

**Estructura social, explotación de los recursos y
distribución de la hormiga *Cataglyphis floricola*
Tinaut 1993.**



TESIS DOCTORAL

Fernando Amor González

Sevilla 2011

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
ESTACIÓN BIOLÓGICA DE DOÑANA
Departamento de Etología y Conservación de la Biodiversidad**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
Departamento de Fisiología y Zoología**

**Estructura social, explotación de los recursos y
distribución de la hormiga *Cataglyphis floricola* Tinaut
1993.**

TESIS DOCTORAL

Fernando Amor González

2011

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
ESTACIÓN BIOLÓGICA DE DOÑANA
Departamento de Etología y Conservación de la Biodiversidad**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
Departamento de Fisiología y Zoología**

**Estructura social, explotación de los recursos y distribución
de la hormiga *Cataglyphis floricola* Tinaut 1993.**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas por**

Fernando Amor González

Directores de la memoria

Fdo. Dr. Xim Cerdá Sureda

Fdo. Dr. Raphaël Boulay

Fdo. Fernando Amor González

Fdo. Dr. Juan Antonio Galarza

A
Patro

Agradecimientos

.En primer lugar, agradezco a los tres directores de mi tesis, Xim Cerdá, Raphaël Boulay y Juan Galarza, su dedicación a tal fin, especialmente a Raphaël Boulay, quien ha llevado la mayor parte del peso de esta dirección, y de quien he aprendido muchísimo, y a Xim Cerdá, por proponerme que hiciera la tesis, por sus correcciones, observaciones y consejos.

Un agradecimiento muy especial es para Patrocinio Ortega, mi mujer y ayudante de campo esencial. En todos los trabajos de esta tesis ha intervenido. Hemos pasado muy buenos días de campo con las dichosas hormiguitas.

Mi agradecimiento también, sea por su colaboración científica, ayuda en el campo u otra faceta relacionada con este trabajo, a las siguientes personas: Ángel Barroso, Mike Jowers, Alain Lenoir, Alberto Tinaut, Ana Carvajal, David Aragonés, Juan Balbontín, María de los Ángeles Cobo, Lucila Sinde, Elena Angulo, Abraham Hefetz, Thibaud Monin, Christian Peeters, Camille Ruel, Ramón Soriguer, Marisa Giménez y Carmen Tozcano,

Mi agradecimiento también para todo el personal de la Estación, y de la Reserva, Biológica de Doñana, por su amabilidad y profesionalidad.

ÍNDICE

I. Introducción general.	3
II Primera parte: Evolución, filogeografía y distribución.	9
Capítulo 1: Distribución y filogeografía de <i>Cataglyphis floricola</i>.	11
Introducción.	11
Material y métodos.	14
Distribución.	14
Diseño del transecto.	15
Análisis moleculares.	16
Estructura de la población	17
Características morfológicas: genitalia de los machos.	19
Análisis químicos cuticulares.	20
Resultados.	21
Distribución.	21
Estructura poblacional.	21
Morfología.	28
Análisis químicos cuticulares.	29
Discusión.	30
Capítulo 2: Descripción taxonómica de la nueva especie <i>Cataglyphis tartessica</i>.	35
Introducción.	35
Material y métodos.	36
Recolección de hormigas.	36
Análisis estadísticos.	37
Resultados.	37
Material.	37
Descripción.	38
Afinidades.	43
Discusión.	46
III Segunda parte: Ecología de <i>C. tartessica</i>.	49
Capítulo 3: Aspectos ecológicos básicos.	51
Introducción.	51
Material y métodos.	52
Distribución de los nidos.	52
Evolución demográfica de las colonias.	53
Alimentación.	54
Modo de forrajeo.	54
Resultados.	55
Distribución de nidos.	55
Periodo de actividad y variaciones estacionales en el número de nidos.	56
Composición y variación estacional de la demografía colonial.	57
Alimentación.	59
Modo de forrajeo.	61

Discusión.	62
Capítulo 4: Efecto de la elevación solar en la actividad de forrajeo.	67
Introducción.	67
Material y métodos.	69
Registro de la actividad de forrajeo.	69
Variación estacional de la actividad respecto a la temperatura del suelo y la elevación solar.	70
Variaciones diarias de la actividad de las hormigas dependiendo de la temperatura y de la elevación solar.	71
Apertura y cierre de los nidos.	71
Resultados.	73
Variaciones estacionales en la actividad.	73
Variaciones diarias en la actividad.	74
Apertura y cierre de los nidos.	76
Discusión.	77
Capítulo 5: Reclutamiento y transporte cooperativo de presas.	81
Introducción.	81
Material y métodos.	82
Resultados.	82
Discusión.	85
IV Tercera parte: Reproducción de <i>C. tartessica</i>.	87
Capítulo 6: Evolución del polimorfismo obrera-reina.	89
Introducción.	89
Material y métodos.	92
Recolección de hormigas y zona de estudio.	92
Polimorfismo obrera-reina.	92
Análisis estadísticos.	94
Resultados.	94
Polimorfismo reina-obrera.	94
Segregación de castas y lucha entre princesas en los nidos madre e hijo.	98
Discusión.	100
Capítulo 7: La fisión colonial.	105
Introducción.	105
Material y métodos.	106
Recolección de hormigas y muestreo.	106
Análisis estadísticos.	107
Resultados.	107
El proceso de fisión.	107
Ciclo de desarrollo de los sexuados.	112
Discusión.	115
V Conclusiones.	117
VI Bibliografía.	119

Introducción general

Los insectos sociales, las hormigas, las abejas y avispas sociales, y las termitas, son uno de los productos más asombrosos, exitosos e instructivos de la evolución. Dominan el entorno de la mayoría de los hábitats terrestres (Wilson 1971) y deben su éxito evolutivo y ecológico a la regulación de los conflictos internos (Bourke 2005; Ratnieks et al. 2006), al control de enfermedades (Schmid-Hempel 1998; Boomsma et al. 2005), y al desarrollo de habilidades e inteligencia colectiva en la adquisición de recursos, en la construcción del nido y en su defensa (Deneubourg y Goss 1989; Camazine et al. 2001). Aunque representan tan sólo el 2% de las aproximadamente 900.000 especies de insectos, su biomasa llega a ser la mitad de la de éstos (Hölldobler y Wilson 2009). Son animales que viven en sociedades divididas en castas reproductoras (machos y hembras) y no reproductoras (obreras y soldados), con un elevado grado de organización social, también denominado eusocialidad (Batra 1966).

Debido a su interés, los insectos sociales han sido utilizados en numerosos estudios como modelos en investigación de la evolución social.

En una naturaleza en la que la selección natural recompensa normalmente la competición y el egoísmo, la aparición de la cooperación entre individuos de la misma o distintas especies siempre resulta de interés. Los insectos sociales son especiales en este aspecto porque han llevado esta cooperación al extremo de renunciar a la propia reproducción individual en favor de la de una casta, la reina, dedicándose los demás miembros de la colonia a trabajar en el cuidado, defensa y alimentación de esta descendencia.

De entre los insectos sociales, las hormigas constituyen el grupo con mayor número de especies y más diverso ecológicamente (Grimaldi y Engel 2005; Hölldobler y Wilson 1990).

El género *Cataglyphis* pertenece a una de las más recientes subfamilias de hormigas: las Formicinas (Moreau et al. 2006); se trata de un género muy homogéneo,

formado por unas cien especies distribuidas por las regiones áridas de Europa, Asia y África, desde el extremo occidental del desierto del Sáhara y el Magreb hasta el desierto del Gobi (Lenoir et al. 2009). Con la excepción de dos especies parásitas, *C. hanna*e (Agosti, 1994), y *C. zakharovi* (Radchenko, 1997), todas las demás son diurnas y muy termófilas, forrajeando en las horas de mayor insolación, sobre suelos que pueden sobrepasar los 50 °C (Wehner et al., 1983; Cerdá et al., 1989; Lenoir et al., 1990; Cerdá y Retana, 1997).

Su relativa fácil localización y observación al habitar en zonas con poca cobertura, junto a la dureza de las condiciones ambientales de los lugares en los que se encuentran, hacen de ellas excelentes modelos en el estudio de interacciones entre ecología, comportamiento social y estrategias reproductivas.

El género *Cataglyphis* ha servido de modelo en muchos estudios dedicados a la navegación en insectos (Mittelstaedt y Mittelstaedt 1982; Wehner 1982, 2003, 2008; Wehner y Wehner 1986, 1990; Müller y Wehner 1988; Wehner et al. 2002; Collet y Collet 2000; Whener y Srinivasan 2003, Merkle et al 2006). Estos trabajos revelaron que las *Cataglyphis* se orientan mediante el uso de vectores de navegación, obtenidos a partir de la configuración espacial de la luz polarizada, cambiante con la posición del sol. Para ello, las obreras son capaces de integrar las informaciones de las direcciones tomadas en cada momento con las distancias recorridas en ellas para obtener un vector resultante que las dirija de nuevo al nido de forma directa. Además, utilizan marcas del terreno como ayuda en la navegación. Todo ello les permite un forrajeo individual de larga distancia, en busca de presas muy dispersas y de distribución aleatoria, debido a la poca productividad de los medios áridos en los que habitan, y en los que el uso de señales químicas (feromonas) de orientación resulta muy costoso o inoperante debido a la volatilidad de éstas y a las altas temperaturas que alcanza el suelo (Morgan 1984; Ruano et al. 2000; Morgan 2009, para una revisión; van Oudenhove et al. 2011).

Las *Cataglyphis* son hormigas cuyas adaptaciones al calor han dado lugar también a numerosos trabajos de investigación. Estas adaptaciones las podríamos clasificar en cuatro categorías: (1) de diseño corporal, (2) metabólicas, (3) químicas, y (4) de comportamiento. Así, el rasgo más característico que presentan estas hormigas es el de sus largas patas que, además de mantener separado a su cuerpo del suelo, y por

tanto de la fuente de calor, les permiten desplazarse a gran velocidad sobre él, minimizando el tiempo de exposición a las altas temperaturas (Delye 1968; Cerdá y Retana 2000; Clemencet et al. 2010). Como adaptación metabólica, las *Cataglyphis* evitan la pérdida de agua reduciendo su tasa de transpiración, gracias, entre otros factores, a la cantidad y/o calidad de sus lípidos cuticulares (Lenoir et al 2009). Entre las adaptaciones químicas, estas hormigas presentan proteínas de choque térmico (heat shock proteins) en su cuerpo que les permiten pasar de inmediato de los 30 °C del nido a temperaturas superiores a los 50°C del exterior sin sufrir daños (Gehring y Wehner 1995). Entre las adaptaciones de comportamiento a las altas temperaturas destaca el uso que hacen las obreras de refugios térmicos, tanto en superficie, como pequeñas sombras en las que detenerse, o a nivel, subiéndose por unos instantes en la vegetación (Marsh 1985, Christian y Morton 1992, Wehner et al. 1992). Durante las horas de máximo calor, con el suelo entre los 50 y 60 °C, los desplazamientos entre estos refugios se hacen a gran velocidad. Todas estas adaptaciones les permiten a las *Cataglyphis* forrajear, incluso, a temperaturas del suelo superiores a la de su tolerancia máxima, temperatura a la cual, tras 10 minutos de exposición, mueren, o quedan gravemente dañadas, el 50% de las hormigas, y que se sitúa entre los 50-56 °C, según la especie (Cerdá et al. 1998; Cerdá 2001).

Finalmente, otra adaptación, que además de tratarse de un comportamiento requiere de un diseño adecuado del peciolo de la hormiga, es la que presentan *C. rosenhaueri* y *C. iberica*. La elevación del gastro por ellas se interpreta como un mecanismo de defensa frente a la temperatura, evitando de esta forma que los órganos situados en él sufran daños debido a las elevadas temperaturas del suelo (Wehner 1989).

Las *Cataglyphis* suscitan también un extraordinario interés científico debido a la gran diversidad de estrategias reproductoras que presentan, y ello a pesar del limitado número de especies que han sido estudiadas. De forma general, la evolución de los apareamientos múltiples (poliandria) así como la coexistencia de varias reinas en una misma colonia (poliginia) resultan de gran interés ya que reducen el grado de parentesco entre los descendientes, y con ello, la ventaja que proporciona el altruismo reproductivo entre parientes con alta tasa de parentesco (Hamilton 1964). Aunque la poliandria es común en los insectos (Choe y Crespi 1997; Simmons y Siva-Jothy 1998; Arnquist y Nilsson 2000), es poco frecuente en los insectos sociales. Si bien la monoandria (cópula

de una hembra con un solo macho) representa el estado ancestral en los himenópteros sociales, la poliandria ha aparecido evolutivamente en contadas ocasiones, encontrándose en las abejas de la miel (*Apis mellifera*; Éstoup et al. 1994; Moritz et al. 1995; Oldroyd et al. 1995, 1996), en avispas del género *Vespula* (Ross y Visscher 1983;) y, entre las hormigas, está limitada a unos pocos géneros de las subfamilias Ecitoninae (*Eciton* y *Neivamyrmex*; Denny et al. 2004; Kronauer et al. 2007), Dorylinae (*Dorylus*; Kronauer et al. 2004, 2007), Aenictinae (*Aenictus*, Kronauer et al. 2007), Myrmicinae (*Atta*, *Acromyrmex* y *Pogonomyrmex*; Bekkevold et al. 1999; Boomsma et al. 1999; Villensen et al. 1999; Fjerdingstad et al. 1998; Murakami et al. 2000; Cole y Wiernasz 1999, 2000; Gadu et al. 2003; Rheindt et al. 2004; Wiernasz et al. 2004) y, en las Formicinae, en el género *Cataglyphis*; concretamente en las especies *C. cursor*, *C. sabulosa* y *C. livida*; (Percy et al. 2004; Timmermans et al. 2008, 2010).

Por otro lado, la poliginia ha evolucionado en varias especies de hormigas y, entre ellas, en al menos dos especies de *Cataglyphis*: *C. niger* (Nowbahari et al. 1994) y *C. mauritanicus* (Lenoir et al. 2009), lo que las hace de interés en el estudio de las presiones evolutivas que favorecieron, en ellas, su surgimiento.

En las hormigas, el número de reinas por colonia y el tipo de dispersión que ésta realiza están estrechamente relacionados con la estructura social (Bourke y Franks 1995; Crozier y Pamilo 1996; Ross 2001). Así, mientras que la monoginia está asociada con la fundación colonial independiente (FCI), con vuelos nupciales y formación de nuevos nidos lejos del de origen, la poliginia se asocia con la fundación colonial dependiente o fisión (FCD), en la que la nueva reina se desplaza caminando con un grupo de obreras y crías para originar una nueva colonia en las proximidades del nido de origen. Mientras que la FCI es la forma más frecuente de dispersión entre las hormigas, la FCD ha surgido de forma independiente en numerosas especies (Peeters e Ito 2001). En línea con esto, *C. niger* y *C. mauritanicus*, ambas poligínicas, se reproducen por fisión, mientras que *C. livida*, *C. bicolor*, *C. sabulosa* y *C. hispanica*, todas ellas monogínicas, lo hacen por fundación independiente (Knaden y Wehner 2006; Timmermans et al. 2008, 2010; Leniaud y Aron, datos no publicados). Sin embargo, existen notables excepciones a esta regla, como ocurre en *C. cursor*, en *C. floricola* y en *C. tartessica* nov. sp., las tres estrictamente monogínicas (Lenoir et al. 1988; Lenoir et al. 1990; Percy y Aron 2006; Amor et al. 2011; F. Amor, datos no publicados), quedando, con ello, aún por esclarecer las causas que delimitan la idoneidad de uno u otro modo de dispersión, ofreciendo las

Cataglyphis modelos muy interesantes de investigación en este campo. El modo de fundación tiene, por otra parte, importantes repercusiones en la vida de una especie. Además de la reducción del tamaño corporal de las reinas, al no precisar de alas, éstas van a estar protegidas por las obreras durante toda su vida, incluyendo el momento en el que son más vulnerables, cuando abandonan el nido para fundar nuevas colonias. Con ello aumentan el éxito del propágulo, aunque limitan su número y reducen mucho la distancia de dispersión. Además, el que se produzca la fisión va a depender de que se alcance un determinado tamaño colonial, lo que va a conllevar que, unido a lo anterior, en las colonias con fisión se producen un gran número de machos y pocas reinas.

Otro aspecto interesantísimo de las estrategias de reproducción presentes en las *Cataglyphis* está relacionado con la capacidad de producción de descendencia, tanto por parte de la reina como de las obreras, por partenogénesis telitoca¹. Se trata de una estrategia de reproducción muy infrecuente, estando citada en la mirmicina *Pristomyrmex pungens* (Itow et al 1984; Tsuji y Ito 1986), y muy bien documentada en *C. cursor* (Cagniant 1979, 1982; Lenoir y Cagniant 1986; Percy et al. 2006). Datos preliminares sugieren que también está presente en *C. floricola* (F. Amor, datos no publicados). No se conoce el grado de extensión de este fenómeno dentro del género *Cataglyphis*, ni las razones que han favorecido su evolución.

Como hemos visto, el género *Cataglyphis* ofrece modelos extraordinarios tanto a nivel ecológico como evolutivo. *C. floricola* es una especie con dos morfos, uno negro y otro bicolor, descubierta y descrita hace relativamente poco (Tinaut 1993), y de la que se conocía muy poco, razón que nos motivó a su selección como modelo de estudio. Se trata de una especie, como todas las del género, muy termófila, por lo que esta característica va a ser, precisamente, el hilo conductor de este trabajo.

En la Primera parte, dividida en dos capítulos, estudiamos, en el primero de ellos, la distribución de la especie, con especial atención a los espacios ocupados por sus morfos y la relación filogenética y evolutiva existente entre ellos y con su ancestro común, *Cataglyphis emmae*, para lo cual diseñamos una metodología multidisciplinar,

¹ La telitoquia es un tipo de partenogénesis en la que se produce un huevo diploide sin necesidad de fertilización, bien porque no se produce la meiosis (telitoquia apomíctica) o bien por fusión de los núcleos de los oocitos primarios (telitoquia automíctica).

en la que compaginamos trabajos moleculares, tanto mitocondriales como nucleares, con datos biométricos y químicos. Dado que obtuvimos resultados que sugirieron que ambos morfos son, en realidad, dos especies diferentes, dedicamos el segundo capítulo a la descripción de la especie nueva, a la que llamamos *Cataglyphis tartessica*, por el parecido en su distribución con la del antiguo reino de Tartessos. A partir de aquí utilizamos esta terminología en el resto del trabajo para referirnos al morfo bicolor de *C. floricola*, ya que, en la descripción de *C. floricola* por Tinaut (1993) se utilizó como holotipo a una obrera del morfo negro.

En la Segunda parte, dividida en tres capítulos, abordamos estudios descriptivos y experimentales sobre aspectos de la ecología de *C. tartessica*. Así, en el capítulo tercero² se describen aspectos ecológicos básicos como tipo de colonia (mono o poligínica, mococálica o policálica) y su evolución demográfica estacional, su forma de distribución, la alimentación, y la estrategia desplegada por sus obreras en el forrajeo. Veremos también cómo mediante variaciones en la profundidad del nido, la colonia consigue mantener una temperatura constante e independiente de la exterior. En el capítulo cuarto estudiaremos el efecto de la posición del sol en la regulación de la su actividad, y, finalmente, en el capítulo quinto, estudiaremos el comportamiento de forrajeo desplegado por sus obreras ante la presencia de presas grandes no transportables individualmente.

En la Tercera parte, y en el capítulo sexto, estudiaremos la evolución del polimorfismo reina obrera, basándonos para ello en el descubrimiento de la existencia de dos castas de reinas en *C. tartessica*: braquíptera y ergatoide. Finalmente, en el capítulo séptimo se describirán el proceso de fisión colonial y la producción de sexuosos.

² Los capítulos están numerados de forma continua en toda la tesis, es decir, de forma independiente a la división en partes de ésta.

Primera parte

Distribución, filogeografía y evolución.

Cataglyphis floricola es una especie sólo citada para el Parque Nacional de Doñana y sus alrededores. Se trata de una especie formada por dos morfos, uno bicolor y otro negro, de los que se sabe que sus nidos no se entremezclan. Esta primera parte la dividimos en dos capítulos. En el capítulo 1, nos proponemos, como primer objetivo, establecer la distribución de la especie, con especial atención en delimitar geográficamente la distribución de sus morfos. A partir de estos datos, y como segundo objetivo nos planteamos establecer la entidad taxonómica de los morfos, es decir, si debemos seguir considerándolos dos morfos de la especie *C. floricola*, o si en realidad son dos especies distintas. Para ello utilizaremos técnicas multidisciplinarias, tanto morfológicas como moleculares. Dado que resultaron ser especies distintas, estudiamos la relación filogenética existente entre ellas mediante comparaciones con su ancestro conocido más próximo: *Cataglyphis emmae*, así como la posible existencia de estructura genética asociada a sus distribuciones. Finalmente, discutimos distintos procesos, no excluyentes, que podrían dar explicación sobre las causas y/o mantenimiento la distribución parapátrica registrada entre ambas especies. En el capítulo 2 describiremos a la nueva especie *Cataglyphis tartessica*.

Capítulo 1

Distribución y filogeografía y evolución de *C. floricola*³

Introducción

Recientemente, el uso de métodos de análisis multidisciplinares muy elaborados y sofisticados ha tomado una posición relevante sobre cómo abordar y dar respuesta a problemas taxonómicos (Schlick-Steiner et al. 2010; Heethoof et al. 2011). Así, la obtención de resultados congruentes entre varias disciplinas puede ofrecernos respuestas más concluyentes e inequívocas sobre estos problemas, y además, sugerirnos posibles patrones y procesos implicados en la diversidad de las especies observadas. Además, la aplicación de estudios metodológicos múltiples en taxonomía reduce la tasa de error en un orden de 10 (del 30% al 3%) (Schlick-Steiner et al. 2001) y, por tanto, pueden resultar necesarios, al menos, en la taxonomía de hormigas, donde más del 50% de los géneros contiene especies crípticas (Seifert 2009) y, más aún, cuando se trata de distinguir entre especies que han divergido recientemente.

Los últimos avances en técnicas moleculares han supuesto un desafío a la forma clásica de estudio empleada por la taxonomía, siendo los basados en el análisis del genoma del ADN mitocondrial y en marcadores genéticos nucleares los más empleados en análisis filogenéticos (Hebert y Gregory, 2005), llegando incluso a ser el método preferente utilizado en la investigación taxonómica.

Muchos son los estudios que se han dedicado a evaluar la idoneidad del uso del ADN en taxonomía, destacando entre ellos los concernientes al uso del ADN mitocondrial, debido a que, además de carecer de recombinación, se hereda

³ Amor et al. Integrating molecular, morphological and chemical data to unveil a recent speciation event in ants. En preparación para PLoS ONE.

exclusivamente por vía materna, por lo que es lineal en el tiempo y, por ello, muy adecuado para inferir relaciones evolutivas entre especies, pudiéndose, en ocasiones, determinar el tiempo y modo en que tuvo lugar una especiación.

Los estudios taxonómicos basados en datos moleculares aplican generalmente el concepto de especie filogenética: “un grupo de organismos que comparten un ancestro; un linaje que mantiene su integridad con respecto a otros linajes”⁴. Sin embargo, este concepto de especie puede resultar insuficiente en los casos de especiaciones muy recientes, debido a la reducida diferenciación genética existente entre los ancestros y sus especies descendientes. En estos casos, el poder determinar la existencia o no de flujo génico entre ellas, buscando zonas en las que sus poblaciones estén en contacto entre resulta esencial para determinar el estatus taxonómico de ambas, utilizando para ello el concepto biológico de especie de Mayr (1942)⁵.

Por lo tanto, el uso combinado de marcadores mitocondriales y nucleares (por ejemplo microsatélites), así como de métodos más tradicionales como los morfológicos y químicos, resultan muy apropiados en el estudio de taxones que han divergido recientemente. Por ejemplo, Knaden et al. (2005) no pudieron separar *C. bicolor* de *C. biatica* en base al gen de la citocromo oxidasa 1 mitocondrial (COI), pero sí pudieron hacerlo con facilidad en base a microsatélites nucleares.

