals in the tissue. After dye diffusion (4–12 hours), brains were aldehyde-fixed, embedded and sectioned according to [3]; biocytin-stained material was reacted with avidin (Vectorstain ABC kit) after fixation and processed according to [9]. Sections were viewed and photographed using brightfield (biocytin-labeled material) or epifluorescent microscopy and the appropriate filters.

RESULTS

Antennal input to the calyx

In honey bees, antennal lobes comprise about 150 glomeruli arranged in four clusters that are defined by the tributary of the antennal nerve and by their position in the antennal lobe [5]. In carpenter ants (*Camponotus ocreatus*), we counted about 199 glomeruli distributed in five clusters: a large anterior cluster (cluster 1; Fig. 1d, f) and four smaller clusters situated more posteriorly (Fig. 1e, f), each of which receives a branch of the antennal nerve that enters the antennal lobe from the antenna. Projection neurons connect the antennal lobe and the mushroom bodies' calyx [13]. In ants and in honey bees, these projection neurons run in two major tracts: the lateral antenno-cerebral tract (Fig. 1a, f) projects laterally with respect to the mushroom body lobes. It gives off blebbed collaterals to the dorso-lateral protocerebrum, the so-called lateral horn (Fig. 1a) before continuing to the calyces. Projection neurons of the inner antenno-cerebral tract project medially with respect to the mushroom body lobes, give off collaterals to the calyces, and have a recurrent branch that terminates in the lateral horn (Fig. 1a).

When injecting tracer into many antennal lobe glomeruli simultaneously, the entire lip region is stained, although not homogeneously, and appearing striated (Fig. 1b). The staining intensity of the different layers reflects the amount of dye taken up

by individual glomeruli and projection neurons. In the lip of ants, 3–6 layers can be discriminated in different preparations (Fig. 1b); in honey bees, at least three layers are discernable (not shown).

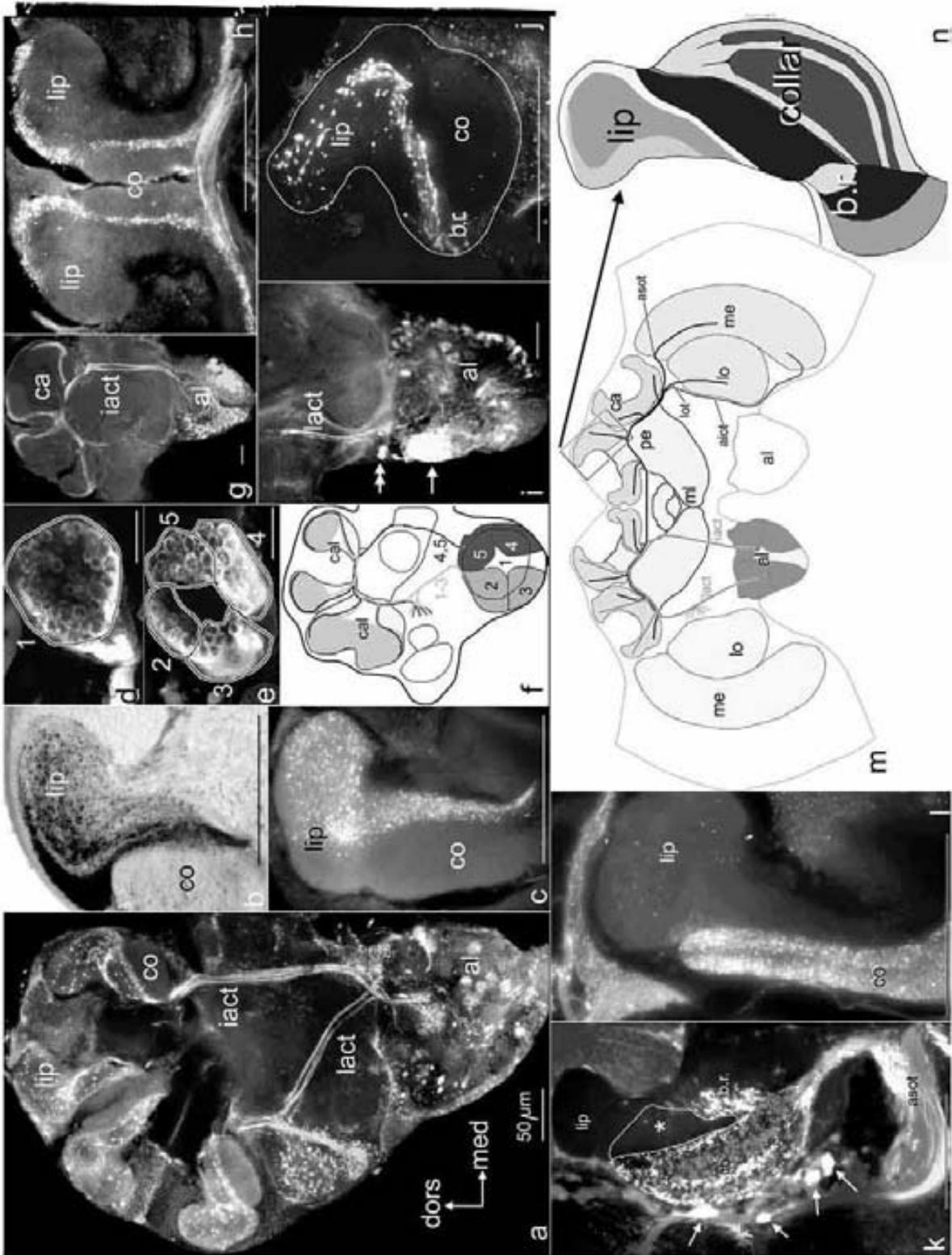
Tracing in ants a small number of projection neurons originating from only one or two clusters of glomeruli reveals that different layers in the lip region receive input from different glomeruli clusters (Fig. 1f). In specimens where projection neurons from the postero-median glomeruli cluster (cluster 4; Fig. 1e) were filled, the narrow outer layer of the lip was stained exclusively (Fig. 1g, h). In contrast, projection neurons originating from the postero-dorsal glomeruli cluster 2 (Fig. 1e) terminate in the median layers of the lip (Fig. 1i, j). Projection neurons mainly originating from the anterior-most glomeruli cluster (cluster 1; Fig. 1d) terminate in medium and inner lip layers but not in the outermost one (Fig. 1c). Taken together, glomeruli clusters 1–3 supply middle and inner lip layers via the lateral antenno-cerebral tract whereas the outer lip layer is supplied by glomeruli clusters 4 and 5 via the inner antenno-cerebral tract (Fig. 1m). Our evidence is not sufficient to assign a single lip layer to each of the five glomeruli clusters because we were not able to fill each cluster individually without tracer leakage into neighboring clusters. However, we suggest that glomeruli clusters do indeed supply individual layers in the lip. Compared to bees, the organization of the lip region appears to be more complex in ants.

