



## El Colegio de la Frontera Sur

Comportamiento de transporte de eucarítidos u otros objetos y  
especialización en *Ectatomma tuberculatum* (Olivier)  
(Hymenoptera: Eucharitidae, Formicidae)

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de  
Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por

Franklin Humberto Rocha Vela

2014



## El Colegio de la Frontera Sur

Chetumal, Quintana Roo a 20 de enero del 2014

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de: **Franklin Humberto Rocha Vela**, hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada: **Comportamiento de transporte de eucarítidos u otros objetos y especialización en *Ectatomma tuberculatum* (Olivier) (Hymenoptera: Eucharitidae, Formicidae)**, para obtener el grado en **Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural**

	Nombre	Firma
Tutora	Dra. Irma Gabriela Pérez López	_____
Asesor	Dr. Jean-Paul Lachaud	_____
Asesor	Dr. Yann Lucien Hénaut	_____
Sinodal adicional	Dr. Leopoldo Cruz López	_____
Sinodal adicional	Dra. Carmen Pozo de la Tijera	_____
Sinodal suplente	Dra. Ariane Dor	_____

## DEDICATORIAS

A mi Padre y Madre

*Humberto Rocha †*

*y*

*Ninfa Vela Carrillo*

A mi Hermana y Sobrina

*Blanca Arlete Rocha Vela*

*y*

*Camila Arlete Hernández Rocha*

Sin más palabras a estas cuatro personas, que con su apoyo y motivación me enseñaron siempre a cumplir mis metas sin importar el sacrificio que se me ponga enfrente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a CONACyT por la beca número 415149 y a ECOSUR por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Gabriela Pérez-Lachaud, por su amistad, calidez humana y el apoyo incondicional en la realización de la tesis ¡GRACIAS!

Dr. Jean-Paul Lachaud y Dr. Yann Hénaut, por su amistad e importante colaboración y apoyo en la realización de la tesis.

Al M. en C. Javier Valle Mora por su apoyo en el análisis estadístico de los datos de la tesis. Asimismo, al M. en C. Holger Weissenberger, por su apoyo en la elaboración del mapa de ubicación geográfica del sitio de colecta. Al M. en C. Aldo de la Mora por su amistad y apoyo intelectual.

Al sínodo externo conformado por Dra. Ariane Dor, Dra. Carmen Pozo y Dr. Leopoldo Cruz, por sus aportaciones en la tesis.

Al grupo académico Interacción, Adaptación y Biodiversidad (GAIA-BIO).

A todos los amigos que conocí en esta etapa y con quienes pasé dos años maravillosos y llenos de alegrías.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
2.1. Objetivo General.....	8
2.2. Objetivos Particulares.....	8
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
4.1 Material biológico.....	10
4.2 Mantenimiento de las hormigas en laboratorio y observaciones preliminares....	11
4.3 Estudio del rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia.....	12
4.4 Estudio de la especialización comportamental en obreras de <i>E. tuberculatum</i> ...	16
4.5 Análisis de datos.....	17
4.5.1 Rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia.....	17
4.5.2 Estudio del comportamiento de especialización.....	18
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
5.1 Estudio del rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia.....	19
5.1.1 Respuesta de las obreras ante los diferentes intrusos.....	19
5.1.2 Latencia y tiempo de manipulación y transporte.....	22
5.1.3 Repertorio comportamental.....	23
5.1.4 Descripción del comportamiento de las obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente a los diferentes intrusos.....	25
5.1.4.1 Comportamiento de <i>E. tuberculatum</i> frente al eucarítido adulto vivo <i>D. lachaudii</i> .....	25

5.1.4.2 Comportamiento de <i>E. tuberculatum</i> frente a eucarítidos sin olor.....	26
5.1.4.3 Comportamiento de <i>E. tuberculatum</i> frente a intrusos no comestibles.....	28
5.1.4.4 Comportamiento de <i>E. tuberculatum</i> frente a presas potenciales.....	29
5.1.4.5 Comportamiento de <i>E. tuberculatum</i> frente a obreras muertas (necroforesis).....	32
5.1.4.6 Comportamiento de <i>E. tuberculatum</i> frente a objetos inertes (insignificancia química).....	33
5.2 Estudio del comportamiento de especialización.....	34
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>35</b>
6.1 Estudio del rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia.....	35
6.2 Estudio del comportamiento de especialización.....	40
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>8. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>44</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>58</b>
Anexo 1. Características de los nidos de <i>E. tuberculatum</i> colectados para este estudio. Número de individuos por casta y por estado de desarrollo.....	58
Anexo 2. Manuscrito individual sometido para su publicación a la revista <i>Ethology</i> ...	59

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Diferentes organismos y objetos (tratamientos) que se utilizaron para caracterizar el comportamiento de obreras de <i>E. tuberculatum</i> ante diferentes intrusos.....	13
<b>Cuadro 2.</b> Repertorio comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> . Eventos comportamentales observados durante el rechazo de intrusos.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> a) Adulto (hembra) del parasitoide eucarítido <i>Dilocantha lachaudii</i> ; b) obrera de la hormiga <i>Ectatomma tuberculatum</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> a) Entrada de un nido de <i>E. tuberculatum</i> ; b) perfil de un nido excavado.....	10
<b>Figura 3.</b> Ubicación geográfica del sitio de colecta.....	11
<b>Figura 4.</b> Dispositivo experimental: nido y zona de forrajeo.....	12
<b>Figura 5.</b> Obreras de <i>E. tuberculatum</i> marcadas individualmente para su reconocimiento individual.....	16
<b>Figura 6.</b> Respuesta global de las obreras de <i>E. tuberculatum</i> ante diferentes tipos de intrusos introducidos experimentalmente en los nidos. Decisión final del lugar donde quedó el intruso después de transcurridos 15 min.....	20
<b>Figura 7.</b> Variabilidad de la respuesta de las obreras de 4 nidos de <i>E. tuberculatum</i> ante diferentes tipos de intrusos. Decisión final del lugar donde quedó el intruso después de transcurridos 15 min.....	21

<b>Figura 8.</b> Latencia promedio en la detección de diferentes intrusos por obreras de <i>E. tuberculatum</i> . Las barras representan el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0.05$ .....	22
<b>Figura 9.</b> Tiempo de manipulación y transporte promedio de diferentes intrusos por obreras de <i>E. tuberculatum</i> . Las barras representan el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0.05$ .....	23
<b>Figura 10.</b> Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente al eucarítido vivo <i>D. lachaudii</i> . El ancho de las flechas corresponde a la frecuencia de transiciones entre comportamientos sucesivos, dividido entre el número total de secuencias del inicio (detección por contacto) expresado en porcentajes. Líneas punteadas representan valores menores a 3%. El diagrama corresponde a 44 secuencias.....	26
<b>Figura 11.</b> Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente al eucarítido muerto (lavado con pentano) <i>D. lachaudii</i> . Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 262 secuencias.....	27
<b>Figura 12.</b> Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente al curculiónido vivo <i>C. oryzae</i> . Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 276 secuencias.....	28
<b>Figura 13.</b> Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente a larvas de <i>C. oryzae</i> . Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 213 secuencias.....	30



<b>Figura 14.</b> Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente a obreros de termitas <i>Nasutitermes</i> sp. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 786 secuencias.....	31
<b>Figura 15.</b> Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente a obreras conespecíficas muertas. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 1224 secuencias.....	33
<b>Figura 16.</b> Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de <i>E. tuberculatum</i> frente a bolitas de papel filtro. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 617 secuencias.....	34

## RESUMEN

Las larvas y pupas de la hormiga *Ectatomma tuberculatum* son parasitadas por dos especies de avispas de la familia Eucharitidae. Las avispas adultas emergen dentro de los nidos de hormigas pero se reproducen afuera. A pesar de que las hormigas son agresivas, transportan a los eucarítidos hacia el exterior, indemnes. Diversas hipótesis como el mimetismo químico (olor semejante), la insignificancia química (ausencia de olor), la necroforesis y la profilaxis social (transporte de cadáveres y/o de desechos potencialmente patógenos) u otras estrategias comportamentales podrían explicar el rechazo sin agresión de los eucarítidos. El objetivo de este trabajo fue contribuir a la determinación de los estímulos que intervienen en el comportamiento de transporte de los eucarítidos, explorando algunas de estas hipótesis, e investigar la existencia de una posible especialización de las obreras en el rechazo de los intrusos. Para inferir sobre los posibles estímulos que determinan el comportamiento de rechazo se efectuaron bioensayos en laboratorio usando 4 nidos experimentales de tamaño controlado, y se determinó el comportamiento de las obreras ante diversos elementos (organismos/objetos) introducidos individualmente en el nido (parasitoides muertos lavados con pentano, adultos de curculiónidos, dos tipos de presas, obreras conespecíficas muertas y bolitas de papel filtro). Se efectuaron 15 observaciones de 15 min. por nido y por tratamiento. Se cuantificó el rechazo o no de los diferentes elementos, la latencia y la duración del manejo/transporte, y se caracterizó y comparó el comportamiento de las obreras ante los diferentes elementos usando diagramas de flujo. El comportamiento de las obreras fue específico según el tipo de intruso. Las presas potenciales (larvas del curculionido *Caulophilus oryzae* y obreros de termitas *Nasutitermes* sp.) fueron trituradas y utilizadas como alimento. A excepción de las

presas, los intrusos de los demás tratamientos no fueron dañados, aunque en algunos casos las obreras intentaron picarlos. Las secuencias comportamentales difirieron de acuerdo con el tipo de intruso. La secuencia típica de las obreras ante el eucarítido vivo (*Dilocantha lachaudii*) presentó mayor semejanza con la del adulto vivo de *C. oryzae*, que con la de los otros intrusos. Es posible que la estructura cuticular rígida de los eucarítidos impida el ataque de las obreras de *E. tuberculatum*. Las obreras de esta hormiga exhibieron una flexibilidad en cuanto a su repertorio comportamental y al número de transiciones entre los actos comportamentales. Por ejemplo, comportamientos como el golpe mandibular y la tentativa de picadura fueron empleados con mayor frecuencia ante las presas e intrusos con movimiento. Por el contrario, ante objetos inertes y organismos muertos (con y sin olor), se presentó con mayor frecuencia la exploración por anteneo. Se observó una posible partición del trabajo relacionado con el rechazo de los intrusos, es decir, el transporte de un intruso por más de una obrera.

Por otro lado, para evaluar la posible existencia de especialización en actividades de rechazo de intrusos se utilizaron 2 nidos diferentes, con obreras marcadas individualmente con pintura. Se utilizó como modelo a *Caulophilus oryzae*, debido a que los adultos presentan estructura y tamaño semejantes a los de los eucarítidos y también adultos muertos lavados con pentano del eucarítido *Dilocantha lachaudii*. Se efectuaron 20 observaciones por intruso y por nido. Se documentaron todos los encuentros y comportamientos de las obreras hasta que se eliminó el intruso. Todos los intrusos fueron retirados del nido, sin daño aparente y en general, las obreras retiraron a los intrusos en menos de 20 min. Algunas obreras retiraron al intruso con más frecuencia de lo esperado al azar lo que indica una fuerte especialización de estas obreras en esta

tarea. El número de encuentros se correlacionó positivamente con el número de rechazos que realizó cada obrera. Un grupo de 7 obreras/por nido fue identificado como especialistas en el rechazo de intrusos. Además, un subconjunto de especialistas en cada nido llevó a cabo más del 60% de la tarea (hiper-especialistas). Es la primera vez que se demuestra una especialización en este contexto.

**Palabras clave:** hormiga, parasitoide, interacción, mimetismo químico, necroforesis, insignificancia química, especialización, rechazo intrusos

## 1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los insectos sociales son territoriales, mantienen colonias cerradas y las defienden contra intrusos incluyendo los de su misma especie. Esta forma de territorialidad requiere que los miembros de la colonia discriminen entre individuos que pertenecen a la misma colonia y aquellos ajenos (Hölldobler y Wilson, 1990; Lenoir et al., 2001; Breed, 2003; Bagnères y Lorenzi, 2010; d'Ettorre y Lenoir, 2010). En los insectos sociales como las hormigas, las señales químicas son el mecanismo más común para el reconocimiento entre congéneres. En muchos casos, los hidrocarburos cuticulares han sido señalados como los principales compuestos que permiten el reconocimiento y la discriminación de miembros de su propia colonia de otros que no lo son (Vander Meer et al., 1989a; Lenoir et al., 2001; d'Ettorre y Lenoir, 2010), aunque también otros estímulos pueden intervenir (e.g. estímulos táctiles, visuales, acústicos; ver Le Masne, 1953; Nelson y Jackson, 2006; Cammaerts, 2007; Barbero et al., 2009; Barbero et al., 2012).

Las colonias de las hormigas representan un recurso estable de alimento y sus nidos proporcionan numerosos nichos para otros organismos (Hölldobler y Wilson, 1990). Los organismos estrechamente relacionados con las hormigas, que habitan dentro de sus nidos o en las inmediaciones de los mismos, se denominan mirmecófilos (Donisthorpe, 1927). Estos organismos usan diferentes tácticas (comportamental, química, etc.) para integrarse en mayor o menor grado a las colonias de hormigas (Hölldobler, 1971; Fiedler et al., 1996; Bagnères y Lorenzi, 2010).

Se conocen cientos de insectos mirmecófilos (Kistner, 1982; Hölldobler y Wilson, 1990; Lachaud y Pérez-Lachaud, 2012), muchos de ellos pasan gran parte de su vida en las colonias de sus hospederas. Los mecanismos que permiten la integración de estos organismos a la vida de las colonias han sido estudiados en algunas especies. Por ejemplo, las larvas de las moscas de la subfamilia Microdontinae (Diptera: Syrphidae) (Wheeler, 1908; Van Pelt y Van Pelt, 1972; Duffield, 1981; Wolton, 2011) y las de algunas especies de mariposas de la familia Lycaenidae (Lepidoptera) (Pierce y Easteal, 1986; Fiedler y Hagemann, 1992; Pierce et al., 2002; Barbero et al., 2009), presentan estrategias comportamentales, químicas y/o acústicas para integrarse a las colonias de las hormigas. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos utilizados por los adultos de éstos o de otros insectos, que emergen al interior de los nidos de hormigas y necesitan salir para reproducirse, por ejemplo parasitoides de las familias Diapriidae (Fernández-Marín et al., 2006) y Eucharitidae (Howard et al., 2001; Lachaud y Pérez-Lachaud, 2012).

Todas las especies de avispas de la familia Eucharitidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) (Figura 1a) son parasitoides específicos de larvas y pupas de hormigas (Wheeler y Wheeler, 1937; Clausen, 1940, 1941; Heraty, 1985, 2002). Las hembras depositan sus huevecillos dentro o en la superficie de hojas, yemas florales o en frutos. El primer estadio larval (planidium) es móvil y accede a las colonias y a las larvas de hormigas hospederas por medio de comportamientos foréticos (Clausen, 1940; Heraty, 2002; Carey et al., 2012). Una vez en el interior del nido, ataca las larvas maduras y sólo se desarrolla después de que éstas alcanzan el estado pupal (ectoparasitoide

koinobionte). Los adultos emergen dentro del nido pero copulan afuera (Clausen, 1941; Pérez-Lachaud et al., 2006a).

El presente trabajo pretende explorar las interacciones comportamentales entre la hormiga *Ectatomma tuberculatum* (Olivier) (Formicidae: Ectatomminae) (Figura 1b) y sus parasitoides eucarítidos. *Ectatomma tuberculatum* se encuentra distribuida desde el norte de México hasta el norte de Argentina a alturas no mayores a los 1500 msnm (Weber, 1946; Brown, 1958; Kempf, 1972; Kugler y Brown, 1982; Valenzuela-González et al., 1995). Es un importante depredador de insectos considerados como plaga en cultivos de algodón, café y cacao en Guatemala, Panamá y México (Cook, 1904, 1905; Weber, 1946; Lachaud et al., 1996; Ibarra-Núñez et al., 2001). Las obreras son monomórficas, aunque existe cierta variación de tamaño, sobre todo en colonias incipientes (Dejean y Lachaud, 1992). En Chiapas, las colonias son monogínicas (una sola reina) y constan en promedio de 470 obreras (rango: 50-1200, Lachaud et al., 1996), pero existe poliginia facultativa en poblaciones de Veracruz (Pérez-Lachaud et al., 2011) y de Quintana Roo (Lachaud y Pérez-Lachaud, datos no publicados).

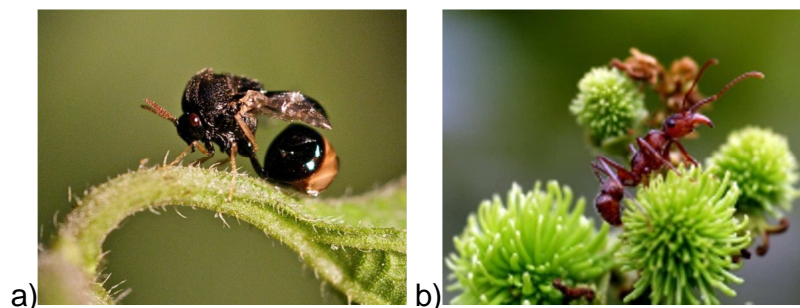


Figura 1. a) Adulto (hembra) del parasitoide eucarítido *Dilocantha lachaudii*; b) obrera de la hormiga *E. tuberculatum*. Fotos cortesía de J.-P. Lachaud.

*Ectatomma tuberculatum* ha sido reportada como hospedera de tres especies de parasitoides de la familia Eucharitidae (Cook, 1905; Lachaud et al., 1998; Pérez-Lachaud et al., 2006b). *Isomerala coronata* (Westwood) y *Dilocantha lachaudii* Heraty son los principales parasitoides de esta hormiga en Chiapas y en Veracruz (Pérez-Lachaud et al., 2006b, 2010, 2011), mientras que en Quintana Roo sólo se ha detectado *I. coronata* (Pérez-Lachaud y Lachaud, datos no publicados).

Las obreras de *E. tuberculatum* defienden con agresividad su colonia contra intrusos (Fénéron, 1993, 1996), sin embargo, no se comportan de manera agresiva con adultos de eucarítidos recién emergidos e incluso los transportan al exterior de los nidos sin daño aparente (Lachaud et al., 1998; Howard et al., 2001). Lo anterior podría estar relacionado con diferentes mecanismos de defensa de las avispas, tales como el mimetismo químico, el uso de sustancias repelentes, de secreciones de apaciguamiento, o el uso de estrategias comportamentales (Dettner y Liepert, 1994; Haynes y Yeorgan, 1999; Lenoir et al., 2001); pero también, a la falta de discriminación de las hormigas (hipótesis de la insignificancia química; Lenoir et al., 2001). Ninguna de estas hipótesis se ha explorado experimentalmente en Eucharitidae. En particular, y al igual que para otros eucarítidos (Vander Meer et al., 1989b; Howard et al., 2001), se ha sugerido la existencia de un posible mimetismo químico ya que el perfil de hidrocarburos cuticulares de los parasitoides de *E. tuberculatum* se asemeja al de sus hormigas hospederas (Bartolo-Reyes, 2006; Quiroa-Montalván, 2006). Otras hipótesis para explicar el rechazo sin agresión de los eucarítidos son: el comportamiento necroforético de las hormigas (transporte de obreras muertas al exterior del nido, e.g. Diez et al., 2011), el comportamiento de profilaxis del nido o limpieza de desechos



potencialmente patógenos (e.g. Diez et al., 2012), y el rechazo del nido de intrusos demasiado pequeños, y/o no comestibles u objetos inertes, (e.g. Pérez-Lachaud y Lachaud, 2007). En este trabajo se indagó sobre algunas de estas preguntas: ¿Las obreras de *E. tuberculatum* reconocen a los eucarítidos como no comestibles, cómo individuos muertos (potencialmente patógenos) o como objetos inertes?

Otro aspecto interesante es determinar quién efectúa el transporte de eucarítidos hacia el exterior del nido. En las colonias de hormigas, las obreras presentan una división eficaz del trabajo o polietismo, con individuos especializados en tareas específicas (Robson y Traniello, 1999). La división del trabajo es un proceso de auto-organización mediante el cual diferentes miembros del grupo realizan funciones diferentes en serie-paralelo, y se piensa que es un atributo fundamental que ha promovido el éxito de todos los insectos sociales (Wilson, 1971; Oster y Wilson 1978; Jaisson et al., 1988; Hölldobler y Wilson, 1990; Robinson, 1992; Sendova-Franks y Franks, 1993).

La división del trabajo es dinámica. Las colonias de insectos sociales responden a los cambios bióticos y abióticos del ambiente (ver Carroll y Janzen, 1973; Traniello, 1989) y también de acuerdo a las propias necesidades de la colonia, mediante el ajuste de la proporción relativa de las obreras que realizan las diferentes tareas (Oster y Wilson, 1978; Lachaud y Fresneau, 1987; Robinson, 1992). Es probable que en todos los insectos sociales, ambas señales (ambientales y sociales) contribuyan a la decisión de realizar las tareas (Robson y Traniello, 1999; Gordon, 2003). Entre los factores que determinan que las obreras respondan o no a los cambios en el nivel de la demanda de

trabajo, se incluyen: la variación morfológica, genotípica y la edad (Lachaud y Fresneau, 1987; Calderone y Page, 1991; Julian y Fewell 2004; Oldroyd y Thompson 2006), la experiencia individual (Deneubourg et al., 1987; Theraulaz et al., 1998; Tripet y Nonacs, 2004; Ravary et al., 2007; Franklin et al., 2012), y el patrón de interacción social que experimenta cada hormiga (Robinson et al., 2009). Además, la ubicación espacial de una obrera podría afectar la tasa de encuentro con un estímulo y el nivel de estimulación experimentado (Arcaute et al., 2009; Robinson et al., 2009).

El tipo de tarea(s) en la(s) que cada obrera se especializa puede estar correlacionado con la edad (polietismo temporal; Beshers y Fewell, 2001), o basado en su tamaño y forma (polietismo físico o en tamaño; Hölldobler y Wilson, 1990) o en ambos. Sin embargo, existe una gran variabilidad intrínseca entre los individuos de la misma colonia (idiosincrasia; Jaisson et al., 1988; Calabi y Traniello, 1989; Corbara et al., 1989; Giray y Robinson, 1994; Weidenmüller, 2004; Ingram et al., 2005; Jeanson y Weidenmüller 2013), y también entre colonias (Crosland, 1990; Buczkowski y Silverman, 2006; Raine et al., 2006; Gordon et al., 2011; Pérez-Lachaud et al., 2011; Wray et al., 2011; Pinter-Wollman et al., 2012; Jandt et al., 2013).