Las características morfológicas constituyen la primera fuente de datos utilizados por la taxonomía tradicional. En las hormigas, el estudio de la genitalia de los machos se ha utilizado mucho con estos propósitos, siendo un ejemplo el género *Cataglyphis* (Agosti 1990; Tinaut 1993; Wehner et al. 1994; Knaden et al. 2005). Ello se debe, principalmente, a la rápida evolución divergente que se da en la genitalia de los machos en los animales con fecundación interna, llegando sus características a proporcionar la única fuente fiable para la identificación morfológica entre especies (Eberghard 1985). Estudios alométricos, en los que junto a la genitalia de los machos se incluyeron otras partes del cuerpo de los insectos, concluyeron que el tamaño de las

⁴ El grupo monofilético más pequeño de un ancestro común (de Queiroz and Donogue 1990). Un grupo irreducible de organismos, distinto de otros grupos, y con un patrón parental de ascendencia y descendencia (Cracraft 1989)

⁵ Las especies son grupos de individuos que se reproducen entre ellos, o que tienen esa capacidad, y que se encuentran aislados reproductivamente de otros grupos.

piezas genitales de éstos es mucho más estable, dentro de una especie, que las demás medidas corporales analizadas, sugiriendo la existencia de una selección sexual en los machos a favor de unas medidas estándar de sus apéndices copuladores (Eberghard et al. 1998). Por otra parte, estos apéndices copuladores presentan una evolución más divergente en aquellos taxones en los que las hembras se aparean con varios machos (poliandria) que en los que lo hacen con uno sólo (monoandria) (Arnqvist 1998).

Además de los datos moleculares y morfológicos, los hidrocarburos cuticulares también han sido utilizados ampliamente en la taxonomía de artrópodos (Bagnères y Wicker-Thomas, 2010) y, más concretamente, en quimiotaxonomía de algunas especies de *Cataglyphis* (Wehner et al; 1994; Dahbi et al., 1996; 2008; Oldham et al., 1999; Gökçen et al., 2002).

La combinación de los hidrocarburos cuticulares, el ADN mitocondrial y la morfología ha demostrado ser útil en la taxonomía de termitas (Jenkins et al., 2000), mostrándonos la robustez ofrecida por los análisis multidisciplinares en los estudios taxonómicos.

El género de hormigas *Cataglyphis* comprende más de un centenar de especies. De ellas, ocho están citadas para la Península Ibérica (<http://faunaeur.org>). Nuestra especie elegida como modelo fue *C. floricola*, una especie endémica de sudoeste de España. En *C. floricola* se conocen dos formas de color, una negra y la otra bicolor (ámbar y negra) (Fig. 1.1) citadas sólo para el Parque Nacional de Doñana (en adelante PND) y sus alrededores (Tinaut 1993), siendo del morfo negro el holotipo empleado en su descripción como especie.

Los objetivos del presente estudio fueron: 1.- establecer la distribución de la especie, determinando, lo más posible, los espacios ocupados por cada morfo; 2.- evaluar la identidad taxonómica de los morfos, es decir, si son especies diferentes o no; y 3.- en el caso de serlo, establecer la relación filogenética existente entre ellos y con *Cataglyphis emmae*, el ancestro más reciente de *C. floricola* (Tinaut 1993, Tinaut comunicación personal).

Para ello, junto a los trabajos de campo para conocer su distribución, emplearemos métodos químicos, como el análisis de hidrocarburos cuticulares; moleculares, como los análisis basados tanto en ADN mitocondrial como en el nuclear, y morfológicos, como el estudio de la genitalia de los machos.



Figura 1.1 Fotografía de los morfos de *C. floricola*, a: negro y b: bicolor.

Material y métodos

Distribución

Para determinar la distribución de *C. floricola*, se visitaron 400 sitios entre 2006 y 2011 en un espacio triangular con vértices en $37^{\circ} 54' N$, $4^{\circ} 23' W$ (cerca de la localidad cordobesa de Bujalance), $37^{\circ} 05' N$, $8^{\circ} 15' W$ (cerca de la ciudad portuguesa de La Albufeira) y $36^{\circ} 01' N$, $5^{\circ} 36' W$ (cerca de Tarifa, Cádiz), lo que supone unos 30.000 km² de superficie. Como eje central de este espacio se encuentra el río Guadalquivir. Teniendo en cuenta las grandes extensiones de las fincas agrícolas localizadas en la zona, los puntos de muestreo fueron elegidos tan al azar como pudimos, registrando su posición por medio de GPS. En cada punto de muestreo, dos personas buscaron y anotaron, por espacio de unos 30 minutos, las especies de *Cataglyphis* encontradas en

él, así como características del lugar, tales como tipo de suelo, de vegetación y uso humano (agrícola, forestal, espacio protegido, etc.).

Diseño del transecto

En junio de 2008 diseñamos un transecto en el PND en un lugar donde los dos morfos solapaban sus distribuciones. El transecto, de una longitud de 1.056 m, se dividió en siete puntos alineados, y distantes entre sí 176 m de media. El punto central del transecto (punto 4) se hizo coincidir con el lugar donde los nidos de ambos morfos se encontraron entremezclados. Del resto de los puntos del transecto, los tres más al este estuvieron dentro del área de distribución del morfo bicolor (puntos 1, 2 y 3) mientras que los tres más al oeste (puntos 5, 6 y 7) lo hicieron en el del morfo negro (Fig. 1.2).

Se muestrearon hasta cinco nidos de cada punto del transecto, excepto en el punto central donde lo fueron 10 nidos, cinco de cada color. Para evitar tomar muestras de nidos pertenecientes a una reciente fisión se seleccionaron nidos distantes entre sí 19.5 m de media (distancia media de fisión en *C. floricola*: 7.7 ± 0.9 m; Amor et al. 2011). Un total de 118 hormigas, 58 bicolors y 60 negras, se recolectaron de un total de 30 colonias diferentes, 15 de cada morfo.

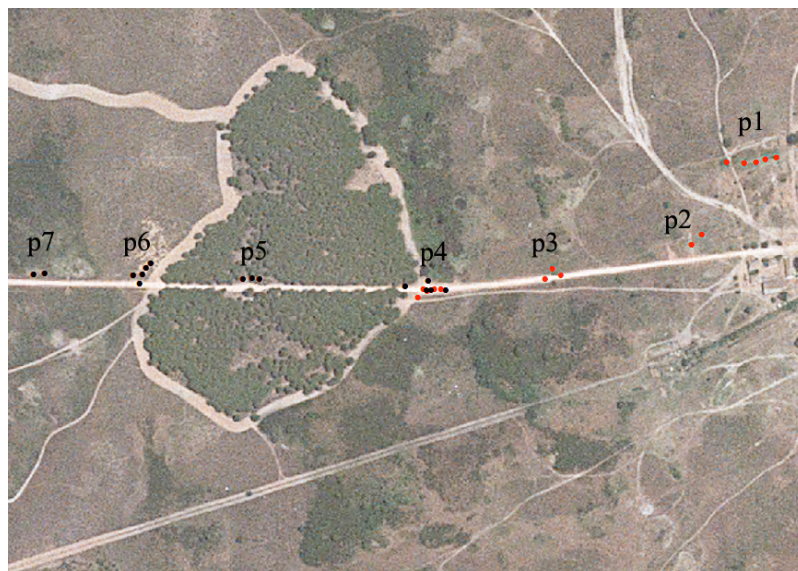


Figura 1.2. Transecto realizado en la Reserva Biológica de Doñana. Las distribuciones de los dos morfos se solapan en el punto central de transecto (p4). Los puntos negros y rojos indican la posición de los nidos de los morfos negro y bicolor respectivamente.

Análisis moleculares

Los análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de ecología molecular de la Estación Biológica de Doñana por Juan Antonio Galarza y Michael Jowers. El ADN fue extraído del cerebro y músculos circundantes del cerebro de las hormigas. Estos tejidos blandos mostraron ser más eficaces para la ampliación por Reacciones en Cadena de la Polimerasa (en adelante PCR) que otras partes quitinosas del cuerpo, tales como patas y tórax, que inhibieron la reacción de la PCR. La extracción se hizo siguiendo el método HotShot (Truett et al. 2000) almacenándose a -20 °C.

Para estudiar el polimorfismo nuclear de los morfos de *C. floricola* utilizamos seis marcadores microsatélites desarrollados para *C. cursor*: Ccur11, Ccur26, Ccur51, Ccur61, Ccur99 y Ccur100 (Percy et al. 2004). Cada 20 µl de volumen de muestra para la PCR contuvo aproximadamente 50 ng de ADN, 200µM de cada dNTP, 0.15 µM de cada primer 2µl de Buffer 10X, 0.8 µl MgCl₂ y 0.1 unidades de polimerasa (QIAGEN).

El ciclo térmico seguido fue: un primer paso de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C; 35 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 94 °C, seguidos por periodos de 30 segundos a 52 °C y extensiones de 45 segundos a 52 °C, más una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Siguiendo la reacción de la PCR, los cebadores y dNTP sobrantes se eliminaron mediante reacción enzimática, utilizando para ello la exonucleasa 1 de *E. coli*, fosfatasa antártica y buffer de fosfatasa antártica (todas de New England Biolabs).

La secuenciación se llevó a cabo en ambas direcciones usando el software de secuenciación BigDye[®] Terminator v1.1 (Applied Biosystems), y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El etiquetado de los fragmentos se hizo mediante un analizador genético automatizado A3130xl (Applied Biosystems). Se eliminaron tanto los cebadores como las secuencias terminales incompletas. Mediante el software Micro-Chequer (van Oosterhout et al. 2001) se eliminaron errores en el genotipado debido a alelos nulos y a alelos perdidos. El grado de asociación entre los marcadores así como la estadística básica se obtuvieron mediante Genepop on the web (Raymond y Rousset 1995).

Analizamos las variaciones en el ADN mitocondrial de todas las colonias muestreadas del transecto. Mediante los cebadores Cflor (L)5'-TGCAGGAACAGGATGAACAA-3' y Cflor (R)5'-TGGCCCATCATAAAGATGAA-3' obtuvimos segmentos de aproximadamente 660 pares de bases de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (CO1). Las condiciones de la PCR fueron las mismas de las empleadas con los marcadores nucleares. Se secuenciaron las dos cadenas de cada muestra utilizándose la lectura complementaria para resolver ambigüedades mediante el software Sequencher v.4.9. Después de eliminar los cebadores y los fragmentos con terminaciones incompletas obtuvimos fragmentos de unos 618 pares de bases para los análisis. Todas las secuencias nucleotídicas pudieron ser alineadas sin huecos mediante Seaview v.4.2.11 (Gouy et al. 2010) con la configuración por defecto ClustalW2 (Larkin et al. 2007). El estudio de las sustituciones nucleotídicas y las distancias p-no corregidas (%) se llevaron a cabo con PAUP*4.b.10 (Swofford 2002)

Estructura de la población

Un total de 169 hormigas fueron recolectadas en 2008, 95 de ellas del morfo bicolor y 74 del negro. De todas ellas, 118 procedieron del transecto mientras que las restantes 51 fueron recolectadas de 24 poblaciones representativas del área de distribución de la especie (Fig. 3), 17 de estas poblaciones, del morfo bicolor, y 7 del negro, a una media de 2 hormigas por población (de cada población se eligió un solo nido para las muestras). Toda la estadística descriptiva (es decir, número de alelos, frecuencia alélica, heterocigosidad esperada y observada) y la estadística F de Wright se hicieron con los programas FSTAT (Goudet 1995) y Genepop on the web. Las frecuencias alélicas de los microsatélites de todas las hormigas recolectadas se compararon mediante el test de probabilidad G con Genepop on the web. La significación total se determinó usando de forma combinada el test de probabilidad de Fishers. La corrección de Bonferroni se utilizó en numerosas comparaciones. Las muestras se consideraron pertenecientes a diferentes colonias si su diferenciación genotípica resultó significativa a $\alpha < 0.0007$, después de la corrección de Bonferroni.

El nivel de diferenciación genética entre los morfos bicolor y negro se estimó, mediante FSTAT 2.9.3 comparando entre sí los F_{ST} obtenidos por separado para las poblaciones de los morfos bicolor y negro

El grado de estructuración geográfica de la variación genética entre las poblaciones del morfo bicolor de *C. floricola* se evaluó mediante estadísticos Φ usando para ello el análisis de la varianza molecular (AMOVA) con el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al 1992; Schneider et al 2000). La significación de los componentes de la varianza y de los estadísticos Φ se evaluó tras 10.000 permutaciones. El grado de estructuración geográfica se evaluó entre diferentes grupos del morfo bicolor de *C. floricola*. La estructura genética se evaluó para 1) las poblaciones situadas al este y al oeste del río Guadamar, y 2) todas las demás poblaciones (zona de Doñana y el Rocío, Aznalcázar, Alcalá de Guadaíra, Utrera y Arcos de la Frontera).

El coeficiente de parentesco r se estimó, a partir de los resultados del análisis de microsatélites y de acuerdo con Queller y Goodnight (1989), entre las hormigas de una misma colonia y entre éstas, comparando por parejas las 58 hormigas bicolors y 60 negras recolectadas del transecto, utilizando para ello el software GenALEX 6.1 (Peakal y Smouse 2006).

Tanto las frecuencias haplotípicas como sus reducciones se estimaron usando una red de medianas unidas (en adelante red MJ, del inglés: Median Joining) construida con Network 4.5 (Bandelt et al. 1999) con configuración por defecto. El software Structure 2.1 (Pritchard et al. 2000) se usó también para inferir el número de poblaciones independientes (K) presentes en el muestreo. El análisis se realizó usando un modelo mixto que correlacionó las frecuencias alélicas en 20 ejecuciones independientes del programa, desde $K=1$ hasta $K=20$, con un descarte (burn-in) de 100.000 iteraciones, seguidas de otras 1.000.000 de iteraciones. La selección de K se hizo usando dos métodos que se ejecutaron en Harvest v.0.6.1 (Earl 2011): (i) haciendo una gráfica con los logaritmos de las probabilidades en negativo $[-\ln P(D/K)]$ frente a K , y (ii) usando el método de ΔK descrito en Evanno et al. (2005). La estadística se realizó utilizando los programas Statistica 6.0, Microsoft Excel y SPSS v.19.

Los modelos de sustituciones más apropiados para los análisis de máxima probabilidad y máxima probabilidad bayesiana se determinaron en base al criterio de

información de Akaike (AIC) (Posada y Buckley 2004) y al criterio de información bayesiana (BIC), respectivamente, usando para ello jModeltest v.0.1.1 (Posada 2008).

Los árboles se construyeron usando máxima parsimonia (MP), máxima probabilidad (PM) y máxima probabilidad bayesiana (BPM). El soporte de los clados, tanto en MP como en PM se infirió con 1.000 remuestreos aleatorios de las muestras (bootstrapping). MrBayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003) se usó, con configuración por defecto. El parámetro gamma shape y la proporción de sitios sin variación se estimaron a partir de los datos. Cada ejecución del programa consistió en 4 cadenas de Markov de 10.000.000 de generaciones, muestreadas cada 10.000, para un total de 1000 árboles. Tras 5.000 generaciones se alcanza la horizontalidad, con un 10% de los árboles resultantes del análisis (100) descartados (burn-in).

Características morfológicas: genitalia de los machos

Comparamos entre sí las piezas copuladoras de los machos de ambos morfos junto a las de *Cataglyphis emmae* (su presunto ancestro). El examen visual de las piezas de la genitalia de los machos de *C. emmae* muestra su proximidad filogenética a *C. floricola*. Esta observación concuerda con los resultados de un análisis filogenético basado en ADN mitocondrial, realizado con 15 especies de *Cataglyphis* (M.Jowers no publicado).

Se recolectaron 15 machos de *C. emmae* en Amerzgane, cerca de Ouarzazate, en Marruecos, durante los meses de mayo de 2009 y 2010, a los que añadimos 53 machos de *C. floricola* recolectados durante los meses de junio y julio de 2009 y 2010, 23 de ellos del morfo negro, procedentes del PND y otros 30 del morfo bicolor procedentes 15 de ellos del PND y los otros 15 de Alcalá de Guadaíra, Sevilla (en adelante ALC).

Todas las medidas se realizaron con la ayuda de una lente micrométrica y del software Imagen (Abramoff et al. 2004) con 10^{-2} mm de precisión. Las piezas copuladoras medidas fueron las siguientes: placa subgenital, de la que se midió la distancia entre los ápices de sus lóbulos laterales; la longitud del estipite, medida desde el primer proceso basal hasta su ápice; la anchura y longitud de la sagita, y la longitud de la volsela. Todas estas medidas fueron sometidas a un análisis lineal discriminante

con Statistica 6.0 en el que la especie se usó como variable respuesta, tomando a los morfos como unidades taxonómicas diferentes.

Análisis químicos cuticulares

Realizamos una comparación de la composición cuticular en hidrocarburos de los dos morfos de *C. floricola* y *C. emmae*. El morfo bicolor fue recolectado en tres localidades: Utrera (en adelante UTR), Alcalá de Guadaíra y el PND; el morfo negro fue recolectado en el PND y *C. emmae* en Amerzgane, Marruecos. Las *C. floricola* del PND fueron recolectadas todas del mismo nido. Las muestras de ambas especies se mataron colocándolas a -18 °C durante 20 min. Las carcasas se sumergieron en 2 PM de hexano durante al menos 24 h. El extracto de hidrocarburos se almacenó a -18 °C hasta el momento del análisis. Un microlitro de cada muestra se inyectó dentro de un cromatógrafo de gases equipado con espectrómetro de masa (Turbomass system, Pekín-Elmer, Norwalk, CT, USA) operando a 70 eV y usando una columna capilar apolar DB-5HT de silicato fundido. Las muestras se sometieron a una temperatura de 100 °C durante 2 min, aumentando hasta los 320 °C a razón de 6 °C cada min, manteniéndose finalmente a la temperatura de 320 °C durante 6 min. Veinte µg de eicosano se añadieron a las muestras antes de la inyección usándose como control interno. Los análisis químicos se llevaron a cabo en el IRBI (Institut de la Recherche sur la Biologie de l'Insecte) por Alain Lenoir.

En los análisis estadísticos se utilizaron sólo aquellos compuestos que alcanzaron una media relativa del 1% en al menos una de las especies. A fin de reducir tanto el número de variables como su colinealidad se hizo previamente un análisis de componentes principales sobre la proporción de cada hidrocarburo. Los primeros 6 componentes principales, que explicaron el 96% del total de la varianza se utilizaron después como variables en un análisis lineal discriminante en el que la especie, junto a su localidad, se usó como variable respuesta.

Resultados

Distribución

Encontramos una distribución parapátrica entre ambos morfos, con muy pocas y estrechas zonas de contacto entre sus distribuciones (Fig 1.3a). Sin embargo, el rango de distribución de cada morfo fue muy diferente. Así, mientras que las poblaciones del morfo bicolor se encontraron distribuidas en un arco de ~200 km de longitud alrededor de la cuenca baja del río Guadalquivir, con extremos en el PND, por el oeste, y en San José del Valle, Cádiz, por el este, pasando por Carmona como punto más al norte, la población del morfo negro se encontró restringida a una estrecha franja costera de ~35 km de largo por 7 km de ancho entre los ríos Tinto y Guadalquivir. En la actualidad, una alineación de lagunas y suelos turbosos, paralela a la costa (complejo de lagunas de Ribetehilo) mantiene separadas, en gran medida, a las poblaciones de ambos morfos (Fig 1.3b).

Estructura poblacional

Ninguno de los seis microsatélites mostró alelos nulos ni desequilibrio debido a ligamiento. La divergencia genética encontrada entre ambos morfos, en el transecto, fue muy significativa (G exact test: $\chi^2 = \text{infinito}$, $df = 12$, $p < 0.0001$). Se encontraron un total de 68 alelos entre ambos morfos, de los que solamente el 23.5% de ellos fueron compartidos. Más aún, de los 19 alelos encontrados para el microsatélite Ccur99, ninguno resultó compartido por los dos morfos (Tabla 1). El rango del número de alelos estuvo entre 7 y 9, con una heterocigosidad media observada para los morfos bicolor y negro de 0.67 y 0.57, respectivamente (rango bicolor – negro: 0.62 a 0.78 y 0.1 a 0.88), con una heterocigosidad esperada para bicolor y negro de 0.65 y 0.46, respectivamente (rango bicolor – negro: 0.55 a 0.8 y 0.33 a 0.74) (Tabla 2). La divergencia genética entre los morfos resultó ser significativa ($F_{ST} \pm SE$: $F_{ST \text{ bicolor}} = 0.068 \pm 0.015$; $F_{ST \text{ negro}} = 0.156 \pm 0.014$; $t = 4.31$, $p < 0.0001$).

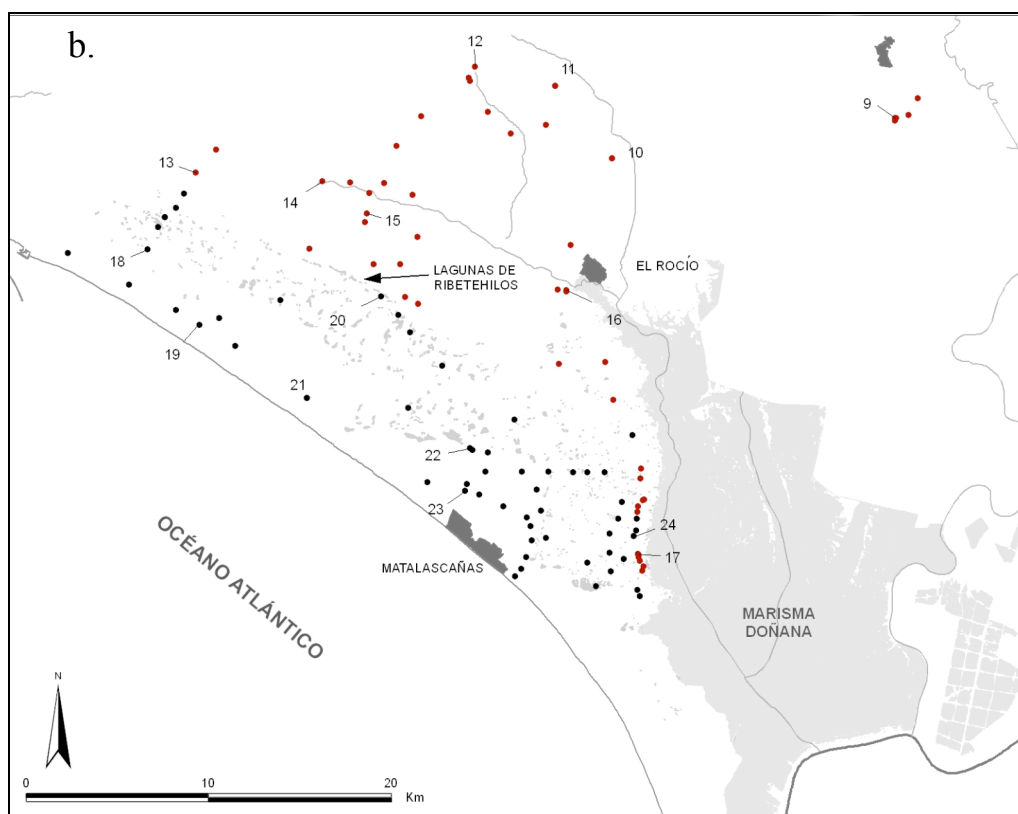
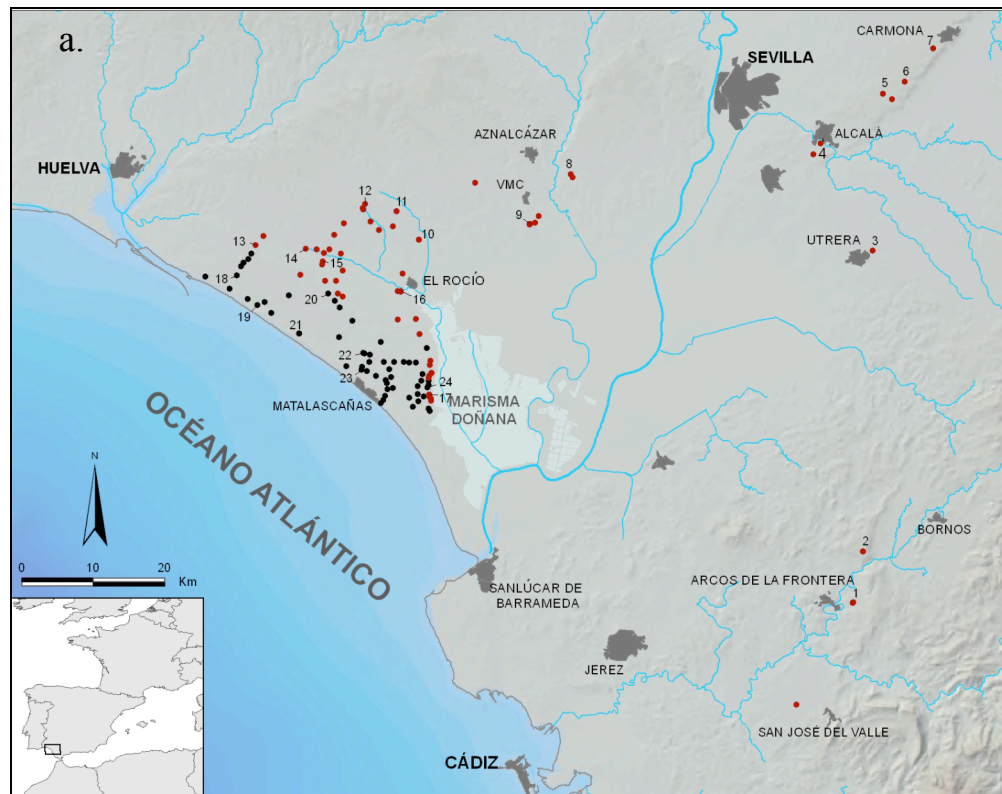


Figura 1.3 (a.) Distribución de *C. floricola*. (b.) Detalle de la distribución de los dos morfos. Los puntos negros y rojos indican la existencia de nidos de los morfos negro y bicolor respectivamente. Los números indican los lugares de donde se tomaron muestras para el estudio filogeográfico.