Visual input to the calyx

Neurons originating from the lobula and medulla supply the calyx' collar. In honey bees, five outer layers of the collar (Fig. 1k) receive alternating input from neurons originating from the dorsal or ventral medulla, respectively. Each layer in the collar is supplied by a different class of medulla neuron that differ not only in their dorso-ventral distribution but also in the length of their dendritic branches probing the medulla [3]. Axons of these medulla neurons form the anterior superior optic tract (asot) and the anterior inferior optic tract (aiot; [16]; Fig. 1k, m). The innermost layer of the collar, marked by an asterisk in Fig. 1k, is supplied by neurons originating from the lobula and carried by the lobula tract (lot; Fig. 1m). These visual interneurons are described in more detail in [3].

In all ants, the collar is smaller and the lip region is larger compared to honey bees, corresponding to the much smaller optic lobes in ants. In carpenter ants, the collar comprises only three layers (Fig. 1m): two receiving input from the medulla and one receiving input from the lobula. The layers receiving input from the medulla are less well separated compared to the layers in bees, hence segregation of input from the dorsal vs. ventral medulla is gradual with considerable overlap. We did not find an anterior inferior optic tract (aiot) in ants. Like the entire visual system, visual input to the mushroom bodies is analogous yet reduced and less complex in ants compared to honey bees.

The basal ring is characterized by coarser neuropile texture compared to the lip and collar. In bees (Fig. 1n), it receives segregated input from the antennal lobes



(inner half), the lobula (middle layer) and the medulla (outer layer). In ants the basal ring is sometimes hard to discern. It also receives visual and antennal input, but it is not clear whether input from the medulla and lobula are segregated.

DISCUSSION

The mushroom bodies are involved in integration of multimodal information, learning and memory, and motor control [reviewed in 11, 18]. In most insects, they receive olfactory input from the antennal lobes. Direct visual input to the mushroom bodies is only prominent in Hymenoptera, and it is likely that it corresponds to the visual learning and orientation abilities of many bees, wasps and ants. Visual information is kept segregated at the input level of the calyx (at least 6 different visual input channels in the bees' collar). In the absence of physiological evidence and judging from behavioral experiments [14] we suggest that different layers in the collar process different visual qualities, such as texture, color or movement.

Like the collar, the lip is subdivided and comprises at least three layers in bees and probably more in ants. Together, the design and stratification pattern of the calyx reflects a species' behavior and sensory environment: bees and wasps fly and strongly rely on vision; their optic lobes and their mushroom body collars are large and comprise many different layers [the latter has only been demonstrated for honey bees [3, 9] and bumblebees]. In contrast, ant workers do not fly and in most species rely much less on vision than on olfaction and touch. Correspondingly, their optic lobes and collar regions are small but their lip regions are large and more complex.