La especialización individual ha sido estudiada en varios contextos: por ejemplo, reubicación de colonias en la hormiga ponerina *Diacamma indicum* Santschi (Sumana y Sona, 2013), división del trabajo durante el forrajeo en *Ectatomma ruidum* (Roger, 1860) (Schatz et al., 1995), el uso de herramientas durante el forrajeo en *Aphaenogaster rudis* Enzmann (Myrmicinae) (Banschbach et al., 2006), el rechazo de cadáveres en la hormiga cortadora *Acromyrmex versicolor* (Julian y Cahan, 1999), etc.

Sin embargo, no hay ningún estudio sobre especialización individual en el contexto de rechazo de intrusos en hormigas. Por lo antes mencionado, se plantea explorar aquí sobre los eventos involucrados en el comportamiento de rechazo de intrusos (eucarítidos y otros organismos/objetos introducidos experimentalmente en los nidos) por obreras de *E. tuberculatum*, y determinar si existe una especialización en su rechazo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar los estímulos que intervienen en el comportamiento de rechazo de los parasitoides eucarítidos y elucidar si existe una especialización en las obreras de *E. tuberculatum* en actividades de transporte de elementos ajenos al nido o de intrusos hacia el exterior.

### 2.2 Objetivos Particulares

1. Describir, cuantificar y comparar el comportamiento de obreras de *E. tuberculatum* ante diferentes organismos intrusos y objetos inertes encontrados en el interior del nido.
2. Inferir sobre la naturaleza de los estímulos que originan el comportamiento de transporte de eucarítidos y su rechazo del nido.
3. Determinar si existe una especialización en el transporte relacionada con el rechazo de intrusos.

### 3. HIPÓTESIS

1. Las obreras de *E. tuberculatum* reconocen y discriminan los parasitoides, así como otros organismos y objetos ajenos en el interior del nido.
2. Las obreras de *E. tuberculatum* presentan una especialización en el transporte (rechazo) de objetos o de organismos ajenos a la colonia.
3. El comportamiento de transporte relacionado con el rechazo de intrusos efectuado por obreras de *E. tuberculatum* es estereotipado, y específico para los diferentes intrusos presentados experimentalmente.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

Para la obtención del material biológico se excavaron y recolectaron manualmente 19 nidos completos de *E. tuberculatum* (Figura 2a, b), en Chetumal, Quintana Roo ( $18^{\circ} 30' 4.54''$  N;  $88^{\circ} 19' 47.74''$  O) (Figura 3). Las colonias fueron transportadas al laboratorio donde se registraron la presencia y el número de reinas, hembras aladas, machos, obreras, larvas y pupas (Anexo 1). Las pupas se separaron en tubos de cristal y se mantuvieron en una habitación a temperatura ambiente, para detectar la eventual emergencia de parasitoides.

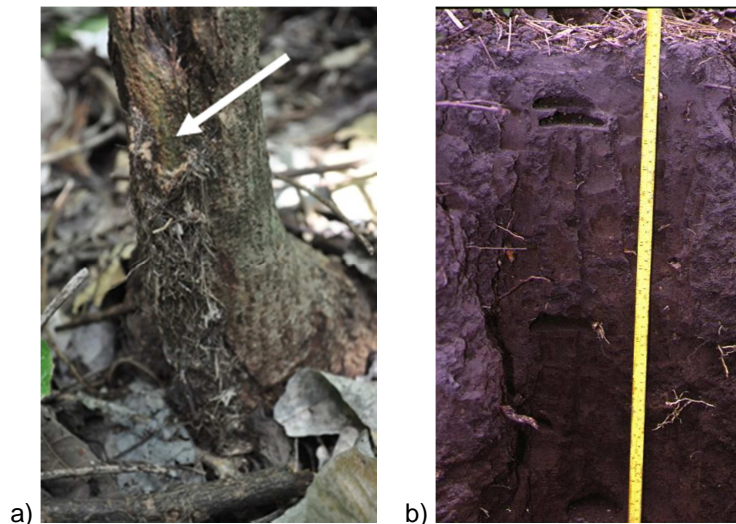


Figura 2. a) Entrada de un nido de *E. tuberculatum*; b) perfil de un nido excavado. Foto 2b cortesía de J.-P. Lachaud.



Figura 3. Ubicación geográfica del sitio de colecta.

#### 4.2 Mantenimiento de las hormigas en laboratorio y observaciones preliminares

Las colonias fueron mantenidas en nidos artificiales (recipientes de plástico de 23 x 17 x 10 cm) provistos de bebederos (tubos de vidrio con agua tapados con algodón). Cada nido estuvo conectado a una segunda área denominada zona de forrajeo (30 x 23 x 8 cm) mediante un tubo de vidrio (1 cm de diámetro y 30 cm de largo) (Figura 4). Para evitar el escape de las hormigas, las paredes laterales de los nidos artificiales se trataron con FLUON (Whitford GmbH). Las hormigas se alimentaron diariamente con miel y pulpa de manzana como fuentes azucaradas y con larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), sin embargo, la dieta con larvas se suspendió una vez iniciados los bioensayos.

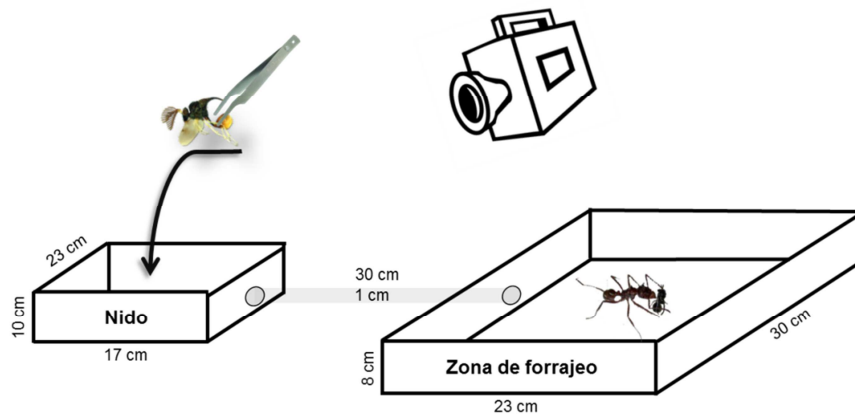


Figura 4. Dispositivo experimental: nido y zona de forrajeo.

Se utilizó un nido diferente para realizar observaciones preliminares con el fin de describir y determinar el repertorio de actos comportamentales de las obreras de *E. tuberculatum*. Se registraron de manera global todas las actividades involucradas en el comportamiento de limpieza del nido y rechazo de objetos u organismos.

#### 4.3 Estudio del rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia

Las colonias de *E. tuberculatum* son parasitadas por eucarítidos durante todo el año, pero la tasa de parasitismo es muy baja (Pérez-Lachaud et al., 2010). En la zona de estudio, las colonias parecen estar parasitadas únicamente por *I. coronata* (Pérez-Lachaud y Lachaud, datos no publicados). Dado que no fue posible obtener suficientes parasitoides vivos para los bioensayos, se utilizaron diversos organismos vivos o muertos (colectados en campo o provenientes de crías de laboratorio) u objetos inertes, para tratar de caracterizar el comportamiento de las obreras ante elementos ajenos a su colonia. Por otro lado, se utilizó información contenida en videos en un trabajo anterior (Pérez-Lachaud et al., datos no publicados) para comparar el comportamiento de las



obreras ante los diferentes intrusos propuestos en este trabajo, con el que presentan ante avispas vivas. El uso de organismos con diferentes características (morfológicas, estructurales o químicas) en bioensayos en laboratorio permitió poner a prueba algunas de las hipótesis sobre las causas del transporte sin agresión de los eucarítidos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferentes organismos y objetos (tratamientos) que se utilizaron para caracterizar el comportamiento de obreras de *E. tuberculatum* ante diferentes intrusos.

Tratamientos	Hipótesis a evaluar	Justificación
Adultos de Eucharitidae vivos (Pérez-Lachaud, datos no publicados).	Control/Mimetismo químico	Para describir el comportamiento de las obreras ante los eucarítidos vivos.
Adulto de Eucharitidae lavado con pentano (muerto, conservado en alcohol)	Mimetismo químico/Insignificancia química	Para describir la respuesta de las obreras ante eucarítidos en ausencia completa de olores.
Obrero de termita <i>Nasutitermes</i> sp. (Dictyoptera: Termitidae)	Presa comestible	Tamaño aproximadamente similar a los eucarítidos. Presa común de <i>E. tuberculatum</i> , muy móvil.
Larva de <i>Caulophilus oryzae</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Presa comestible	Para evaluar la respuesta ante una presa potencial con poco movimiento.
Adulto de <i>C. oryzae</i> vivo	No comestible	Insecto no comestible (cutícula rígida). Para evaluar si la estructura cuticular rígida en los eucarítidos, impide el ataque.
Obreras conespecíficas muertas por congelación (48 h después)	Necroforesis	Para evaluar posibles diferencias entre el comportamiento de las obreras ante una obrera muerta y ante eucarítidos.
Bolitas de papel filtro	Insignificancia química	Para evaluar la respuesta ante objetos inertes.

Se constituyeron 4 nidos experimentales con un número de individuos controlado (1 reina, 50 obreras, y la cría) (Anexo 1), con el fin de homogeneizar los parámetros que pueden influir sobre el comportamiento social de las colonias y la división del trabajo (Lachaud y Fresneau, 1987). Los bioensayos se llevaron a cabo después de un periodo de aclimatación de las hormigas a las condiciones de laboratorio (nido 4 y 6: 46 días; nido 7 y 11: 58 días). Se efectuaron 60 repeticiones por cada tratamiento (15/ nido).

Las termitas *Nasutitermes* sp. fueron colectadas en un predio ubicado en Bacalar, Quintana Roo. Son consideradas como una presa común para *E. tuberculatum* (hasta un 9% de su dieta en ciertos hábitats, Ibarra-Núñez et al., 2001). Las larvas y adultos de *C. oryzae* (Gyllenhal) fueron obtenidos a partir de una cría de laboratorio de ECOSUR, y los adultos de *D. lachaudii* muertos (conservados en alcohol) a partir de nidos de *E. tuberculatum* colectados en Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas en 2006. Análogo a los eucarítidos, los adultos de *C. oryzae* presentan una cutícula muy dura y tamaño similar, aunque ambos modelos difieren significativamente en su peso (peso promedio del curculiónido:  $1.32 \text{ mg} \pm 0.04 \text{ SEM}$ ; avispa  $1.89 \text{ mg} \pm 0.15$ ;  $N_1 = N_2 = 30$ , prueba t de Student,  $t = -3.59$ ;  $g.l. = 58$ ;  $p < 0.001$ ). Se eligió esta especie porque los adultos no constituyen una presa comestible para las hormigas; además, su tamaño permite que las hormigas puedan sujetarlos entre sus mandíbulas y se ha visto que las hormigas los transportan al exterior del nido (observaciones preliminares). Los eucarítidos adultos conservados en alcohol se dejaron secar al aire libre sobre papel toalla y para eliminar cualquier registro de olor se lavaron en 10 ml de pentano (Grado-CG, Fluka Analytical, 99%) durante 5 min, y nuevamente fueron secados antes de usarlos en el bioensayo. Las obreras conespecíficas muertas fueron obtenidas de colonias diferentes a las utilizadas en los bioensayos (Anexo 1). Las obreras se mataron por congelación, y antes de cada observación se dejaron a temperatura ambiente por 48 horas. Finalmente, las bolitas de papel filtro fueron elaboradas manualmente con la ayuda de guantes, para evitar contaminación.

El protocolo para las observaciones fue el siguiente: se introdujeron de manera individual los organismos/objetos con la ayuda de pinzas finas y suavemente se

depositaron en el centro del nido. Se realizó un registro continuo del comportamiento de las hormigas ante el elemento intruso (muestreo focal) con la ayuda de una cámara de video (Sony-HDR-XR260) que se colocó por encima del nido experimental, bajo iluminación natural y a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C).

Cada registro se inició al introducir el organismo u objeto, y concluyó después de transcurrir 15 minutos o antes si éste era transportado fuera (rechazo). Se determinó: el tiempo de latencia (desde la introducción del organismo/objeto hasta su detección por contacto por parte de una obrera), y el tiempo de manipulación y transporte (desde el contacto por una obrera hasta el rechazo o hasta el término de la observación). Además, para cada observación se evaluó la respuesta final de las obreras como: i) rechazo en un basurero (dentro o fuera del nido), ii) transporte al interior del nido (debajo de la hoja, donde se encontraba la reina y la cría), iii) la obrera permanece sujetando al intruso entre las mandíbulas, y iv) sin respuesta. La condición del organismo/objeto después de la manipulación por la(s) obrera(s) se registró como: “con” o “sin daño aparente”. *Ectatomma tuberculatum* es activa las 24 horas del día (Valenzuela-González et al., 1995), así que las observaciones se realizaron entre las 07:00 y 14:00 horas y cada organismo/objeto (intruso) fue evaluado una sola vez. Los diferentes tratamientos se presentaron de manera completamente aleatoria en los diferentes nidos; la aleatorización se realizó con el programa R (R Development Core Team, 2013). Las observaciones se efectuaron del 02 de mayo al 11 de junio del 2013.

#### 4.4 Estudio de la especialización comportamental en obreras de *E. tuberculatum*

Los bioensayos se efectuaron con dos nidos experimentales diferentes a los ya utilizados, con número de individuos controlado (1 reina, 30 obreras, y cría). Las obreras fueron seleccionadas al azar de los nidos originales, y se marcaron individualmente en el tórax y abdomen con diferentes colores usando marcadores Uni Paint Marker PX-203 (Figura 5), para así poder diferenciar una obrera de otra. Las marcaciones se realizaron en 1 día. Las observaciones comenzaron una semana después de marcar las obreras, para evitar cualquier efecto de la manipulación.



Figura 5. Obreras de *E. tuberculatum* marcadas individualmente para su reconocimiento individual.

Para estudiar la división del trabajo se utilizaron dos modelos de intrusos: adultos vivos de *C. oryzae* y adultos de *D. lachaudii* muertos lavados con pentano. Al igual que en el experimento anterior, se introdujeron de manera individual y aleatoria los intrusos con la ayuda de pinzas finas y suavemente se depositaron en el centro del nido y se realizó un registro continuo del comportamiento de las hormigas ante el elemento intruso (muestreo focal) mediante una cámara de video y hasta que el intruso fuera transportado fuera del nido. Al final de cada registro se documentó lo siguiente: 1) el tiempo de latencia, 2) el tiempo de manipulación y transporte, 3) el tiempo total de cada

observación (desde la introducción del intruso hasta su rechazo al exterior del nido), 4) el número y la identidad de las obreras que hicieron contacto con el intruso (encuentros), y 5) cómo, cuándo y cuál obrera realizó el rechazo del intruso. Por lo tanto, para cada obrera se obtuvo un registro de las veces que se encontró con un intruso a lo largo de los bioensayos, así como del número de rechazos que realizó. Los bioensayos se llevaron a cabo entre las 07:00 y las 15:00 horas, durante aproximadamente 3 semanas. Este período de tiempo es lo suficientemente corto como para evitar que la mayoría de las hormigas cambiaran de tarea por efecto del polietismo de edad (ver Fénéron, 1993). Se efectuaron 20 observaciones por tipo de intruso y por nido (40 observaciones por colonia y por intruso, en total). Los intrusos se evaluaron una sola vez.

## **4.5 Análisis de datos**

### **4.5.1 Rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia**

La decisión comportamental de las obreras con respecto a los diferentes tipos de intrusos presentados (rechazo dentro o fuera del nido, aprovechamiento como presa, etc.), fue analizada mediante una regresión logística con respuesta multinomial (Venables y Ripley, 2002; Wickham, 2007).

Para determinar la influencia del tipo de intruso sobre la latencia y el tiempo de manipulación y transporte se utilizó un modelo lineal generalizado de efectos mixtos ajustado a los datos transformados (logaritmo natural), con “nido” como un factor aleatorio (Galwey, 2006). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando R (R Development Core Team, 2013). Los datos se representan como promedios  $\pm$  SEM. N,

se refiere al número de individuos; n, al número de interacciones analizadas. Se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

El comportamiento de las obreras ante los elementos intrusos se analizó a través del análisis de diagramas de flujo (etograma) (se consideraron transiciones comportamentales principales, como los eventos que aparecen en por lo menos 5% de las secuencias). Para ello, se construyeron y analizaron tablas de contingencia de primer orden de Markov, que proporcionan la frecuencia de transición de una conducta a todas las otras posibles (ver Fagen y Young, 1978).

#### **4.5.2 Estudio del comportamiento de especialización**

Los análisis del experimento de especialización se presentan a detalle en el manuscrito individual sometido para su publicación a la revista *Ethology* (ver Anexo 2).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estudio del rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia

#### 5.1.1 Respuesta de las obreras ante los diferentes intrusos

Se realizó un total de 360 observaciones, de las cuales 15 no concluyeron (no pudo determinarse la decisión de las obreras) en el tiempo establecido por lo que no se incluyeron en los análisis. La respuesta final de las obreras ante los diferentes intrusos evaluada como: rechazo en un basurero (dentro o fuera del nido), sujetándolo entre las mandíbulas (interior del nido), bajo la hoja (interior del nido) o no respuesta (centro del nido), se muestra en la figura 6. A excepción de las larvas de *C. oryzae* y obreros de termitas *Nasutitermes* sp., que fueron triturados por las hormigas y utilizados como presa, se observó que los intrusos de los demás tratamientos no fueron dañados, aunque en algunos casos las obreras intentaron picarlos (ver apartado 5.1.4).

En la mayoría de los casos, los intrusos fueron rechazados en el basurero (51.5%, n= 177) ( $\chi^2 = 131.2$ ; g.l. = 3;  $p < 0.001$ ); con la excepción de las larvas de *C. oryzae* y los obreros de termitas, lo cuales fueron transportados bajo la hoja en donde se encontraba la cría (20.1%, n= 69). En algunos casos, al final del tiempo de observación, las obreras aún sujetaban a los intrusos entre las mandíbulas (16.3%, n= 56: adultos y larvas de *C. oryzae* y obreros de termitas). Finalmente, en 43 casos (12.5%: adultos y larvas de *C. oryzae*, adultos muertos de *D. lachaudii* y bolitas de papel) no se presentó el transporte por parte de las obreras y después de los 15 minutos de observación los intrusos aún seguían en el lugar inicial donde habían sido depositados, sin embargo, si se presentó reconocimiento por antenación (Figura 6).

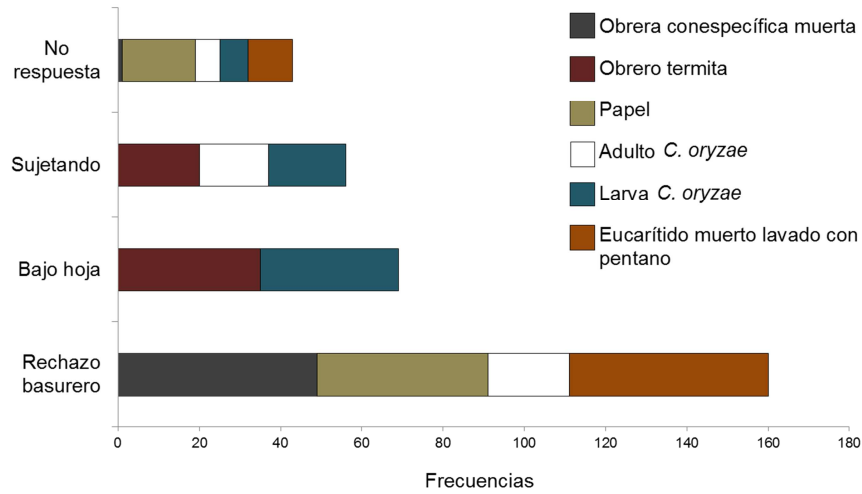


Figura 6. Respuesta global de las obreras de *E. tuberculatum* ante diferentes tipos de intrusos introducidos experimentalmente en los nidos. Decisión final del lugar donde quedó el intruso después de transcurridos 15 min.

La mayoría de las obreras conespecíficas muertas (98%) fueron transportadas al exterior del nido o depositadas en la basura interna (Figura 7). De manera similar, los adultos de *D. lachaudii* muertos, los adultos vivos de *C. oryzae* y las bolitas de papel, fueron en su mayoría rechazados hacia el exterior del nido (81.7, 61.7 y 70% de los intrusos, respectivamente). Por otro lado, las larvas de *C. oryzae* y los obreros de termitas fueron principalmente transportados bajo la hoja (56.7 y 63.6% de los intrusos, respectivamente).

Existen diferencias significativas en la respuesta de las obreras entre los nidos evaluados (Regresión logística,  $\chi^2 = 74.5$ ; *g.l.* = 12;  $p < 0.001$ ), y también según los diferentes intrusos ( $\chi^2 = 425.4$ ; *g.l.* = 20;  $p < 0.001$ ), pero no hay interacción entre nidos y tipos de intrusos (Prueba de razón de verosimilitud, Modelos Multinomiales,  $\chi^2 = 25.95$ ; *g.l.* = 75; *n.s.*).