Loci	Número de alelos encontrados	Número de alelos compartidos por los morfos	Riqueza alélica morfo bicolor	Riqueza alélica morfo negro
Ccur21	9	2	3	8
Ccur26	13	2	11	4
Ccur51	9	5	6	8
Ccur61	11	5	8	8
Ccur99	7	2	5	4
Ccur100	19	0	3	16

Tabla 1.1 Marcadores microsatélites, número total de alelos encontrados y compartidos y riqueza alélica de los morfos de *C. floricola*. Nótese la pequeña proporción de alelos compartidos y la mayor riqueza alélica del morfo negro.

Locus	N _A	Morfo bicolor (n=58)		Morfo negro (n=60)	
		H _O	H _E	H _O	H _E
Ccur11	9	0.622	0.551	0.860	0.669
Ccur26	13	0.691	0.764	0.208*	0.472
Ccur51	9	0.672	0.589	0.590	0.685
Ccur61	11	0.784	0.804	0.727	0.720
Ccur99	7	0.645	0.668	0.098*	0.327
Ccur100	19	0.646	0.565	0.879	0.738
Entre todos	-	0.677	0.657	0.560	0.460

Tabla 1.2 N_A: número de alelos; H_O: heterocigosidad observada; H_E: heterocigosidad esperada. Los asteriscos indican los valores de frecuencia observada en desequilibrio Hardy-Weinberg.

Encontramos diferencias significativas en la estructura de parentescos analizada en el transecto (ANOVA: $F_{4, 3434} = 3106$, $p < 0.0001$). Mientras que el coeficiente de parentesco fue siempre positivo entre las comparaciones dentro de un morfo, éste resultó ser negativo en las comparaciones entre morfos (Fig. 1.4). El parentesco obtenido entre obreras pertenecientes a una misma colonia fue de 0.70 ± 0.022 y 0.72 ± 0.024 (media \pm SE; $n = 83$ y $n = 90$; colonias bicolor y negras, respectivamente). Estos

valores, próximos a 0.75, junto con el hecho de que el número de alelos encontrado por locus nunca fue superior a 3 en ninguno de los morfos, sugieren monogía y monoandria en ambos morfos.

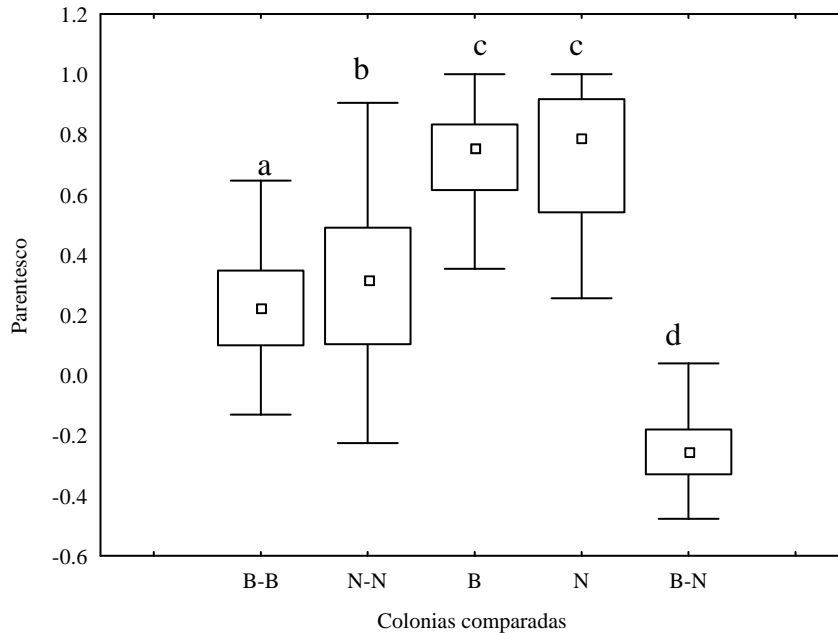


Figura 1.4 Relaciones de parentesco (RP) encontradas en *C. floricola* en el transecto de la RBD. B-B: RP entre las colonias bicolors; N-N: RP entre las colonias negras; B: RP entre hormigas de una misma colonia de bicolors; N: RP entre hormigas de una misma colonia de negras; B-N: RP entre colonias de bicolors y negras. Diferentes letras indican diferencias significativas.

No obtuvimos ninguna estructura geográfica con las poblaciones de *C. floricola* bicolor.

Las distancias genéticas entre todos los haplotipos encontrados en el transecto tuvo un rango comprendido entre 0-0.4% para los morfos bicolor y negro, mientras que resultó ser mucho más elevada, 1.2-1.9%, entre ambos morfos (Tabla 3).

	Haplotipos								
	<i>C. floricola</i> bicolor					<i>C. floricola</i> negra			
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	<i>C. emmae</i>
H1	-	0	1	0	1	6	7	8	39
H2	0	-	0.2	0	1	6	7	8	39
H3	0.2	1	-	1	2	7	8	9	40
H4	0	0	0.2	-	1	6	7	8	39
H5	0.2	0.2	0.4	0.2	-	7	8	9	40
H6	1.2	1.2	1.4	1.2	1.5	-	1	2	37
H7	1.4	1.5	1.7	1.5	1.7	0.2	-	1	38
H8	1.7	1.7	1.9	1.7	1.9	0.4	0.2	-	39
<i>C.emmae</i>	8.1	8.1	8.3	8.1	8.3	7.7	7.9	8.1	-

Tabla 3 Sustituciones nucleotídicas (sobre la diagonal) y distancias p no corregidas (%) (bajo la diagonal) para cada comparación por parejas entre todos los haplotipos de *C. floricola* bicolor (de H1 a H5) y *C. floricola* negra (H6, H7 y H8) del transecto. Nota: las distancias “0” son consecuencias de una inserción o deleción.

El filograma construido con todos los haplotipos del transecto mostró dos clados monofiléticos hermanos, uno por cada morfo (Fig. 1.4a). Este mismo patrón se observó también en la red MJ, tanto con los datos del transecto como con los obtenidos de la distribución general (Fig. 1.5b y 1.6). Los resultados del análisis bayesiano de clados realizado con Structure, y analizados a su vez en Harvest (Earl 2011), mostraron que el logaritmo $-\ln[P(D/K)]$ saturó a $K = 17$ (Fig. 1.7a). Un análisis estadístico adicional “ad hoc”, que proporciona un mejor predictor de los clados (K) a niveles superiores (Evanno et al. 2005) mostró un pico a $K = 2$ (Fig. 1.7b). Ambos $K = 2$ y $K = 17$ son concordantes con la red MJ (Fig. 1.5b), mostrando, por una parte, la existencia de una clara diferenciación genotípica entre ambos morfos, y, por otra, a nivel inferior, la existencia de subestructura dentro de cada morfo (Fig. 1.8).

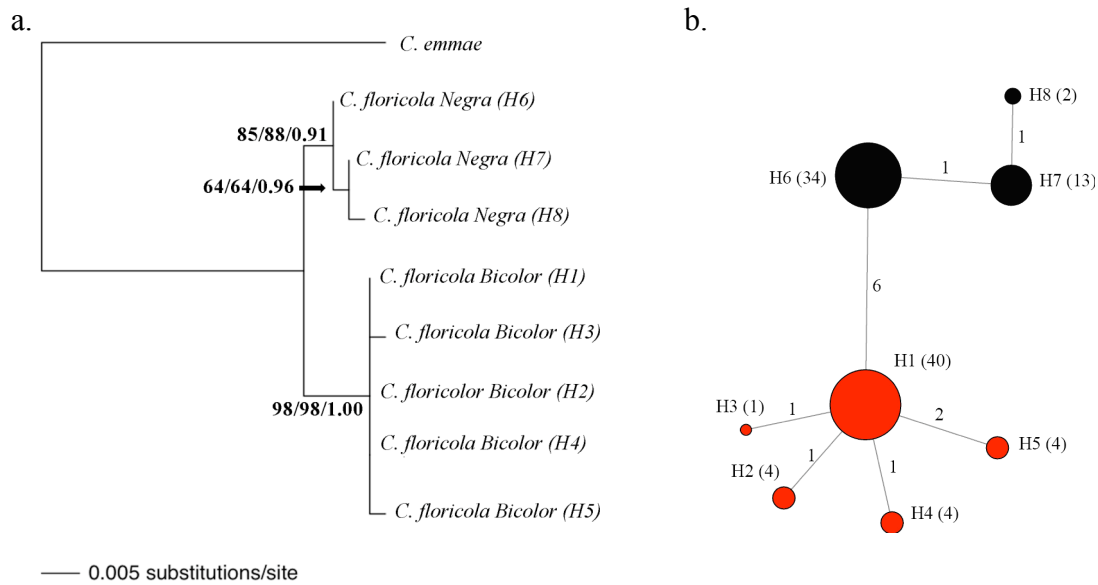


Figura 1.5 (a.) Filograma de los dos morfos de *C. floricola* elaborado a partir de las secuencias de AND mitocondrial obtenidas del transecto. Los números sobre los nodos son valores de Máxima Parsimonia, Máxima Probabilidad y de Probabilidades Máximas Bayesianas. (b.) Red Mediam Joining construida a partir de los mismos datos que el filograma anterior. El tamaño de los círculos se corresponde con la frecuencia haplotípica, que también se indica con un número entre paréntesis. Sobre las líneas que unen los círculos se indica el número de mutaciones entre haplotipos.

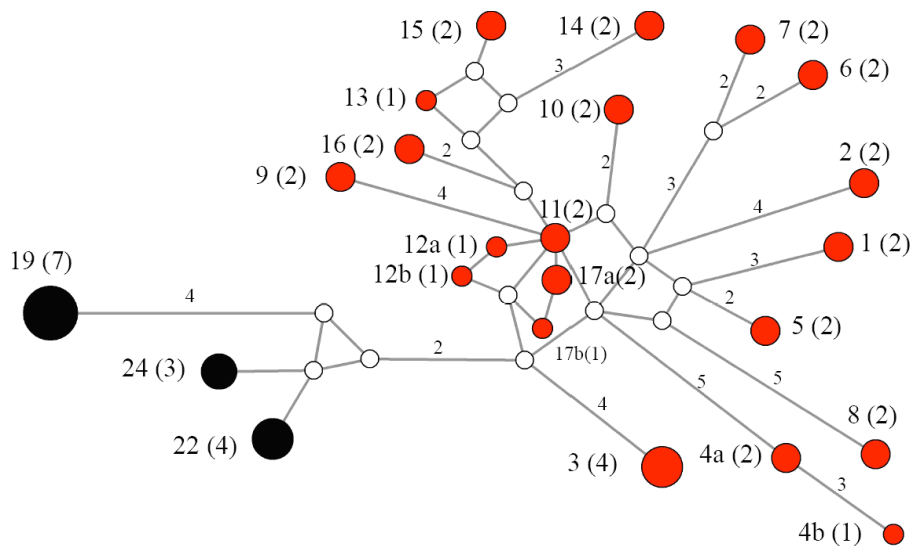


Figura 1.6 Red Mediam Joining realizada con todos los haplotipos encontrados de *C. floricola* basados en secuencias parciales del gen CO1 (618 pb). Cada círculo representa a un haplotipo, en rojo los del morfo bicolor y en negro los de morfo negro. El tamaño de cada círculo se corresponde con la frecuencia del haplotipo. De los números que aparecen junto a los círculos, el primero identifica al haplotipo mientras que el segundo, entre paréntesis, da su frecuencia. Los círculos pequeños blancos indican haplotipos intermedios no detectados. Los números en las líneas indican el número de mutaciones entre haplotipos.

Sin embargo, el análisis de los haplotipos de las poblaciones de *C. floricola* bicolor a nivel regional no ofreció ninguna estructura geográfica.

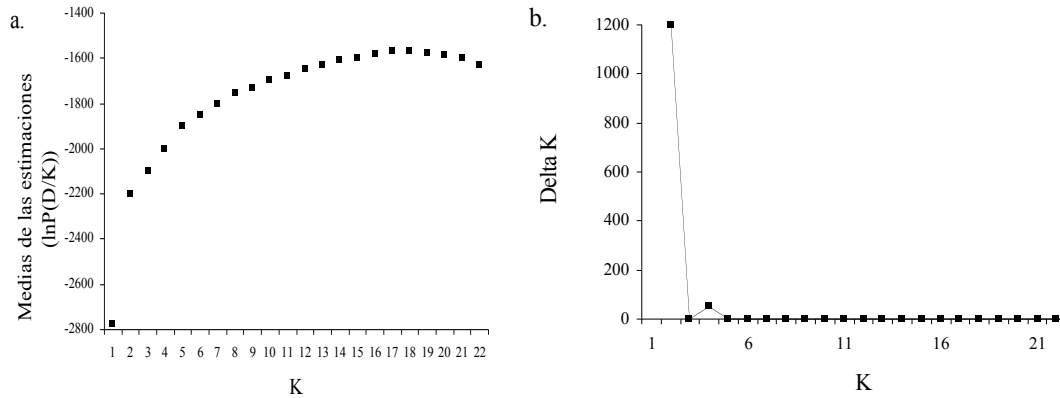


Figura 1.7 Resultados del agrupamiento genotípico multilocus con Structure. (a.) Estimación de las probabilidades logarítmicas de los datos [$\ln P(D / K)$] explicada por subdivisiones de K grupos, y (b.) el estadístico ΔK (Evanno et al. 2005) como una función del número de grupos testados.

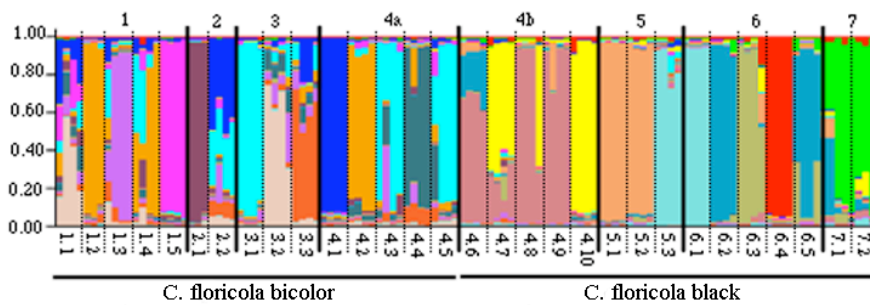


Figura 1.8 Estructura de la población evaluada con Structure mediante el método de agrupamiento genotípico multilocus. El eje de ordenadas da las probabilidades de las frecuencias alélicas a $K=17$. Cada punto del transecto está delimitado por una línea vertical gruesa. Dentro de cada punto, cada colonia viene delimitada por una línea vertical de puntos. Colores diferentes denotan alelos diferentes.

Los análisis de distribución mismatch mostraron que el morfo bicolor está en equilibrio demográfico mientras que el negro está en expansión (Fig. 1.9a y 1.9b).

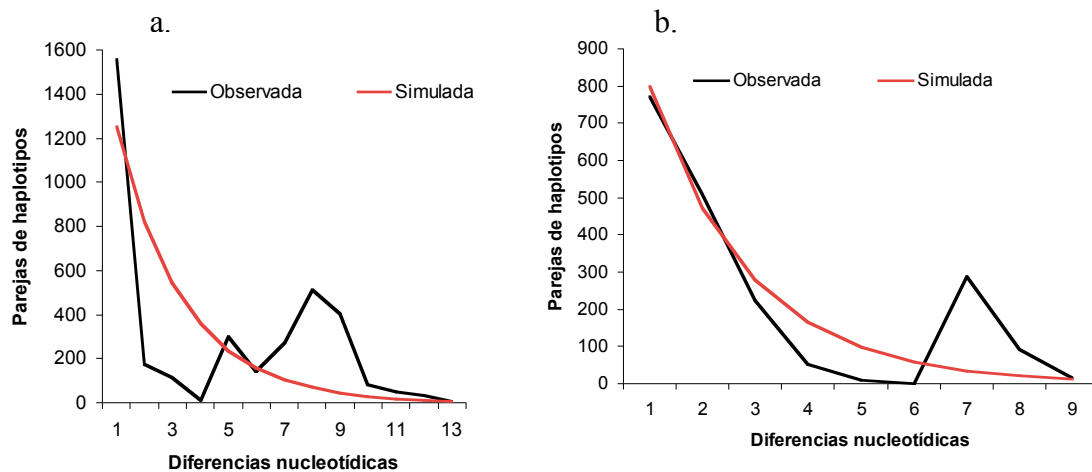


Figura 1.9. Modelos sobre la situación demográfica de los morfos bicolor (a. en equilibrio) y negro (b. en expansión) de *C. floricola*. La línea roja representa la distribución esperada en una población estable. La línea negra representa la distribución observada.

Morfología

Las dos primeras funciones extraídas del análisis discriminante y que explicaron el 75 y 17 por ciento de la varianza total de los valores biométricos de las piezas copuladoras separaron claramente a *C. emmae* y a los dos morfos de *C. floricola* en tres grupos (Fig. 1.9A). El análisis discriminante resultó muy significativo (Wilks' Lambda = 0.006, $F_{18,167} = 46,43$, $p < 10^{-4}$), siendo la placa subgenital la variable que más discriminó (Wilks' Lambda = 0.013, $F\text{-remove}_{3, 59} = 20.38$, $p < 10^{-6}$), mientras que la que menos fue la longitud de la sagita (Wilks' Lambda = 0.008, $F\text{-remove}_{3, 59} = 6,03$, $p = 0.001$). Esto significa que los machos de *C. floricola* bicolor y negro encontrados viviendo juntos en el PND agruparon aparte. Sin embargo, dentro del morfo bicolor, muestras recolectadas a 70 km de distancia agruparon juntas. Biométricamente, *C. emmae* resultó estar más cerca de *C. floricola* bicolor (PND) que de la negra (PND) (Distancia al cuadrado de Mahalanobis: 48.79 vs 103.71, respectivamente).

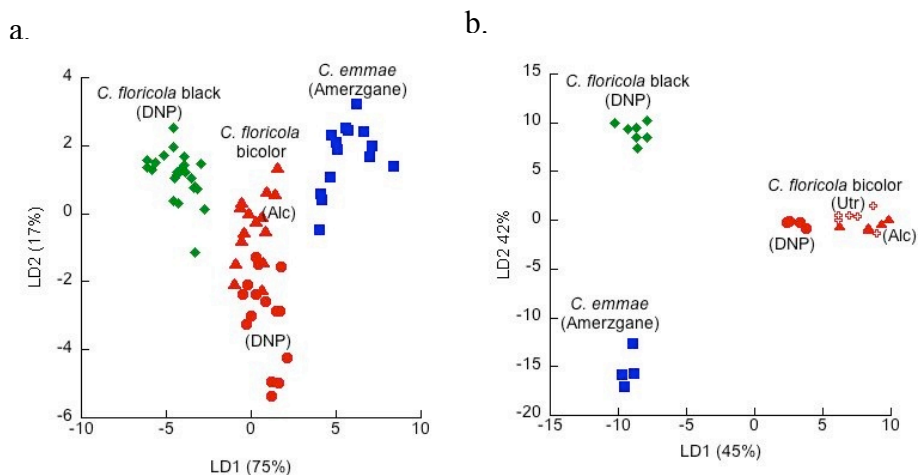


Figura 1.9. Análisis discriminates de (a.) la biometría de 6 piezas copuladoras de los machos de *C. floricola* (n= 53) y *C. emmae* (n= 15) y (b.) de 27 hidrocarburos cuticulares de *C. floricola* (n= 22) y *C. emmae* (n=9).

Análisis químicos cuticulares

La cutícula de *C. emmae* y de los dos morfos de *C. floricola* resultaron estar compuestos por una mezcla de monometil y dimetil alcanos de entre 25 y 35 átomos de carbono (ESM). Solamente se encontró un hidrocarburo insaturado en la cutícula de *C. floricola* (C31:1) sin estarlo en la cutícula de *C. emmae*. Seis hidrocarburos, entre ellos tres mezclas de dimetil alcanos pesados de 31, 33 y 35 átomos de carbono se encontraron en *C. emmae* y no en *C. floricola*. En *C. floricola*, ambos morfos presentaron un componente específico.

Por otra parte, las cantidades relativas de hidrocarburos fueron muy diferentes en los dos morfos. Por ejemplo, el compuesto dominante en el morfo negro fue una mezcla de varios monometil alcanos de 30 carbonos mientras que en el bicolor lo fue una mezcla de monometil alcanos de 31 carbonos. Las dos primeras funciones extraídas del análisis discriminante y que explicaron el 45 y 42 por ciento del total de la varianza de los perfiles cuticulares mostraron la existencia de diferencias importantes entre *C. emmae* y los dos morfos de *C. floricola* (Fig. 1.9b).

Las muestras de los morfos bicolor y negro, recolectadas en el mismo sitio del PND, no agruparon, mientras que sí lo hicieron muestras del morfo bicolor recogidas en tres localidades distantes entre sí 30 y 70 km (Fig. 1.9b).

Discusión

Todos los métodos de análisis utilizados, sean estos moleculares (mitocondriales o nucleares), químicos o morfológicos encuentran diferencias importantes entre los dos morfos de *C. floricola*. Así, desde un punto de vista taxonómico resulta razonable concluir que ambos son en realidad dos especies distintas.

La secuencia mitocondrial CO1 ha sido ampliamente utilizada en identificación taxonómica (Knaden et al., 2005; Moreau 2008; Bacci et al., 2009; Seppä et al., 2011) y por tanto su utilidad parece evidente en trabajos taxonómicos multidisciplinares. Desde una perspectiva filogenética, se trata de un gen adecuado para inferir la historia evolutiva de una especie o grupo de especies. Los tres métodos de construcción de árboles filogenéticos ofrecieron la misma topología que la obtenida a partir de las secuencias del gen CO1 mitocondrial del transecto. El valor más bajo de bootstrap obtenido para cualquiera de los dos clados (MP y PM) fue tan alto como de un 85%, y los análisis bayesianos dieron probabilidades posteriores muy altas, de 0.91 para el morfo negro y de 1.0 para el bicolor, sugiriendo una gran congruencia entre los tres métodos de construcción de árboles filogenéticos y, por lo tanto, reflejando la verdadera relación filogenética entre ambos morfos.

Así, desde el punto de vista del concepto filogenético de especie, podemos concluir que ambos morfos, al formar dos grupos aparte, son dos especies distintas. Sin embargo, la baja distancia p-no corregida (media 1.5%) sugiere una divergencia muy baja entre los dos morfos si la comparamos con otras especies del mismo género (por ejemplo, con *C. emmae* es de ~8%), pero suficiente para que ambos grupos hallan completado el proceso de especiación. La red MJ ofrece dos grupos genéticamente diferentes, uno para cada morfo (Fig. 1.6). El número de sustituciones dentro de cada

morfo fue tan bajo como de 2, mientras que entre los dos morfos fue de 6. Tanto con los datos mitocondriales del transecto como de los obtenidos de la distribución general de la especie, los dos morfos aparecen separados en dos grupos, sin entremezclarse, indicando la inexistencia de flujo génico entre ellos y por lo tanto un alto grado de aislamiento genético. El análisis de la distribución mismach muestra que ambos morfos se encuentran en dos etapas demográficas diferentes, con el morfo bicolor en equilibrio y el negro en expansión, sugiriendo una reciente colonización por parte del morfo negro del terreno en el que actualmente se encuentra, un proceso que podría tener relación con su especiación a partir del morfo bicolor.