In no case do we know about the functional differences between neurons supplying different calyx layers. Obviously, all visual input neurons respond to simple light and some to movement stimuli, but more complex stimuli have not been tested [7]. Likewise, most antennal lobe projection neurons in bees respond to odors and many

←

Fig. 1. Antennal lobe input to the lip region in *C. ocreatus* (a–j). **a** Two major tracts, the lateral (*lact*) and the inner antenno-cerebral tract (*iact*) connect the antennal lobe *al* to the calyx' (*ca*) lip region. **b** Antennal input to the lip is layered; **c** injecting tracer in the anterior glomerular cluster (cluster 1 in **d**) only stains the inner part of the lip. Antennal lobe glomerular clusters 1–5 shown in **d** (anterior section) and **e** (posterior section). **f** Schematic showing glomerular clusters 1–3 connecting to the inner part of the lip and clusters 4 and 5 to the outer layers. **g** Filling glomeruli cluster 4 results in labeling of the outer lip layer (lip enlarged in **h**). **i** Filling glomeruli cluster 2 results in labeling of middle layers of the lip (lip enlarged in **j**). **k** Terminals of visual interneurons in the honey bee's collar *co* are labeled from the dorsal (grey terminals) and ventral medulla (white terminals). Arrows indicate cell bodies of some of the medulla neurons; asterisk denotes part of collar that receives input from the lobula (not labeled); *asot* anterior superior optic tract. **l** Lip and collar of a carpenter ant's calyx; layers in collar labeled from the medulla and lobula; **m** Schematic showing major tracts supplying the honey bee's calyx *ca* with input from the optic lobes medulla *me* and lobula *lo* (*aiot* anterior inferior optic tract, *lot* lobula tract) and from the antennal lobe (*lact*, *iact* lateral and inner antennal cerebral tract, respectively); **n** Different input layers in the calyx' lip, collar and basal ring. *br*: basal ring; *pe* peduncle, *ml* median lobe, *cal* calyx; scale bars 50 μ m

also to mechanosensory stimuli or to sugar water [13], but general differences between neurons originating from different glomeruli clusters are not known except for sex-specific macroglomerular complexes which process pheromone information (reviewed in [12]). It is not even known whether the clustering of glomeruli has any functional significance; one study suggests that similar odors may be processed, but that temporal aspects are different between different glomeruli clusters [1]. In analogy to visual input segregation we suggest that antennal input to the lip may be segregated according to broad odor classes that may have different biological meaning, such as food odor, pheromones or aversive odors. In summary, we think that input to the mushroom bodies is not only modality specific but is segregated into many different, behaviorally relevant channels of sub-modalities that may support the associative function ascribed to the mushroom bodies, such as linking a particular color or pattern with food odor. The basal ring receives collaterals from the same neurons that supply the lip or collar, hence it does not process different kinds of sensory information. However, the basal ring comprises a different set of Kenyon cells [19], which are postsynaptic to the sensory input neurons. The basal ring might thus extract different information from the same input neurons (such as stimulus quality or amplitude, temporal aspects or coincidence of input).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank James Averill for technical assistance. This work was supported by the National Science Foundation (IBN-0083163).

REFERENCES

1. Abel, R., Rybak, J., Menzel, R. (2001) Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 437, 363–383.
2. Collett, T. S., Collett, M., Wehner, R. (2001) The guidance of desert ants by extended landmarks. *J. Exp. Biol.* 204, 1635–1639.
3. Ehmer, B., Gronenberg, W. (2002) Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Comp. Neurol.* 451, 362–373.
4. Erber, J., Masuhr, T., Menzel, R. (1980) Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol. Ent.* 5, 343–358.
5. Flanagan, D., Mercer, A. R. (1989) An atlas and 3-D reconstruction of the antennal lobes in the worker honey bee *Apis mellifera* L. Hymenoptera: Apidae. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 18, 145–159.
6. Frisch, von K. (1967) *Dance language and orientation of honeybee*. Harvard University Press, Cambridge Mass.
7. Gronenberg, W. (1986) Physiological and anatomical properties of optical input-fibres to the mushroom body in the bee brain. *J. Insect Physiol.* 32, 695–704.
8. Gronenberg, W. (1999) Modality-specific segregation of input to ant mushroom bodies. *Brain, Behav. Evol.* 54, 85–95.
9. Gronenberg, W. (2001) Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *J. Comp. Neurol.* 436, 474–489.
10. Heinrich, B. (1979) *Bumblebee economics*. Harvard University Press, Cambridge.

11. Heisenberg, M. (1998) What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learning and Memory* 5, 1–10.
12. Hildebrand, J. G., Shepherd, G. (1997) Mechanism of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 595–631.
13. Homberg, U. (1984) Processing of antennal information in extrinsic mushroom body neurons of the bee brain. *J. Comp. Physiol. A* 154, 825–836.
14. Lehrer, M. (1998) Looking all around: Honeybees use different cues in different eye regions. *J. Exp. Biol.* 201, 3275–3292.
15. Menzel, R., Erber, J. (1978) Learning and memory in bees. *Sci. Am.*, 239, 102–110.
16. Mobbs, P. G. (1982) The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 298, 309–354.
17. Rosengren, R. (1971) Route fidelity, visual memory and recruitment behaviour in foraging wood ants of the genus *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Zool. Fennica* 133, 1–106.
18. Strausfeld, N. J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R. S., Ito, K. (1998) Evolution, discovery, and interpretation of arthropod mushroom bodies. *Learning and Memory* 5, 11–37.
19. Strausfeld, N. J. (2002) Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J. Comp. Neurol.* 450, 4–33.