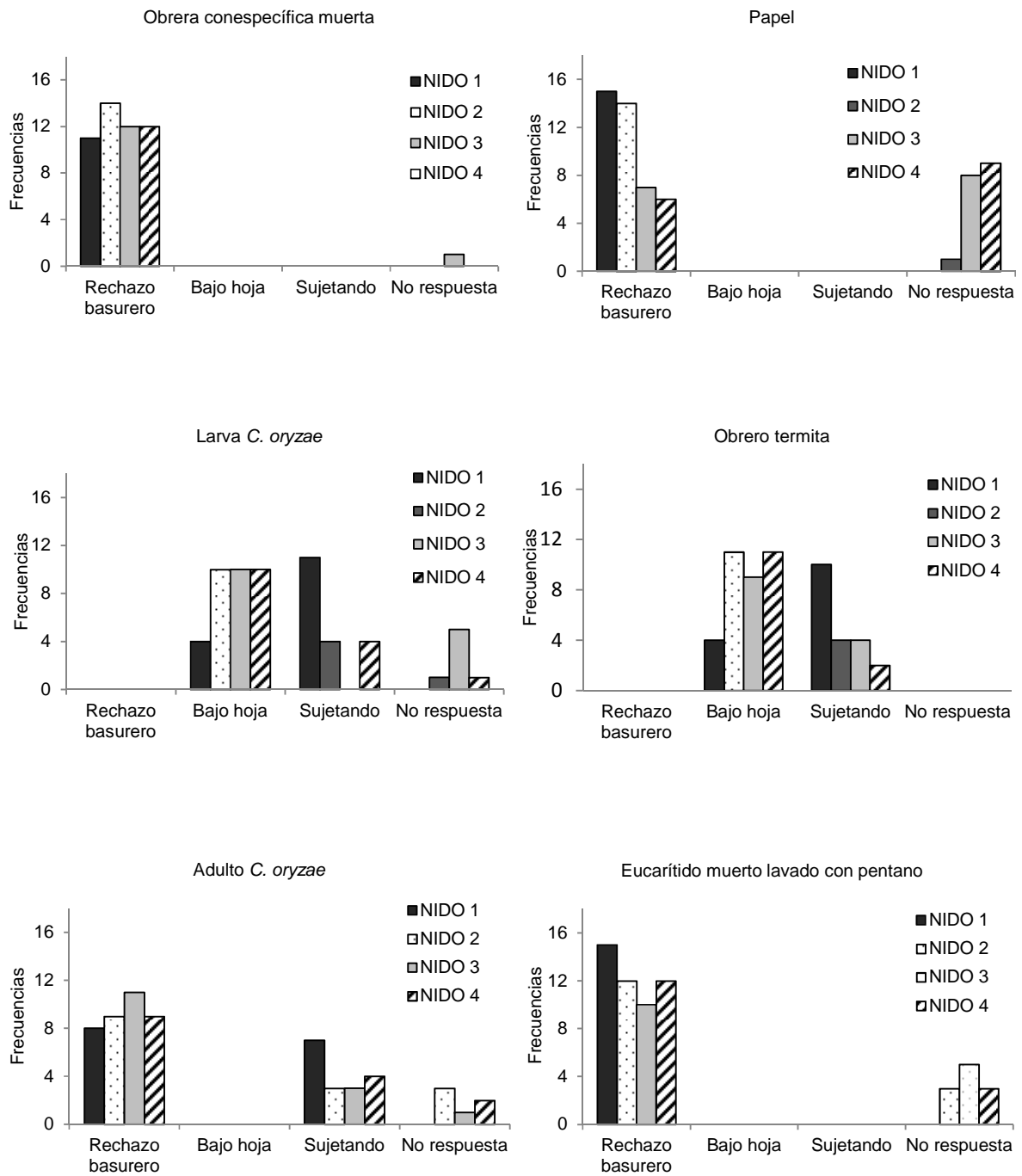


Figura 7. Variabilidad de la respuesta de las obreras de 4 nidos de *E. tuberculatum* ante diferentes tipos de intrusos. Decisión final del lugar donde quedó el intruso después de transcurridos 15 min.

### 5.1.2 Latencia y tiempo de manipulación y transporte

La latencia varía en función del tipo de intruso (Modelo lineal de efectos mixtos,  $\chi^2 = 131.46$ ;  $g.l. = 5$ ;  $p < 0.001$ ). Los intrusos cuya detección necesitó más tiempo fueron las larvas de *C. oryzae* ( $2.05 \pm 0.22$  min, Figura 8) y los eucarítidos muertos ( $1.23 \pm 0.14$  min), aunque ambos tratamientos difieren significativamente entre sí y con el resto de los tratamientos. Por el contrario, los intrusos que fueron detectados más rápidamente fueron las obreras conespecíficas muertas ( $0.50 \pm 0.03$  min) y las bolitas de papel ( $0.68 \pm 0.06$  min), cuyos promedios no difieren significativamente. En el caso de obreros de termitas y de adultos vivos de *C. oryzae* se necesitaron  $0.75 \pm 0.06$  min y  $0.86 \pm 0.10$  min, respectivamente (Figura 8).

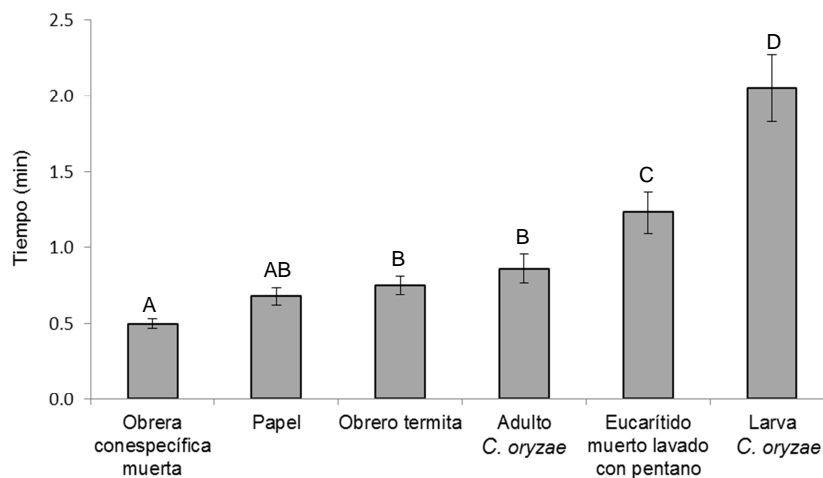


Figura 8. Latencia promedio en la detección de diferentes intrusos por obreras de *E. tuberculatum*. Las barras representan el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .

Así mismo, se presentaron diferencias significativas en cuanto al tiempo necesario para manipular y transportar a los diferentes intrusos (Modelo lineal de efectos mixtos,  $\chi^2 = 103.65$ ;  $g.l. = 5$ ;  $p < 0.001$ ). Se observó que las termitas requirieron

de más tiempo de manipulación y transporte ( $6.82 \pm 0.62$  min), presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Por el contrario, las bolitas de papel filtro fueron rápidamente transportadas ( $1.40 \pm 0.13$  min) y de igual manera presentaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Los adultos y las larvas de *C. oryzae* necesitaron tiempos similares,  $5.54 \pm 0.49$  min y  $6.01 \pm 0.63$  min, respectivamente, y cuyos promedios no difieren significativamente. Mientras que para los adultos muertos de *D. lachaudii* y las obreras conespecíficas muertas se necesitaron  $2.55 \pm 0.32$  min y  $3.94 \pm 0.39$  min, respectivamente y difieren significativamente (Figura 9).

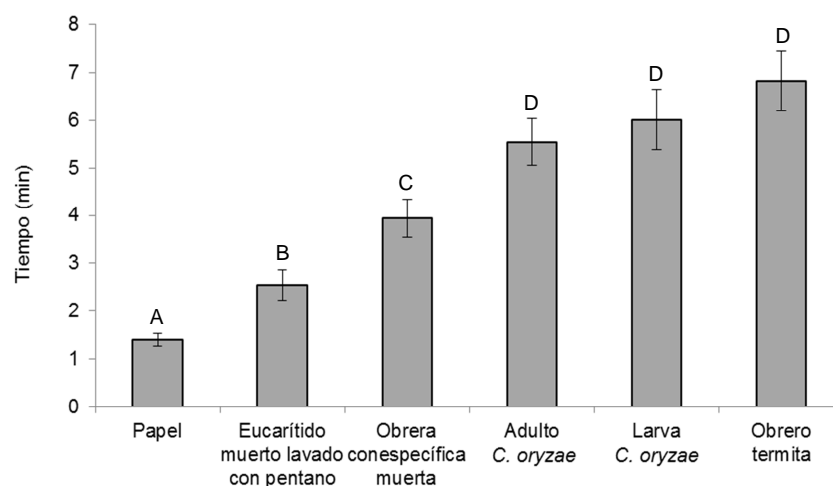


Figura 9. Tiempo de manipulación y transporte promedio de diferentes intrusos por obreras de *E. tuberculatum*. Las barras representan el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .

### 5.1.3 Repertorio comportamental

Se identificaron trece eventos comportamentales diferentes que intervinieron en el rechazo de los intrusos: deambulación, detección por contacto, antenación, golpe

mandibular, sujeta y levanta, transporte, rechazo, flexión del abdomen, tentativa de picadura, falla, abandono, robo e inmovilización (Cuadro 2). De acuerdo con el tipo de intruso, las secuencias comportamentales fueron más o menos complejas (Figuras 10 a 16).

Cuadro 2. Repertorio comportamental de obreras de *E. tuberculatum*. Eventos comportamentales observados durante el rechazo de intrusos:

<b>Evento comportamental</b>	<b>Descripción del evento</b>
Deambulación	Las hormigas deambulan aparentemente sin objetivo fijo dentro del nido experimental.
Detección por contacto	Durante la deambulación por el nido, las obreras hacen contacto directo con el intruso.
Antenación	La hormiga realiza golpes repetidos sobre el intruso con sus antenas (exploración del intruso con las antenas).
Golpe mandibular	La hormiga cierra rápidamente las mandíbulas para capturar al intruso.
Sujeta y levanta	La hormiga agarra y levanta al intruso entre sus mandíbulas.
Transporte	La hormiga transporta al intruso, sujetándolo con las mandíbulas.
Rechazo del intruso	La hormiga transporta al intruso, y lo deposita en el basurero dentro o fuera del nido.
Flexión del abdomen	Mientras la hormiga sujeta al intruso entre sus mandíbulas, encorva la parte apical del abdomen.
Tentativa de picadura	Mientras la hormiga sujeta al intruso, encorva la parte apical del abdomen e intenta picarlo.
Falla	Cuando la hormiga no proporciona un golpe mandibular exitoso sobre el cuerpo del intruso, éste sale proyectado a cierta distancia y la hormiga pierde temporalmente la ubicación del intruso.
Abandono	La hormiga interrumpe todo comportamiento relacionado con el intruso y se aleja de éste.
Robo	Cuando una obrera le quita a otra obrera el intruso que mantenía entre las mandíbulas.
Inmovilización	Cuando una obrera se mantiene sin movimiento alguno mientras sujeta al intruso entre las mandíbulas.

#### **5.1.4 Descripción del comportamiento de las obreras de *E. tuberculatum* frente a los diferentes intrusos**

##### **5.1.4.1 Comportamiento de *E. tuberculatum* frente al eucarítido adulto vivo de *D. lachaudii***

Para describir el comportamiento típico de las obreras de *E. tuberculatum* ante los eucarítidos adultos emergidos en el interior del nido, se utilizaron 18 registros de video obtenidos con un mismo nido en el 2006, utilizando la misma metodología que en el presente estudio (Pérez-Lachaud, datos no publicados). Dado que una misma obrera podía encontrar al intruso más de una vez, cada registro puede incluir varias secuencias comportamentales. Se analizó un total de 26 secuencias comportamentales que terminaron en el abandono del intruso o en el reinicio de la secuencia, después de que una obrera realizó el contacto inicial, y 18 secuencias que terminaron en el rechazo del parasitoide. Se distinguieron 16 transiciones comportamentales principales. La secuencia típica en el rechazo del eucarítido fue (Figura 10): deambulación, detección por contacto, golpe mandibular, sujeta y levanta, tentativa de picadura, transporte y rechazo del intruso. La detección por contacto y el golpe mandibular sobre la avispa siempre ocurren de manera casi simultánea, y en 16 ocasiones las obreras intentaron picar a las avispas. En cuatro registros se presentó robo del intruso de una obrera a otra.

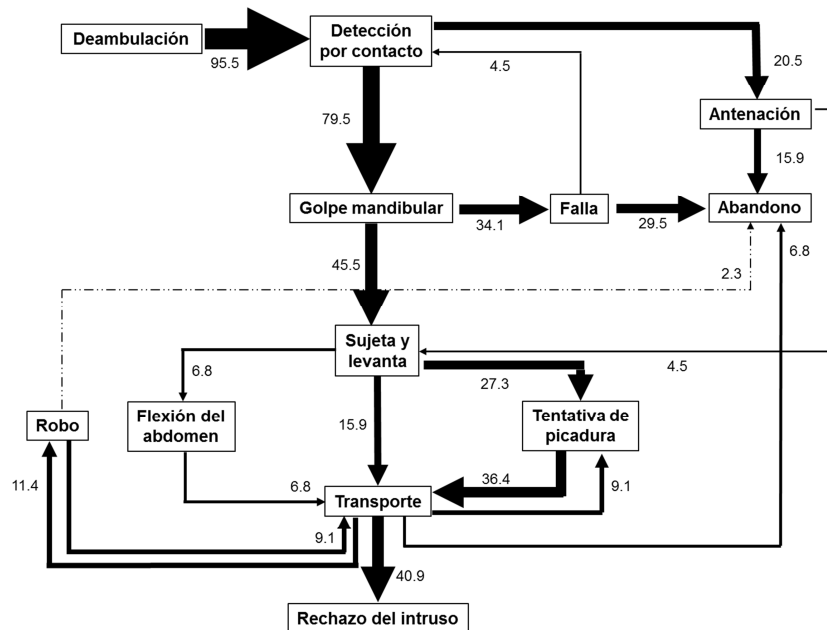


Figura 10. Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de *E. tuberculatum* frente al eucarítido vivo *D. lachaudii*. El ancho de las flechas corresponde a la frecuencia de transiciones entre comportamientos sucesivos, dividido entre el número total de secuencias del inicio (detección por contacto) expresado en porcentajes. Líneas punteadas representan valores menores a 3%. El diagrama corresponde a 44 secuencias.

#### 5.1.4.2 Comportamiento de *E. tuberculatum* frente a eucarítidos sin olor

Para evaluar la hipótesis del posible mimetismo químico y/o insignificancia en los parasitoides, se utilizaron eucarítidos adultos muertos de *D. lachaudii* en ausencia completa de olores. En la mayoría de las observaciones la primera obrera que detecta por contacto al intruso no procede a su rechazo, sino que explora repetidamente al intruso con las antenas. Se analizó un total de 213 secuencias comportamentales que terminaron en el abandono del intruso o el reinicio de la secuencia después de que la obrera realizó el contacto inicial y la antenación, y 49 secuencias que terminaron en rechazo, mientras que 11 intrusos no fueron rechazados en los 15 minutos de la

observación, sin embargo, si se presentó reconocimiento por antenación por parte de las obreras. Se distinguieron 11 transiciones comportamentales principales. La secuencia típica en el rechazo del eucarítido muerto fue (Figura 11): deambulación, detección por contacto, antenación, sujeta y levanta, transporte y rechazo del intruso. En este caso, la antenación prolongada del intruso siempre sucede a la detección por contacto.

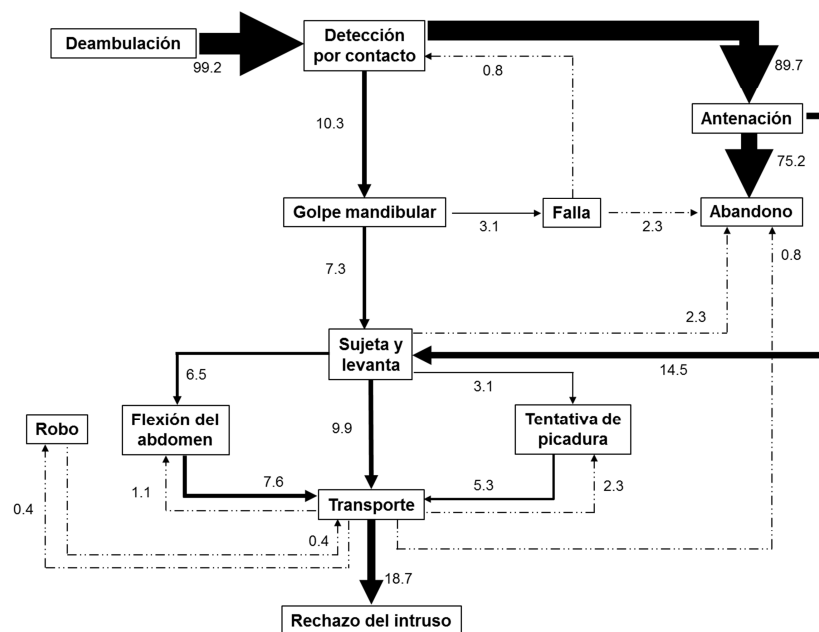


Figura 11. Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de *E. tuberculatum* frente al eucarítido muerto (lavado con pentano) *D. lachaudii*. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 262 secuencias.

En cada observación, la avispa muerta fue detectada por contacto por un promedio de  $5 \pm 0.33$  SEM obreras (rango: 1 a 11 obreras). Por lo general, la segunda obrera en hacer contacto es la que realizó el rechazo del intruso (valor modal, 13 casos / 49), y en su transporte participa en general solamente  $1 \pm 0.05$  obrera (rango: 1 a 3).

### 5.1.4.3 Comportamiento de *E. tuberculatum* frente a intrusos no comestibles

Se utilizaron adultos de *C. oryzae* vivos, para evaluar si su estructura cuticular rígida impide el ataque de las obreras. De los 60 intrusos que se presentaron, 6 no provocaron el transporte por parte de las obreras, sin embargo, si se observó un reconocimiento por antenación. Se analizó un total de 222 secuencias comportamentales que terminaron en el abandono del intruso o el reinicio de la secuencia después de que una obrera realizó el contacto inicial, y 39 secuencias que terminaron en rechazo. En 15 casos las observaciones finalizaron mientras las obreras se encontraban inmóviles y con el intruso entre las mandíbulas. Se distinguieron 13 transiciones comportamentales principales. La secuencia típica en el rechazo del curculiónido vivo fue (Figura 12): deambulación, detección por contacto, golpe mandibular, sujeta y levanta, tentativa de picadura, transporte y rechazo del intruso.

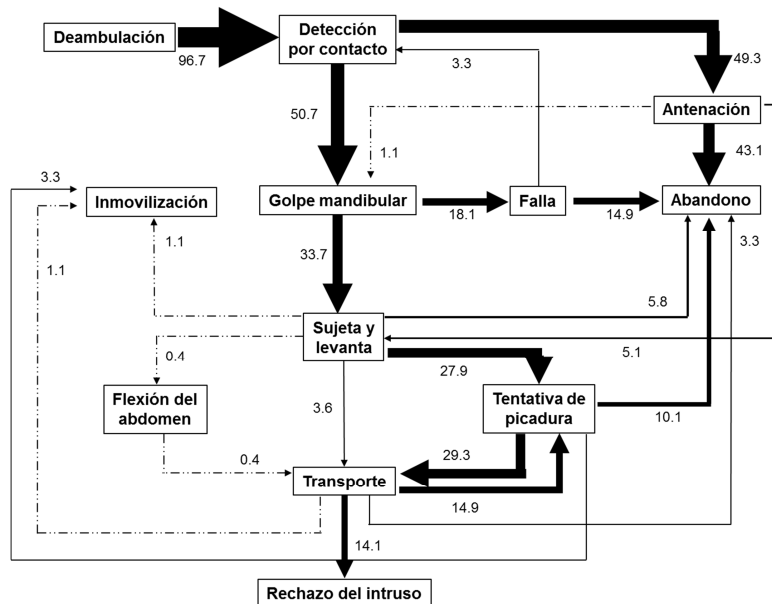


Figura 12. Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de *E. tuberculatum* frente al curculiónido vivo *C. oryzae*. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 276 secuencias.



Para cada observación, un promedio de  $5 \pm 0.32$  obreras (rango: 1 a 12) detecta por contacto al intruso. Por lo general, la segunda obrera en hacer contacto es la que realizó el rechazo del intruso (14 casos / 54), y en el transporte principalmente participa  $1 \pm 0.06$  obrera (rango: 1 a 2).

#### **5.1.4.4 Comportamiento de *E. tuberculatum* frente a presas potenciales**

Para conocer el comportamiento de las obreras ante presas potenciales encontradas dentro del nido, y evaluar si los parasitoides son reconocidos como presas o no, se utilizaron larvas de *C. oryzae* (presa con poco movimiento) y obreros de termitas *Nasutitermes* sp (presa con movimiento). De las 60 larvas de *C. oryzae* que se presentaron, 7 no provocaron el transporte por parte de las obreras, sin embargo, si se observó un reconocimiento por antenación. Se analizó un total de 160 secuencias comportamentales que terminaron en el abandono del intruso o el reinicio del comportamiento de contacto después de que la obrera realizó el contacto inicial. Además, 34 secuencias terminaron en el transporte del intruso bajo la hoja donde se encontraba la reina y las crías y 19 secuencias finalizaron con la obrera inmóvil y manteniendo al intruso entre sus mandíbulas. Se distinguieron 17 transiciones comportamentales principales. La secuencia típica en el caso de las larvas de *C. oryzae* fue (Figura 13): deambulación, detección por contacto, golpe mandibular, sujeta y levanta, tentativa de picadura, transporte y rechazo del intruso (depósito bajo la hoja). Las obreras picaron a las larvas ocasionando su muerte.

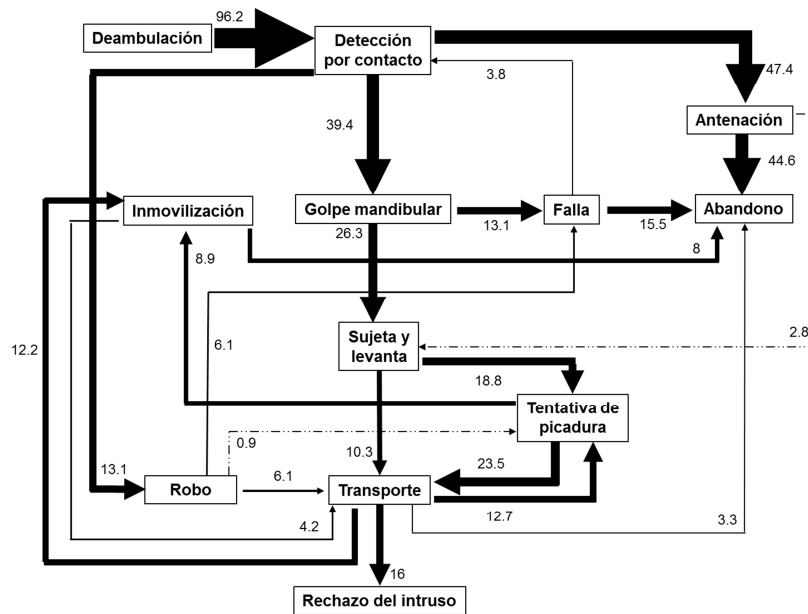


Figura 13. Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de *E. tuberculatum* frente a larvas de *C. oryzae*. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 213 secuencias.