El bajo número de alelos de los marcadores nucleares compartidos por ambos morfos (~23%) más el hecho de que ninguno de los 19 alelos de uno de ellos resultara estar compartido sugiere un alto nivel de aislamiento genético entre los dos morfos, reflejando un flujo génico muy restringido entre ellos. Evidencias adicionales proceden de los valores F_{ST} obtenidos entre ellos y de los resultados del test G ($p < 0.0001$) indicando igualmente un alto nivel de divergencia y de aislamiento genético entre los morfos. Los análisis bayesianos de agrupamiento, el de bajo nivel jerárquico, el del logaritmo de la probabilidad ($\ln[P(D / K)]$) y el estadístico “ad hoc” ΔK , que proporciona un mejor predictor de (K) grupos a niveles jerárquicos superiores, confirmaron que los dos morfos representan grupos génicos diferentes. Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 1.1 y en la Fig 1.8, un gran número de los alelos resultaron ser únicos de cada morfo, y sólo unos pocos de ellos compartidos.

Los dos análisis discriminantes realizados, el morfológico y el químico, ofrecen el mismo tipo de resultado: las hormigas (machos y obreras) de ambos morfos cuyos hormigueros aparecen entremezclados en el PND, y con una diferenciación genética entre sus poblaciones del 2%, agrupan por separado, mientras agrupan juntas las *C. floricola* bicolor (obreras y machos) del PND con las de ALC y UTR, distantes 70 km, con las que muestran una diferenciación genética del 1.95%. Estos resultados además de evidenciar el distanciamiento existente entre los morfos bicolor y negro, muestran la continuidad específica existente entre las poblaciones de bicolor, a pesar de encontrarse hoy día fuertemente aisladas, y que la diferenciación genética, de por sí, no explica una especiación, al menos en eventos de especiación muy recientes.

El diferente número de sustituciones nucleotídicas encontrado entre los morfos, mayor en el morfo bicolor (Fig. 1.5a), sugiere que el morfo negro es, filogenéticamente, el más joven de los dos. Ello, unido a la mayor similitud biométrica de las piezas copuladoras del morfo bicolor al ancestro común *C. emmae*, sugieren que el morfo negro podría haber evolucionado a partir del bicolor.

Debido a la ausencia de un reloj molecular calibrado para hormigas (Goropashnaya et al. 2004), el tiempo transcurrido desde que ambos morfos se separaron se puede estimar sólo a partir de trabajos publicados sobre otras especies de insectos más o menos próximas a las hormigas (Juan et al, 1996; Prüser y Mossakowski, 1998). Por ello, elegimos una tasa de divergencia del 2% por millón de años (m.a.) estimada para *Drosophila* (DeSalle et al. 1987) y *Pimelia* (Juan et al. 1995). Así, ambos morfos debieron divergir hace ~1 m.a., durante el Pleistoceno. El estuario del Guadalquivir y sus alrededores han experimentado grandes transformaciones geomorfológicas durante este periodo geológico (Goy et al. 1994; Salvany y Custodio 1995; Rodríguez 1998; Zazo et al., 2005; Salvany et al., 2010), que pudieron haber separado una parte de la población que finalmente concluyó en especiación.

Uno de los problemas asociados con los estudios moleculares filogenéticos de los procesos de especiación es su resolución, menor cuanto más reciente ha sido ésta (Verneau et al. 1998; Barraclough y Vogler 2002; Wang et al. 2008). Sin embargo, estos procesos de especiación reciente son de extraordinario interés, ya que hacen más accesible la comprensión de los procesos evolutivos que han tenido lugar en ella.

Hoy día, las distribuciones de los dos morfos de *C. floricola*, además de ser muy pequeñas, especialmente la del morfo negro, son entre sí parapátrica, con pequeñas y estrechas zonas de solapamiento entre ellas. Siendo ambos morfos muy similares ecológicamente, con una misma alimentación y mismos ritmos de actividad, y reproduciéndose ambos por fisión, resulta interesante preguntarnos por qué sus poblaciones no se entremezclan. Para darle respuesta, podemos plantearnos varias hipótesis:

a) Hipótesis geomorfológica y filogenética. La actual distribución sería consecuencia, por una parte, del desarrollo reciente, holocénico, de la barra de Doñana

que cerró la desembocadura del Guadalquivir (Rodríguez 1998), originando un gran lago que acabó, por colmatación sedimentaria, en marismas, y por otra, por la formación de una alineación de lagunas al norte del Abalarío, hoy día aún existente en proceso de desecación y colmatación, que habría actuado de barrera física entre las poblaciones de los dos morfos. Hoy día estaríamos viendo las consecuencias de estos dos procesos geomorfológicos. El hecho de que los análisis mismach revelen que la población negra esté en expansión, en contraste con la del morfo bicolor, que se encuentra estable, podría sugerir un reciente ingreso y colonización de la zona, al sur del alineamiento lagunar, por el morfo negro. Esta hipótesis, que podría estar tras el proceso de especiación, implica asumir una buena dosis de oportunidad en el hallazgo de la situación.

b) Exclusión competitiva. El principio de que dos competidores por los mismos recursos no pueden coexistir de forma estable, de tal forma que uno siempre dominará al otro, por sí sólo supondría que una de las formas, la negra o la bicolor va a ir desplazando a la otra. Si mantienen una frontera estable entre sus poblaciones podría sugerir que ambos morfos poseen adaptaciones ecológicas, que no observamos, que los hacen más idóneos en los espacios en los que se encuentran.

c) Inercia poblacional. Debido a que ambos morfos se reproducen de la misma forma, por fisión, siendo transportada la reina virgen al nido hijo, podría ocurrir que el éxito de esta nueva reina, en cuanto a cópula se refiere, dependa de un umbral de machos en el entorno próximo. Si la fisión la ha llevado al terreno de la otra población, podría no conseguir copular y fracasar, no permitiendo la expansión de la población.

d) Híbridos estériles. Otra posibilidad sería la formación de híbridos estériles en la zona de contacto entre las poblaciones de los dos morfos impidiendo el avance de una de estas en la otra. Esta hipótesis tiene el obstáculo de las diferencias biométricas existentes entre los machos de ambos morfos, que sugieren la existencia de limitaciones físicas en el apareamiento entre ellos.

Todos los métodos utilizados en el estudio de la relación taxonómica entre los dos morfos de *C. floricola* coinciden en que nos encontramos ante dos especies diferentes. Nos queda describir a la nueva especie encontrada.

Capítulo 2

Descripción taxonómica de la nueva especie

*Cataglyphis tartessica*⁶

Introducción

El género *Cataglyphis* Förster 1850 está formado por un centenar de especies distribuidas por zonas áridas y desérticas del Viejo Mundo, desde Mauritania hasta el desierto del Gobi. Se trata de un género muy homogéneo dividido en grupos monofiléticos en base a la genitalia de los machos (Agosti 1990). Sin embargo, en este género existen problemas taxonómicos y sistemáticos a nivel de especie. *C. floricola* es un buen ejemplo de ello. La especie fue descrita como un complejo formado por dos morfos, uno negro y el otro bicolor (rojizo y negro) en base a parámetros geográficos y biométricos (Tinaut 1993). Este diferente patrón de coloración es atribuido a una adaptación a la temperatura (Carpintero et al. 2002). Sin embargo, un reciente estudio taxonómico multidisciplinar, basado en datos de distribución, moleculares, químicos y biométricos, concluyó que ambos morfos son en realidad dos especies diferentes (ver capítulo 1). Esta resolución, basada en la ausencia de flujo génico entre los morfos y en el hecho de que ambos, filogenéticamente, agrupan por separado, está de acuerdo con los conceptos biológico y filogenético de especie (Mayr 1942; de Queiroz y Donoghue 1990).

La presente descripción de la nueva especie está basada en las castas de obrera, reina y macho. Además, comparamos su morfología y medidas biométricas con las de *Cataglyphis floricola* (antes el morfo negro), la especie con parentesco más próximo a

⁶ Amor y Ortega. *Cataglyphis tartessica* nov. sp. new Spanish ant species for the genus *Cataglyphis* Förster, 1850. En preparación para Myrmecological News.

ella, usando para ello obreras y sexuados (reinas y machos). Las obreras de ambas especies, fácilmente distinguibles por el color, son, sin embargo, muy similares biométricamente, mostrando sólo diferencias significativas en sus proporciones corporales. Los sexuados, sin embargo, muestran claras diferencias en cuanto al tamaño corporal, siendo mayores los de *Cataglyphis tartessica* nov. sp. Correlacionados con el tamaño corporal, las piezas copuladoras son, así mismo, mayores en los machos de *C. tartessica* nov. sp (ver capítulo 1). También encontramos diferencias morfológicas en las placas subgenitales entre ambas especies.

Debido a que en la descripción de *C. floricola* se usó el morfo negro como holotipo, llamamos *C. tartessica* nov. sp. (*C. emmae* group (Agosti 1990)) al morfo bicolor de *C. floricola*.

Material y métodos

Recolección de hormigas

Todo el material fue obtenido entre los años 2008 y 2010. De *C. tartessica* nov. sp. se recolectaron un total de 181 obreras pertenecientes a 31 nidos de 5 localidades representativas de su área de distribución: la Reserva Biológica de Doñana (en adelante RBD), Alcalá de Guadaíra (en adelante ALC), Aznalcázar (en adelante AZN), Utrera (en adelante UTR) y Bornos (en adelante BRN); 32 machos, 17 de ellos en la RBD de nidos diferentes y 15 en ALC procedentes de 2 nidos; y 72 reinas, 25 braquípteras y 47 ergatoides, en la RBD.

Con el objetivo de establecer comparaciones, un total de 36 obreras de 9 nidos diferentes, a razón de 4 por nido, 23 machos de nidos diferentes y 16 reinas braquípteras de *C. floricola* fueron recolectados en la RBD. Todas las medidas se hicieron mediante regla micrométrica y la ayuda del software Imagen, con precisión de 10^{-2} mm (Abramoff et al 2004). Las medidas e índices seleccionados para el estudio biométrico fueron los siguientes: longitud de la cabeza (LC), tomada desde el borde clipeal anterior hasta el margen preoccipital; anchura de la cabeza (AC), tomada a la altura de los ojos; longitud del escapo (LE), excluyendo el cóndilo; longitud del tórax (LT) y la longitud

del fémur del tercer par de patas. Además, en la casta de sexuados, consideramos también la anchura del mesonoto (AM) y la longitud de las alas (LA).

Entre los índices más utilizados (Bolton 1987) seleccionamos el índice cefálico (IC) y el índice escapular (IE), obtenidos de las siguientes fórmulas: $IC = AC \cdot 100 / LC$; $IE = LE \cdot 100 / AC$. Además añadimos el índice de fémur (IF) como la relación entre la longitud del fémur y del tórax ($IF = LF \cdot 100 / LT$). De la genitalia de los machos medimos la anchura de la placa subgenital, tomada entre los extremos apicales de sus lóbulos distales, la longitud del estipite, tomada desde su primer proceso basal hasta el ápice del estipite, la longitud y anchura de la sagita y, finalmente, la longitud de la volsela.

Análisis estadísticos

Comparamos las medidas de las obreras y de los apéndices copuladores de los machos entre *C. tartessica* y *C. floricola* mediante análisis MANOVA y traza Pillai. En el análisis comparativo de las obreras añadimos las variables AC/LT y LF/LT. Evaluamos las diferencias de tamaños entre los sexuados de ambas especies, considerando la longitud del tórax, mediante test de Student. La significación de las diferencias morfológicas encontradas entre los apéndices copuladores se evaluó mediante el test χ^2 de Pearson. Toda la estadística se llevó a cabo mediante el software Statistica 6.0 (Statsoft Inc. Tulsa, OK, U.S.A.). Todos los valores se dan como media \pm SE.

Resultados

Material

Holotipo obrera: España, Huelva, Parque Nacional de Doñana, recolectada el 03-07-2009. En la colección de la Estación Biológica de Doñana.

Paratipos: 72 reinas (25 braquípteras y 47 ergatoides), 32 machos y 181 obreras, recolectadas entre los años 2008 y 2010.

Descripción

Holotipo obrera: LC: 1.17 mm, AC: 1.13 mm, LE: 1.42 mm, LT: 1,90 mm, LF: 1.85 mm, IC: 96.58, IE: 125.66, IF: 97.37. Bicoloreada: gastro negro brillante, ojos y ocelos negros y el resto del cuerpo ámbar. Tegumento densamente microesculturado (micropunteado) y, por lo tanto mate, excepto en el gastro. Pubescencia abundante que no oculta la textura del tegumento.

Cabeza rectangular, borde occipital suave y redondeado con 2 pelos suberectos. Ojos compuestos grandes y ovoides en la mitad superior de la cara, ocelos pequeños. Mandíbulas triangulares finamente estriadas; pilosidad en la cara externa y en los márgenes, destacando los largos pelos curvados en forma de J en el margen externo. Margen masticatorio armado de 6 dientes, el apical mayor y más puntiagudo. El preapical de tamaño intermedio y el resto pequeños e irregulares, siendo el cuarto menor que el tercero. Clípeo crestado en el centro con 7 setas gruesas en su margen frontal; una seta a cada lado de la porción posterior de la cresta clipeal. Fosas antenales lindando con el margen posterior del clípeo. Funiculo con 11 segmentos, el proximal casi el doble de largo que los otros. Fórmula palpar 6.4. Palpos maxilares extremadamente largos, tanto como la cabeza, con densa pilosidad; el par distal similar en longitud y menor a la mitad del par precedente. El área posterior (basal) de la maxila con 6 pelos largos y curvados hacia adelante con forma de J. Pubescencia mayor en el área occipital, entre y detrás de los ojos.

Tórax típico del género, epinoto suavemente convexo y patas largas. Espiráculo propodeal con forma elíptica alargada, como una ranura. Glándula metapleuraleal justo sobre la coxa posterior con su orificio protegido por un mechón de pelos. Peciolo con forma de escama gruesa y con ápice redondeado. Pubescencia dispersa sobre el mesonoto; abundante pubescencia plateada sobre el pronoto, pleura, epinoto, peciolo y coxas.

Gastro brillante debido a un tegumento muy ligeramente microesculpido y a una pubescencia muy dispersa. Ápice del gastro con un acidoporo circular y bordeado de setas. Largas setas en los esternitos gastrales; presencia de setas dispersas dorsalmente sólo en los tergitos más apicales.

Paratipo obreras (Tabla 2.1): dependiendo de la procedencia de la muestra, las obreras muestran variaciones biométricas. Tomando el tamaño corporal como ejemplo, la mayor diferencia se da entre las obreras de las poblaciones de BRN y AZN (longitud del tórax: 2.13 ± 0.03 vs 1.77 ± 0.02 , respectivamente). También aparecen diferencias entre las obreras en la presencia y número de setas y dientes.

Paratipo hembras (Tabla 2.2): esta especie presenta dos tipos de hembras reproductoras que se describen por separado.

Hembra braquíptera: misma distribución de color que las obreras, pero con cabeza, tórax y gastro mayores; cabeza más cuadrada y escapo más corto. Ojos compuestos y ocelos normales. Fuertes mandíbulas ligeramente estriadas, con el diente apical más puntiagudo y desarrollado que su correspondiente en las obreras; el segundo diente de tamaño intermedio; los otros dientes pequeños y cortos. Torác no tan desarrollado como el de las hembras macrópteras, pero mucho más desarrollado que el de las hembras ergatoides (Amor et al. 2011). Escudo, escutelo y metanoto pequeños pero bien diferenciados. Alas frágiles con nerviación débilmente marcada; tégulas y tocones del segundo par de alas patentes. Patas relativamente más cortas que en las obreras. Peciolo escuamiforme grande, ancho y con ápice redondeado.

Gastro similar al de las obreras pero de mayor tamaño. Pubescencia más dispersa.

Variabilidad: pequeñas diferencias en el tamaño del mesonoto y en el grado de desarrollo del tórax.

Obreras de *C. tartessica* (n = 181)

Variable	media \pm SE
Longitud de la cabeza	1.23 \pm 0.01
Anchura de la cabeza	1.15 \pm 0.01
Longitud del escapo	1.47 \pm 0.01
Longitud del tórax	1.94 \pm 0.01
Longitud del fémur	2.03 \pm 0.01
IC	93.6 \pm 0.23
IE	128.1 \pm 0.57
LF/LT	1.05 \pm 0.004
AC/LT	0.59 \pm 0.002

Tabla 2.1. Medidas en milímetros de las obreras de *C. tartessica*. (CI = índice cefálico; SI = índice escapular; LF = longitud del fémur; LT = longitud del tórax; AC = anchura de la cabeza).

Hembra ergatoide: muy parecida a la obrera y difícilmente distinguible de ella a simple vista. Escapo más corto que el de las obreras. Tórax ligeramente desarrollado con escudo, escutelo y metanoto muy pequeños. Sutura entre escudo y escutelo muy poco marcada. Escudo sin tégulas o con dos tégulas muy pequeñas. A veces con un par de tocones muy pequeños en el lugar de inserción del segundo par de alas. No desarrolla alas. Metanoto arqueado y arrugado. Patas y peciolo de tamaño intermedio al de las braquípteras y obreras.

Hembras de *C. tartessica*

Variable	Braquíptera		Ergatoide	
	media \pm SE	n	media \pm SE	n
Longitud de la cabeza	1.26 \pm 0.05	7	1.20 \pm 0.03	15
Anchura de la cabeza	1.33 \pm 0.02	24	1.13 \pm 0.007	46
Longitud del escapo	1.25 \pm 0.02	10	1.30 \pm 0.01	15
Longitud del tórax	2.25 \pm 0.03	25	1.90 \pm 0.02	47
Anchura del mesonoto	0.86 \pm 0.02	25	0.52 \pm 0.005	47
Longitud del fémur	1.64 \pm 0.02	23	1.75 \pm 0.01	46
IC	104.45 \pm 5.07	7	94.89 \pm 3.11	15
IE	96.23 \pm 2.13	7	115.58 \pm 1.21	15

Tabla 2.2. Medidas en milímetros de las hembras de *C. tartessica*, braquípteras y ergatoides.

Paratipo machos (Tabla 3): cabeza, escapo, tórax y coxas de color negro mate; funículo, patas y gastro de color ámbar. Alas grandes, ligeramente marrones y con nerviación fuertemente marcada.

Cabeza ovoide y pequeña. Ojos compuestos ovoides, grandes y prominentes en los márgenes de la mitad superior de la cara; ocelos grandes y prominentes también. Cápsula cefálica con una ligera prominencia en el margen occipital por detrás de los ocelos. Mandíbulas con forma de pala, pequeñas, frágiles y sin estriaciones, terminadas en un diente apical pequeño. Funículo con doce segmentos, los dos más basales algo más largos que los demás.

Tórax masivo, con escudo y escutelo bien desarrollados; metanoto pequeño. Placas pleurales estriadas cerca de las inserciones alares. Peciolo escuamiforme grande y grueso, con ápice ligeramente bilobulado. Escudo, escutelo y metanoto con pubescencia muy dispersa. Setas dispersas en el escudo. Pubescencia abundante en el pronoto, epinoto, pleuras, coxas y peciolo.

Gastro cilíndrico densamente microesculturado y con pubescencia media; Esternitos con numerosas y largas setas; terguitos sin setas.

Machos de <i>C. tartessica</i> (n = 29)	
Variable	media \pm SE
Longitud de la Cabeza	1.18 \pm 0.01
Anchura de la cabeza	1.29 \pm 0.03
Longitud del escapo	1.43 \pm 0.02
Longitud del tórax	2.63 \pm 0.03
Anchura del mesonoto	1.39 \pm 0.02
Longitud del fémur	2.04 \pm 0.1
Longitud de las alas	4.77 \pm 0.05
Anchura de la placa subgenital	0.59 \pm 0.01
Anchura de la sagita	0.55 \pm 0.006
Longitud de la sagita	0.96 \pm 0.009
Longitud del estipite	0.89 \pm 0.007
Longitud de la volsela	0.74 \pm 0.007
IC	109.23 \pm 1.92
IE	111.39 \pm 1.54

Tabla 3. Medidas en milímetros de los machos de *C. tartessica*.

Genitalia (Fig. 2.1): estipite elongado y oval con abundantes setas, y con un pequeño proceso digitaliforme en su base. Volsela y lacinia rectas y paralelas. La sagita es dos veces más larga que ancha, terminada en un pico curvo y con 7 (6-8) dientes pequeños en su arqueado margen interno. La placa subgenital es ancha, cóncava y bilobulada posterolateralmente, con un escotadura interlobular en su margen posterior; con numerosas setas en su cara externa.

Variabilidad: la extensión del color negro varía entre los machos y, particularmente, el escapo, normalmente negro, puede ser ámbar. El primer segmento funicular y gastral puede ser negro en algunos machos. La genitalia es muy uniforme; existen pequeñas diferencias en el número de dientes sagitales y, en algunos machos no aparece la escotadura de la placa subgenital.

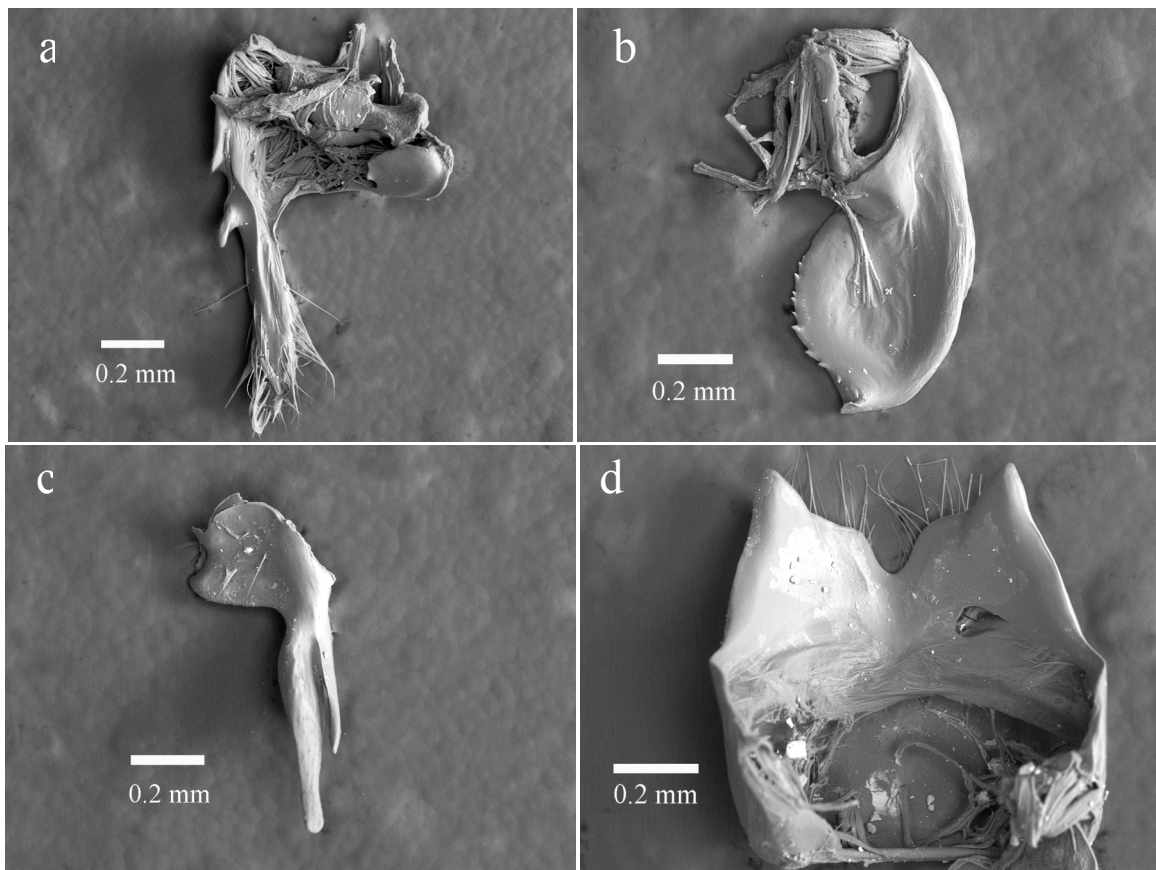


Figura 2.1. Imágenes a microscopio electrónico de barrido de la genitalia de los machos de *C. tartessica*: a) estipite, b) sagita, c) volsela y lacinia, d) placa subgenital.

Afinidades

Se trata de una especie muy cercana filogenéticamente a *C. floricola*. También son especies muy similares ecológicamente: las dos anidan sobre suelos arenosos en zonas áridas, sus obreras son monomórficas, se reproducen por fisión y sus nidos, monogínicos, están liderados por una reina que puede ser braquíptera o ergatoide (Amor et al. 2011).