Para cada observación,  $3 \pm 0.23$  obreras (rango: 1 a 9) en promedio detectan por contacto a la larva del curculiónido. Por lo general, la primera obrera en hacer contacto es la que lo levanta y lo transporta (26 casos / 53), y en el transporte principalmente participan  $2 \pm 0.07$  obreras (rango: 1 a 3).

En el caso de los obreros de termitas *Nasutitermes* sp., cinco observaciones no concluyeron por lo que no se utilizaron para los análisis estadísticos, sin embargo, si se observó un reconocimiento por antenación por lo que para la construcción de los diagramas de flujo si fueron tomados en cuenta. Se analizó un total de 731 secuencias comportamentales que terminaron en el abandono del intruso después de que la obrera realizó el contacto inicial. Además, 35 secuencias terminaron en el transporte del intruso bajo la hoja y 20 secuencias finalizaron con la obrera inmóvil y manteniendo al

intruso entre sus mandíbulas. Se observaron la mayoría de los eventos comportamentales principales observados en el caso de las larvas de *C. oryzae*. Se distinguieron 11 transiciones comportamentales principales. La secuencia típica en el caso de las larvas de *C. oryzae* fue (Figura 14): deambulación, detección por contacto, golpe mandibular, sujeta y levanta, tentativa de picadura, transporte y rechazo del intruso.

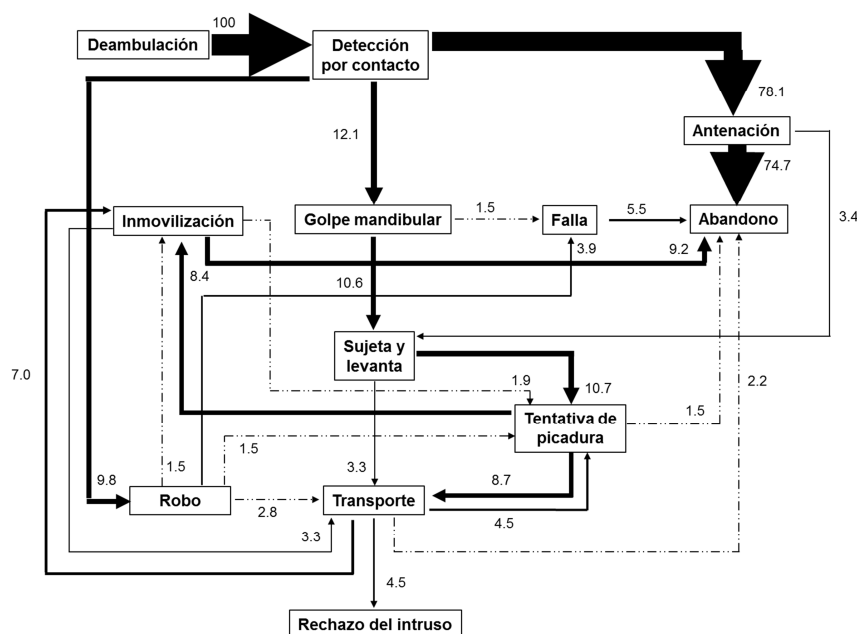


Figura 14. Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de *E. tuberculatum* frente a obreros de termitas *Nasutitermes* sp. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 786 secuencias.

Para cada observación,  $14 \pm 0.90$  obreras (rango: 1 a 35) en promedio detectan por contacto al obrero de termita. Por lo general, la primera obrera en hacer contacto es la que realizó el rechazo del intruso (43 casos / 55), y en su transporte participa en general  $3 \pm 0.16$  obreras.

#### **5.1.4.5 Comportamiento de *E. tuberculatum* frente a obreras muertas (necroforesis)**

Se utilizaron obreras conespecíficas muertas, para evaluar posibles diferencias o semejanzas entre el comportamiento de las obreras ante una obrera de su misma especie muerta y ante los eucarítidos. Se analizó un total de 1165 secuencias comportamentales que terminaron en el abandono del intruso y 59 secuencias que terminaron en su rechazo (10 de estos registros sobrepasaron el tiempo establecido de observación, sin embargo, para la construcción de los diagramas de flujo fueron tomados en cuenta), mientras que en 1 caso no hubo transporte por parte de las obreras, sin embargo, si se presentó un reconocimiento por antenación. Se distinguieron 2 transiciones comportamentales principales, lo que denota una respuesta directa de las obreras. La secuencia típica en el rechazo de la obrera conespecífica fue (Figura 15): deambulación, detección por contacto, antenación, sujeta y levanta, transporte y rechazo del intruso.

Para cada observación, un promedio de  $20 \pm 1.54$  (rango: 2 a 54) obreras tienen contacto con la obrera muerta. En un mayor número de casos la novena obrera en hacer contacto es la que realizó el rechazo (5 casos / 49), y en el transporte principalmente participa  $1 \pm 0.05$  obrera (rango: 1 a 2), aunque en algunos casos dos obreras transportaron al mismo tiempo la obrera muerta hacia el exterior del nido.

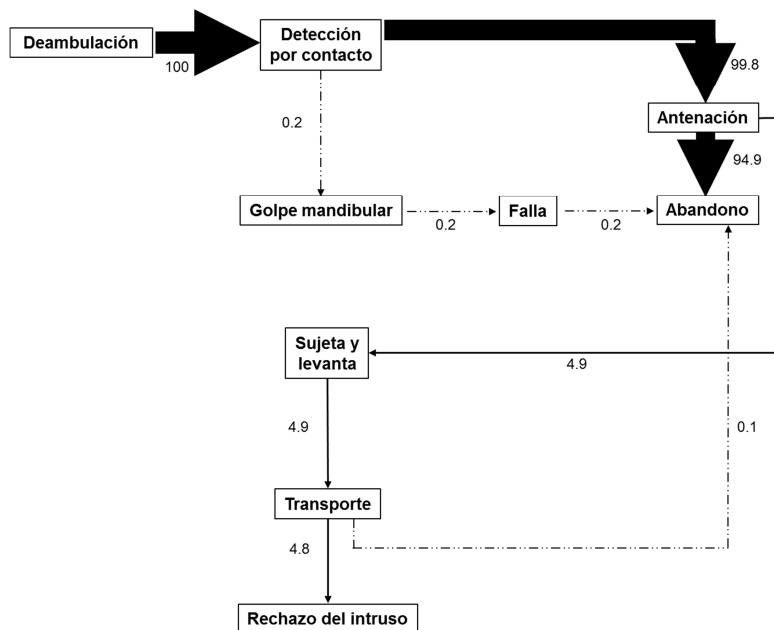


Figura 15. Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de *E. tuberculatum* frente a obreras conespecíficas muertas. Ver más explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 1224 secuencias.

#### 5.1.4.6 Comportamiento de *E. tuberculatum* frente a objetos inertes (insignificancia química)

Se utilizaron bolitas de papel filtro para evaluar la respuesta de las obreras ante objetos inertes. Se analizó un total de 575 secuencias comportamentales que terminaron en el abandono del intruso después de que la obrera realizó el contacto inicial, y 42 secuencias que terminaron en su rechazo, mientras que 18 bolitas de papel no generaron el transporte por parte de las obreras en los 15 minutos de la observación, sin embargo, si se observó reconocimiento por antenación. Se distinguieron 5 transiciones comportamentales principales. La secuencia típica en el rechazo de la

bolita de pape fue (Figura 16): deambulaci3n, detecci3n por contacto, atenci3n, sujeta y levanta, transporte y rechazo del intruso.

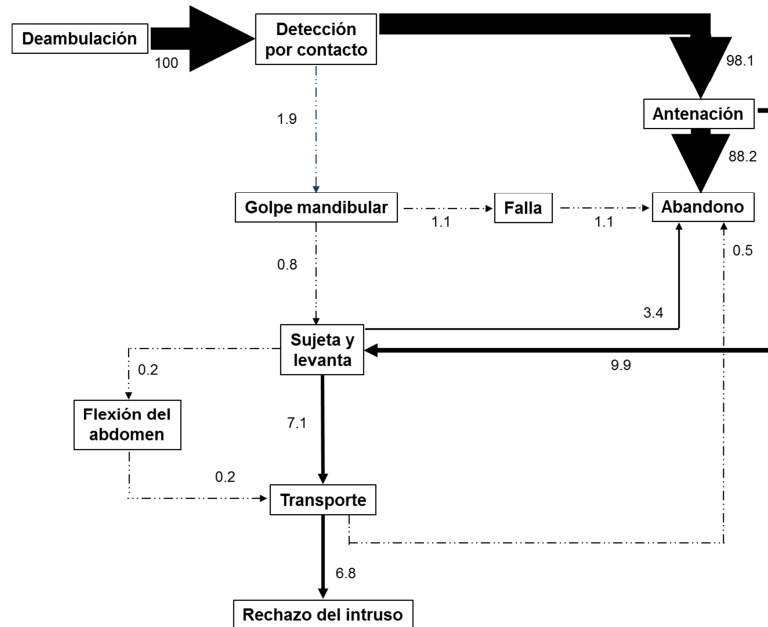


Figura 16. Diagrama de flujo de la secuencia comportamental de obreras de *E. tuberculatum* frente a bolitas de papel filtro. Ver m3s explicaciones en la Figura 10. El diagrama corresponde a 617 secuencias.

Para cada observaci3n, un promedio de  $11 \pm 0.81$  (rango: 1 a 26) obreras tienen contacto con la bolita de papel filtro. Por lo general, la tercera obrera en hacer contacto es la que realiz3 el rechazo del intruso (5 casos / 42), y en el transporte 3nicamente participa  $1 \pm 0.04$  obrera (rango: 1 a 2).

## 5.2 Estudio del comportamiento de especializaci3n

Los resultados del experimento de especializaci3n se presentan en el Anexo 2 como un manuscrito individual sometido para su publicaci3n a la revista *Ethology*.

## 6. DISCUSIÓN GENERAL

### 6.1 Estudio del rechazo de diferentes elementos ajenos a la colonia

En este trabajo se utilizaron diferentes modelos de intrusos para tratar de determinar el o los estímulos que intervienen en el rechazo de los eucarítidos por obreras de *E. tuberculatum* y para poner a prueba algunas de las hipótesis sugeridas para explicar su rechazo del nido sin agresividad. Los modelos de intrusos elegidos representan objetos novedosos en el nido, altamente visibles y con características químicas, morfológicas o estructurales semejantes o no a las de los eucarítidos.

Los resultados demuestran que el comportamiento de las obreras de *E. tuberculatum* ante diferentes objetos o intrusos encontrados en el interior del nido es estereotipado y que la respuesta es específica para cada tipo. Con base en el comportamiento de las obreras se pudieron distinguir dos grupos: un primer grupo constituido por las larvas del curculiónido y los obreros de termitas, quienes fueron reconocidos como presas; y un segundo grupo, constituido por los individuos y objetos del resto de los tratamientos, que si fueron reconocidos como intrusos o agentes extraños a la colonia o potencialmente patógenos, y que fueron transportados al basurero del nido o directamente al exterior (zona de forrajeo).

La respuesta de las obreras ante presas potenciales (larvas de curculiónido y termitas obrero) encontradas en el interior del nido difiere completamente de la respuesta observada ante eucarítidos vivos, además de que las presas siempre fueron llevadas bajo la hoja donde se encontraban la reina y la cría. Observaciones adicionales permitieron corroborar que estos tipos de intrusos eran utilizados como alimento para

las larvas de hormiga. La captura de estas presas presentó con mucha recurrencia la picadura, comportamiento frecuente entre las ponerinas (Hölldobler y Wilson, 1990), y componente importante de la secuencia comportamental de *Odontomachus troglodytes* Santschi cuando se enfrenta a termitas (Dejean, 1980).

En el caso del eucarítido vivo, las obreras realizaron con mucha recurrencia el golpe mandibular y la tentativa de picadura, dos eventos que denotan agresividad; sin embargo, en un solo caso se produjo la muerte del parasitoide (Pérez-Lachaud, datos no publicados). La secuencia comportamental de las obreras de *E. tuberculatum* ante los adultos vivos del curculiónido *C. oryzae* incluyó estos dos comportamientos agresivos, y la respuesta fue muy similar a la observada ante los eucarítidos vivos, aunque en ningún caso se causó la muerte del curculiónido. Es muy probable que la estructura cuticular rígida tanto en el curculiónido como en los eucarítidos, represente una defensa exitosa que les permite salir libre de daños de la interacción con las hormigas, aunque no está exenta de riesgo. Esta defensa estructural también se ha reportado en el escarabajo *Myrmecophodius excavaticollis* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) cuyo exoesqueleto blindado le permite sobrevivir al ataque de las obreras de la hormiga *Solenopsis invicta* Buren y permanecer dentro del nido y así poder adquirir el olor de la colonia de su hospedero (Vander Meer y Wojcik, 1982).

El uso de eucarítidos muertos y sin olor como modelo de intruso permitió evaluar la hipótesis del mimetismo químico y/o la posible insignificancia química de los eucarítidos manteniendo constante la forma, pero eliminando el olor y el movimiento. En este caso, las obreras de *E. tuberculatum* presentaron una respuesta muy contrastante



con lo ocurrido ante los parasitoides vivos, observándose una exploración prolongada del intruso (antenación) y la casi desaparición del golpe mandibular y de la tentativa de picadura en la secuencia comportamental. A pesar de carecer de olor, los eucarítidos lavados con pentano continuaron siendo considerados como intrusos y fueron transportados al exterior del nido.

La respuesta de las obreras ante las bolitas de papel (objeto inerte) y ante las obreras conespecíficas muertas (potencialmente patógenas) fue muy semejante a la observada cuando el intruso era un eucarítido lavado con hexano. En estos tres casos, con intrusos inmóviles pero que difieren en las señales químicas que pueden ser percibidas, las obreras de *E. tuberculatum* exploraron repetidamente los intrusos con sus antenas y en muy pocas ocasiones realizaron golpes mandibulares o tentativas de picadura. Lo anterior refleja una baja agresividad por parte de las obreras de *E. tuberculatum* ante organismos/objetos sin movimiento. Sin embargo, las hormigas sí discriminan entre estos dos intrusos. En un 30% de los casos no hubo respuesta por parte de las obreras ante las bolitas de papel, además, de que fueron transportadas frecuentemente (30%) al basurero interno, lo cual sugiere que no fueron reconocidos como objetos potencialmente patógenos o de peligro para la colonia. Por el contrario, todas las obreras conespecíficas muertas fueron rechazadas del nido. Cabe señalar que los cadáveres de hormigas conespecíficas fueron detectados por contacto por un número mayor de obreras y generaron la respuesta más directa en las obreras. Es probable que el ácido oleico que liberan los cuerpos en descomposición (Akino y Yamaoka, 1996) ocasionara una respuesta más rápida y directa en las obreras de *E. tuberculatum*.

La ausencia de agresividad o agresividad reducida de las obreras del hospedero es una característica clave en el mimetismo químico por intrusos. Por ejemplo, Vander Meer et al. (1989b) señalaron que el eucarítido *Orasema xanthopus* (Cameron) (Heraty et al., 1993) presenta el mismo perfil de hidrocarburos cuticulares que su hospedera, la hormiga *S. invicta*, por lo que es tolerado por las obreras dentro del nido. De igual manera, se ha sugerido la existencia de un posible mimetismo químico en los parasitoides *I. coronata* y *D. lachaudii* pues los perfiles de hidrocarburos cuticulares de las avispas se asemejan al de *E. tuberculatum*, su hormiga hospedera, (Bartolo-Reyes, 2006; Quiroa-Montalván, 2006). Sin embargo, aunque las obreras de *E. tuberculatum* transportan a los parasitoides eucarítidos hacia el exterior del nido sin daño aparente (Lachaud et al., 1988; Howard et al., 2001), sí presentan comportamientos que denotan cierta agresividad ante los eucarítidos vivos como son los golpes mandibulares y las tentativas de picar (ver Figura 10). Esto sugiere que las obreras reconocen a los parasitoides como organismos intrusos por lo que la hipótesis de un mimetismo químico no explica el rechazo de los parasitoides.

Por otro lado, se ha sugerido una supresión de las señales químicas de reconocimiento o insignificancia química en insectos mirmecófilos como mecanismo de integración a las colonias de su hospedero, por ejemplo en el caso de los ácaros, moscas fóridos y caracoles encontrados en los nidos de la hormiga *Leptogenys distinguenda* (Emery) (Witte et al., 2008). En el caso de los eucarítidos, la hipótesis de la insignificancia química tampoco parece explicar el comportamiento de las obreras, pues los parasitoides desprovistos de hidrocarburos cuticulares y las bolitas de papel también son rechazados del nido. Además, la exploración prolongada que contrasta con

el golpe mandibular súbito ante los eucarítidos vivos sugiere que los estímulos que generan el reconocimiento de los parasitoides vivos como intrusos si son de naturaleza química.

En general, nuestros resultados sugieren una respuesta muy flexible de las obreras de *E. tuberculatum* ante organismos ajenos a su colonia. Se sabe que las hormigas ajustan su respuesta (repertorio de comportamientos) durante la depredación de acuerdo con las características de su presa (e.g. *Smithistruma*, Dejean, 1985; *Odontomachus*, De la Mora et al., 2008). De la misma manera, nuestros resultados mostraron un comportamiento de ajuste a las características de los intrusos encontrados. Esta flexibilidad puede tener un valor adaptativo en condiciones naturales donde las hormigas tienen que lidiar con sus enemigos naturales como los parasitoides, y con otros organismos entre ellos individuos homoespecíficos por ejemplo, que irrumpen en los nidos para robar comida (Perfecto y Vandermeer, 1993; Breed et al., 1999).

Otro aspecto interesante es la partición del trabajo, es decir, la división de una tarea en subtareas realizadas por diferentes individuos. Es una adaptación clave que requiere la coordinación a nivel de grupo, y se ha demostrado en varias especies de hormigas y en diferentes contextos, por ejemplo, en *E. ruidum* durante el forrajeo y el transporte de semillas o de presas (Agbogba y Howse, 1992; Schatz et al., 1996). En este estudio, se registraron algunos casos de partición del trabajo durante la manipulación de los adultos vivos del curculiónido y del eucarítido muerto. En seis ocasiones las obreras depositaron a los adultos vivos de *C. oryzae* en el basurero del

nido y una segunda obrera continuó su rechazo hacia el exterior. Lo anterior, también se documentó en cuatro ocasiones para los adultos muertos de *D. lachaudii*. Cabe señalar que el 17.44% de todos los intrusos rechazados finalizaron en el basurero del nido, sin embargo, después de terminado el tiempo de observación establecido, se notó que los intrusos eran transportados hacia el exterior, lo cual podría aumentar el número de casos de partición de la tarea.

## **6.2 Estudio del comportamiento de especialización**

En cuanto a la posible especialización de algunas obreras en el rechazo de intrusos, se demostró que sólo un grupo pequeño de obreras se dedicó a esta tarea, y que la mayor parte de ella fue realizada por sólo dos a cuatro obreras en cada nido (hiper-especialización o elitismo). Los resultados demuestran con claridad la existencia de una especialización en el comportamiento de rechazo de intrusos en *E. tuberculatum*. Este es el primer reporte de especialización en el contexto de rechazo de intrusos en hormigas.

Varias hipótesis se han propuesto para explicar por qué algunas obreras se especializan en una determinada tarea, por ejemplo, la variación morfológica, genotípica y la edad (Robinson et al., 2009), la distribución espacial de los obreras dentro del nido (Arcaute et al., 2009; Robinson et al., 2009), la experiencia individual (Ravary et al., 2007; Franklin et al., 2012) y variaciones en el umbral de respuesta de las obreras (Robinson, 1992; Bonabeau et al., 1996).

Se observó una relación positiva entre el número de encuentros con un intruso y el número de rechazos que una obrera realizó, lo que sugiere que algunas hormigas pueden tener mayores oportunidades de encontrar a los intrusos y/o que son más sensibles (umbral de respuesta más bajo) a los estímulos del intruso. Es probable que las obreras hiper-especialistas, que realizaron hasta 60% de los rechazos en cada nido, presenten un umbral de respuesta hacia algunos estímulos relacionados con los intrusos (movimiento, olor, forma) más bajo que el resto de las obreras, o que la experiencia (a través del refuerzo por los éxitos en el desempeño de la tarea, Deneubourg et al., 1987; Ravary et al., 2007) influyera en la probabilidad de rechazar a los intrusos.

Por otro lado, los datos obtenidos sugieren la existencia de una especialización no sólo en el rechazo de los intrusos, sino también a un nivel más fino, en el tipo de intruso rechazado: algunas obreras únicamente rechazaron a los curculiónidos vivos y otras sólo a las avispas lavadas con pentano. Sin embargo, se requieren más bioensayos para explorar esta posibilidad. Una especialización comportamental semejante en relación a un solo tipo de alimento se ha demostrado en forrajeras de la hormiga *Ectatomma ruidum* Roger, ya que pueden elegir forrajear sobre un solo tipo de alimento cuando otros están disponibles (Passera et al., 1994; Schatz et al., 1995).

Es probable que la experiencia individual influya en la(s) tarea(s) que las obreras desempeñan (Deneubourg et al., 1987; Ravary et al., 2007; Franklin et al., 2012). En el caso de *E. tuberculatum*, se ha demostrado que las obreras aprenden a evitar a su depredador la araña *Nephyla* mediante un condicionamiento en un solo ensayo (Hénaut

et al., 2013), y que son también capaces de realizar un aprendizaje tridimensional durante el forrajeo (Roche-Labarbe et al., 2004), lo que sugiere que estas hormigas pueden aprender algunas características relacionadas con sus depredadores y presas. En este contexto, es posible que la experiencia individual y el refuerzo desempeñen un papel importante en la especialización comportamental en *E. tuberculatum*. Es probable que al principio de los bioensayos, las obreras no respondieran a los estímulos de los intrusos (no tenían una tendencia a realizar esa tarea), pero que a medida que se encontraban con más intrusos, la probabilidad de efectuar el rechazo fue mayor.

## 7. CONCLUSIONES

El comportamiento de las obreras de *E. tuberculatum* fue específico según el tipo de intruso. Las obreras de esta hormiga exhibieron una flexibilidad en cuanto a su repertorio comportamental.

La secuencia típica de las obreras ante el eucarítido vivo de *D. lachaudii* presentó mayor relación con la secuencia comportamental observada con el adulto vivo de *C. oryzae*.

Se observó una posible partición del trabajo relacionado con el rechazo de los intrusos, es decir, el transporte de un intruso por más de una obrera.

Algunas obreras retiraron al intruso con más frecuencia de lo esperado al azar lo que indica una fuerte especialización de estas obreras en esta tarea. Un grupo de 7 u 8 obreras por nido fue identificado como especialistas en el rechazo de intrusos.

Dentro de las obreras especializadas de cada colonia se detectó un subconjunto de individuos con un mayor grado de especialización (hiper-especialistas), quienes realizaron 60% de los rechazos.

Es el primer reporte que demuestra la especialización e hiperespecialización comportamental en el rechazo de intrusos.

## 8. LITERATURA CITADA

- Agbogba, C. y Howse, P.E., 1992.** Division of labour between foraging workers of the ponerine ant *Pachycondyla caffraria* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, 39, pp. 455-458.
- Akino, T. y Yamaoka, R., 1996.** Origin of oleic acid: corpse recognition signal in the ant, *Formica japonica* Motschlsky (Hymenoptera:Formicidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 40, pp. 265-271.
- Arcaute, E., Christensen, K., Sendova-Franks, A., Dahl, T., Espinosa, A. y Jensen, H.J., 2009.** Division of labour in ant colonies in terms of attractive fields. *Ecological Complexity*, 6 (4), pp. 396-402.
- Bagnères, A.-G. y Lorenzi, M.-C., 2010.** Chemical deception/mimicry using cuticular hydrocarbons. En: G.J. Blomquist, y A.-G. Bagnères, eds. 2010. Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology. Cambridge University Press, pp. 282–323.
- Banschbach, V.S., Brunelle, A., Bartlett, K.M., Grivetti, J.Y. y Yeamans, R.L., 2006.** Tool use by the forest ant *Aphaenogaster rudis*: ecology and task allocation. *Insectes Sociaux*, 53 (4), 463 – 471.
- Barbero, F., Patricelli, D., Witek, M., Balleto, E., Casacci, L.P., Sala, M. y Bonelli, S., 2012.** *Myrmica* ants and their butterfly parasites with special focus on the acoustic communication. *Psyche*, 2012, Article 725237, pp. 11.
- Barbero, F., Thomas, J.A., Bonelli, S., Balleto, E. y Schönrogge, K., 2009.** Queen ants make distinctive sounds that are mimicked by a butterfly social parasite. *Science*, 323 (5915), pp. 782-785.



- Bartolo-Reyes, J.C., 2006.** Identificación de hidrocarburos cuticulares de *Dilocantha lachaudii* (Hymenoptera: Eucharitidae), y de su huésped, *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae). Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Tehuacán, pp. 43.
- Beshers, S.N. y Fewell, J.H., 2001.** Models of division of labor in social insects. *Annual Review of Entomology*, 46, 413–440.
- Bonabeau, E., Theraulaz, G. y Deneubourg, J.L., 1996.** Quantitative study of the fixed threshold model for the regulation of division of labour in insect societies. *Biological Sciences*, 263, pp. 1565-1569.
- Breed, M.D., 2003.** Nestmate recognition assays as a tool for population and ecological studies in eusocial insects: a review. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 76 (4), pp. 539-550.
- Breed, M.D., McGlynn, T.P., Stocker, E.M. y Klein, A.N., 1999.** Thief workers and variation in nestmate recognition behavior in a ponerine ant, *Ectatomma ruidum*. *Insectes Sociaux*, 46, pp. 327-331.
- Brown, W.L., Jr. 1958.** Contributions toward a reclassification of the Formicidae. II. Tribe Ectatommini (Hymenoptera). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard University*, 118, pp. 173–362.
- Buczowski, G. y Silverman, J., 2006.** Geographical variation in Argentine ant aggression behaviour mediated by environmentally derived nestmate recognition cues. *Animal Behavior*, 71, pp. 327–335.
- Calabi, P. y Traniello, J.F.A., 1989.** Social organization in the ant *Pheidole dentata*. Physical and temporal caste ratios lack ecological correlates. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 24, pp. 69–78.

- Calderone, N.W. y Page Jr., R.E., 1991.** Evolutionary genetics of division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *The American Naturalist*, 138, pp. 69–92.
- Cammaerts, M.-C., 2007.** Perspective vision in workers of *Myrmica sabuleti* Meinert, 1861 (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 10, pp. 21-26.
- Carey, B., Visscher, K. y Heraty, J., 2012.** Nectary use for gaining access to an ant host by the parasitoid *Orasema simulatrix* (Hymenoptera, Eucharitidae). *Journal of Hymenoptera Research* 27, pp. 47–65. doi: 10.3897/JHR.27.3067.
- Carroll, C.R. y Janzen, H.D., 1973.** Ecology of foraging by ants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4, 231-257.
- Clausen, C.P., 1940.** The oviposition habits of the Eucharidae (Hymenoptera). *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 30 (12), pp. 504-516.
- Clausen, C.P., 1941.** The habits of the Eucharidae. *Psyche*, 48 (2-3), pp. 57-69.
- Cook, O.F., 1904.** An enemy of the cotton-boll-weevil. *Science*, 19 (492), pp. 862-864.
- Cook, O.F., 1905.** The social organization and breeding habits of the cotton protecting Kelep of Guatemala. U.S.D.A. Technical Series N°10 , pp. 1-55.
- Corbara, B., Lachaud, J.-P. y Fresneau, D., 1989.** Individual variability, social structure and division of labour in the ponerine ant *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera, Formicidae). *Ethology*, 82, pp. 89–100.
- Crosland, M.W.J., 1990.** Variation in ant aggression and kin discrimination ability within and between colonies. *Journal of Insect Behavior*, 3, pp. 359–379.
- d'Ettorre, P. y Lenoir, A., 2010.** Nestmate recognition. En: L. Lach, C.L. Parr y K.L. Abbott, eds. *Ant ecology*. 2010. Oxford University Press, Oxford, pp. 194-209.

- De La Mora, A., Pérez-Lachaud, G. y Lachaud, J.-P., 2008.** Mandible strike: the lethal weapon of *Odontomachus opaciventris* against small prey. *Behavioural Processes*, 78, pp. 64-75.
- Dejean, A., 1980.** Étude comparée du comportement de prédation d'une fourmi primitive: *Odontomachus troglodytes* (Formicidae, Ponerinae) et de trois fourmis de la tribu des Dacetini: *Strumygenys rufobrunea*, *Serrastruma serrula*, *Smithistruma emarginata* (Formicidae, Myrmicinae) en présence de leur proie habituelle (termites pour les *Odontomachus*, collemboles pour les Dacetines). *Bulletin intérieur de la Société Française pour l'Étude du Comportement Animal*, 1980, pp. 43-59.
- Dejean, J., 1985.** Étude éco-éthologique de la prédation chez les fourmis du genre *Smithistruma* (Formicidae, Myrmicinae, Dacetini). II. La capture des proies chez *S. emarginata*. *Insectes Sociaux*, 32, pp. 241-256.
- Dejean, A. y Lachaud, J.-P., 1992.** Growth-related changes in predation behavior in incipient colonies of the ponerine ant *Ectatomma tuberculatum* (Olivier). *Insectes Sociaux*, 39 (2), pp. 129-143.
- Deneubourg, J.L., Goss, S., Pasteels, J.M., Fresneau, D., y Lachaud, J.-P., 1987.** Self-organization mechanisms in ant societies. II. Learning in foraging and division of labor. En: J.M. Pasteels y J.L. Deneubourg, eds. 1987. From Individual to Collective Behavior in Social Insects: les Treilles Workshop, (Basel: Birkhauser), pp. 177–196.
- Dettner, K. y Liepert, C., 1994.** Chemical mimicry and camouflage. *Annual Review of Entomology*, 39, pp. 129-154.

- Diez, L., Deneubourg, J.-L. y Detrain, C., 2012.** Social prophylaxis through distant corpse removal in ants. *Naturwissenschaften*, 99 (10), pp. 833–842.
- Diez, L., Deneubourg, J.-L., Hoebeke, L. y Detrain, C., 2011.** Orientation in corpse-carrying ants: memory or chemical cues?. *Animal Behaviour*, 81 (6), pp. 1171-1176.
- Donisthorpe, H.St.J.K., 1927.** The guests of British ants. Their habits and life-histories. George Routledge and Sons, London. pp. 244.
- Duffield, R.M., 1981.** Biology of *Microdon fuscipennis* (Diptera: Syrphidae) with interpretations of the reproductive strategies of *Microdon* species found north of Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 83 (4), pp. 716-724.
- Fagen, M.R. y Young, D.Y., 1978.** Temporal patterns of behavior: durations, intervals, latencies, and sequences. En: P.W. Colgan, ed. *Quantitative Ethology*. John Wiley & Sons, New York. pp. 79-114.
- Fénéron, R., 1993.** Ethogenèse et reconnaissance interindividuelle: influence de l'expérience précoce chez une fourmi ponérine (*Ectatomma tuberculatum* Olivier). PhD thesis Université Paris 13, Paris, Francia. pp.142.
- Fénéron, R., 1996.** A new ethological test to study nestmate recognition in adult ants. *Insectes Sociaux*, 43 (2), pp. 131-135.
- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J.K. y Wcislo, W.T., 2006.** *Acanthopria* and *Mimopriella* parasitoid wasps (Diapriidae) attack *Cyphomyrmex* fungus-growing ants (Formicidae, Attini). *Naturwissenschaften*, 93 (1), pp. 17–21.
- Fiedler, K. y Hagemann, D., 1992.** The influence of larval age and ant number on myrmecophilous interactions of the African grass blue butterfly, *Zizeeria knysna*

(Lepidoptera: Lycaenidae). *Journal of Research on the Lepidoptera*, 31 (3-4), pp. 213-232.

**Fiedler, K., Hölldobler, B. y Seufert, P., 1996.** Butterflies and ants: the communicative domain. *Experientia*, 52 (1), pp. 14-24.

**Franklin, E.L., Robinson, E.J.H., Marshall, J.A.R., Sendova-Franks, A. y Franks, N.R., 2012.** Do ants need to be old and experienced to teach? *The Journal of Experimental Biology*, 215, pp. 1287-1292.

**Galwey, N. W., 2006.** Introduction to Mixed Modeling: Beyond Regression and Analysis of Variance. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

**Giray, T. y Robinson, G.E., 1994.** Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 35, pp. 13–20.

**Gordon, D., 2003.** The organization of work in social insect colonies. Task allocation as an ad hoc, dynamical network. *Complexity*, 8, pp. 43–46.

**Gordon, D.M., Guetz, A., Greene, M.J. y Holmes, S., 2011:** Colony variation in the collective regulation of foraging by harvester ants. *Behavioral Ecology*, 22, pp. 429–435.

**Haynes, K.F. y Yeorgan, K.V., 1999.** Exploitation of intraspecific communication systems: illicit signalers and receivers. *Annals of the Entomological Society of America*, 92 (6), pp. 960-970.

**Hénaut, Y., Machkour-M'Rabet, S. y Lachaud, J.-P., 2013.** The role of learning in risk-avoidance strategies during spider–ant interactions. *Animal Cognition*, 10.1007/s10071-013-0651-x.

- Heraty, J.M., 1985.** A revision of the Nearctic Eucharitinae (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eucharitidae). *Proceedings of the Entomological Society of Ontario*, 116, pp. 61-103.
- Heraty, J.M., 2002.** A revision of the genera of Eucharitidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) of the world. *Memoirs of the American Entomological Institute*, 68, pp. 1-368.
- Heraty, J.M., Wojcik D.P., y Jouvenaz, D.P., 1993.** Species of *Orasema* parasitic on the *Solenopsis saevissima*-complex in South America (Hymenoptera: Eucharitidae, Formicidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 2, pp. 169–182.
- Hölldobler, B., 1971.** Communication between ants and their guests. *Scientific American*, 224 (3), pp. 86-93.
- Hölldobler, B. y Wilson, E.O., 1990.** The Ants. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 743 p.
- Howard, R.W., Pérez-Lachaud, G. y Lachaud, J.-P., 2001.** Cuticular hydrocarbons of *Kapala sulcifacies* (Hymenoptera: Eucharitidae) and its host, the ponerine ant *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94 (5), pp. 707-716.
- Ibarra-Núñez, G., García, J.A., López, J.A. y Lachaud, J.-P., 2001.** Prey analysis in the diet of some ponerine ants (Hymenoptera: Formicidae) and web-building spiders (Araneae) in coffee plantations in Chiapas, Mexico. *Sociobiology*, 37 (3B), pp. 723-755.
- Ingram, K.K., Oefner, P. y Gordon, D.M., 2005.** Task-specific expression of the foraging gene in harvester ants. *Molecular Ecology*, 14, pp. 813–818.

- Jaisson, P., Fresneau, D. y Lachaud, J.-P., 1988.** Individual traits of social behavior in ants. En: R.L. Jeanne, ed. 1988. *Interindividual Behavioral Variability in Social Insects*. Westview Press, Boulder and London, pp. 1-55.
- Jandt, J.M., Bengston, S., Pinter-Wollman N., Pruitt, J.N., Raine, N.E., Dornhaus, A. y Sih, A., 2013.** Behavioural syndromes and social insects: personality at multiple levels. *Biological Reviews*, DOI: 10.1111/brv.12042.
- Jeanson, R. y Weidenmüller, A., 2013.** Interindividual variability in social insects – proximate causes and ultimate consequences. *Biological Reviews*, in press.
- Julian, G.E. y Cahan, S., 1999.** Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. *Animal Behaviour*, 58, pp. 437–442.
- Julian, G.E. y Fewell, J.H., 2004.** Genetic variation and task specialization in the desert leaf-cutter ant, *Acromyrmex versicolor*. *Animal Behaviour*, 68, pp. 1–8.
- Kempf, W.W., 1972.** Catálogo abreviado das Formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomologica*, 15 (1-4), pp. 3-344.
- Kistner, D.H., 1982.** The social insects' bestiary. En: H.R. Hermann, ed. 1982. *Social Insects*. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 1–244.
- Kugler, C. y Brown, W.L., 1982.** Revisionary & other studies on the ant genus *Ectatomma*, including the descriptions of two new species. *Search Agriculture*, 24, pp. 1-7.
- Lachaud, J.-P. y Fresneau, D., 1987.** Social regulation in ponerine ants. En: J.M. Pasteels y J.-L. Deneubourg, eds. 1987. *From Individual to collective behavior in social insects*. (Experientia Suppl. 54). Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 197-217.
- Lachaud, J.-P., López -Méndez, J.A., Schatz, B., De Carli, P. y Beugnon, G., 1996.** Comparaison de l'impact de prédation de deux ponérines du genre *Ectatomma*

dans un agroécosystème néotropical. *Actes des Colloques Insectes Sociaux*, 10, pp. 67-74.

**Lachaud, J.-P. y Pérez-Lachaud, G., 2012.** Diversity of species and behavior of hymenopteran parasitoids of ants: a review. *Psyche*, 2012, Article 134746, 24 pp.

**Lachaud, J.-P., Pérez-Lachaud, G. y Heraty, J.M., 1998.** Parasites associated with the ponerine ant *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae): first host record for the genus *Dilocantha* (Hymenoptera: Eucharitidae). *Florida Entomologist*, 81 (4), pp. 570-574.

**Le Masne, G.M., 1953.** Observations sur les relations entre le couvain et les adultes chez les fourmis. *Annales des Sciences Naturelles*, 15, pp. 1-56.

**Lenoir, A., d'Etterre, P., Errard, C. y Hefetz, A., 2001.** Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annual Review of Entomology*, 46, pp. 573-599.

**Nelson, X.J. y Jackson, R.R., 2006.** Vision-based innate aversion to ants and ant mimics. *Behavioral Ecology*, 17 (4), pp. 676-681.

**Oldroyd, B.P. y Thompson, G.J., 2006.** Behavioural genetics of the honey bee *Apis mellifera*. *Advances in Insect Physiology*, 33, pp. 1-49.

**Oster, G.F. y Wilson, E.O., 1978.** Caste and ecology in the social insects. Princeton University Press, Princeton, N.J., 352 pp.

**Passera, L., Lachaud, J.-P. y Gomel, L., 1994.** Individual food source fidelity in the neotropical ponerine ant *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera Formicidae). *Ethology Ecology and Evolution* 6, pp. 13-21.

**Pérez-Lachaud, G., Heraty, J.M., Carmichael, A. y Lachaud, J.-P., 2006a.** Biology and behavior of *Kapala* (Hymenoptera: Eucharitidae) attacking *Ectatomma*, *Gnamptogenys*, and *Pachycondyla* (Formicidae: Ectatomminae and Ponerinae) in



Chiapas, Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*, 99 (3), pp. 567-576.

**Pérez-Lachaud, G. y Lachaud, J.-P., 2007.** Comportement de transport de parasitoïdes Eucharitidae par leur hôte: mimétisme chimique et effet de la taille de l'objet à transporter. Proceedings Colloque Annuel de la Section Française de l'UIEIS, Toulouse, p. 32.

**Pérez-Lachaud, G., López-Méndez, J.A., Beugnon, G., Winterton, P. y Lachaud, J.-P., 2010.** High prevalence but relatively low impact of two eucharitid parasitoids attacking the Neotropical ant *Ectatomma tuberculatum* (Olivier). *Biological Control*, 52 (2), pp. 131-139.

**Pérez-Lachaud, G., López-Méndez, J.A. y Lachaud, J.-P., 2006b.** Eucharitid parasitism of the neotropical ant *Ectatomma tuberculatum*: parasitoid co-occurrence, seasonal variation, and multiparasitism. *Biotropica*, 38 (4), pp. 574-576.

**Pérez-Lachaud, G., Valenzuela, J.E. y Lachaud, J.-P., 2011.** Is increased resistance to parasitism at the origin of polygyny in a Mexican population of the ant *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae)? *Florida Entomologist*, 94 (3), pp. 677-684.

**Perfecto, I. y Vandermeer, J.H., 1993.** Cleptobiosis in the ant *Ectatomma ruidum* in Nicaragua. *Insectes Sociaux*, 40 (3), pp. 295-299.

**Pierce, N.E., Braby, M.F., Heath, A., Lohman, D.J., Mathew, J., Rand, D.B. y Travassos, M.A., 2002.** The ecology and evolution of ant association in the Lycaenidae (Lepidoptera). *Annual Review of Entomology*, 47, pp. 733-771.

- Pierce, N. y Eastal, S., 1986.** The selective advantage of attendant ants for the larvae of a lycaenid butterfly, *Glaucopsyche lygdamus*. *Journal of Animal Ecology*, 55 (2), pp. 451-462.
- Pinter-Wollman, N., Gordon, D.M. y Holmes, S., 2012.** Nest site and weather affect the personality of harvester ant colonies. *Behavioral Ecology*, 23, pp. 1022–1029.
- Quiroa- Montalván, C.M., 2006.** Determinación del perfil de hidrocarburos cuticulares de *Isomeria coronata* (Hymenoptera: Eucharitidae) y de su huésped, la hormiga *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) en la relación huésped-parasitoide. Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Tapachula, 45 pp.
- R Development Core Team (2013).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Raine, N.E., Ings, T.C., Ramos-Rodríguez, O. y Chittka, L., 2006:** Intercolony variation in learning performance of a wild British bumblebee population (Hymenoptera: Apidae: *Bombus terrestris audax*). *Entomologia Generalis*, 28, pp. 241–256.
- Ravary, F., Lecoutey, E., Kaminski, G., Châline, N. y Jaisson, P., 2007.** Individual experience alone can generate lasting division of labor in ants. *Current Biology*, 17, pp. 1308-1312.
- Robinson, G.E., 1992.** Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 37, 637-665.
- Robinson, E.J.H., Feinerman, O. y Franks, N.R., 2009.** Flexible task allocation and the organization of work in ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276, pp. 4373-4380.

- Robson, S.K. y Traniello, J.F.A., 1999.** Key individuals and the organization of labour in ants. En: C.C. Detrain, J.M. Pasteels, y J.L. Deneubourg, eds. 1999. Information Processing in Social Insects. BirkŠuser Verlag Press, pp. 239-259.
- Roche-Labarbe, N., Beugnon, G. y Lachaud, J.-P., 2004.** Apprentissage de routes et orientation spatiale chez un insecte sur un support en trois dimensions. *Actes des Colloques Insectes Sociaux*, 16, pp. 52–56.
- Schatz, B., Lachaud, J.-P. y Beugnon, G., 1995.** Spatial fidelity and individual foraging specializations in the neotropical ponerine ant, *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 26, pp. 269-282.
- Schatz, B., Lachaud, J.-P. y Beugnon, G., 1996.** Polyethism within hunters of the ponerine ant, *Ectatomma ruidum* Roger (Formicidae, Ponerinae). *Insect Sociaux*, 43, pp. 111-118.
- Sendova-Franks, A. y Franks, N.R., 1993.** Task allocation in ant colonies within variable environments (a study of temporal polyethism, experimental). *Bulletin of Mathematical Biology*, 55, pp. 75-96.
- Sumana A. y Sona, C., 2013.** Key relocation leaders in an Indian queen less ant. *Behavioural Processes*, 97, pp. 84– 89.
- Theraulaz, G., Bonabeau, E., y Deneubourg, J.-L., 1998.** Response threshold reinforcements and division of labour in insect societies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265, pp. 327–332.
- Traniello, J.F.A., 1989.** Foraging strategies of ants. *Annual Review of Entomology*, 34, pp. 191-210.

- Tripet, F. y Nonacs, P., 2004.** Foraging for work and age based polyethism: The roles of age and previous experience on task choice in ants. *Ethology*, 110, pp. 863–877.
- Valenzuela-González, J., López-Méndez, A. y Lachaud, J.-P., 1995.** Activity patterns and foraging activity in nests of *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) in cacao plantations. *Southwestern Entomologist*, 20 (4), pp. 507-515.
- Van Pelt, A.F. y Van Pelt, S.A., 1972.** *Microdon* (Diptera: Syrphidae) in nests of *Monomorium* (Hymenoptera: Formicidae) in Texas. *Annals of the Entomological Society of America*, 65 (4), pp. 977-979.
- Vander Meer, R.K., Jouvenaz, D.P. y Wojcik, D.P., 1989b.** Chemical mimicry in a parasitoid (Hymenoptera: Eucharitidae) of fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 15 (8), pp. 2247-2261.
- Vander Meer, R.K., Saliwanchik, D. y Lavine, B., 1989a.** Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*: Implications for nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology*, 15 (7), pp. 2115-2125.
- Vander Meer, R.K. y Wojcik, D.P., 1982.** Chemical mimicry in the myrmecophilous beetle, *Myrmecophodius excavaticollis*. *Science*, 218, pp. 806-808.
- Venables, W.N. y Ripley, B.D., 2002.** Modern Applied Statistics with S. 4ta edición. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.
- Weber, N.A., 1946.** Two common ponerine ants of possible economic significance, *Ectatomma tuberculatum* (Oliver) and *E. ruidum* Roger. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 48 (1), pp. 1-16.