Aparte del color, característica que las distingue con facilidad, existen otras diferencias biométricas remarcables, especialmente entre sus sexuos. Las obreras de *C. tartessica* nov. sp. aunque similares en tamaño corporal a las obreras de *C. floricola* (~5 mm), se diferencian de ellas en sus proporciones corporales (MANOVA, Pillai = 0.94, $F_{9,207} = 340$, $p < 10^{-2}$), siendo el índice escapular (IS) la variable cuya varianza quedó mejor explicada por las dos especies (R^2 ajustado = 0.71; índice escapular: 128.1

± 0.57 (n = 181), *C. tartessica* vs 97.54 ± 0.76 (n = 36), *C. floricola*; $F_{9,207} = 534.7$, $p < 10^{-6}$).

Las hembras braquípteras de *C. tartessica* nov. sp. son mayores que las de *C. floricola* (longitud del tórax: 2.25 ± 0.03 (n = 25) vs 1.97 ± 0.02 (n = 16), respectivamente, test de Student: $t = 6.33$, $p < 10^{-6}$) (Fig. 2.2a).

Los machos de *C. tartessica* nov. sp. son también significativamente mayores que los de *C. floricola* (longitud del tórax: 2.63 ± 0.03 (n = 29) vs 2.20 ± 0.01 (n = 23) respectivamente; test de Student: $t = 9.71$, $p < 10^{-6}$) (Fig. 2.2b y Fig. 2.3).

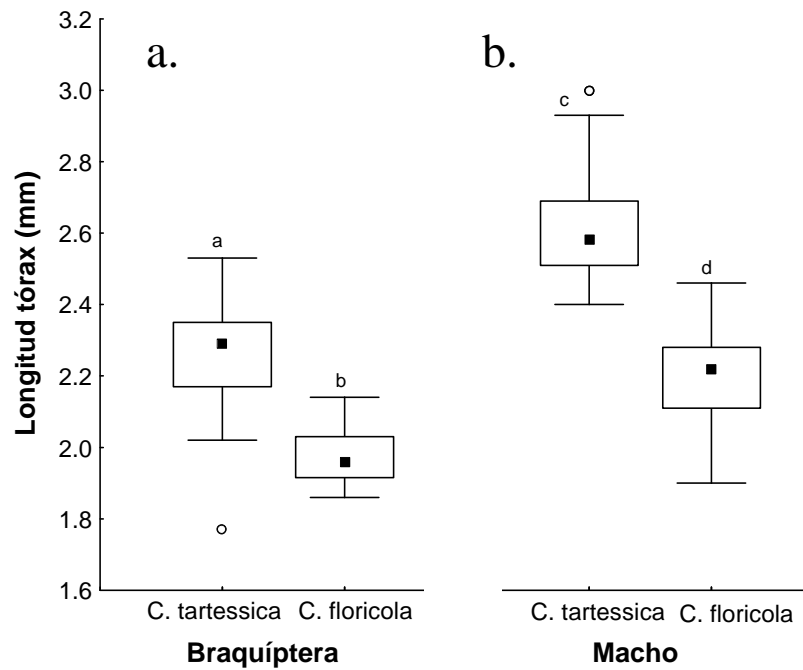


Figura 2. Comparación de la longitud del tórax entre braquípteras a.) y machos b.) de *C. tartessica* y *C. floricola*. Diferentes letras denotan diferencias significativas.



Figura 2.3. Imagen comparativa de los machos de a *C. tartessica* y b *C. floricola*.

Sus apéndices copuladores son también mayores (MANOVA, Pillai = 0,87, $F_{5, 49} = 67.97$, $p < 10^{-2}$), siendo la anchura de la sagita la variable cuya varianza resultó más explicada por las dos especies, (R^2 ajustado=0.80; 0.55 ± 0.006 (n=32), *C. tartessica* vs $0.42 \pm 0,005$ (n=23), *C. floricola*; $F_{5, 59} = 221.59$, $p < 10^{-6}$). Además, la escotadura de la placa subgenital está presente en el 53.1% de los machos de *C. tartessica* nov. sp. frente al 4.3% de los machos de *C. floricola* que la tienen (Chi cuadrado de Pearson: $\chi^2_1 = 14.46$, $p < 10^{-3}$) (Figura 2.4).

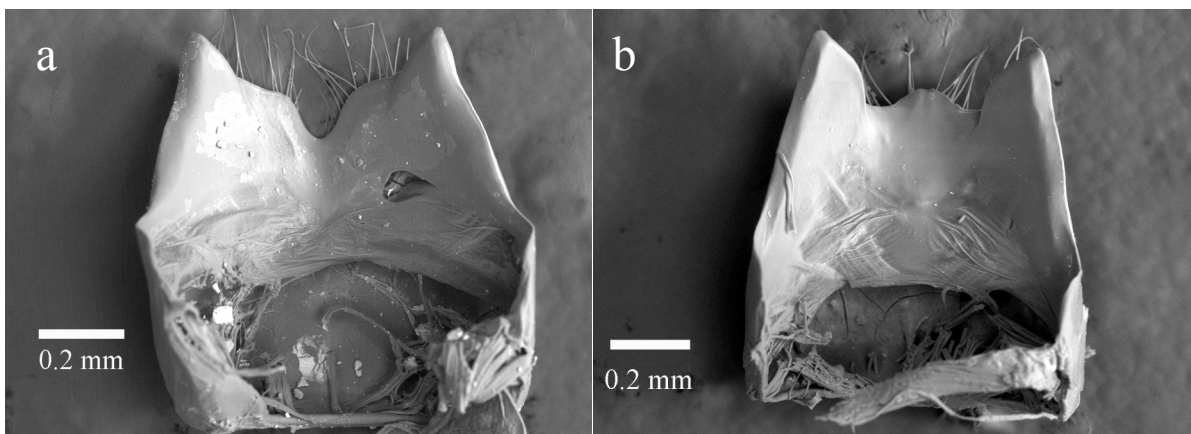


Figura 2.4. Diferencias entre las placas subgenitales de *C. tartessica* (a) y *C. floricola* (b). La de *C. tartessica* es de mayor tamaño y presenta en su zona central una acusada depresión.

Discusión

El aspecto físico de las obreras del género *Cataglyphis* es muy homogéneo, pudiéndonos a veces inducir a error en su identificación. Un ejemplo de ello es que hasta 1993 las obreras del morfo bicolor de *C. floricola* se consideraban *C. rosenhaueri* Santschi, 1925, y las del morfo negro, *C. ibericus* Emery, 1906, ambas del grupo de *C. albicans* (Agosti 1990; Tinaut 1993). La estrecha similitud morfológica entre estas especies sugiere una fuerte convergencia adaptativa a condiciones medioambientales parecidas.

C. tartessica nov. sp. y *C. floricola* son dos especies endémicas del suroeste de España con rangos de distribución muy pequeños (Fig. 2.5), y filogenéticamente muy cercanas. Los fuertes cambios geomorfológicos que han tenido lugar en torno al actual estuario del Guadalquivir durante el Pleistoceno (Goy et al. 1994; Salvany y Custodio 1995; Zazo et al. 2005; Salvany et al. 2010) pudieron haber propiciado la fragmentación y aislamiento de poblaciones de *Cataglyphis* de la zona, originando fenómenos de especiación.

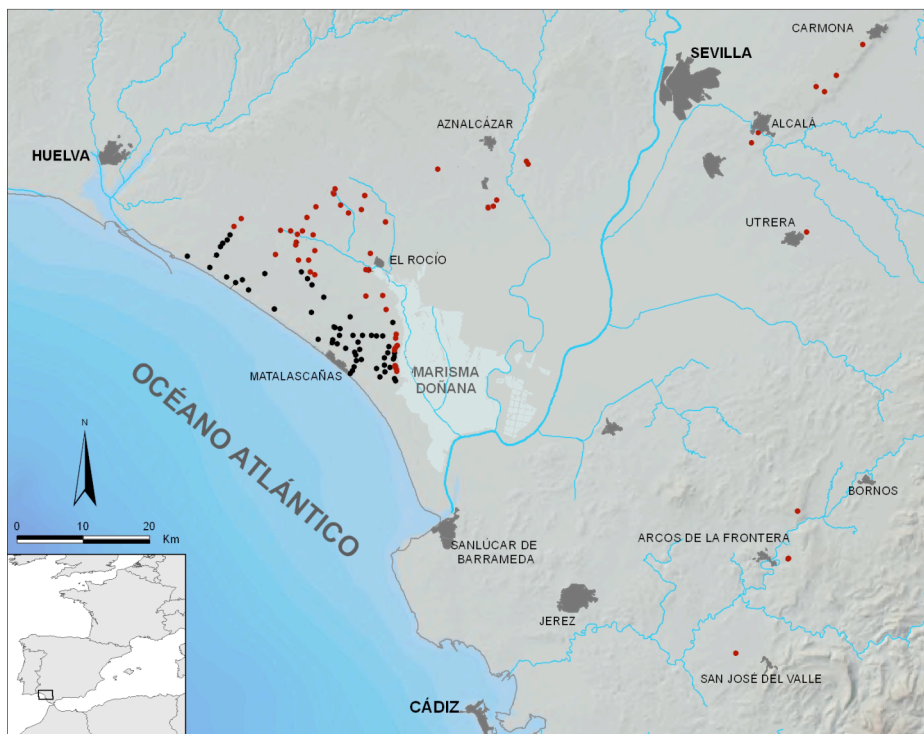


Figura 2.5 Mapa con la distribución de *C. tartessica* (puntos rojos) y *C. floricola* (puntos negros)

Si no fuera por su diferente coloración, *C. tartessica* y *C. floricola* pasarían por especies crípticas, en el supuesto de que hubiesen sido detectadas y taxonómicamente diferenciadas. La asociación de *C. tartessica* nov. sp. con lugares más abiertos y *C. floricola* con lugares de mayor cobertura (Carpintero et al 2002) necesita ser revisada a la luz de los actuales conocimientos sobre la distribución de ambas especies, que muestran a *C. tartessica* nov. sp. como residente frecuente de zonas con cobertura arbórea (como por ejemplo, en los pinares de Hinojos, de Villamanrique de la Condesa, de Aznalcázar y de Alcalá de Guadaíra). Conocer si el color constituyó un cambio adaptativo de relevancia, o no, resulta básico para la interpretación del reciente proceso evolutivo acaecido entre ambas especies.

El nombre de esta especie procede de su distribución, parecida a la que se supone que ocupó el antiguo reino de Tartessos en el sudoeste de la Península Ibérica (López-Davalillo 1999; Fig. 2.6), la más antigua civilización de occidente según Herodoto de Halicarnaso (siglo V a.C.).



Figura 2.6. Área aproximada de la extensión e influencia del Reino de Tartessos en el sudoeste de la Península Ibérica (fuente Wikipedia).

Segunda parte

Ecología

Cataglyphis tartessica es una especie de la que, excepto sobre su alimentación y comportamiento social, no existen estudios generales sobre su ecología. Así, en esta segunda parte nos proponemos como objetivo estudiar las adaptaciones de esta especie termófila a su medio ambiente. Para ello, esta segunda parte la dividimos en tres capítulos. En el primer capítulo trataremos de ofrecer una visión general sobre temas básicos de su ecología, como su tipo de distribución, la evolución estacional de la demografía de sus nidos, su alimentación y su modo de forrajeo. En el segundo capítulo estudiaremos los papeles desempeñados por la temperatura del suelo y la elevación solar en la regulación de sus ritmos, diario y estacional, de actividad. En el tercero estudiaremos el sistema de reclutamiento desplegado por sus forrajeras ante presas que, por su tamaño, no son capaces de transportar al nido sin la colaboración de otras obreras, una novedad en *Cataglyphis*, a las que se suponían hormigas con estricto forrajeo individual.

Capítulo 3

Aspectos ecológicos básicos de *C. tartessica*

Introducción

Tanto el tipo de alimentación como el lugar de anidamiento constituyen recursos muy importantes para el conocimiento de la ecología de las hormigas. Debido a que los insectos son esencialmente organismos recolectores, el tipo de comida que consumen va a estar muy relacionado con el tamaño, localización y forma de distribución de sus colonias (Blüthgen y Feldhaar, 2010).

En las hormigas, como en los insectos en general, existen diferencias en cuanto a requerimientos alimenticios entre las etapas juveniles del desarrollo y los adultos. Así, las proteínas y lípidos son requeridos para el crecimiento de las larvas, el desarrollo ovárico y la producción de huevos, mientras que, para el metabolismo de los adultos y la producción de esperma por los machos, son los carbohidratos los que van a jugar un papel esencial, fundamentalmente como fuente de energía (Nation 2002; Markin 1970). Sin embargo, a día de hoy es poco lo que se conoce sobre los requerimientos mínimos nutricionales de las hormigas ni cómo, las que presentan dietas más restringidas, consiguen los micronutrientes necesarios para su metabolismo (Blüthgen y Feldhaar 2010).

Las especies de *Cataglyphis* son, principalmente, hormigas recolectoras de cadáveres de artrópodos (Délye 1968; Wehner *et al.* 1983; Cerdá 1988; Cerdá *et al.* 1989; Cerdá y Retana 1997). Sin embargo, se considera que la alimentación de *C. tartessica* es excepcional dentro del género al tener un producto vegetal, como son los pétalos, como principal fuente de alimento (Cerdá *et al.* 1992, 1996). El conocimiento de la distribución de esta especie nos permitió estudiar qué presas recolecta y sus posibles preferencias alimenticias.

Mantener estable las condiciones microclimáticas, al menos parcialmente, es una característica importante de muchos insectos sociales (Wilson 1971). Al carecer de alas, las hormigas no son capaces de ventilar sus nidos abanicándolos a la manera de las abejas y avispa. Anidar bajo el suelo, además de conferir protección frente a depredadores, podría actuar de aislante frente a las temperaturas superficiales, reduciendo además la oscilación diaria de ésta. Esto sería especialmente importante en hormigas que, como las *Cataglyphis*, viven en lugares de alta insolación y elevadas temperaturas. Mediante el seguimiento de la profundidad de los nidos a lo largo de la estación de actividad de *C. tartessica* y del registro de la temperatura superficial a 50 cm de profundidad, nos propusimos comprobar si la hormiga ajusta la profundidad del nido en función de la temperatura.

Material y métodos

Distribución de nidos

Para el estudio de la distribución espacial de los nidos de *C. tartessica* se confeccionaron, durante los meses de julio y agosto del 2006, 5 mapas de nidos de 5x5 m en Villamanrique de la Condesa, Sevilla (en adelante VMC), en la Reserva Biológica de Doñana, Huelva (en adelante RBD) y en Aznalcázar, Sevilla (en adelante AZN). Además, realizamos siete mapas más de 5x5 m, en una misma parcela de AZN, repartidos entre el 26 de Abril al 4 de Septiembre de 2008. Para la localización de los nidos se usaron cebos de galleta con una distancia entre ellos de un metro.

El patrón de distribución de la especie lo obtuvimos, con los datos extraídos de los mapas, del test estadístico de Clark y Evans (1954) basado en la distancia al vecino más próximo. Para limitar efectos de bordes, utilizamos la corrección de Donnelly propuesta por Sinclair (Sinclair 1985). El método, en pocas palabras, consiste en comparar la distancia media entre los nidos, tomadas entre aquellos más próximos entre sí, con un valor esperado de distancia si la distribución de estos nidos fuese al azar. De esta comparación obtenemos y valor R. Si R no es significativamente distinto a 1, la distribución encontrada está distribuida al azar; si, por el contrario, lo fuese, la distribución sería regular (sobredispersa), para valores de $R > 1$, o agregada para valores de

$R < 1$. A fin de comprobar estadísticamente la significación de R , lo estandarizamos, obteniendo de ello un nuevo valor C . Finalmente, haciendo uso de las tablas de la distribución normal, comprobamos la significación del parámetro C .

La evolución estacional de la actividad de *C. tartessica* (número de nidos activos por día del año) se estudió en VMC en 2008. Para ello se levantaron 12 mapas de 35x4 m entre los meses de marzo y octubre (cada 10 días en mayo y quincenales en junio y julio; el resto uno al mes) en los que se marcaron todos los nidos activos encontrados.

Las distancias a los nidos más próximos se compararon entre parcelas diferentes y, para una misma parcela, entre diferentes meses, mediante el análisis de medias de ANOVA.

Para conocer la persistencia temporal de las colonias, es decir, si su ubicación es o no estable a lo largo de la estación de actividad, se marcaron 35 nidos en julio de 2007 en VMC. Los nidos fueron visitados en 28 ocasiones hasta agosto de 2008. La ocurrencia de cambios de entrada de los nidos fue anotada, midiéndose la distancia entre su nueva posición con la anterior. Los datos fueron analizados mediante el test de supervivencia de Kaplan – Meier. Además, 10 de estos nidos fueron sometidos a observación durante 8 días entre agosto y septiembre, por espacio de 30 minutos al día y a horas diferentes, con la finalidad de detectar la ocurrencia o no de comunicación entre nidos por medio de transportes sociales.

Evolución demográfica de las colonias

Un total de 99 nidos fueron excavados entre 2006 y 2010 en la RBD. Todos los nidos fueron trasladados al laboratorio donde los adultos y la progenie (paquetes de huevos, larvas y capullos) fueron contados. Mediante ANOVA analizamos las diferencias, en cuanto al número de obreras, entre tres periodos de tiempo, en base a la presencia de sexuados: Antes de su presencia (meses de marzo, abril y mayo), durante su presencia (junio y julio) y después de su presencia (agosto, septiembre y octubre). De 52 de estos nidos, repartidos de marzo a octubre, entre 2006 y 2010, se tomaron datos de su profundidad máxima. Mediante data logger, registramos de forma continua, cada hora y durante un año, a partir de mayo de 2007, valores de temperatura a 50 cm de profundidad, en la superficie y a 1m de altura, en la RBD.

Alimentación

Un total de 334 forrajeras portando presa fueron capturadas, y sus presas retiradas, en 4 parajes diferentes de su área de distribución durante el mes de mayo de 2010 y los meses junio y julio de 2011. Los parajes elegidos fueron: un herbazal con algún eucalipto en sus márgenes, en ALC, un matorral de *Retama sphaerocarpa* en Bornos, Cádiz (en adelante BRN), un pinar de *Pinus pinea*, en VMC y un matorral de *Halimium halimifolium* en la RBD. En ALC se tomaron presas en dos puntos próximos entre sí. Uno de ellos en las cercanías de una fuente de cóccidos (eucaliptos infectados por hemípteros cocoideos) y el otro a una distancia de 100 m del anterior y alejado de la infección. El rango de presas recolectadas por lugar y mes estuvo comprendido entre 22 y 61. Las obreras fueron liberadas de inmediato en su lugar de captura.

Una vez retiradas las presas a las forrajeras, se llevaron al laboratorio donde se identificaron y se midieron (a la décima de mm) y pesaron (a la décima de mg). Con ellas se establecieron tres categorías: 1.- cadáver de artrópodo, 2.- resto vegetal, frecuentemente pétalo de flor y 3.- miscelánea, consistente en presas variadas poco frecuentes, como pequeños excrementos, o bien presas no identificadas.

Modo de forrajeo

Un total de 42 forrajeras de 8 nidos diferentes fueron marcadas con un punto de color en el abdomen, usando para ello rotuladores uniPAINT, en la RBD, AZN y ALC, en los meses de mayo y junio de 2007 (RBD y AZN) y en mayo de 2011 (ALC). Para cada individuo registramos la orientación de 2 a 18 direcciones de forrajeo, monitorizadas hasta 9 días. Para ello consideramos 8 sectores posibles, cada uno de 45° ayudándonos con grabaciones de vídeo. A 27 de ellas, distribuidas por los 8 nidos, se les registraron además los tiempos de forrajeo y de descanso dentro del nido y, mediante seguimiento, el tipo de alimento recolectado por la obrera. La temperatura del suelo fue registrada mediante data logger. Los tiempos de forrajeo (log-trasformados) se analizaron mediante ajuste a un modelo lineal general con Statistica 6.0 en el que el nido y forrajera se incluyeron como factores aleatorios anidados. Todos los resultados se dan como medias \pm S.E, excepto que se indique otra cosa.

La distancia media de forrajeo se calculó, en ALC, a partir de tres medidas tomadas de 14 forrajeras diferentes marcadas.

Resultados

Distribución de nidos

El análisis de la distancia al vecino más próximo di resultados no significativos tanto entre las distintas parcelas de muestreo (ANOVA de una vía, efecto parcela: $F_{4, 60} = 0.712$, $p = 0.59$) como, para una misma parcela, entre los distintos meses del periodo de actividad anual de la especie (ANOVA de una vía, efecto mes: $F_{6, 99} = 1.10$, $p = 0.36$). Además, los nidos de *C. tartessica* mostraron una distribución no significativamente distinta a la del azar (Tabla 3.1). La distancia media entre nidos fue de 0.78 ± 0.08 m, y la densidad 0.57 ± 0.03 nidos/m².

Localidad	Fecha	D. al V. más P.	nidos/m ²	C	p
RBD - A	5-7-06	0.8	0.64	0.97	0.17
RBD - B	9-8-06	0.81	0.44	-0.37	0.35
VMC - A	8-7-06	0.84	0.44	-0.15	0.44
VMC - B	15-7-06	0.98	0.56	1.28	0.10
AZN - 1	26-4-08	0.61	0.56	-1.23	0.11
AZN - 2	22-5-08	0.79	0.6	0.62	0.27
AZN - 3	9-6-08	0.83	0.6	0.94	0.18
AZN - 4	23-6-08	0.71	0.76	0.84	0.20
AZN - 5	10-7-08	0.76	0.56	0.09	0.46
AZN - 6	1-8-08	0.72	0.56	-0.32	0.37
AZN - 7	4-9-08	0.77	0.6	0.41	0.34

Tabla 3.1 Resultados del estudio sobre el tipo de distribución de *C. tartessica* mediante levantamiento de mapas de nidos 5 x 5 m y aplicando la técnica de la distancia al vecino más próximo. En la localidad, la terminación A y B indica dos emplazamientos distintos del mapa de nidos dentro de la misma zona. La terminación numérica indica que los mapas de nidos se hicieron exactamente en el mismo emplazamiento. En todos los mapas la distribución fue al azar ($p > 0.05$).

Del seguimiento de 35 colonias marcadas durante un año obtuvimos que la proporción acumulada de colonias que permanecieron en su sitio, al finalizar el periodo de observación, fue de 0.77 ± 0.07 , lo que, junto a no observarse ninguna actividad de recolocación de nidos, sugiere que la mortandad local para ese año fue de aproximadamente el 23%.

Durante el seguimiento de las colonias se observaron, además, 33 cambios de localización de la entrada del nido. Estos cambios, de 23.09 ± 1.74 cm, estuvieron muy repartidos entre ellas. Ocasionalmente se observaron nidos con dos bocas activas abiertas. Fuera del periodo de reproducción colonial (junio-julio) no se observaron transportes sociales entre colonias.

Periodo de actividad y variaciones estacionales en el número de nidos

Los resultados del estudio sobre la evolución estacional del número de nidos activos realizado en VMC mostraron que *C. tartessica* es activa durante las estaciones de primavera y verano. Tras un periodo de total inactividad en invierno, se observan las primeras hormigas forrajeando al final del mes de Marzo. El número de nidos activos fue aumentando regularmente hasta su estabilización en el mes de mayo. A partir de junio, el número de nidos activos volvió a aumentar hasta llegar a un máximo en julio, que se mantuvo en agosto. En septiembre se inició un descenso en el número de nidos en actividad hasta su desaparición en octubre, mes en el que terminan su periodo de actividad estacional retornando a la diapausa invernal (Fig. 3.1).

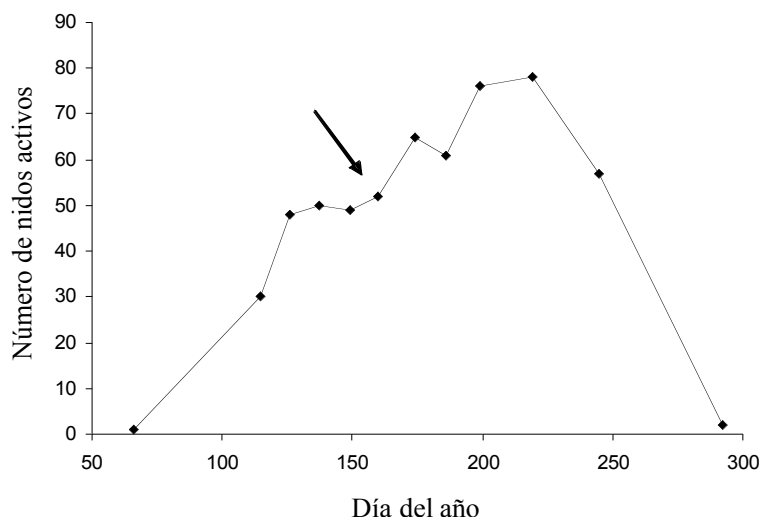


Figura 3.1 Resultados del estudio sobre la variación estacional de nidos activos realizado en VMC de marzo a octubre de 2008. La flecha indica el comienzo, a principios de junio de la época de reproducción por fisión de las colonias (como referencia, el día 200 se corresponde con el 19 de julio).