- Weidenmüller, A., 2004.** The control of nest climate in bumblebee (*Bombus terrestris*) colonies: interindividual variability and self-reinforcement in fanning response. *Behavioral Ecology*, 15, pp. 120–128.
- Wheeler, G.C. y Wheeler, E.W., 1937.** New hymenopterous parasites of ants (Chalcidoidea: Eucharidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 30, pp. 163-175.
- Wheeler, W.M., 1908.** Studies of myrmecophiles III. *Microdon*. *Journal of the New York Entomological Society*, 16 (4), pp. 202-213.
- Wickham, H., 2007.** Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software*, 21 (12), pp. 1-20.
- Wilson, E.O., 1971.** The insect societies. Cambridge, MA: Belknap/Harvard Univ. Press. 548 pp.
- Witte, V., Leingärtner, A., Saba, L., Hashim, R. y Foitzik, S., 2008.** Symbiont microcosm in an ant society and the diversity of interspecific interactions. *Animal Behaviour*, 76, pp. 1477-1486.
- Wolton, R.J., 2011.** Observations on the ecology and behaviour of *Microdon myrmicae* Schönrogge *et al.* (Diptera, Syrphidae), with a description of egg and early instar morphology. *Dipterists Digest*, 18, pp. 55-67.
- Wray, M.K., Mattila, H.R. y Seeley, T.D., 2011.** Collective personalities in honeybee colonies are linked to colony fitness. *Animal Behavior*, 81, pp. 559–568.

## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Características de los nidos de *E. tuberculatum* colectados para este estudio. Número de individuos por casta y por estado de desarrollo.

Nido	Colecta	Reina(s)	Hembra(s) alada(s)	Obreras	Machos	Pupas	Larvas	Huevos
**1	17/01/2013	1	0	70	0	0	0	0
2	17/01/2013	1	0	117	0	0	19	1
3	17/01/2013	1	0	183	0	3	25	20
*4	17/01/2013	1	0	209	0	0	18	0
**5	17/01/2013	1	0	131	0	0	24	5
*6	17/01/2013	2	0	221	0	0	2	0
*7	09/03/2013	1	0	142	0	4	4	0
8	09/03/2013	1	0	92	1	26	6	0
9	09/03/2013	0	0	106	0	21	5	0
10	09/03/2013	1	0	60	2	1	0	0
*11	09/03/2013	1	0	92	1	26	6	0
12	20/05/2013	0	0	44	6	0	1	0
13	20/05/2013	0	0	181	5	0	1	0
14	20/05/2013	2	1	25	35	3	14	6
15	20/05/2013	1	0	62	5	26	4	0
16	20/05/2013	0	0	152	25	80	25	0
17	20/05/2013	0	29	224	3	6	2	0
18	20/05/2013	0	1	243	61	11	9	0
19	20/05/2013	0	1	62	11	1	0	0

\*Usados en los bioensayos del experimento 1

\*\* Usados en el experimento sobre especialización

## Anexo 2.



### **Fine Individual Specialization and Elitism among Workers of the Ant *Ectatomma tuberculatum* for a Highly Specific Task: Intruder Removal**

Journal:	<i>Ethology</i>
Manuscript ID:	ETH-13-0294
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	05-Dec-2013
Complete List of Authors:	Rocha, Franklin H.; El Colegio de la Frontera Sur, Conservación de la Biodiversidad Lachaud, Jean-Paul; El Colegio de la Frontera Sur, Conservación de la Biodiversidad; Centre de Recherches sur la Cognition Animale, CNRS-UMR 5169, , Université de Toulouse UPS Valle-Mora, Javier; El Colegio de la Frontera Sur, Informática Pérez-Lachaud, Gabriela; El Colegio de la Frontera Sur, Conservación de la Biodiversidad
keywords:	division of labor, individual specialization, Formicidae, elitism, intruder removal

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Fine Individual Specialization and Elitism among Workers of the Ant  
*Ectatomma tuberculatum* for a Highly Specific Task: Intruder Removal

Franklin H. Rocha<sup>1</sup>, Jean-Paul Lachaud<sup>1,2</sup>, J. Valle-Mora<sup>3</sup> & Gabriela Pérez-Lachaud<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> El Colegio de la Frontera Sur, Conservación de la Biodiversidad, Avenida Centenario  
Km 5.5, Chetumal 77014, Quintana Roo, Mexico

<sup>2</sup> Centre de Recherches sur la Cognition Animale, CNRS-UMR 5169, Université de  
Toulouse UPS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 09, France

<sup>3</sup> El Colegio de la Frontera Sur, Carr. Ant. Aeropuerto km 2.5, Tapachula 30700,  
Chiapas, Mexico

Running title: Individual Specialization and Elitism in *Ectatomma*

\*Correspondence: e-mail: [igperez@ecosur.mx](mailto:igperez@ecosur.mx)

Total number of words 7939



## **Abstract**

Insect societies are characterized by a relatively sophisticated division of labor; they form tightly knit groups that must effectively exclude non-members from the colony. However, the Neotropical predatory ant *Ectatomma tuberculatum* can harbor several specific eucharitid parasitoid wasp species. Adult wasps eclose in the host nests and are removed by worker ants without harm. Previous observations suggest that only a few workers perform this task. To test this hypothesis, we introduced two types of intruders, live broad-nosed grain weevil individuals (*Caulophilus oryzae*) and dead, pentane-washed eucharitids (*Dilocantha lachaudii*), into laboratory colonies containing individually marked workers. We recorded all encounters and behaviors until the intruders were removed. Certain workers removed intruders more frequently than expected by chance. The number of encounters with an intruder was positively correlated with the number of removals performed by the workers. For each nest, a group of 7 or 8 workers was identified as specialized in intruder removal. A subset of very committed workers in the specialists group that performed more than 60% of removals qualified as hyper-specialists or elite-workers. Additionally, a few workers were specialized in removing a specific intruder type. The behavioral sequences differed based on the type of intruder; the sequence was more complex and included numerous aggressive behaviors (mandibular strikes and attempts at stinging) when workers encountered a live weevil. In contrast, the behavioral sequences with dead, pentane-washed wasps were characterized by numerous detections through contact that did not lead to rejection and by the wasps being simply seized and removed from the nest. Overall, the data show that the ants discriminated between the two types of intruders

and adjusted their behavior accordingly. This is the first demonstration in ants of both behavioral specialization and hyper-specialization in intruder removal.

## **Introduction**

Division of labor is an interplay between self-organized and evolutionary processes, whereby different group members perform different functions; specialized individuals tend to perform certain tasks more often than others. This attribute is typical of social insect systems (Oster & Wilson 1978; Bonabeau et al. 1998; Beshers & Fewell 2001; Duarte et al. 2011). Through task specialization and the simultaneous, series-parallel performance of different tasks, division of labor is central to social insects' ecological success (Oster & Wilson 1978; Jaisson et al. 1988; Robinson 1992; Beshers & Fewell 2001; Dornhaus et al. 2012). Division of labor is also a dynamic phenomenon. Social insect colonies respond to changes in both their biotic and abiotic environments (Gardner et al. 2007; Pinter-Wollman et al. 2012) and according to the colony's changing needs (Gordon 2003; Robinson et al. 2009) by adjusting the relative proportions of individuals that perform different tasks (Oster & Wilson 1978; Lachaud & Fresneau 1987; Robinson 1992; Robinson et al. 2009; Pinter-Wollman et al. 2013). Both environmental and social cues likely contribute to individual task decisions in all social insects (Robson & Traniello 1999; Gordon 2003). The factors that determine which individuals respond to colony-level task-demand changes include morphological, genotypic, and age variations among workers (e.g. Lachaud & Fresneau 1987; Julian & Fewell 2004; Oldroyd & Thompson 2006). Each worker's individual experience (Deneubourg et al. 1987; Theraulaz et al. 1998; Tripet & Nonacs 2004; Ravary et al.

2007; Franklin et al. 2012) and social interaction pattern (Powell & Tschinkel 1999) may also influence the probability that it will perform a given task. Furthermore, a worker's spatial location may affect its rate of encounters with a stimulus and the level of stimulation experienced (Fresneau et al. 1989; Sendova-Franks & Franks 1995; Powell & Tschinkel 1999; Gordon & Mehdiabadi 1999; Robinson et al. 2009, Arcaute et al. 2009). The type of task(s) that individuals specialize in may correlate with their age (temporal polyethism; see Beshers & Fewell 2001 for a review), may be based on their size and shape (size or physical polyethism; reviewed in Hölldobler & Wilson 1990), or both (Jaisson et al. 1988). However, high intrinsic variability has been observed among individuals in the same colony (idiosyncrasy; see Jaisson et al. 1988; Corbara et al. 1989; Giray & Robinson 1994; Jeanson & Weidenmüller in press) and among colonies (colony-level behavioral syndrome; see Crosland 1990; Raine et al. 2006; Gordon et al. 2011; Pinter-Wollman et al. 2012; Jandt et al. 2013).

Individual specialization in ants has largely been studied in several contexts, such as colony relocation in the queenless ponerine ant *Diacamma indicum* (Sumana & Sona 2013), task partitioning during foraging in the ectatommine *Ectatomma ruidum* (Schatz et al. 1996), tool use during foraging in the myrmicine *Aphaenogaster rudis* (Banschbach et al. 2006), undertaking in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor* (Julian & Cahan 1999), and trapped nestmate "rescuing" in the formicine *Cataglyphis cursor* (Nowbahari et al. 2012). However, no study has addressed individual specialization in intruder rejection from an ant nest, although such behavior must be commonly performed because ant colonies are frequent targets of an impressive diversity of guests and/or parasites (Kistner 1982; Hölldobler & Wilson 1990; Hughes et al. 2008; Lachaud & Pérez-Lachaud 2012). Here, we studied task specialization and

behavioral performance at the individual level in workers of the Neotropical ectatommine ant *Ectatomma tuberculatum* (Olivier) in the context of rejection of eucharitid parasitoid wasps and other intruders.

As with all social insects, ants have highly developed recognition mechanisms for accepting nestmates and rejecting aliens (Hölldobler & Wilson 1990; Lenoir et al. 2001; Bagnères & Lorenzi 2010), thereby maintaining the integrity of their society. However, whereas certain parasites are recognized and attacked by their ant hosts, others have apparently obfuscated the ants' recognition code and primarily interact peacefully with their hosts (e.g. Vander Meer et al. 1989, von Beeren et al. 2011).

Eucharitid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) are specific parasitoids of ants with a highly specialized life cycle (Clausen 1941; Heraty 2002; Lachaud & Pérez-Lachaud 2012). The adults emerge in the host ant nest and mate in the surrounding vegetation (Clausen 1941; Pérez-Lachaud et al. 2006). The females lay eggs onto or into plant tissues (Heraty 2002). Through phoretic attachment to foraging ants or other insects, the active first-instar larvae (planidia) access the ant nest, where they parasitize the ant brood (Clausen 1941; Carey et al. 2012). The extremely small size of the planidia likely facilitates both their entrance into the host colony and the initial parasitism (Vander Meer et al. 1989); however, the adults must cope with ant aggression at eclosion.

*Ectatomma tuberculatum* is the host of three eucharitid species: *Isomerala coronata* (Westwood), *Dilocantha lachaudii* Heraty, and *Kapala* sp. (Lachaud & Pérez-Lachaud 2012). *Ectatomma tuberculatum* workers aggressively defend their nest against non-nestmates and other insects (Fénéron 1993). However, eucharitid parasitoids that eclose as pharate adults in the ant nest are not treated aggressively and

are removed (transported outside) from the colony without injury (Lachaud et al. 1998). Preliminary observations using unmarked ants indicated typical rejection behavior in certain instances, suggesting that only a few workers actively participate in eucharitid removal. The aims of this study were: i) to determine whether some *E. tuberculatum* workers specialize in intruder removal; ii) to determine whether any intruder found within the nest is rejected, regardless of the intruder's species; and iii) to characterize the rejection behavior toward two insect models through laboratory bioassays.

## **Methods**

### Study Model

*Ectatomma tuberculatum* workers are monomorphic, with certain size variations present only in incipient colonies (i.e., with fewer than 30 individuals) (Dejean & Lachaud 1992). Colonies contain 470 individuals on average (range: 22-1200 or more; Pérez-Lachaud et al. 2010) and are characterized by clear age polyethism among workers (Fresneau & Lachaud 1984; Champalbert & Lachaud 1990; Fénéron 1993) and by the presence of a foraging group that regularly includes up to 50% of the colony members (Fresneau et al. 1982).

Workers are active throughout the day, with a marked peak at night; greater nocturnal activity has been observed during the dry season, whereas diurnal foraging predominates during the wet season (Valenzuela-González et al. 1995). Their foraging or hunting strategy is essentially solitary. Foragers exhibit path fidelity (García-Pérez et al. 1991; Franz & Wcislo 2003; Roche-Labarbe et al. 2004), and they display “sit-and-wait” ambush behavior at open flowers and at extrafloral nectaries that attract other arthropods (Dejean & Lachaud 1992; Franz & Wcislo 2003).

## Colony Collection and Housing

Two mature *E. tuberculatum* colonies were excavated and collected in January 2013 in Chetumal, Quintana Roo, Mexico (18° 30' 4.54" N; 88° 19' 47.74" W), and the experiments were conducted between February and March 2013. Each colony included one queen and brood at different stages (nest 1: 70 workers and eggs; nest 2: 131 workers, 24 larvae and eggs). The ants were reared in transparent plastic nest boxes (23 x 17 x 10 cm) covered with a glass lid. Each nest box was connected to a foraging arena (a plastic box, 30 x 23 x 8 cm) via a transparent glass tube (1 cm diam. x 30 cm long). Each clear plastic box included a glass tube (80 mm long x 20 mm diam.) filled with water and stuffed with cotton at one end, as well as a large, dry leaf for concealment and darkness. The ants were fed sliced apple pulp, diluted honey and *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae), which were placed in the foraging arena every two days.

## *E. tuberculatum* Task Specialization

Laboratory tests were conducted using artificially reduced colonies homogeneous in size with 1 queen, 30 workers chosen from the initial colony at random (from both the nest and the foraging arena), and the original brood. We marked the workers individually with oil-based paint markers (Uni-Paint ® Marker PX-203) using a unique color combination of paint dots on the thorax and abdomen. The workers were marked over the course of one day, a week before trials began. The marks persisted at least through the end of the experiment and did not noticeably affect worker behavior.

Eucharitids parasitize *E. tuberculatum* colonies throughout the year, but the parasitism rate is low (Pérez-Lachaud et al. 2010). Because we could not secure

sufficient numbers of live parasitoids for the bioassays, we studied task allocation using two intruder models: live adults of the broad-nosed granary weevil *Caulophilus oryzae* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae), which are currently reared in our laboratory, and dead, alcohol-preserved adults of the eucharitid wasp *Dilocantha lachaudii*. *Caulophilus oryzae* adults are similar to eucharitids in size and in the presence of a hard cuticle, but they differ in weight (the mean  $\pm$  SE weight of the weevils was 1.32 mg  $\pm$  0.04; that of the wasps was 1.89 mg  $\pm$  0.15;  $N_1 = N_2 = 30$ ; Student's t-test  $t = -3.59$ ,  $df = 58$ ,  $p < 0.001$ ). We chose *C. oryzae* because the adults are not edible prey for ants, their size allows *E. tuberculatum* workers to hold them between their mandibles, and the weevils were removed from the nest during the preliminary assays. Furthermore, myrmecophilous Heteriinae beetles (Histeridae) have occasionally been found in *E. tuberculatum* nests, and ants have been observed to grab and transport them (Pérez-Lachaud and Lachaud, unpub. data). Eucharitid adults preserved in alcohol were air dried, soaked in 10 ml GC-grade n-pentane (Fluka Analytical, 99%) for 5 min, and air dried again before use in the bioassays.

The opportunity for intruder rejection was created by gently placing an intruder in the middle of the nest. We recorded the identity of each worker that encountered the intruder and/or performed the rejection until the intruder was transported to the foraging arena. If an individual ant encountered an intruder once but left without picking it up, then later returned and re-encountered the intruder, that action was recorded as a second encounter. For 3 weeks, two to three trials were performed per colony per day (allocated at random and separated by at least 30 min), between 7.00 and 15.00 h. This duration was sufficiently short to prevent most ants from switching to another task due to age polyethism (Fénéron 1993). Twenty trials with each of the two different intruders

were conducted for each colony (40 trials per colony and per intruder). The intruders were used only once. Five recordings were incomplete and were not considered in certain duration analyses.

A digital video camera with high color resolution (Sony-HDR-XR260) was positioned above the nest, and the ants' behavior was recorded continuously (focal sampling) under natural illumination and at room temperature (approximately 26°C). The recordings were later viewed by a first observer and cross-checked by a second observer. We evaluated the following: i) the time that elapsed between the introduction of the intruder and when the ants initiated contact (latency); ii) the handling plus transport time; iii) the total time for each trial, which began when the intruder was placed into the nest and ended when the intruder was completely removed from inside the colony; iv) the number and identities of the workers that encountered the intruder; and v) whether, how, when, and by whom the intruder was removed from the colony. We also evaluated the decision-making time (the time from the first contact between the ants and the intruder until when an ant picked up the intruder and initiated removal) and the workers' speed in transporting the intruders. The transport speed was calculated as the time necessary to walk the 30 cm glass tube that connected the nest to the exterior arena; only transports with no obstacles (other ants) present were considered in the analysis.

We used preliminary observations to determine the behavioral repertoire of the worker ants upon encountering an intruder. Mutually exclusive, observed behaviors were then integrated into a comprehensive ethogram (see Results). For each intruder type, a flow diagram was devised using observational data, and we constructed a matrix with the observed transitions. The relative transition frequencies between behaviors were



calculated as the ratio of the observed frequency to the overall number of initial transitions (Schatz et al. 1997).

## Data Analysis

To determine whether certain workers preferentially performed intruder removal, we compared the distribution of the number of removals per ant to a negative binomial distribution using a  $\chi^2$  goodness of fit test. If ants' spatial distribution in the nest was not random, then certain ants would encounter the intruder more frequently than expected by chance. The distribution of the number of times individuals encountered the intruder was compared to a negative binomial distribution. The encounter number included events both where the worker did not pick up the intruder and where the intruder was removed. A simple linear regression analysis was used to assess the relationship between the number of times a worker encountered intruders during trials and the number of times it performed removals. If removal specialization was due to certain individuals having a greater opportunity to perform the task, then the relationship between encounters and rejections would be significant.

To test the influence of intruder type on the number of contacts per trial and on the latency and "handling + transport" times, a generalized linear mixed-effects model was fitted to the natural log transformed data, with nest as a random factor (Galwey 2006). We used this analytic method because our data included successive observations using the same nests and to avoid pseudo-replication. The statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2013). The data

represent the mean values  $\pm$  SE. N refers to the number of individuals, and n refers to the number of analyzed interactions.

## Results

### Behavioral Sequences

Twelve distinct behavioral acts were involved in intruder rejection: wandering, detection through contact, mandible strike, antennation, seizure-lifting, abdomen bending, stinging attempt, carrying, failure, giving up, removal, and robbing (Table 1). The primary transitions observed between such behaviors defined the average behavioral sequence for each intruder type (Fig. 1).

In most trials, the first ant that contacted an intruder did not initiate its rejection, especially for the pentane-washed wasps. Because several ants could participate in intruder rejection, and the same ant could encounter an intruder more than once, the trials could include several behavioral sequences. A total of 211 sequences were analyzed for *D. lachaudii*, and 132 were analyzed for *C. oryzae*. In most instances, the behavioral sequences ended rapidly with the worker giving up after an initial phase of simple antennation (73.9% of the sequences for *D. lachaudii* [156/211] and 25.8% of the sequences for *C. oryzae* [34/132]; Fig. 1). The giving-up behavior was observed significantly more frequently for dead, pentane-washed wasps than live weevils ( $\chi^2 = 76.3$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.0001$ ).

In addition, the complexity of the behavioral sequences varied according to the intruder type. The behavioral sequences with *C. oryzae* included 21 transitions between behaviors, of which only 2 represented less than 3% of all transitions (Fig. 1A). By

contrast, the behavioral sequences with *D. lachaudii* included 9 transitions that represented less than 3% of all transitions (Fig. 1B). For this intruder, the essential portion of the behavioral sequence included only 10 transitions, and was characterized by numerous, repeated contacts from the same or different workers; prolonged antennation of the intruder (in 89.1% of the transitions that followed detection); and the gentle seizure and lifting of the intruder, followed by transport outside the nest. In contrast, the workers' response was more aggressive when they encountered a live weevil. Antennations composed only 35.6% of the transitions after *C. oryzae* was detected through contact, and more mandible strikes were directed toward weevils (64.4%) than wasps (10.9%). Furthermore, attempts at stinging were regularly performed against weevils (N = 30 attempts) and were significantly more frequent than those against dead wasps (N = 5 attempts;  $Z = 4.23$ ,  $p < 0.05$ ).

All of the intruders were removed from the nest and discarded in the foraging arena. Regardless of their condition and species, the intruders were not injured or damaged; however, the ants attempted to sting intruders on several occasions. The trials were significantly longer with *D. lachaudii* ( $22.35 \pm 3.2$  min, N = 35) than with *C. oryzae* ( $12.47 \pm 2.07$  min, N = 40; linear mixed-effects model,  $F_{1,72} = 8.24$ ,  $p = 0.005$ ). In general, the removal of live weevils initiated earlier ( $6.54 \pm 1.86$  min after introduction, N = 40) than the pentane-washed wasps ( $16.09 \pm 3.04$  min, N = 39). However, due to a high degree of variability, the decision-making time for removing a *D. lachaudii* was not significantly greater than for *C. oryzae*, (linear mixed-effects model,  $F_{1,76} = 3.81$ ,  $p = 0.0546$ ), but the results were at the limit of significance. Furthermore, workers transporting live *C. oryzae* walked significantly more rapidly than did those transporting pentane-washed *D. lachaudii* (linear mixed-effects model,  $F_{1,31} = 14.13$ ,  $p < 0.0001$ ).