Composición y variación estacional de la demografía colonial.

Del análisis de la demografía de las colonias, encontramos que éstas siempre estuvieron liderados por una sola reina (colonias con una reina: 73.6%; colonias sin reina: 26.4%; n=72). Más aún, encontramos que las colonias podían estar lideradas por dos morfos distintos de reina: a) braquíptera: un tipo de reina que, aunque desarrolla alas, no puede volar, y b) ergatoide: un tipo de reina que nunca desarrolla alas y que es muy semejante en tamaño y aspecto a las obreras.

De las colonias con reina, encontramos que en el 47.2% de los casos ésta fue braquíptera, mientras que en los restantes 52.8% lo fue ergatoide. Para obtener estas proporciones descartamos los nidos sacados con anterioridad a 2008, ya que fue a principios de este año cuando descubrimos la existencia de reinas ergatoides y pudimos caracterizarla con precisión.

Respecto a la evolución demográfica anual de las colonias, encontramos que el número de obreras de *C. tartessica* sigue una distribución con forma de V, opuesta a la de la progenie (Fig.3.2). En marzo-abril salieron de la hibernación con un número medio de obreras por nido de 351 ± 92 (media \pm SD; n = 9), comenzando en mayo la

producción de progenie. El número de obreras fue descendiendo progresivamente hasta junio (126 ± 106 obreras; media \pm SD; $n = 61$), mientras que el número larvas y capullos aumentó. En junio – julio, junto a la producción de sexuales, eclosionaron numerosos adultos, con lo que el nivel poblacional comenzó a recuperarse, hasta alcanzarse una media de 264 ± 24 obreras por nido (media \pm SD; $n = 10$) en septiembre-octubre, coincidiendo con la finalización de la producción de crías y el comienzo de la diapausa invernal.

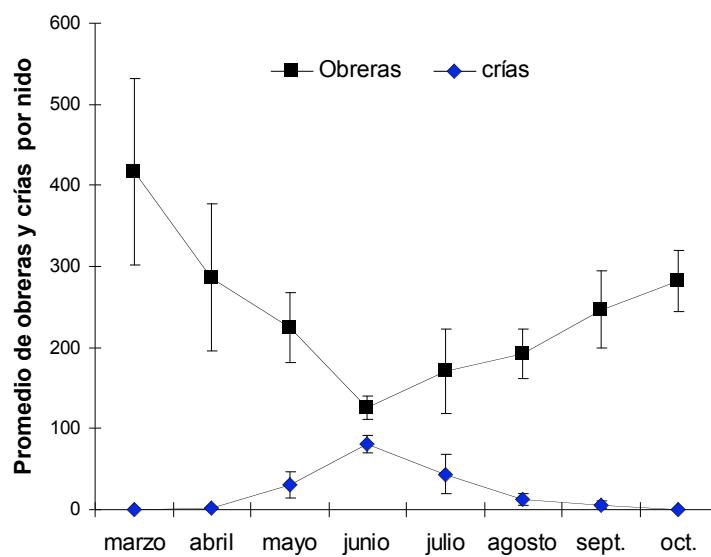


Figura 3.2 Variación estacional del número de obreras (cuadrados) y crías (rombos) en los nidos de *C. tartessica*. Las crías son la suma de paquetes de huevos, larvas y capullos de obreras.

El análisis ANOVA de diferencias intra-anales en el número de obreras de los nidos, agrupando a éstos en tres fases del ciclo de actividad de *C. tartessica*: antes, durante y después de la producción de sexuales, dio resultados muy significativos (ANOVA, $F_{2,96} = 13.11$; g.l. = 2; $p < 0.0001$). El número de obreras por nido descendió durante el periodo reproductivo, pasando de 272 ± 40.3 en la etapa previa a la producción de sexuales, a 129.1 ± 13.1 durante esta etapa. Posteriormente la población recuperó sus niveles iniciales (Fig. 3.3).

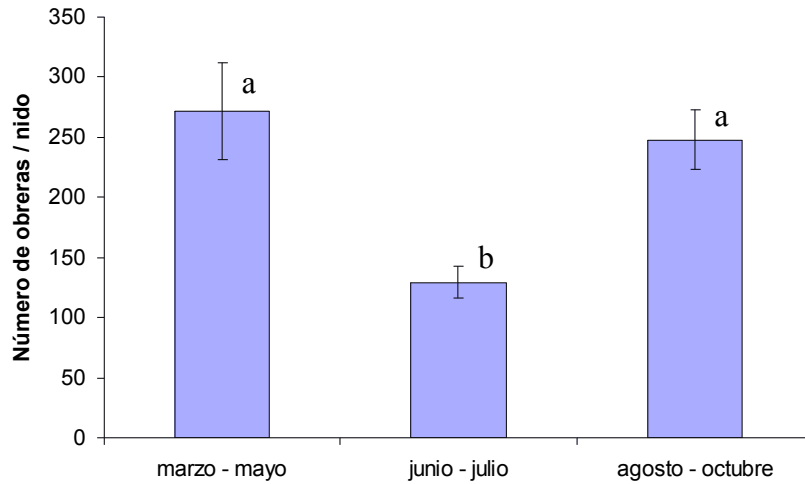


Figura 3.3 Tamaño medio de los nidos (\pm SE) en tres periodos del ciclo anual de actividad de *C. tartessica*: antes de la aparición de los sexuales (marzo – mayo), durante la aparición de sexuales (junio – julio) y tras el periodo de sexuales (agosto – octubre). Diferentes letras denotan diferencias significativas.

El marcado descenso poblacional registrado en junio coincidió con el periodo de reproducción por fisión de las colonias.

Respecto a la evolución anual de la profundidad de los nidos de *C. tartessica*, encontramos una alta correlación positiva entre ésta y la temperatura existente a 50 centímetros de profundidad (profundidad del nido = $-6.387 + 2.2411 \cdot \text{temp}_{-0.5 \text{ cm}}$; $r = 0.92$, $p = 0.001$; Fig. 3.4).

Alimentación

Los resultados mostraron que *C. tartessica* recolectó mayoritariamente cadáveres de artrópodos, llegando éstos a superar, en el mes de junio, el 90% de las presas en ALC y VMC (Fig. 3.5 y Fig. 3.6). Del total de cadáveres de artrópodos, el de hormiga resultó ser la presa mayoritaria (50.0%). También recolectó pétalos de flores de plantas herbáceas de floración primaveral (*Geranium*, *Erodium* y *Tuberaria*) y de matorrales como *Halimium commutatum* y *Halimium halimifolium*, este último de floración estival. En la RBD, los pétalos de *H. halimifolium* fueron la presa mayoritaria en junio (58.1%).

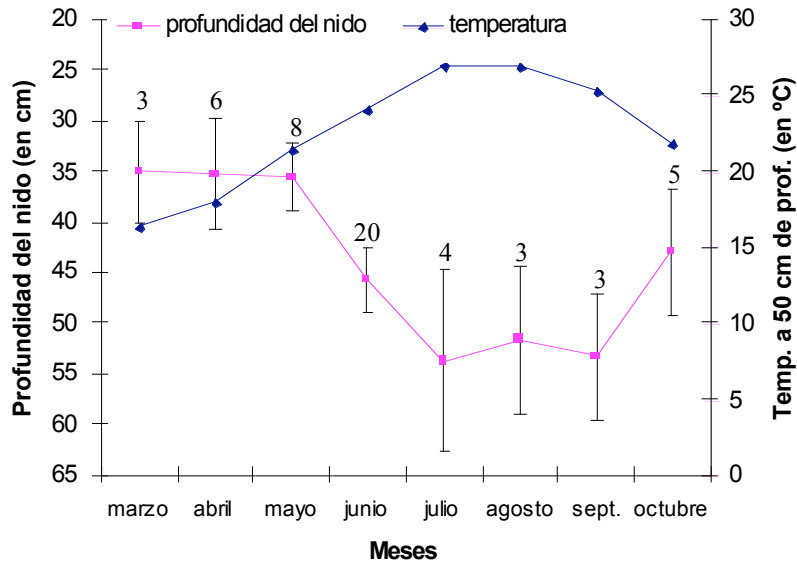


Figura 3.4 Relación entre la variación estacional de la profundidad de los nidos de *C. tartessica* con la temperatura existente bajo el suelo a 50 cm de profundidad. Cada punto representa la media (\pm SE). Los números sobre las barras de ES de los valores medios de profundidades de los nidos indican el tamaño de la muestra (n). Los ES de los valores medios de las temperaturas son muy pequeños, y no aparecen en la gráfica debido a que se calculan sobre un número muy alto de valores (n = 720 por mes)

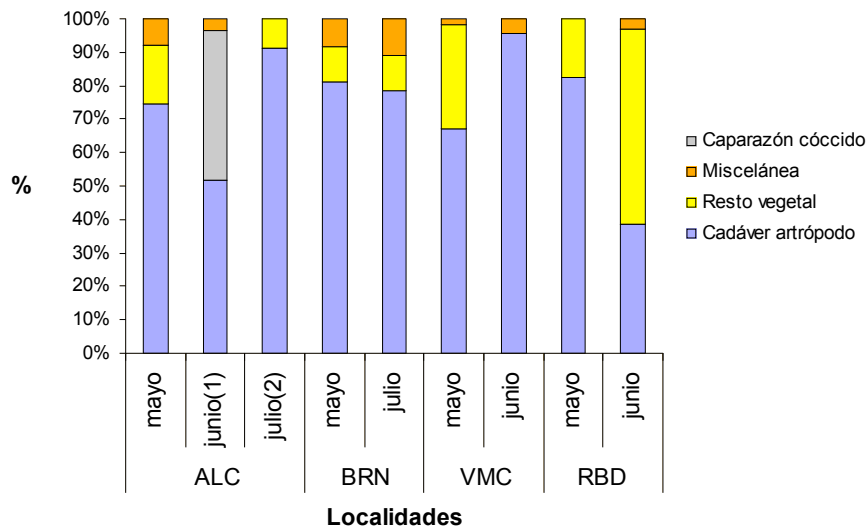


Figura 3.5 Presas recolectadas por *C. tartessica* (en %) en cuatro parajes distintos: un herbazal (ALC), un matorral de *Retama* (BRN), un pinar (VMC) y un matorral de *Halimium* (RBD) durante el mes de mayo de 2010 y los meses junio y julio de 2011. junio(1) y julio(2), en ALC, hacen referencia a dos puntos de muestreo distantes entre sí 100m, estando el primero próximo a eucaliptos infectados con cóccidos.

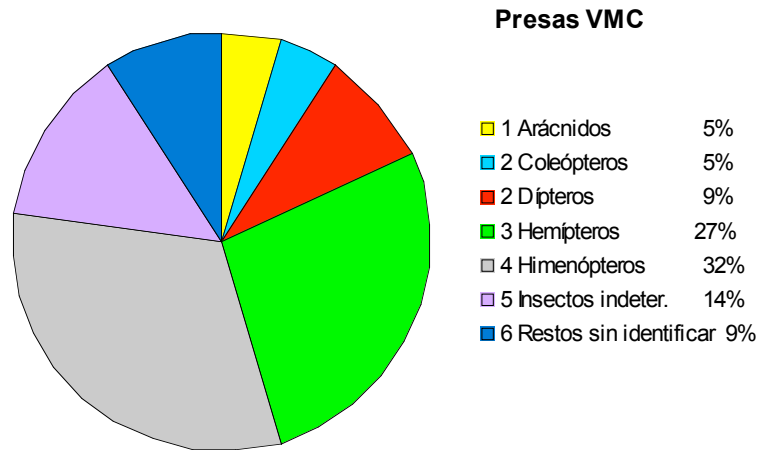


Figura 3.6 Composición de la dieta de *C. tartessica*. Se muestra la frecuencia relativa de las diferentes categorías de presas sólidas recolectadas en VMC el 19/6/2011 (n = 22).

El tamaño y peso de las presas recolectadas fue de 3.6 ± 0.11 mm, n = 334 y 1.7 ± 0.14 mg, n = 266, respectivamente.

Modo de forrajeo

Del total de hormigas marcadas, el 15.4% dedicaron su actividad a la recolección de néctar de flores de los géneros *Euphorbia*, *Paronychia* y *Loeflingia*, mientras que el restante 84.6 % de forrajeras se dedicaron a la búsqueda y recolección de presas sólidas.

En el registro de las direcciones de forrajeo se encontraron dos tipos de comportamientos: a) el de obreras que realizaron trayectos en torno al nido y b) las que se alejaron de él. Las obreras pertenecientes al primer grupo (en nuestro estudio, el 18% de las forrajeras) se mantuvieron muy próximas al nido (hasta 2 m de distancia) a veces buscando presas y otras no, mientras que las del segundo grupo se dirigieron siempre hacia un mismo sector del terreno, al que sometían a exploración en sucesivas visitas. La distancia de forrajeo encontrada, a partir de forrajeras del segundo grupo, fue de 7.05 ± 0.93 m, n= 42.

Los tiempos de forrajeo y descanso resultaron ser de 14 min 48 seg ± 48 seg y 13 min 03 seg ± 62 seg, respectivamente (media \pm SE), y la eficacia recolectora de

presas sólidas fue del 23.4% (n = 201 entradas de obreras vigiladas), con una temperatura media de la superficie del suelo, en el mes de mayo, de 48.5 °C.

En el modelo lineal general (glm), con variable respuesta el tiempo de forrajeo, resultaron ser muy significativos los efectos tanto del tipo de presa (líquida o sólida) recolectada por la obrera como el de la obrera encargada de su recolección (glm: $F_{1,173} = 9.95$; $p = 0.002$ y $F_{12,173} = 2.91$; $p = 0.005$, respectivamente), mientras que resultó discretamente significativo el efecto del nido (glm: $F_{2,173} = 5.33$; $p = 0.02$), y no resultaron significativos los efectos de la temperatura de la superficie del suelo ni la variable forrajera(nido) (glm: $F_{1,173} = 0.01$; $p = 0.91$ y $F_{6,173} = 0.27$; $p = 0.95$, respectivamente), indicando esto último un comportamiento homogéneo, en cuanto a sus forrajeras, en los diferentes nidos.

En el análisis de los tiempos de forrajeo no se incluyeron los tiempos de descanso, ya que ambos tiempos resultaron estar positivamente correlacionados ($F_{1, 140} = 24,2$; $p < 0.0001$).

Discusión

Nuestros resultados muestran que *C. tartessica* es una especie de hormiga que, en los lugares donde habita, lo hace formando agrupaciones muy densas de nidos. La pérdida de la dispersión aérea podría ser la causa de estas elevadas densidades. Sus espacios de forrajeo están muy solapados al ser la distancia de forrajeo unas diez veces superior a la distancia al nido vecino más próximo. La distribución al azar de sus colonias no evidencia competencia intraespecífica, lo cual sugiere que, como ocurre en la mayoría de las *Cataglyphis* (Lenoir et al. 2010), *C. tartessica* no defiende territorio.

Frente a otras especies de *Cataglyphis* con fundación colonial independiente, como por ejemplo *C. rosenhaueri*, con gran capacidad de colonización de nuevos espacios, las especies con fundación por fisión someten a una mayor explotación al espacio en el que viven (Knaden M y Wehner R 2006).

Los resultados del muestreo realizado en VMC nos muestran a una hormiga con un periodo de actividad inter-equinoccial primavera-otoño, similar al de otras *Cataglyphis* de la península ibérica como *C. ibericus*, *C. cursor* y *C. rosenhaueri* (Cerdá et al. 2002; Clemencet 2006; F. Amor observación personal sobre *C. rosenhaueri*). El aumento poblacional registrado partir de junio (Fig. 3.1) está de acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de las fisiones (ver capítulo 2: la fisión colonial).

Del estudio del cambio estacional de la profundidad de los nidos encontramos una estrecha correlación entre ésta y la temperatura, sugiriendo que *C. tartessica* consigue una temperatura adecuada y relativamente constante de su microhábitat mediante variaciones de la profundidad de su nido⁷ (Fig. 3.4). Así, para los meses de máximo calor (julio, agosto y septiembre) la profundidad de los nidos está en torno a los 50 cm, a la que le corresponde una temperatura aproximada de entre 25 y 26 °C sin prácticamente oscilaciones, que podría resultar ser idónea para el nido en esas fechas (Fig. 3.7). Futuros trabajos en los que se incluya además la humedad relativa del suelo como variable nos ayudarán sin duda a entender mejor las preferencias microclimáticas de esta hormiga durante su periodo de actividad.

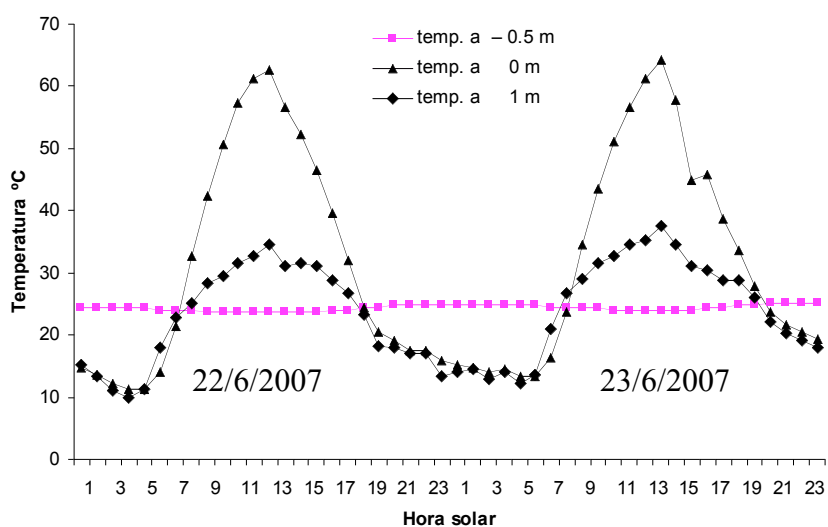


Figura 3.7 Fluctuación de la temperatura diaria a tres niveles: a) a – 0.5m c) a 0 m y d) a 1 m del suelo. Los datos están recogidos en El Martinazo (RBD) los días 22 y 23 de junio de 2007. Para esos días, la profundidad media de los nidos fue de 45.7 cm. Nótese la mínima oscilación térmica diaria registrada a –0.50 m.

⁷ En las extracciones de los nidos, es muy frecuente encontrar a la reina, junto a un buen número de obreras, en lo más profundo de éste.

La falta de una pauta apreciable en el tipo de presas recolectadas por *C. tartessica* durante la primavera y comienzos de verano, momento éste último de la reproducción colonial, junto a un aprovechamiento de recursos de disponibilidad temporal, como son los pétalos de *Hamimium halimifolium* en verano, en la RBD, u ocasional, como la recolección de caparazones de cóccidos ricos en melaza, en ALC, nos muestran a una especie con un forrajeo oportunista. La alimentación mayoritaria a base de cadáveres de artrópodos, posiblemente muertos en las horas de máximo calor, parece ser más consecuencia de la pobreza en recursos de los lugares áridos en los que habita que de sus propias preferencias. Así, los pétalos de *H. halimifolium* llegan a representar hasta el 81.9% de las presas recolectadas en julio por *C. tartessica* (Cerdá et al. 1992). La observación de que estos pétalos son eliminados de los nidos, como basura, en estado seco, sugiere que *C. tartessica* aprovecha de ellos sólo sus jugos floemáticos, pobres en proteínas y ricos en hidratos de carbono, justo en una etapa del ciclo de la hormiga en la que el número de sus larvas es la más alta (Fig 3.5) y, por tanto, sus requerimientos proteínicos se consideran máximos (Nation 2002). Posiblemente, el balance entre la fácil disponibilidad de este recurso, como también ocurre en ALC con los caparazones de cóccidos, junto a la necesidad de hidratos de carbono por los adultos como fuente de energía (Markin 1970), y todo ello en un ambiente tan hostil como en el que esta especie habita, lleva a *C. tartessica* a su aprovechamiento.

La fidelidad a la dirección de forrajeo encontrada en *C. tartessica* es frecuente, tanto en el género *Cataglyphis* (Wehner et al. 1983; Wehner et al. 2004), como en *Melophorus*, su equivalente ecológico en Australia y también perteneciente a la subfamilia Formicinae (Muser et al. 2005), así como en *Ocymyrmex*, un género sudafricano de la subfamilia Myrmicinae del desierto namibio (Wehner 1987), lo que sugiere que se trata de una adaptación del forrajeo a condiciones de temperaturas del suelo muy altas, donde el uso de señales químicas de orientación resulta muy costoso o del todo inoperante (Ruano et al. 2000; van Oudenhove et al. 2011). Lo impredecible de la localización de las presas en los lugares donde habita lleva a las forrajeras de *C. tartessica*, y en general a todas las *Cataglyphis*, a tenerse que alejar del nido muchos metros en su búsqueda, lo que, al no disponer de feromonas de orientación, favorece la memorización del terreno y, con ello, la fidelización de una zona de forrajeo.

La observación en *C. tartessica* de obreras que, una vez que salen del nido, hacen un itinerario corto sin alejarse de éste, ha sido también descrita en *Cataglyphis bicolor*, interpretándose como parte inicial del desarrollo de las forrajeras, encaminado a la adquisición de actitudes de navegación (Wehner et al. 2004).

Los tiempos de forrajeos resultaron ser independientes de la temperatura del suelo dentro de un rango comprendido entre los 45 y los 60°C, lo que denota su gran adaptación al forrajeo en ambientes térmicos extremos (Wehner et al. 1992; Lenoir et al. 1990; Cerdá et al. 1998). Para una misma actividad de forrajeo, sea recolección de líquidos o búsqueda de presas, resultó significativa la “idiosincrasia” de la obrera, una característica que resultó estar compartida entre los nidos y que sugiere una valoración individual por parte de las forrajeras de los costes y beneficios de su actividad.

Como resumen podemos decir que *C. tartessica* es una especie muy bien adaptada a las condiciones ambientales en las que vive. Así, su distribución podría ser consecuencia de su modo de reproducción, y ésta, a su vez, podría estar muy relacionada con los lugares áridos y pobres en recursos en los que habita (Heinze y Tsuji 1995; Bolton 1986; Tinaut y Heinze 1992). Su alimentación resulta ser oportunista, aprovechando recursos locales y /o temporales disponibles, muy dispersos, que busca de forma individual dentro de un sector bien conocido por ella.

Además, como veremos a continuación, la especie ha retenido capacidad de reclutamiento, aunque primitivo, que le permite aprovechar presas grandes. También, como veremos a continuación, además de utilizar la posición del sol como fuente de orientación, lo van a hacer para regular su actividad de forrajeo.

Capítulo 4

Efecto de la elevación solar en la actividad de forrajeo de *Cataglyphis tartessica*⁸.

Introducción

La mayoría de los animales alternan el forrajeo con otras actividades en un espacio específico, ambos a escala diaria y anual. Desde una perspectiva ecológica y evolutiva, esta partición del tiempo es importante debido a que potencialmente reduce las interacciones entre especies simpátricas (Kronfeld-Schor y Dayan 2003). Forrajear a horas diferentes del día o durante diferentes estaciones del año puede, por ejemplo, evitar la interferencia entre especies competidoras (Alanãrã et al. 2001), la predación (Fenn y MacDonald 1995) y el parasitismo (Feener 1988; Orr 1992). Los ritmos de actividad pueden condicionar las interacciones entre especies mutualistas (Boulay et al. 2007; Ranganathan et al. 2010). Determinar las señales responsables de los ritmos de actividad de las especies es, por lo tanto, una cuestión clave para entender la coexistencia entre las especies. Las comunidades de hormigas están a menudo estructuradas mediante un compromiso entre dominancia y termorresistencia, por lo que las especies que conviven juntas tienen diferentes horarios de forrajeo según su jerarquía de dominancia (Albrecht y Gotelli 2001). Esto es particularmente evidente en los hábitats mediterráneos y subtropicales, donde la temperatura del suelo muestra considerables fluctuaciones diarias y estacionales (Cerdá et al. 1997; Cerdá et al. 1998; Bestelmeyer 2000; Albrecht y Gotelli 2001; Holway et al. 2002; Thomas y Holway 2005).