The intruder type did not significantly influence latency (linear mixed-effects model,  $F_{1,77} = 0.014$ ,  $p = 0.90$ ). The mean latency for both intruder types was  $3.7 \pm 0.5$  min ( $N = 80$ ). Handling + transport time (beginning with intruder detection and ending with its full removal from the nest) was not influenced by intruder type (linear mixed-effects model,  $F_{1,72} = 0.277$ ,  $p = 0.6$ ). The mean handling and transport time for both intruder types was  $2.6 \pm 0.2$  min ( $N = 75$ ).

### Intruder Removal Specialization

By marking individual ants, we could identify which workers encountered intruders and which were involved in rejecting them. Nearly 75% of the workers in the colonies encountered intruders at least once during the experimental period (nest 1: 22/30, nest 2: 23/30), but only a few workers performed rejections. Ant workers repeatedly encountered intruders before removing them, especially when dead wasps were involved. For the trials involving *D. lachaudii*, the mean number of encounters between any worker ant and the intruder was significantly greater than those where *C. oryzae* was the intruder ( $2.8 \pm 0.41$  vs.  $1.6 \pm 0.28$  encounters, respectively; Student's t-test:  $t_{118} = 2.512$ ,  $p = 0.01$ ). Moreover, more ants were involved in the trials with *D. lachaudii* ( $4.2 \pm 0.62$  workers, range 1-16) than with *C. oryzae* ( $2.4 \pm 0.25$ , range 1-9) (linear mixed-effects model,  $F_{1,77} = 5.93$ ,  $p = 0.01$ ).

For both intruder types, the distribution of the intruder removal task among workers in the same colony was right-skewed (i.e., a few highly active individuals performed a large proportion of the task, while most individuals were less active and either performed a small proportion of the task or, in most cases, none of it). The frequency distribution of removals per worker was similar for the two colonies; thus, the

data were pooled (Fig. 2). The number of intruders removed per worker in a given nest was not randomly distributed. The frequency distribution of removals per worker was consistent with a negative binomial distribution (goodness of fit test:  $\chi^2 = 7.75$ ;  $df = 5$ ,  $p = 0.17$ , with  $k = 0.176$ ; Fig. 2).

Similarly, the frequency of encounters with intruders was not randomly distributed among workers when the intruder was *C. oryzae*, and it was consistent with a negative binomial distribution (goodness of fit test:  $\chi^2 = 3.135$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0.21$ , with  $k = 1.617$ ). By contrast, when the intruder was a dead, pentane-washed wasp, the encounters were more evenly distributed (goodness of fit test:  $\chi^2 = 16.50$ ;  $df = 7$ ,  $p = 0.02$ , with  $k = 1.022$ ). For both intruder types, we observed a significant positive correlation between the number of times a worker encountered intruders during trials and the number of times it performed removals (*C. oryzae*:  $R^2 = 0.748$ ,  $F_{1,58} = 172.2$ ,  $p < 0.0001$ ; *D. lachaudii*:  $R^2 = 0.4651$ ,  $F_{1,58} = 50.43$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 3).

The number and types of intruders removed by each worker in each nest is shown in Fig. 4. Only one-third of the workers were involved in intruder rejection (nine workers in nest 1 and eight workers in nest 2; Fig. 4). For each colony, we calculated a specialization baseline (Fig. 4, continuous line) corresponding to the number of rejections a worker should perform if the rejection task was randomly allocated among the colony members (40 intruders divided by 30 workers; i.e., 1.3 intruders per worker). Ants that performed more rejections than the baseline were considered specialized in this particular task (see Corbara et al. 1989 and Schatz et al. 1995 for a similar treatment). The dashed line corresponds to the number of rejections a worker within the previously defined specialist group should have performed if the intruder rejections were

randomly allocated among the specialists (40 intruders removed by the number of specialists in each nest). The workers that performed more rejections than the baseline for the specialists group were considered hyper-specialists or elite-workers (four workers in nest 1 and two in nest 2). Over 60% of the removals were performed by the elite-workers.

Certain specialists, including those ranked highest for the number of rejections performed, removed only one intruder type. For example, worker B1 from nest 1 and worker G2 from nest 2 exclusively removed eucharitid wasps (11 and four *D. lachaudii*, respectively; Fig. 4), whereas worker C1 and worker G1 from nest 1 exclusively removed *C. oryzae* weevils (seven and three, respectively).

## Discussion

Robson & Traniello (1999) defined behaviorally specialized individuals as individuals that perform a given behavior far more frequently than others of similar age or group that are engaged in the same activity. For a highly specific task, such as intruder removal, we show that although most *E. tuberculatum* workers detected both live weevils and dead, pentane-washed eucharitid wasps through contact, only a few workers were actually involved in removal, and certain workers were considered behaviorally specialized. Although ant behavior with intruders has been studied repeatedly in the nestmate vs. non-nestmate recognition context (see Lenoir et al. 2001; Fürst et al. 2012), this is the first demonstration in ants of behavioral specialization in intruder removal. Ants and other social insects keep the interior of their nest meticulously clean (Sun & Zhou 2013); they remove both nestmate corpses and debris. Moreover, the rejection of non-nestmates, such as intruding thief workers stealing food, has been

reported on several occasions (Breed et al. 1992; Yamaguchi 1995). However, only a few studies have investigated individual specialization in sanitary tasks critical for the colony's survival such as waste or corpse management (e.g. Julian & Cahan 1999; Diez et al. 2013); a group of tasks seemingly similar to intruder removal but far better studied. There are a few examples in which the management of waste, corpses or hazardous items is achieved by distinct size- or age-based groups of workers. For example, a short-term specialization in corpse removal was demonstrated in *Acromyrmex versicolor* (Julian & Cahan 1999) and in *Myrmica rubra* (Diez et al. 2013), although specialists of the latter species were not exclusively involved in necrophoresis. Furthermore, a caste specialization between minor and major workers of the fungus garden ant *Acromyrmex octospinosus* was found for two sanitary tasks: grooming and weeding of *Escovopsis*-infected fungus garden (Abramowski et al. 2011).

The *E. tuberculatum* workers in the present work recognized both live weevils and pentane-washed wasps as intruders and rapidly removed them from the nest. However, they showed specific, stereotyped behaviors during removal that differed based on intruder type, which suggests that the workers discriminated among intruder types and behaved accordingly, resulting in a different behavioral sequence structure (Fig. 1). Furthermore, the decision-making time for removing live weevils was not significantly different than for removing pentane-washed wasps, but it tended to be shorter. Additionally, ants carrying weevils moved faster than ants carrying pentane-washed wasps. Globally, these data suggest that *E. tuberculatum* intruder removal is intruder-specific and cannot simply be considered a general nest-cleaning activity.

The presence of live insects was likely a strong stimulus that elicited a faster and stronger response in the specialized workers, which also exhibited certain agonistic

behaviors; mandible strikes and stinging attempts were frequently observed with *C. oryzae*. Similarly, live *D. lachaudii* parasitoids always elicited a strong response from *E. tuberculatum* workers, which exhibited mandible strikes and stinging attempts during removal (Pérez-Lachaud et al., unpub. data). Compared with live insects, the removal of pentane-washed wasps required more time but each was removed. The static, odorless intruders were repeatedly contacted and antennated before being gently removed, which suggests that visual and tactile stimuli are also involved in *E. tuberculatum* intruder recognition.

A positive relationship was observed between the numbers of intruder encounters and removals performed by the *E. tuberculatum* workers, which suggests that certain individuals may have more opportunities to encounter intruders or are more sensitive and, hence, more prone to respond to intruder stimuli. The allocation of tasks in the colony is believed to depend strongly on the ants' spatial location in the nest, which implies that whether an ant performs a task is related to its proximity to the stimulus (Fresneau et al. 1989; Arcaute et al. 2009). Because we used focal recorder sampling during the bioassays, we could not measure the distances between different workers and an intruder. However, although only a few workers performed removals, approximately 75% of the workers in our experimental colonies came into contact with the intruders during the trials. These data suggest that even if numerous workers were in the vicinity of an intruder, they were not ready or willing to perform the task and did not participate in the removal. Furthermore, contact with an intruder was not sufficient to trigger its removal because the first worker that encountered an intruder initiated its removal in only 32.5% of the sequences. Therefore, it is likely that the workers' spatial location in the nest does not solely explain the behavioral specialization observed.



Among the numerous factors that may influence task specialization in social insects, several authors have indicated a key role for interindividual variability (Perez et al. 2013; Jeanson & Weidenmüller in press). Most of the removals (at least 60% in each colony) observed in the present study were performed by only two to four workers, which were much more active than the other specialists and persistent in their role, fully qualifying as elite-workers (see Chen 1937; Oster & Wilson 1978; Lenoir & Ataya 1983). Such hyper-specialized workers may have a lower response threshold to certain intruder-related cue(s) (e.g., movement, odor, and form) than the other workers. Alternatively, positive reinforcement from a previous, successful task (see Deneubourg et al. 1987; Ravary et al. 2007) may influence the likelihood of performing intruder removal. Stimuli responsiveness variability between individuals belonging to different behavioral castes has been demonstrated in *E. tuberculatum* as a differential capacity to discriminate between nestmate and non-nestmate brood among foragers and nurses (Fénéron & Jaisson 1992). Moreover, young workers of the same age and reared under similar environmental conditions showed high interindividual variability in the intensity of brood care performed (Champalbert & Lachaud 1990).

In addition to behavioral specialization and hyper-specialization by certain individuals in intruder removal, our data suggest a finer degree of specialization related to intruder type; certain workers only removed live weevils, and other workers exclusively removed eucharitid wasps. The wasps were pentane-washed and, hence, did not include the chemicals that characterize corpses. Thus, this difference likely resulted from individual variability in selecting the intruder for removal (perhaps due to experience and/or to the first intruder the “specialized worker” encountered influencing its subsequent choices), and not from a difference in the nature of such behavior

(intruder removal vs. necrophoric or corpse-rejecting behavior). However, more bioassays are necessary to explore this notion. Behavioral specialization on specific food items (i.e., the tendency to consistently choose the same food item when others are available) has been demonstrated among foragers of certain ant species (Rissing 1981; Dejean & Lachaud 1991; Fewell & Harrison 1991; Agbogba & Howse 1992), namely, in the related species *Ectatomma ruidum* (Passera et al. 1994; Schatz et al. 1995), which also exhibited within-caste elitism.

Task partitioning (i.e., dividing a task into subtasks performed by different individuals) is a key adaptive behavior that requires group-level coordinated actions and has been demonstrated in several ant species in several contexts, particularly during foraging (Fewell & Harrison 1991; Agbogba & Howse 1992; Schatz et al. 1996; Reyes & Fernández Haeger 1999; López et al. 2000). Herein, we observed task partitioning during intruder removal. In certain instances, the intruders were deposited at the nest exit hole by one worker and were then transported to the refuse pile by a second worker. In two additional instances with live weevils, robbing (a worker taking the intruder by force from the transporting worker) was observed, and the “thief” worker removed the *C. oryzae* intruder.

Individual experience and learning abilities are known to influence which tasks a worker engages in (Deneubourg et al. 1987; Fourcassié & Traniello 1994; Ravary et al. 2007; Franklin et al. 2012). For *E. tuberculatum*, such learning abilities have been demonstrated in a variety of contexts. For example, learning of orientation and timing is involved when the workers forage on patchy food resources on the forest floor, which is linked to foraging success during previous trips (Franz & Wcislo 2003). When foraging in an experimental tridimensional device, workers rapidly learn (most often in a one-trial

essay) individual routes, and show long-term constancy in exploiting only one or a few food sources (Roche-Labarbe et al. 2004), just as they do in natural conditions (García-Pérez et al. 1991). Furthermore, workers of this species can learn to avoid a new, unpalatable prey type, such as *Acrolepiopsis assectella* larvae, after a single contact with the larvae (Godzinska 1989) or to escape the web of a dangerous opponent, such as the spider *Nephila clavipes*, after a single trial (Hénaut et al. 2013). These data strongly suggest that this ant species may learn certain traits related to intruders. Under our experimental conditions, both individual experience and positive reinforcement may have played roles in the observed patterns and task specialization for *E. tuberculatum* workers.

Our results suggest that *E. tuberculatum* workers respond with flexibility to alien organisms encountered in their nest; the intruders that represented a potential threat to the ants were removed faster than the inanimate intruders. Such flexibility may represent an adaptive advantage under natural conditions, where ants interact with natural enemies, such as parasitoids, and other intruders, such as homospecific non-nestmate thieves.

### **Acknowledgements**

We thank Y. Hénaut for useful comments and suggestions on a previous version of the manuscript. This study was supported by scholarship grant no. 415149 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to FHRV. The experiments and field work comply with current Mexican laws.

## Literature Cited

- Abramowski, D., Currie, C. R. & Poulsen, M. 2011: Caste specialization in behavioral defenses against fungus garden parasites in *Acromyrmex octospinosus* leaf-cutting ants. *Insect. Soc.* **58**, 65–75.
- Agbogba, C. & Howse, P. E. 1992: Division of labour between foraging workers of the ponerine ant *Pachycondyla cafraria* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Insect. Soc.* **39**, 455–458.
- Arcaute, E., Christensen, K., Sendova-Franks, A., Dahl, T., Espinosa, A. & Jensen, H. J. 2009: Division of labour in ant colonies in terms of attractive fields. *Ecol. Complex.* **6**, 396–402.
- Bagnères, A.-G. & Lorenzi, M. C. 2010: Chemical deception/mimicry using cuticular hydrocarbons. In: *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (Blomquist, G. J., Bagnères, A.-G., eds). Cambridge University Press. pp. 282–323.
- Banschbach, V. S., Brunelle, A., Bartlett, K. M., Grivetti, J. Y. & Yeaman, R. L. 2006: Tool use by the forest ant *Aphaenogaster rudis*: Ecology and task allocation. *Insect. Soc.* **53**, 463–471.
- von Beeren, C., Schulz, S., Hashim, R. & Witte, V. 2011: Acquisition of chemical recognition cues facilitates integration into ant societies. *BMC Ecology* **11**:30.
- Beshers, S. N. & Fewell, J. H. 2001: Models of division of labor in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* **46**, 413–440.
- Bonabeau, E., Theraulaz, G. & Deneubourg, J.-L. 1998: Fixed response thresholds and the regulation of division of labor in insect societies. *Bull. Math. Biol.* **60**, 753–807.

- Breed, M. D., Snyder, L. E., Lynn, T. L. & Morhart, J. A. 1992: Acquired chemical camouflage in a tropical ant. *Anim. Behav.* **44**, 519–523.
- Carey, B., Visscher, K. & Heraty, J. 2012: Nectary use for gaining access to an ant host by the parasitoid *Orasema simulatrix* (Hymenoptera, Eucharitidae). *J. Hym. Res.* **27**, 47–65.
- Champalbert, A. & Lachaud, J.-P. 1990: Existence of a sensitive period during the ontogenesis of social behaviour in a primitive ant. *Anim. Behav.* **39**, 850–859.
- Chen, S. C. 1937: The leaders and followers among the ants in nest-building. *Physiol. Zool.* **10**, 437–455.
- Clausen, C. P. 1941: The habits of the Eucharidae. *Psyche* **48**, 57–69.
- Corbara, B., Lachaud, J.-P. & Fresneau, D. 1989: Individual variability, social structure and division of labour in the ponerine ant *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera, Formicidae). *Ethology* **82**, 89–100.
- Crosland, M. W. J. 1990: Variation in ant aggression and kin discrimination ability within and between colonies. *J. Insect Behav.* **3**, 359–379.
- Déjean, A. & Lachaud, J.-P. 1991: Polyethism in the ponerine ant *Odontomachus troglodytes*: interaction of age and interindividual variability. *Sociobiology* **18**, 177–196.
- Dejean, A. & Lachaud, J.-P. 1992: Growth-related changes in predation behavior in incipient colonies of the ponerine ant *Ectatomma tuberculatum* (Olivier). *Insect. Soc.* **39**, 129–143.
- Deneubourg, J.-L., Goss, S., Pasteels, J. M., Fresneau, D. & Lachaud, J.-P. 1987: Self-organization mechanisms in ant societies (II): Learning in foraging and division of labor. *Experientia Suppl.* **54**, 177–196.

- Diez, L., Le Borgne, H., Lejeune, P., & Detrain, C. 2013: Who brings out the dead? Necrophoresis in the red ant, *Myrmica rubra*. *Anim. Behav.* **86**, 1259–1264.
- Dornhaus, A., Powell, S. & Bengtson, S. 2012: Group size and its effects on collective organization. *Annu. Rev. Entomol.* **57**, 123–141.
- Duarte, A., Weissing, F. J., Pen, I. & Keller, L. 2011: An evolutionary perspective on self-organized division of labor in social insects. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **42**, 91–110.
- Fénéron, R. 1993: Éthogénèse et reconnaissance interindividuelle: influence de l'expérience précoce chez une fourmi ponérine (*Ectatomma tuberculatum* Olivier). PhD Thesis, Université Paris 13, Paris, France.
- Fénéron, R. & Jaisson, P. 1992: Nestmate-brood recognition among workers of different social status in *Ectatomma tuberculatum* Olivier (Formicidae, Ponerinae). *Behav. Process.* **27**, 45–51.
- Fewell, J. H. & Harrison, J. F. 1991: Flexible seed selection by individual harvester ants, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **28**, 377–384.
- Fourcassié, V. & Traniello, J. F. A. 1994: Food searching behaviour in the ant *Formica schaufussi* (Hymenoptera, Formicidae): response of naive foragers to protein and carbohydrate food. *Anim. Behav.* **48**, 69–79.
- Franklin, E. L., Robinson, E. J. H., Marshall, J. A. R., Sendova-Franks A. B. & Franks, N. R. 2012: Do ants need to be old and experienced to teach? *J. Exp. Biol.* **215**, 1287–1292.
- Franz, N. M. & Wcislo, W. T. 2003: Foraging behavior in two species of *Ectatomma* (Formicidae: Ponerinae): individual learning of orientation and timing. *J. Insect Behav.* **16**, 381–410.

- Fresneau, D., García Pérez, J. & Jaisson, P. 1982: Evolution of polyethism in ants: observational results and theories. In: *Social Insects in the Tropics*, vol. 1 (Jaisson, P. ed.). Presses de l'Université de Paris XIII, Paris, pp. 129–155.
- Fresneau, D. & Lachaud, J.-P. 1984: Résultats préliminaires sur l'ontogenèse d'une société d'*Ectatomma tuberculatum* (Hym. Formicidae). In: *Processus d'Acquisition Précoce. Les Communications* (De Haro, A., Espadaler, X., eds). Publ. Universitat Autònoma de Barcelona e S.F.E.C.A., Barcelona, Spain, pp. 437–444.
- Fresneau, D., Corbara, B. & Lachaud, J.-P. 1989: Organisation sociale et structuration spatiale autour du couvain chez *Pachycondyla apicalis* (Formicidae, Ponerinae). *Actes Coll. Ins. Soc.* **5**, 83–92.
- Fürst, M. A., Durey, M. & Nash, D. R. 2012: Testing the adjustable threshold model for intruder recognition on *Myrmica* ants in the context of a social parasite. *Proc. R. Soc. B* **279**, 516–522.
- García-Pérez, J. A., Peña-Sánchez, R., Camargo-Huiqui, P. & Champalbert, A. 1991. Rutas de forrajeo utilizadas por *Ectatomma tuberculatum* O. (Hymenoptera, Ponerinae) en una plantación de cacao en el Soconusco, Chiapas, México. *Folia Entomol. Mex.* **82**, 161–171.
- Galwey, N. W. 2006: *Introduction to Mixed Modeling: Beyond Regression and Analysis of Variance*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Gardner, K. E., Foster, R. L. & O'Donnell, S. 2007: Experimental analysis of worker division of labor in bumblebee nest thermoregulation (*Bombus huntii*, Hymenoptera: Apidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **61**, 783–792.

- Giray, T. & Robinson, G. E. 1994: Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **35**, 13–20.
- Godzinska, E. J. 1989: Rapid learning of a new prey type in the ants. Abstracts 21st Intern. Ethol. Conf., Utrecht, The Netherlands, pp. 69.
- Gordon, D. 2003: The organization of work in social insect colonies. Task allocation as an ad hoc, dynamical network. *Complexity* **8**, 43–46.
- Gordon, D. M. & Mehdiabadi, N. J. 1999: Encounter rate and task allocation in harvester ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **45**, 370–377.
- Gordon, D. M., Guetz, A., Greene, M. J. & Holmes, S. 2011: Colony variation in the collective regulation of foraging by harvester ants. *Behav. Ecol.* **22**, 429–435.
- Hénaut, Y., Machkour-M'Rabet, S. & Lachaud, J.-P. 2013: The role of learning in risk-avoidance strategies during spider–ant interactions. *Anim. Cogn.* 10.1007/s10071-013-0651-x.
- Heraty, J. M. 2002: A revision of the genera of Eucharitidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) of the world. *Mem. Am. Entomol. Inst.* **68**, 1–368.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. 1990: *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Hughes, D. P., Pierce, N. E. & Boomsma, J. J. 2008: Social insect symbionts: evolution in homeostatic fortresses. *Trends Ecol. Evol.* **23**, 672–677.
- Jaisson, P., Fresneau, D. & Lachaud, J.-P. 1988: Individual traits of social behavior in ants. In: *Interindividual Behavioral Variability in Social Insects* (Jeanne, R. L., ed.). Westview Press, Boulder, USA, pp. 1–51.