Las especies pequeñas con una limitada termorresistencia a menudo ocupan un rango dominante en la jerarquía, mientras que las subordinadas forrajean a temperaturas más extremas. Por ejemplo, el género *Cataglyphis* está formado por un centenar de

⁸ Fernando Amor, Patrocinio Ortega, Xim Cerdá y Raphaël Boulay. 2011. Solar Elevation Triggers Foraging Activity in a Thermophilic Ant. *Ethology*. Aceptado Agosto 2011.

especies distribuidas exclusivamente por los hábitats áridos y semiáridos del Viejo Mundo. A menudo se las consideran especies subordinadas que no son capaces de defender una fuente de alimento frente a especies competidoras (Cerdá et al. 1998). Sin embargo, estas hormigas han desarrollado numerosas adaptaciones, incluida la producción continua de proteínas de shock térmico (heat shock proteins) (Gehring y Wehner 1995), largas patas que mantienen el cuerpo separado de la superficie del suelo (Cerdá et al. 1997; Clémencet et al. 2009) y el uso de refugios térmicos (Cerdá et al. 2000) que les permiten forrajear a temperaturas, superiores a los 50 °C, que no son toleradas por las especies dominantes (Lenoir et al. 2009).

El hecho de que una especie presente numerosas adaptaciones a la temperatura no implica necesariamente que este factor deba ser el factor clave de su actividad de forrajeo. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre los ritmos de actividad de las hormigas sugieren que estos están directamente marcados por la temperatura del suelo. Por ejemplo, los patrones de actividad diarios en hormigas granívoras cambian entre las estaciones frías y cálidas (Whitford et al. 1981; Azcárate et al. 2007; Cole et al. 2010). En invierno, las colonias tienen una actividad unimodal alrededor del mediodía. A medida que la temperatura aumenta durante la primavera y el verano, las colonias comienzan a forrajear más temprano y acaban más tarde, haciendo una larga parada al mediodía.

Son numerosas las correlaciones registradas entre la actividad y la temperatura en especies de hormigas no granívoras (Nuss et al. 2005; Yamamoto y Del-Claro 2008; Chong y Lee 2009) que, aunque proporcionan una importante información, pueden llevarnos a confusión, porque, a escala geográfica local, la temperatura puede correlacionar con otras variables ambientales tales como la intensidad lumínica y la elevación del sol.

En un reciente estudio, datos correlacionales fueron combinados con datos experimentales para mostrar que las entradas y salidas de los nidos de las forrajeras de *Myrmecia pyriformis* dependen exclusivamente de la intensidad de luz y no de la temperatura (Narendra et al. 2010).

El objetivo del presente estudio fue examinar el papel de la temperatura del suelo y el de la elevación del sol en el inicio y fin de la actividad de forrajeo de la hormiga termófila *Cataglyphis tartessica*. Aunque esta especie presenta un rudimentario sistema de reclutamiento (Amor et al. 2010), las obreras en general se orientan mediante patrones de luz polarizada, dependientes de la posición del sol, y del uso de marcas del paisaje para encontrar el camino de regreso al nido. Por lo tanto, nosotros planteamos la hipótesis de que el forrajeo puede estar condicionado por marcas solares en vez de exclusivamente por la temperatura. Primero, mediante modelos lineales generales y modelos aditivos, examinamos la correlación entre el volumen del tráfico en la entrada de los nidos con la temperatura del suelo y la elevación solar media, ambos a escalas diarias y estacionales. Segundo, examinamos la correlación entre la hora de apertura y el cierre de los nidos y la temperatura.

En *C. tartessica*, las obreras utilizan pequeñas piedrecillas y arena para cerrar el nido al final del periodo diario de actividad. Tal comportamiento puede haber evolucionado como un sistema de protección frente a depredadores y parásitos (Hölldobler y Wilson 1990). Si las obreras esperan hasta un determinado nivel de temperatura del suelo para comenzar o finalizar su forrajeo, esperaríamos que la pendiente de la regresión de las horas de apertura/cierre de los nidos frente a la temperatura no fuese significativamente diferente a cero. Finalmente, de modo experimental, aumentamos la elevación solar sobre la entrada de los nidos y disminuimos la temperatura, y examinamos si esta manipulación retrasaba el cierre de los nidos.

Material y métodos

Registro de la actividad de forrajeo

La actividad de forrajeo se midió en un total de 62 nidos elegidos al azar en RBD, VMC y AZN, localidades muy próximas entre sí (< 35 km). Los datos se obtuvieron entre marzo de 2005 y septiembre de 2009. Cada nido fue observado durante un solo día, comenzando como mínimo una hora antes de la actividad y terminando una hora

después de su cese. En 36 de los nidos, el número de salidas y entradas se contaron cada hora durante 10 minutos y extrapolados a una hora. Para los restantes 26 nidos se registró la actividad total mediante filmación con una cámara de vídeo Sony DCR-SR30. Las obreras dedicadas a trabajos de mantenimiento del nido y que no se alejan de él más que unos pocos centímetros no fueron tenidas en cuenta en esta medida.

Durante cada sesión de observación, la temperatura a la entrada del nido se registró, con precisión de 0.1 °C, cada 10 minutos usando HOBO® data loggers. La temperatura fue promediada por horas.

Variación estacional de la actividad respecto a la temperatura del suelo y la elevación solar.

Con el fin de examinar la correlación entre la actividad de forrajeo colonial con la temperatura del suelo y con la elevación solar, calculamos el tráfico total de hormigas (suma de salidas y entradas al nido) desde las 8:00 a las 20:00 horas solares de 40 colonias de la RBD. Este periodo de tiempo incluye el principio y el final de la actividad a lo largo del año.

Las diferencias en cuanto al tráfico de hormigas se compararon entre meses usando modelos lineales (lm) en R (R Development Core Team) en los que el nido fue la unidad estadística y el mes fue la variable predictora. Las diferencias fueron evaluadas mediante retroanálisis de contraste (backward contrast) en los que los meses con diferencias no significativas se reagruparon progresivamente hasta alcanzar el mínimo modelo adecuado (Crawley 2007). A continuación, la media de tráfico diario por mes desde marzo a septiembre se sometió a regresión tanto con la media solar respectiva por mes como con la temperatura media del suelo desde la 8:00 hasta las 22:00 durante los mismos meses. Debido a que el tráfico de hormigas probablemente varía con el tamaño de la colonia, que también varía a lo largo del año, incluimos el tamaño medio de las colonias (número de obreras) durante cada mes como otro predictor.

El número medio de obreras por mes lo obtuvimos de la excavación de 36 nidos en 2008 y 2009 en la RBD. La temperatura media de la superficie del suelo se obtuvo a

partir del registro de temperaturas desde las 8:00 a las 20:00 de marzo a septiembre de 2007, independientemente del seguimiento de la actividad.

Los datos de temperatura se obtuvieron en dos puntos de la RBD con presencia de nidos de *C. tartessica* mediante HOBOTM data logger. La elevación media solar por mes se obtuvo promediando el ángulo de elevación solar calculado para cada hora desde las 8:00 hasta las 20:00 los días 5, 15 y 25 de cada mes entre abril y septiembre. El ángulo de elevación solar se obtuvo con la ayuda del software <http://www.susdesign.com/sunangle/index.php>.

Aunque los datos de temperatura y elevación solar se obtuvieron para sólo un año, la media de valores por mes varía poco de año a año y asumimos que los datos de 2007 son una buena estimación para el periodo 2005-2009.

Variaciones diarias de la actividad de las hormigas dependiendo de la temperatura y de la elevación solar.

El patrón diario de actividad de forrajeo se analizó a partir del tráfico de hormigas en la entrada del nido de las 40 colonias previamente mencionadas y seguidas en la RBD más datos similares obtenidos entre marzo de 2005 y septiembre de 2009, de 17 y 5 colonias en AZN y VMC, respectivamente. Los datos se estandarizaron dividiendo el tráfico correspondiente a cada hora por el tráfico máximo por hora registrado durante el día. Esto nos permitió eliminar las variaciones entre estación y entre nido del total de actividad. Sin embargo, el patrón de actividad todavía varía mucho a lo largo del año y es difícil de modelizar mediante regresión polinomial. Por ello, ajustamos un Modelo Aditivo Mixto Generalizado (GAMM) usando el paquete mgcv de R. El modelo se ajustó utilizando una distribución del error cuasi-binomial, con el tráfico estandarizado como la variable respuesta, y la temperatura, elevación solar y su interacción como predictores fijos. La colonia se incluyó como factor aleatorio.

Apertura y cierre del nido

En agosto de 2007 hicimos un seguimiento durante 7 días consecutivos de la hora de apertura de 17 nidos en VMC, registrando también la temperatura del suelo en la que

ésta tiene lugar. Los datos obtenidos se analizaron mediante el ajuste a un modelo mixto general utilizando para ello el paquete nlme de R. La apertura del nido y la temperatura del suelo fueron la variable respuesta y el factor fijo, respectivamente. La colonia se incluyó como factor aleatorio. Si la temperatura provoca la apertura del nido esperaríamos que la pendiente no fuese significativamente diferente de cero.

También seguimos la hora de cierre en la misma localidad entre el 30 de agosto y el 7 de septiembre de 2007. Cada dos días, durante ocho, registramos la hora de cierre y la temperatura a la que se producía, de 10 colonias. Los días intermedios manipulamos la elevación del sol, mediante espejos, en la entrada de los nidos una hora y media antes del cierre esperado de éstos (Fig. 4.1). Un espejo (M1; 25x30 cm) se colocó directamente sobre el suelo a aproximadamente 0.5 m de la entrada del nido con la superficie reflectante hacia arriba y con un ángulo de inclinación sobre la horizontal α . Un segundo espejo (M2; 25x30 cm) se colocó entre el anterior y la entrada del nido (N) a 40 cm de altura y con la superficie reflectante hacia abajo. Mediante dos paneles de cartulina (P1 y P2) se impidió que los rayos del sol incidieran directamente sobre la boca del nido. Con ello se conseguía aproximadamente doblar la elevación solar.

La posición del espejo M1 se fue modificando progresivamente según el desplazamiento azimutal del sol. La temperatura fue de unos 2 °C inferior bajo la luz reflejada. Aún así, a las hormigas les podía llegar luz polarizada que podrían utilizar como información ya que el espejo superior no les cubría el cielo por completo.

Con la finalidad de comparar la hora y la temperatura de cierre de los nidos con y sin espejos, ajustamos los datos a un modelo lineal mixto general. Si la elevación solar determina la hora de cierre del nido, esperaríamos que los nidos bajo manipulación cerrasen significativamente más tarde que los no manipulados. Por el contrario, si es la temperatura la que provoca el cierre de los nidos, esperaríamos que los nidos manipulados cerrasen significativamente antes que los que no manipulados. Por otra parte, como en la apertura de los nidos, esperaríamos que la pendiente entre la hora de cierre y la temperatura del suelo no difiriera significativamente de cero.

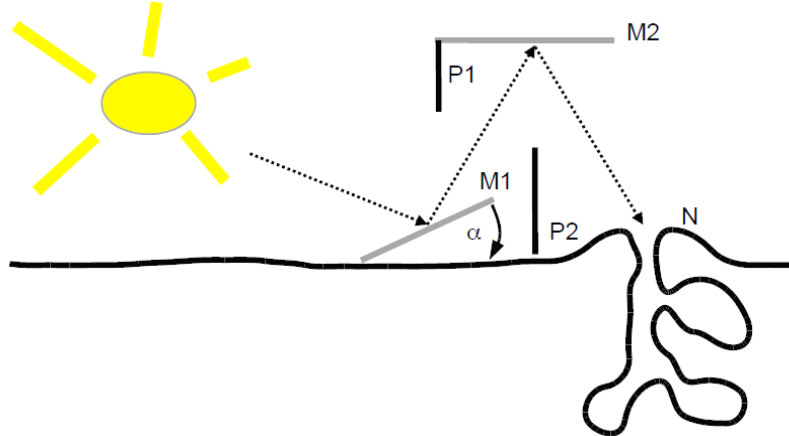


Figura 4.1 Diseño experimental para modificar el ángulo de elevación solar en el nido (N). Los rayos solares se reflejaron por medio de los espejos M1 y M2. Dos paneles de cartulina (P1 y P2) impidieron la llegada a N de rayos directos del sol. El ángulo α se fue modificando durante el experimento a fin de mantener una elevación aparente del sol doble que la real.

Resultados

Variaciones estacionales en la actividad de C. tartessica

La actividad estacional de *C. tartessica* puede ser dividida en tres periodos (Fig. 4.2; lm: $F=16.09$, $df=2$, $p<0.0001$). Al comienzo de la estación (marzo-abril), el rango de tráfico a la entrada del nido oscila entre 30 y 270 entradas y salidas de forrajeo por día. A partir de ahí, el tráfico de hormigas se incrementa significativamente a más de 1300 movimientos por día entre mayo y julio ($t=5.57$, $p<0.0001$). Agosto y septiembre marcan el final de la estación de actividad con un descenso significativo del tráfico de hormigas ($t=-3.17$, $p<0.01$). La temperatura del suelo durante el día también se incrementa lentamente durante la primavera y alcanza su máximo en julio y agosto, aproximadamente un mes después del pico de máxima actividad de *C. tartessica*. Como resultado, el tráfico de hormigas a lo largo del año no resultó significativamente correlacionado con la temperatura del suelo (lm: $F_{1,5}= 0.46$, $p=0.5259$, $R^2= 0.08$) incluso cuando se tuvieron en cuenta las variaciones en el tamaño de la colonia (lm: $F_{1,3}= 2.52$, $p=0.2104$, $R^2=0.56$). Por el contrario, el tráfico de hormigas estuvo correlacionado con los valores promedios de los ángulos de elevación solar entre las 8:00 y las 22:00 horas, tanto si el tamaño de la colonia se tuvo, o no, en cuenta (lm:

$F_{1,3}= 9.09$, $p=0.0181$, $R^2=0.92$ y $F_{1,5}= 8.33$, $p=0.0343$, $p=0.0343$, $R^2=0.63$, respectivamente).

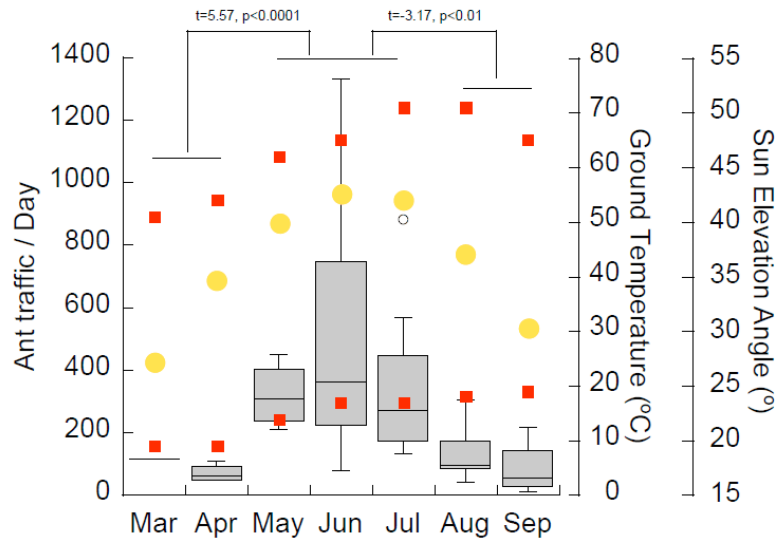


Figura 4.2 Variación en el tráfico diario de hormigas (suma de entradas y salidas) en la entrada del nido entre las 8:00 y las 20:00 horario solar a lo largo del año, en relación con el rango promedio de temperaturas del suelo (mínimo y máximo; cuadrados rojos) y el promedio de elevación solar (círculos amarillos).

Variaciones diarias en la actividad de C. tartessica

El tráfico de hormigas también varió ampliamente a lo largo del día. El análisis GAMM llevado a cabo con la actividad estandarizada explicó una porción relativamente pequeña de la varianza ($R^2=0.34$). Los resultados indicaron que la temperatura por sí sola no afectó significativamente al tráfico en la entrada del nido (Fig. 4.3; $df=1.0$, $F=0.75$, $p=0.39$). Sin embargo, ambos, la elevación solar y la interacción entre la elevación solar y la temperatura tuvieron un efecto significativo en el tráfico de hormigas (Fig. 4.3; $df=1.0$, $F=5.34$, $p=0.02$ y $df=7.4$, $F=6.01$, $p<0.001$). Por lo tanto, cuando la elevación solar fue pequeña (por debajo de 20°), el tráfico de hormigas fue pequeño, independientemente de la temperatura del suelo. Cuando la elevación solar aumentó, también lo hizo la actividad. Esta fue mayor cuando la elevación solar alcanzó los 70° y la temperatura fue de 48°C . A temperaturas mayores, el tráfico de hormigas disminuyó, incluso aumentando la elevación solar, debido probablemente a una

limitación fisiológica de las hormigas para soportar temperaturas muy altas. Esta diferencia en el patrón de actividad diario queda muy bien recogida en la figura 4.4, que muestra el tráfico de hormigas, en dos hormigueros distintos y en dos fechas, el 25 de mayo y el 5 de julio de 2007. En mayo, cuando las temperaturas del suelo se mantuvieron relativamente suaves a lo largo del día, el tráfico de hormigas siguió un patrón campaniforme centrado en la hora de mayor elevación solar. Por el contrario, en julio, cuando la temperatura sobrepasó los 60°C, el tráfico se ralentizó al medio día.

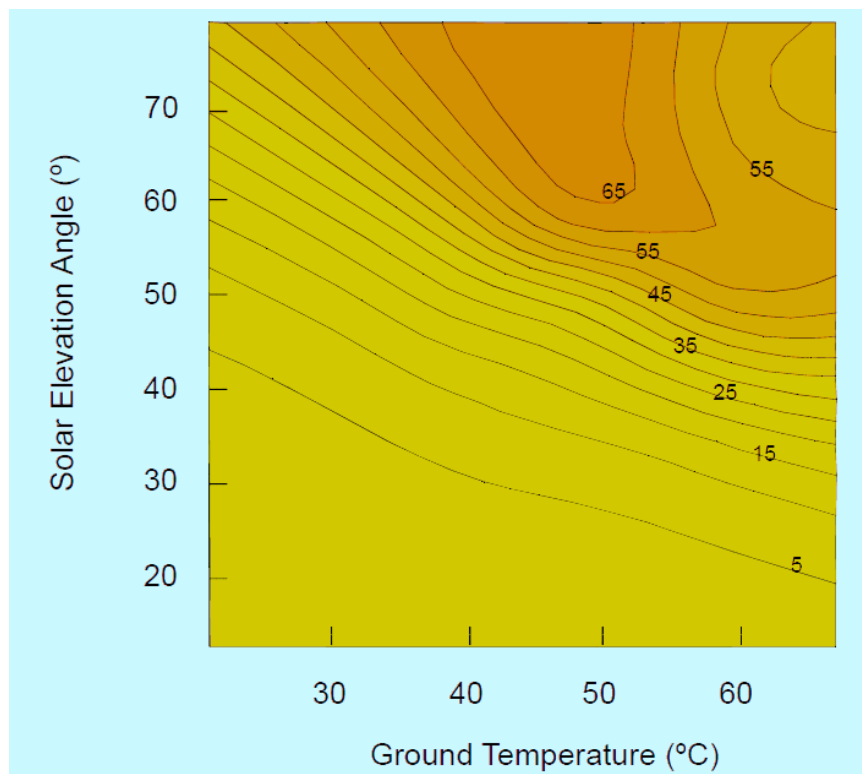


Figura 4.3 Relación entre la temperatura del suelo, el ángulo de elevación solar y el patrón diario de actividad de *C. tartessica*. Los números sobre las líneas y la intensidad de color rojo denotan actividad de forrajeo estandarizada (%)

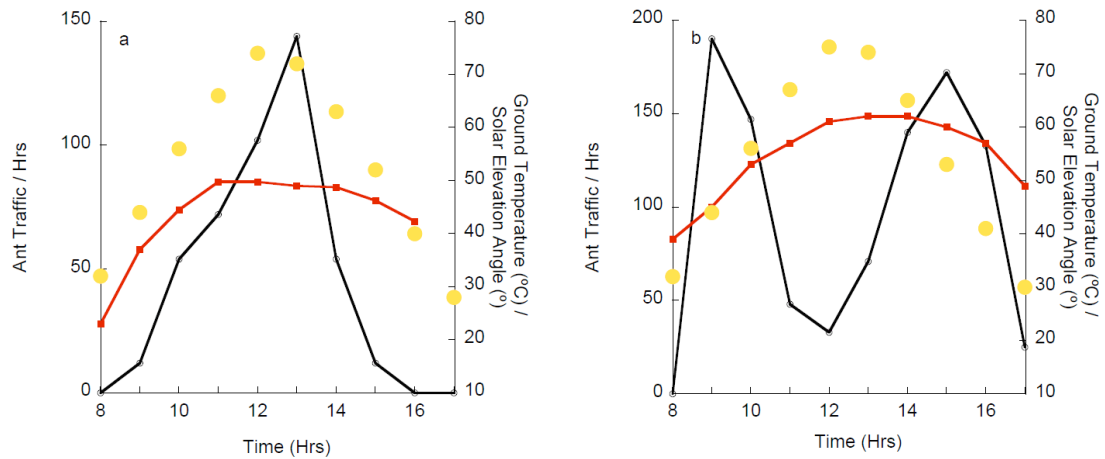


Figura 4.4 Dos ejemplos de la variación diaria del tráfico de hormigas (líneas negras) en la entrada de dos nidos, registradas el 25 de mayo de 2005 (a) y el 5 de julio de 2007 (b). Los cuadrados rojos y los círculos amarillos representan, respectivamente, el promedio de temperaturas del suelo y la elevación solar.

Apertura y cierre de los nidos

El 92% de la varianza observada en la temperatura de apertura de los nidos fue explicada por diferencias entre nidos, mientras que tan solo el 8% restante lo fue por diferencias dentro del nido (Fig. 4.5a). La temperatura a la que abrieron los nidos se incrementó significativamente con la hora (lme: $t_{87}=7.69$, $p<0.0001$) sugiriendo que las hormigas no esperaron a que la temperatura alcanzara un valor determinado para comenzar la actividad.

El cierre de los nidos, bajo condiciones manipuladas mediante espejos, se produjo $8 \text{ min } 51 \text{ seg} \pm 1 \text{ min } 38 \text{ seg}$ más tarde que en los que no fueron manipulados (Fig. 4.5b; lme: $t_{69}=2.85$, $p=0.0063$). La temperatura a la hora de cierre también varió más entre nidos que dentro de los nidos (75% vs 25%, respectivamente) y fue de media $2.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ inferior en las colonias manipuladas. Además, la pendiente de la regresión entre la hora de cierre y la temperatura fue muy significativa (lme: $t_{69}=-7.84$, $p<0.0001$), sugiriendo que los nidos no cierran a una temperatura fija.

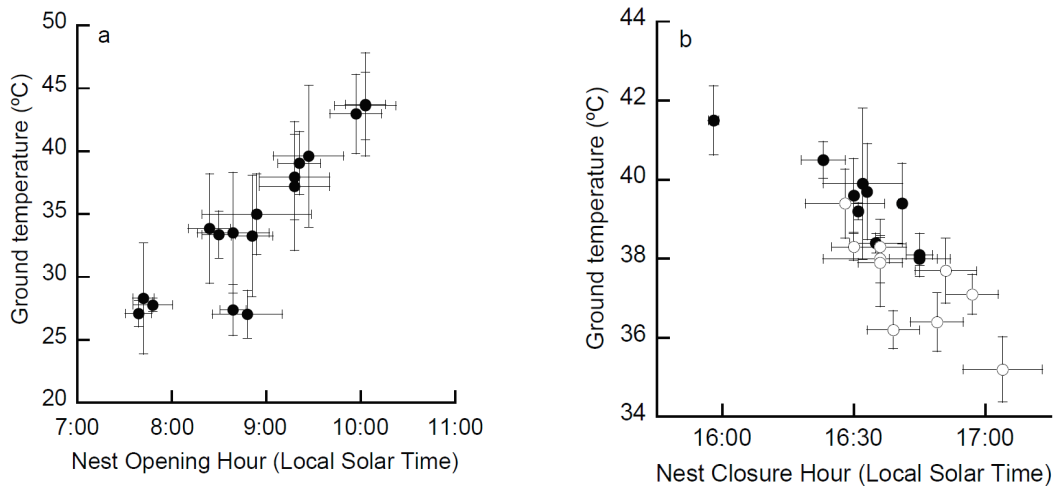


Figura 4.5 Relación entre la apertura (a) y el cierre de los nidos (b) con la hora y la temperatura del suelo. Cada círculo representa el valor medio (\pm SE) de nidos diferentes seguidos durante de 4 a 7 días consecutivos. Para el cierre de los nidos, los círculos vacíos y rellenos representan, respectivamente, condiciones manipuladas (con espejos) y de control.