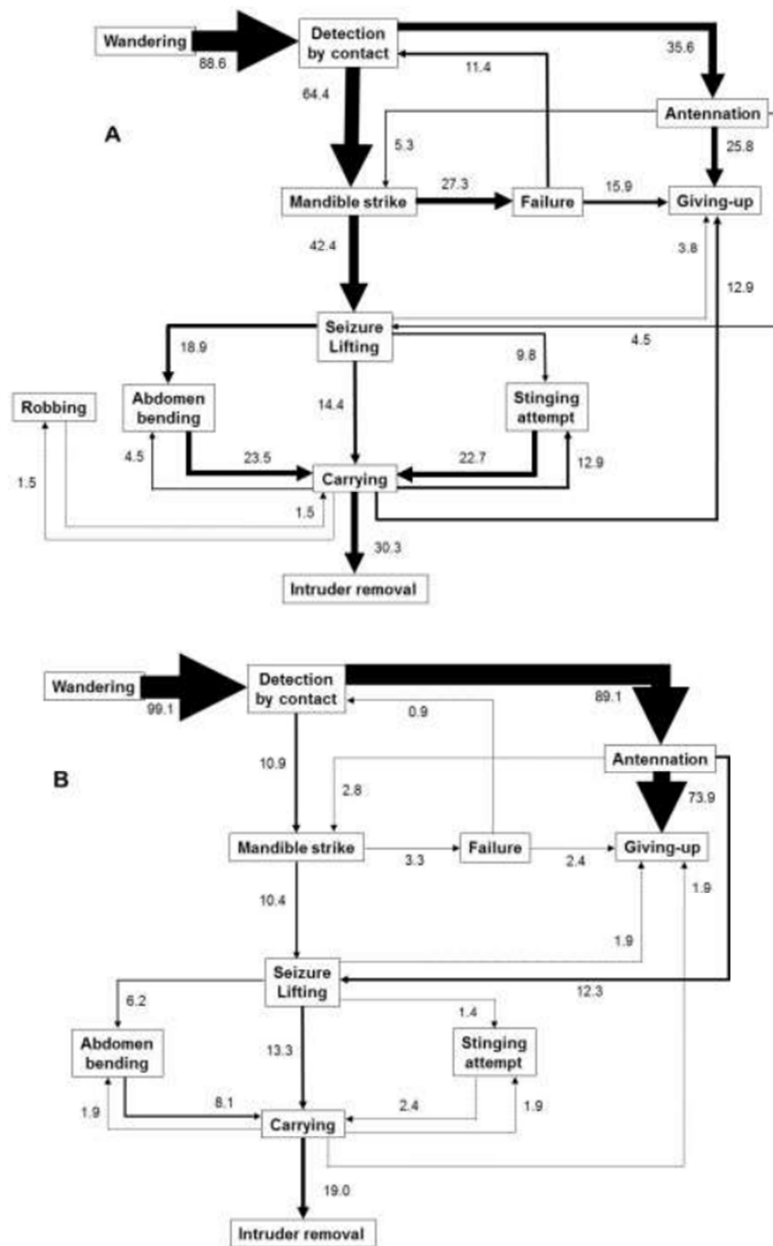
- Jandt, J. M., Bengston, S., Pinter-Wollman N., Pruitt, J. N., Raine, N. E., Dornhaus, A. & Sih, A. 2013: Behavioural syndromes and social insects: personality at multiple levels. *Biol. Rev.* DOI: 10.1111/brv.12042.
- Jeanson, R. & Weidenmüller, A. Interindividual variability in social insects – proximate causes and ultimate consequences. *Biol. Rev.*, in press.
- Julian, G. E. & Cahan, S. 1999: Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. *Anim. Behav.* **58**, 437–442.
- Julian, G. E. & Fewell, J. H. 2004: Genetic variation and task specialization in the desert leaf-cutter ant, *Acromyrmex versicolor*. *Anim. Behav.* **68**, 1–8.
- Kistner, D. H. 1982: The social insects' bestiary. In: *Social Insects* (Hermann, H. R., ed.). Academic Press, New York, NY, USA. pp. 1–244.
- Lachaud, J.-P. & Fresneau, D. 1987: Social regulation in ponerine ants. *Experientia Suppl.* **54**, 197–217.
- Lachaud, J.-P. & Pérez-Lachaud, G. 2012: Diversity of species and behavior of hymenopteran parasitoids of ants: a review. *Psyche* **2012**, Article 134746, 24 pp.
- Lachaud, J.-P., Pérez-Lachaud, G. & Heraty, J. M. 1998: Parasites associated with the ponerine ant *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae): first host record for the genus *Dilocantha* (Hymenoptera: Eucharitidae). *Fla. Entomol.* **81**, 570–574.
- Lenoir, A. & Ataya, H. 1983: Polyéthisme et répartition des niveaux d'activité chez la fourmi *Lasius niger* L. *Z. Tierpsychol.* **63**, 213–232.
- Lenoir, A., D'Éttorre, P., Errard, C. & Hefetz, A., 2001: Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annu. Rev. Entomol.* **46**, 573–599.

- López, F., Agbogba, C. & Ndiaye, I. 2000: Prey chain transfer behaviour in the African stink ant, *Pachycondyla tarsata* Fabr. *Insect. Soc.* **47**, 337–342.
- Nowbahari, E., Hollis, K. L. & Durand, J.-L. 2012: Division of labor regulates precision rescue behavior in sand-dwelling *Cataglyphis cursor* ants: to give is to receive. *PloS One* **7**, e48516.
- Oldroyd, B. P. & Thompson, G. J. 2006: Behavioural genetics of the honey bee *Apis mellifera*. *Adv. Ins. Physiol.* **33**, 1–49.
- Oster, G. F. & Wilson, E. O. 1978: *Caste and Ecology in the Social Insects*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Passera, L., Lachaud, J.-P. & Gomel, L. 1994: Individual food source fidelity in the neotropical ponerine ant *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera Formicidae). *Ethol. Ecol. Evol.* **6**, 13–21.
- Perez, M., Rolland, U., Giurfa, M. & d’Etorre, P. 2013: Sucrose responsiveness, learning success, and task specialization in ants. *Learn. Mem.* **20**, 417–420.
- Pérez-Lachaud, G., Heraty, J. M., Carmichael, A. & Lachaud, J.-P. 2006: Biology and behavior of *Kapala* (Hymenoptera: Eucharitidae) attacking *Ectatomma*, *Gnamptogenys*, and *Pachycondyla* (Formicidae: Ectatomminae and Ponerinae) in Chiapas, Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **99**, 567–576.
- Pérez-Lachaud, G., López-Méndez, J. A., Beugnon, G., Winterton, P. & Lachaud, J.-P. 2010: High prevalence but relatively low impact of two eucharitid parasitoids attacking the Neotropical ant *Ectatomma tuberculatum* (Olivier). *Biol. Control* **52**, 131–139.
- Pinter-Wollman, N., Gordon, D. M. & Holmes, S. 2012: Nest site and weather affect the personality of harvester ant colonies. *Behav. Ecol.* **23**, 1022–1029.

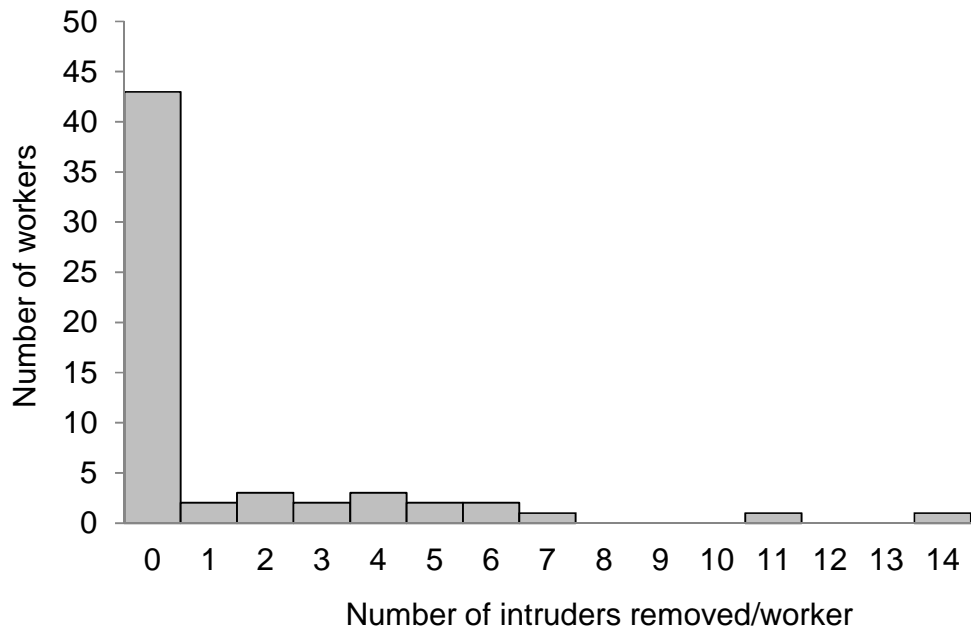
- Pinter-Wollman, N., Bala, A., Merrell, A., Queirolo, J., Stumpe, M. C., Holmes, S. & Gordon, D. M. 2013: Harvester ants use interactions to regulate forager activation and availability. *Anim. Behav.* **86**, 197–207.
- Powell, S. & Tschinkel, W. R. 1999: Ritualized conflict in *Odontomachus brunneus* and the generation of interaction-based task allocation: a new organizational mechanism in ants. *Anim. Behav.* **58**, 965–972.
- R Core Team 2013: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Raine, N. E., Ings, T. C., Ramos-Rodríguez, O. & Chittka, L. 2006: Intercolony variation in learning performance of a wild British bumblebee population (Hymenoptera: Apidae: *Bombus terrestris audax*). *Entomol. Gener.* **28**, 241–256.
- Ravary, F., Lecoutey, E., Kaminski, G., Châline, N. & Jaisson, P. 2007: Individual experience alone can generate lasting division of labor in ants. *Curr. Biol.* **17**, 1308–1312.
- Reyes, J. L. & Fernández Haeger, J. 1999: Sequential co-operative load transport in the seed-harvesting ant *Messor barbarus*. *Insect. Soc.* **46**, 119–125.
- Rissing, S. W. 1981: Foraging specializations of individual seed-harvester ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **9**, 149–152.
- Robinson, E. J. H., Feinerman, O. & Franks, N. R. 2009: Flexible task allocation and the organization of work in ants. *Proc. R. Soc. B* **276**, 4373–4380.
- Robinson, G. E. 1992: Regulation of division of labor in insect societies. *Ann. Rev. Entomol.* **37**, 637–665.

- Robson, S. K. & Traniello, J. F. A. 1999: Key individuals and the organisation of labor in ants. In: Information Processing in Social Insects (Detrain, C., Pasteels, J. M., Deneubourg, J.-L., eds). Birkäuser Verlag Press, pp. 239–259.
- Roche-Labarbe, N., Beugnon, G. & Lachaud, J.-P. 2004: Apprentissage de routes et orientation spatiale chez un insecte sur un support en trois dimensions. Actes Coll. Ins. Soc. **16**, 52–56.
- Schatz, B., Lachaud, J.-P. & Beugnon, G. 1995: Spatial fidelity and individual foraging specializations in the Neotropical ponerine ant, *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera, Formicidae). Sociobiology 26, 269–282.
- Schatz, B., Lachaud, J.-P. & Beugnon, G. 1996: Polyethism within hunters of the ponerine ant, *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera, Ponerinae). Insect. Soc. 43, 111–118.
- Schatz, B., Lachaud, J.-P. & Beugnon, G. 1997: Graded recruitment and hunting strategies linked to prey weight and size in the ponerine ant *Ectatomma ruidum*. Behav. Ecol. Sociobiol. 40, 337–349.
- Sendova-Franks, A. B. & Franks, N. R. 1995: Spatial relationships within nests of the ant *Leptothorax unifasciatus* (Latr.) and their implications for the division of labour. Anim. Behav. **50**, 121–136.
- Sumana, A. & Sona, C. 2013: Key relocation leaders in an Indian queenless ant. Behav. Process. **97**, 84–89.
- Sun, Q. & Zhou, X. 2013: Corpse management in social insects. Intern. J. Biol. Sci. **9**, 313–321.

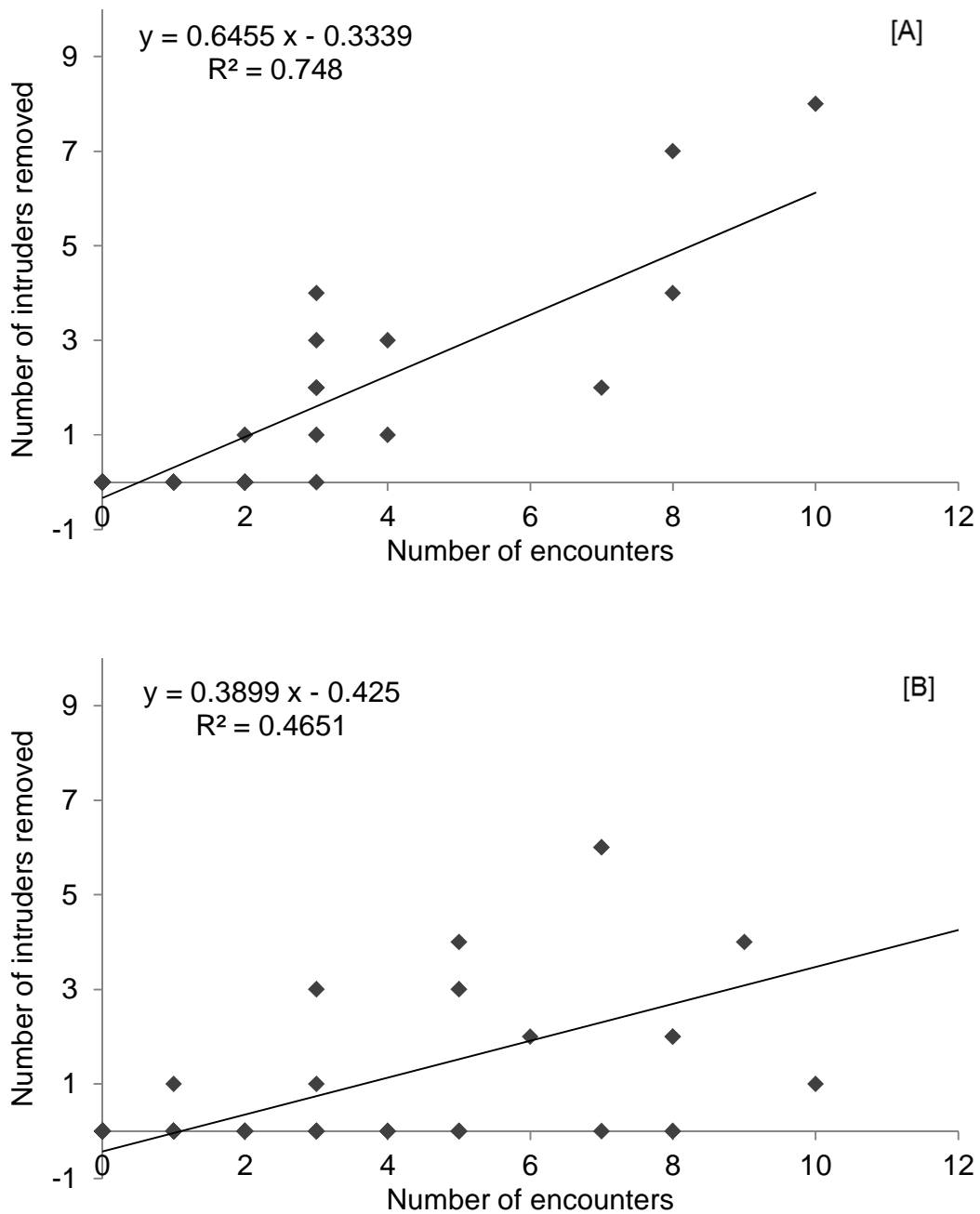
- Theraulaz, G., Bonabeau, E. & Deneubourg, J.-L. 1998: Response threshold reinforcement and division of labour in insect societies. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **265**, 327–332.
- Tripet, F. & Nonacs, P. 2004: Foraging for work and age-based polyethism: the roles of age and previous experience on task choice in ants. *Ethology* **110**, 863–877.
- Valenzuela-González, J., López-Méndez, A. & Lachaud, J.-P. 1995: Activity patterns and foraging activity in nests of *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) in cacao plantations. *Southwest. Entomol.* **20**, 507–515.
- Vander Meer, R. K., Jouvenaz, D. P. & Wojcik, D. P. 1989: Chemical mimicry in a parasitoid (Hymenoptera: Eucharitidae) of fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Chem. Ecol.* **15**, 2247–2261.
- Yamaguchi, T. 1995: Intraspecific competition through food robbing in the harvester ant, *Messor aciculatus* (Fr. Smith), and its consequences on colony survival. *Insect. Soc.* **42**, 89–101.



**Figure 1.** Behavioral sequences of *Ectatomma tuberculatum* workers upon encountering two different intruder types. (A) Live *Caulophilus oryzae* weevils (n = 132 sequences; and (B) dead, pentane-washed *Dilocantha lachaudii* wasps (n = 211 sequences). For each intruder type, 40 trials were conducted. The percentage values were calculated as the observed transition frequencies between two successive behavioral acts, divided by the number of sequences. The arrows' thickness is proportional to the percent value.

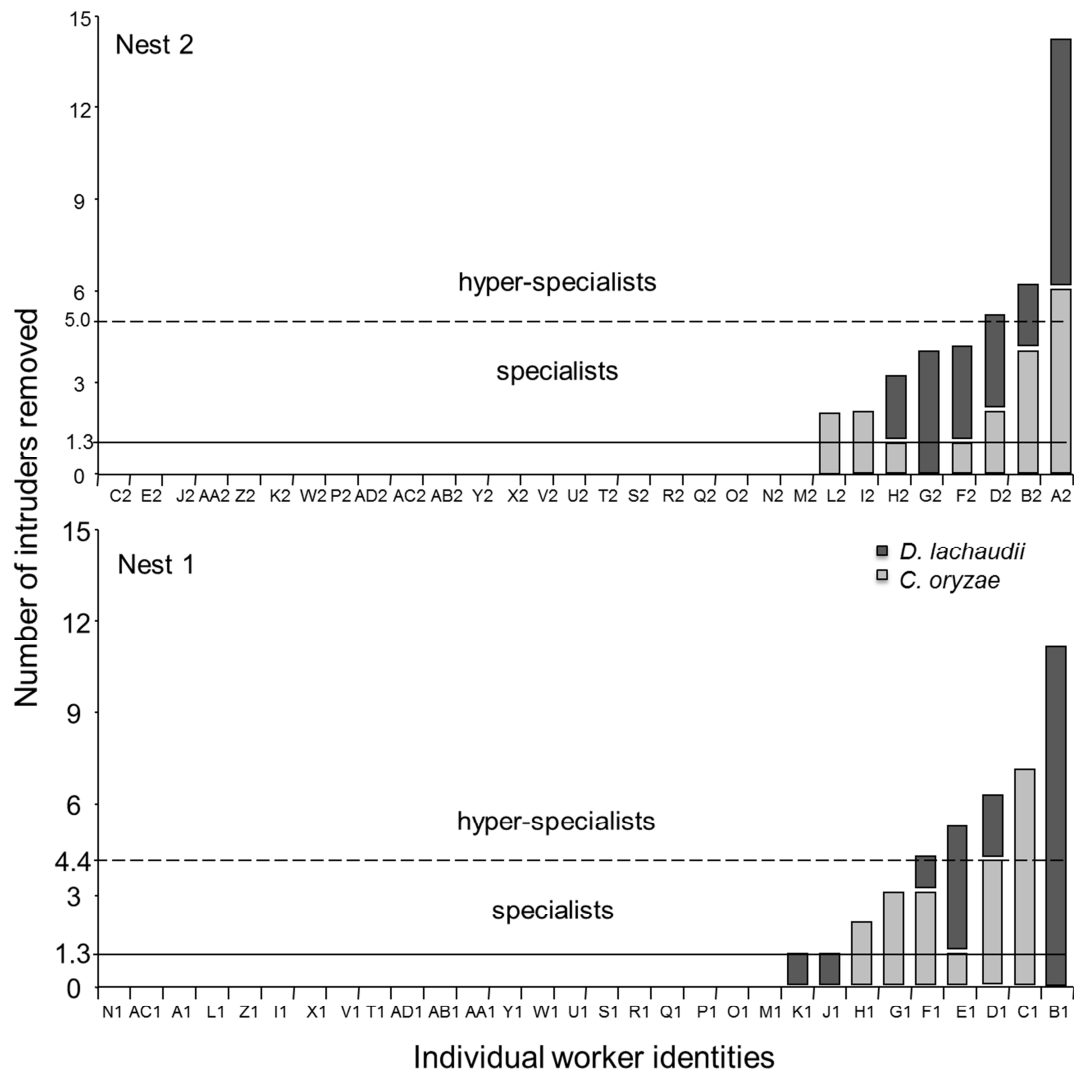


**Figure 2.** The frequency distribution for the number of intruders removed per worker in the two *E. tuberculatum* nests. Pooled data for the two intruder types are presented (N = 80).



**Figure 3.** The relationship between the number of encounters with two intruder types and the number of removals each ant performed. Pooled data for the two *E. tuberculatum* nests are presented. A) Live *Caulophilus oryzae* weevils; and B) dead, pentane-washed *Dilocantha lachaudii* wasps. N = 40 trials per intruder.





**Figure 4.** The intruder numbers and types removed by individual, marked workers in the two *E. tuberculatum* nests. For each nest, the individual workers are presented based on their rank (removal rate). Continuous line: the baseline for the specialists; dashed line: the baseline for the hyper-specialists (see the text for an explanation).

**Table 1.** The behavioral repertoire observed in *Ectatomma tuberculatum* workers upon encountering intruders in their nests.

Behavior	Description
Wandering	Ants move about within the nest box.
Detection through contact	Ants approach the intruder and contact it with their antennae.
Antennation	Ants explore the intruder through rapid antennae movement.
Mandible strike	Sudden mandible snapping directed toward the intruder. As a result, the worker may catch the intruder between the mandibles or throw it out.
Seizure - lifting	The intruder is seized with the mandibles and lifted.
Carrying	The intruder is transported by an ant using its mandibles.
Abdomen bending	The ant bends its gaster while holding the intruder between its mandibles.
Stinging attempt	While bending the abdomen, the stinger is protruded to sting the intruder.
Intruder removal	The intruder is transported outside and dropped in the midden pile or foraging arena.
Failure	The mandible strike fails, and the intruder is thrown out and is momentarily lost by the ant.
Giving up	The ant ceases its intruder-related behavior and walks away.
Robbing	While a first worker carries the intruder between its mandibles, a second worker takes the intruder by force.