Discusión

El presente estudio claramente demuestra que el comienzo y fin de la actividad de forrajeo en la hormiga termófila *C. tartessica* es provocado por señales solares más que directamente por la temperatura. Primero, el patrón de actividad se explica mejor por las variaciones en la elevación solar media que por diferencias en la temperatura del suelo, tanto a escala diaria como estacional. Segundo, en contra de lo que esperaríamos si la temperatura determinase la actividad, la hora de apertura y cierre de los nidos correlaciona con la temperatura del suelo. Tercero, incrementando experimentalmente la elevación solar y disminuyendo la temperatura en la entrada del nido, se retrasa la hora de cierre.

El papel de las señales luminosas y solares en la actividad de las hormigas ha sido poco investigado. Por lo que sabemos, sólo un reciente estudio experimental ha abordado esta cuestión. Como en el caso de *C. tartessica*, se demostró que la actividad de forrajeo en la hormiga toro australiana *Myrmecia pyriformis* es provocada por señales luminosas, aunque en sentido contrario (Narendra et al. 2010). En esta especie nocturna, las forrajeras esperan a una reducción significativa de la intensidad lumínica para salir de sus nidos. Por el contrario, la mayoría de estudios apuntan directamente a

la temperatura como el principal determinante de la actividad (Hölldobler y Wilson 1990; Cole et al. 2010).

Sin embargo, a una escala diaria y estacional, ambos factores, la actividad y la temperatura, están toscamente correlacionados. La temperatura es generalmente mayor en verano y durante la fase luminosa, que en invierno y durante la fase oscura. Por otra parte, la inercia térmica de la tierra retrasa el enfriamiento del suelo después de la reducción de la radiación solar. Esto nos permitió distinguir, mediante el uso de modelos lineales y aditivos, entre ambos efectos, demostrando que el tráfico de hormigas de *C. tartessica* se explica mejor mediante la elevación solar que mediante la temperatura. De aquí que el tráfico de hormigas, al final del verano y por la tarde, fuese bajo mientras que la temperatura del suelo se mantuvo alta.

El uso de materiales para cerrar el nido al final del periodo de actividad es un comportamiento peculiar de un pequeño grupo de hormigas, entre los que se encuentran las *Cataglyphis*, *Messor*, *Harpegnathos* y *Pogonomyrmex* (Hölldobler y Wilson 1990, y referencias en él). Su principal función es, probablemente, la protección de la colonia frente a depredadores y parásitos durante la noche. En *C. tartessica* el cierre de los nidos es llevado a cabo por una sola obrera entre 15 a 30 minutos después de finalizado el forrajeo. El depender de señales ambientales comunes es probablemente determinante para que tanto las forrajeras como la obrera que cierra el nido coincidan temporalmente, y el nido sea cerrado cuando todas o la mayoría de las forrajeras han regresado. Ocasionalmente algunas obreras regresan demasiado tarde al nido y no pueden entrar, debiendo pasar la noche en sus inmediaciones. La temperatura del suelo cuando las colonias de *C. tartessica* abren/cierran el nido está correlacionada con la hora de apertura/cierre. Tan elevada correlación no sería de esperar si las colonias esperasen hasta una temperatura específica para comenzar/finalizar la actividad. La temperatura a la hora de apertura/cierre varió más entre colonias que entre días consecutivos. Estas variaciones pueden ser debidas a diferencias microambientales (algunos nidos están más a la sombra que otros). Tanto el tamaño de la colonia (número de obreras) como componentes idiosincrásicos del comportamiento de las obreras podrían también explicar estas variaciones.

Mediante el uso de un sencillo experimento, pudimos modificar la luz que llegó a la entrada de los nidos y, consecuentemente, su hora de cierre. Esto claramente demostró que son las señales luminosas en lugar de la temperatura las que determinan el cierre de los nidos. Aunque el retraso en el cierre fue significativo, fue relativamente pequeño (8 min 51 seg). Esto sugiere que el cierre está probablemente influenciado por otras variables que se correlacionan con la elevación solar, como por ejemplo la intensidad de luz, y por factores endógenos que gobiernan el reloj interno de las obreras.

Todas las especies del género *Cataglyphis* son termófilas. Varias adaptaciones morfológicas (largas patas), de comportamiento (rápidos movimiento y el uso de refugios térmicos) y fisiológicas (síntesis de proteínas de shock térmico) les confiere una elevada tolerancia a la temperatura (Gehring y Wehner 1995; Cerdá y Retana 1997, 2000; Clémencet et al. 2009). En el caso de *C. tartessica*, el valor térmico crítico máximo (CTM) medido para sus obreras en laboratorio es de 50°C (Cerdá 2001), que es 5 o 10 grados mayor que en otras especies simpátricas. Esto proporciona a *C. tartessica* una clara ventaja contra sus competidoras que son forzadas a forrajear durante la estación fría o al amanecer y atardecer. Por ejemplo, *Tapinoma nigerrimum*, una de las especies más dominantes en el Mediterráneo occidental, apenas puede soportar temperaturas superiores a los 40°C. Está activa durante todo el día a comienzos de primavera mientras que en verano sólo lo está a primeras horas de la mañana (Cerdá et al. 1989; van Oudenhove 2011). Por el contrario, en el Parque Nacional de Doñana, *C. tartessica* es la única especie que forrajea al mediodía en junio-julio. Sin embargo, forrajear a las horas más cálidas del día implica importantes limitaciones. A diferencia de muchas otras especies de hormigas que depositan marcas químicas sobre el suelo para comunicar a sus compañeras la posición de una fuente valiosa de alimento, las *Cataglyphis* forrajean individualmente. Se ha sugerido que la sensibilidad de las feromonas a la temperatura constituye el principal obstáculo que tienen las *Cataglyphis* para poder reclutar (Ruano et al. 2000). En su lugar, las *Cataglyphis* han desarrollado un sistema de navegación basado en “path integration” y en la memorización de marcas del terreno para poder regresar al nido (Wehner y Lanfranconi 1981; Knaden y Wehner 2005; Ronacher 2008; Wehner 2008). Esto probablemente explique por qué las forrajeras de *C. tartessica* necesitan elevaciones solares superiores a 20°, ya que de esta forma les sería más fácil el reconocimiento de siluetas que les permitan volver al nido.

Aunque nuestros resultados enfatizan el papel del ángulo de elevación solar en la determinación de la actividad de *C. tartessica*, ello no excluye que las temperaturas extremas limitan su actividad de forrajeo. Por un lado, el efecto de la elevación solar en el tráfico de hormigas depende de la temperatura. A temperaturas relativamente suaves, la elevación solar desencadenó la actividad de las hormigas, pero cuando la temperatura excedió de 48°C la actividad decreció, independientemente de la elevación solar. Por otro lado, aunque el tráfico total se correlacionó con la longitud media de los días entre marzo y septiembre, *C. tartessica* está totalmente inactiva entre finales de octubre y principios de marzo, probablemente debido más a las bajas temperaturas que al sol, ya que los días son más cortos.

Finalmente, nuestros resultados podrían sugerir un futuro difícil para las hormigas del género *Cataglyphis* en un escenario de calentamiento global. Debido a él, las *Cataglyphis* se podrían ver forzadas a reducir su actividad de forrajeo durante las horas centrales del día. Deberán adaptarse a estas nuevas condiciones y compensar la reducción de actividad diurna comenzando a forrajear a horas más tempranas. Sin embargo, las *Cataglyphis*, que precisan de una elevación solar mínima para forrajear, podrían verse incapaces de adelantar y retrasar su inicio y fin del forrajeo. El calentamiento global puede, por lo tanto, limitar de forma considerable su comportamiento de forrajeo e infligir una desventaja competitiva neta respecto a otras especies. Harán falta más seguimientos de actividad colonial, prolongados en el tiempo, para dar más crédito a este escenario.

Capítulo 5

Reclutamiento y transporte cooperativo de presas grandes en *Cataglyphis tartessica*⁹

Introducción

En los insectos sociales, el reclutamiento se define como una forma de comunicación que sirve para llevar obreras a un punto del espacio donde su trabajo sea requerido (Wilson, 1971). Ello permite a los miembros de la colonia acceder a la información sobre la presencia, calidad y/o cantidad de una fuente de alimento difícilmente explotable por un solo individuo.

En las hormigas este fenómeno se divide en dos etapas: en la primera, la reclutadora usa feromonas y/o vibraciones corporales con la finalidad de reclutar obreras de dentro del nido; en una segunda etapa, las hormigas reclutadas siguen marcas químicas dejadas por la reclutadora desde el nido hasta la fuente de alimento (Passera y Aron, 2005).

El reclutamiento está considerado como un comportamiento “evolucionado”, ausente en subfamilias “primitivas”, cuyas obreras forrajean de forma solitaria (Hölldobler y Wilson, 1990). Por el contrario, el reclutamiento es la norma en subfamilias “evolucionadas”, como Myrmicinae, Dolichoderinae y Formicinae, aunque en esta última se dan algunas notables excepciones, como ocurre en los géneros *Gigantiops* (Beugnon et al. 2001) y *Cataglyphis* (Wehner et al., 1983; Lenoir et al., 1990; Baroni Urbani, 1993).

⁹ Fernando Amor, Patrocinio Ortega, Xim Cerdá y Raphaël Boulay. 2009. Cooperative prey-retrieving in the ant *Cataglyphis floricola*: an unusual short-distance recruitment. *Insectes Sociaux*, **57**: 91-94.

En *Cataglyphis*, la pérdida del comportamiento de reclutamiento se considera una adaptación secundaria, debida a la ineficacia de marcar con feromonas relativamente volátiles superficies muy calientes para comunicar la presencia de alimento (Ruano et al., 2000; van Oudenhove et al. 2011). Sin embargo, trabajando en el campo con *C. tartessica* advertimos que el regreso de una obrera al nido desencadenaba a veces la salida de varias obreras. Esta observación nos animó a explorar experimentalmente la hipótesis de que esta especie ha retenido cierta capacidad de reclutamiento.

Material y métodos

El lugar de estudio fue un pinar cercano a VMC, donde la densidad de nidos era de aproximadamente 0.6 por m² y con una distancia al nido más próximo de 1 m. Dado que la distancia de forrajeo de esta especie de 8-10 m, las áreas de forrajeo de los nidos están altamente solapadas en este pinar. Ofrecimos a las forrajeras de 42 colonias saltamontes de la zona, del género *Oedipoda*, previamente sacrificados y demasiado pesado para un transporte individual (peso: $0.2 \pm 0.002\text{g}$, media \pm ES), colocándolos a distancias de 20, 40 y a 100 o más centímetros de la boca del nido, durante la horas de mayor actividad (en junio, de 9:00 a 15:00 hora solar). Registramos la actividad de la colonia, medida como el número de obreras que salen del nido, durante un minuto y desde el momento en que la primera forrajera que encontró la presa del saltamontes regresó al nido. Como control, registramos la actividad del mismo nido durante un minuto tras la entrada de una obrera que no hubiese encontrado ninguna presa a esa distancia. El tiempo de separación entre el control y la prueba fue de 30 minutos.

Resultados

Las obreras que encontraron la presa no transportable trataron de arrastrarla y, después de algunos intentos fallidos, regresaron rápidamente a su nido. Su entrada provocó la salida inmediata de hasta 16 obreras en el siguiente minuto (Fig. 5.1a). Por el contrario, no más de 3 obreras salieron del nido tras el regreso de una forrajera que no

encontró ninguna presa (ANOVA de dos vías, Efecto presa: $F_{1,39} = 55.4$, $p > 0.0001$). Curiosamente la solicitud de forrajeo a las compañeras dependió de la distancia entre la presa y el nido (Fig. 5.1a; Efecto distancia: $F_{2,39} = 22.7$, $p > 0.0001$; Interacción distancia x Presa: $F_{2,39} = 15,1$, $p > 0.0001$), de tal forma que la hormiga que encontró la presa a más de 1 m de distancia no regresó al nido a reclutar.

Las obreras reclutadas salen del nido en todas las direcciones, aparentemente sin información sobre la posición de la presa. Se dedican a buscar por los alrededores, hasta que eventualmente la descubren. Algunas de estas obreras regresarán al nido a por más compañeras. A medida que aumenta el número de obreras sobre la presa más fácilmente les resulta a las nuevas reclutadas encontrarla. Finalmente hay muchas hormigas sobre la presa, cuya posesión defienden muy agresivamente frente a obreras de *C. tartessica* de otros nidos o de especies diferentes.

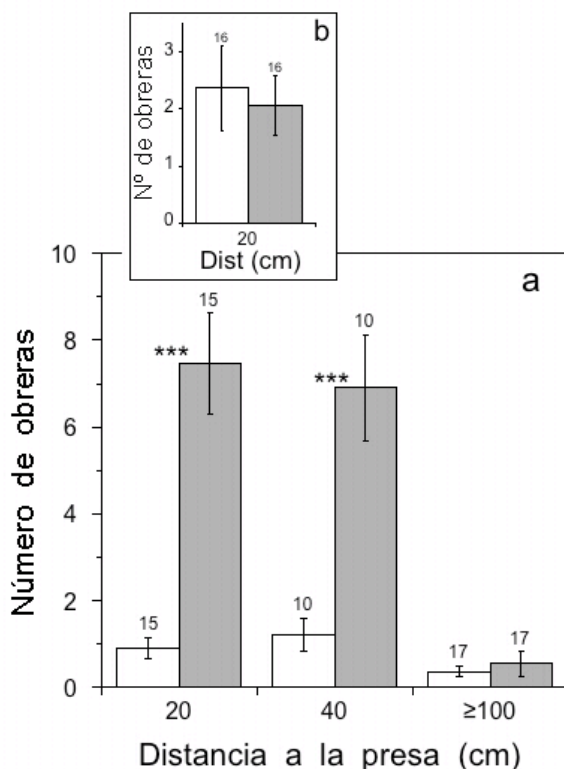


Figura 5.1 Número medio de hormigas que salen del nido durante un minuto tras el ingreso de un forrajera que, en su caso, ha encontrado una presa grande (columnas grises) o no (columnas blancas, control). a) *C. tartessica*; las presas fueron colocadas a 20, 40 y a más de 100 cm de los nidos. b) *C. rosenhaueri*; las presas fueron colocadas a 20 cm. Barras de Error: SE. Los valores sobre las barras de error indican el tamaño de la muestra. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los grupos control y experimental para cada distancia por separado, *** $p < 0.001$.

Con la finalidad de probar la especificidad de estos resultados, colocamos una presa similar a 20 cm de la entrada de nidos de *C. rosenhaueri*, una especie que vive

frecuentemente de forma simpátrica con *C. tartessica*. Ambas especies son termófilas y recolectan en solitario cadáveres de pequeños artrópodos durante las horas centrales del día hasta distancias del orden de los 10 m de sus nidos (F.A., datos no publicados; Cerdá y Retana, 2000). Las obreras de *C. rosenhaueri* son muy similares en tamaño a las de *C. tartessica* y tampoco fueron capaces de mover la presa en solitario. Sin embargo, una vez que la encontraron, en lugar de regresar al nido para reclutar, las obreras de *C. rosenhaueri* se dedicaron a despedazarla. Su regreso al nido fue seguido por la salida de 2.1 ± 0.7 hormigas, lo que no difirió significativamente de los controles, en los que el retorno de una forrajera que no encontró presa fue seguido por la salida de 2.4 ± 0.7 hormigas (Fig. 5.1b; test de Student, $t = 0.26$, $P = 0.8$, $n = 16$ nidos).

En un segundo experimento con *C. tartessica* utilizamos también presas muertas de saltamontes, pero fijándolas al suelo mediante alfileres y a una distancia fija de 20 cm. Esto lo hicimos en 11 nidos diferentes. Con ello, registramos la dinámica de la acumulación de hormigas sobre la presa cada minuto durante 10 min, contados desde el momento en que ésta fue encontrada por una obrera y regresó al nido. El tiempo del descubrimiento de la presa fue muy variable, con un rango entre los 0.15 y 6.12 minutos (tiempo medio de descubrimiento \pm SE: 4.3 ± 1.0 min, $n = 11$). En el tiempo transcurrido entre el descubrimiento de la presa por parte de una obrera y su ingreso al nido (Fig. 5.2; tiempo < 0), el número de hormigas sobre la presa aumentó muy ligeramente (pendiente de la acumulación de hormigas sobre la presa: 0.0079 hormigas/min). Sin embargo, este aumento fue muy rápido a partir del momento en que la obrera ingresa en el nido (pendiente: 1.473 hormigas min^{-1}).

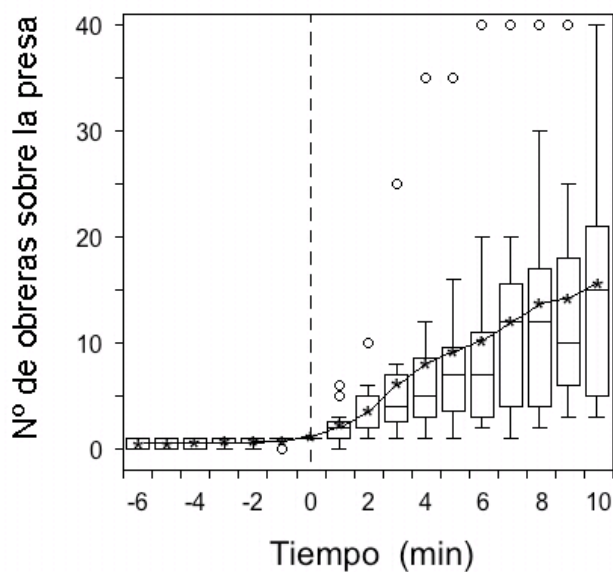


Figura 5.2 Número de obreras de *C. tartessica* en la presa fijada al suelo a 20 cm de la entrada del nido. Tiempo 0 es el momento en que la primera forrajera que ha descubierto la presa regresa a su nido. Cada columna incluye los cuartiles superior e inferior (50% de los datos) con la mediana señalada con una línea y la media con un asterisco. Los círculos son outliers.

Discusión

Nuestros resultados demuestran claramente que *C. tartessica* usa una forma rudimentaria de reclutamiento con la que alerta a las obreras de su nido sobre la existencia de una presa grande próxima. Esto supone una importante diferencia con otras especies del mismo género, que han perdido completamente la capacidad de reclutar, incluyendo *C. bicolor* (Wehner et al., 1983), *C. cursor* (Lenoir et al., 1990) y *C. rosenhaueri* (en este estudio). Las hormigas pueden aumentar en gran manera el rango de presas que capturan reclutando obreras (Traniello, 1987, 1989; Cerdá et al., 1998, 2009). No obstante, el forrajeo sobre presas pequeñas de localización impredecible junto al coste de producir feromonas resistentes a altas temperaturas pueden haber seleccionado la pérdida del uso de marcadores químicos en la mayoría de las especies del género *Cataglyphis*.

El reclutamiento en *C. tartessica* no parece contener información sobre la localización del alimento, y la solicitud de obreras probablemente se basa en un “motor display”, como ocurre en *Camponotus socius* (Hölldobler, 1971) y *Rossomyrmex minuchae* (Ruano y Tinaut, 1999). También recuerda la “social facilitation” descrita en algunas Ponerinas en las que las cazadoras solitarias estimulan a las otras obreras a salir

del nido para ayudar en el transporte de grandes presas (Traniello 1982; Lachaud 1985; Schatz et al. 1997; Cogni y Oliveira, 2004). En el caso de *C. tartessica*, solicitar obreras puede ser ventajoso para presas localizadas en las proximidades del nido, ya que, debido a ello, las probabilidades de descubrirla por parte de las hormigas reclutadas, sin información sobre su localización, es suficientemente alta. Sin embargo, en un entorno de alta densidad de nidos, movilizar obreras para buscar presas situadas lejos del nido (>100 cm) y sin indicar su posición, probablemente no sea operativo. Mientras que las obreras estuviesen buscando la presa, otras hormigas de nidos vecinos y más próximos a ella la encontrarían antes y la defenderían.

Desde un punto de vista mecanístico, estos resultados demuestran que las reclutadoras hacen uso de su conocimiento de la distancia de la presa al nido para decidir cuándo reclutar o no, ya sea mediante referencias visuales o químicas, o estimando la distancia de regreso al nido (Müller y Wehner 1988; Collett et al. 1999; Wehner 2003; Wohlgemuth et al. 2001; Wenseleers et al. 2002; Steck et al. 2009).

Una posible hipótesis para explicar esta diferencia de comportamiento entre *C. tartessica* y *C. rosenhaueri* sería que la primera pertenece a un grupo relativamente primitivo de *Cataglyphis*, con algunas características ancestrales (Tinaut 1993). Esta hipótesis está apoyada por evidencias filogenéticas que sugieren una separación muy antigua de *C. tartessica* del grupo de *Cataglyphis* (incluyendo a *C. rosenhaueri* y *C. bicolor*) en el que el reclutamiento está completamente ausente (Hasegawa et al. 2002). Sin embargo, se necesitan más datos sobre un mayor número de especies de *Cataglyphis* y un mejor registro de sus relaciones filogenéticas para determinar la evolución de la capacidad de reclutamiento en este género.

Tercera parte

Reproducción

En las colonias de hormigas, tanto el braquipterismo como el apterismo de las reinas están asociadas con la reproducción por fisión. Bien la reina madre de la colonia o las futuras nuevas reinas (princesas) tendrán que desplazarse andando, junto a un grupo de obreras, o ser transportadas, al nuevo nido. Como vimos en el capítulo 3, las colonias de *Cataglyphis tartessica* pueden estar lideradas por dos tipos de reinas diferentes, braquíptera o ergatoide, lo que, junto a los datos obtenidos sobre la variación demográfica de sus colonias, en la que se registra un fuerte descenso poblacional de los nidos asociado a la presencia de los sexuales, nos estimuló a estudiar la fisión colonial en esta especie, un fenómeno que, por su discreción, resulta difícil de observar en el campo. Además, y en primer lugar, aprovecharemos la circunstancia de la ocurrencia de los dos tipos de reinas para analizar el papel de la selección natural en la evolución de las reinas ergatoides, actuando tanto a nivel individual como colonial.

Capítulo 6

Evolución del polimorfismo obrera – reina¹⁰.

Introducción

La dispersión es un importante fenómeno biológico involucrado tanto en la permanencia de la especie como en su evolución (Clobert et al. 2001; Bullock et al. 2002). Los beneficios de la dispersión son variados, entre los que se encuentran la colonización de ambientes favorables, el evitar la endogamia y el no aumentar localmente la competencia por los recursos. Sin embargo, con la dispersión se incrementa el riesgo de depredación y, además, requiere una gran cantidad de energía que no puede ser invertida en otros aspectos de la vida. Debido a ello, en muchos organismos la dispersión está limitada a algunos individuos o a un breve periodo de tiempo, generalmente al comienzo de sus ciclos de vida (Roff 1990; Dingle y Holyoak 2001; Van Dyck y Baguette 2005; Hawkes 2009). Por otra parte, en las especies eusociales, la producción de unidades de dispersión se podría complicar al poder estar operando la selección natural tanto a nivel individual como colonial (Keller y Reeve 1999).

Las reinas de muchas especies de hormigas dispersan como individuos solitarios. En las especies que realizan a fundación colonial independiente (en adelante FCI), las princesas¹¹ tienen alas y se alejan volando de sus nidos antes de copular. Una vez que han copulado se deshacen de las alas y buscan un lugar adecuado donde iniciar una nueva colonia. Este tipo de fundación presenta ventajas como son la producción de numerosos, y relativamente poco costosos, propágulos y la distancia de dispersión, relativamente grande, a la que éstos llegan. El principal inconveniente es la extrema debilidad de las colonias incipientes frente a la competencia y depredación (Wiernasz y

¹⁰ Fernando Amor, Patrocinio Ortega, Michael J. Jowers, Xim Cerdá, Johan Billen, Alain Lenoir, Raphaël R. Boulay 2011. The evolution of worker–queen polymorphism in *Cataglyphis* ants: interplay between individual and colony-level selections. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**: 1473-1482.

¹¹ Denominamos princesas a las hembras reproductoras vírgenes, futuras reinas.

Cole 1995; Gordon y Kulig 1998; Adams y Tschinkel 2001; Wiernasz y Cole 2003; Boulay et al. 2007). De forma alternativa, la fundación colonial dependiente (FCD) o fisión colonial ha evolucionado de forma independiente en numerosas especies (Peeters y Ito 2001). En ella, un grupo de obreras salen de su nido natal para ayudar a las princesas ya fecundadas en la fundación de nuevos nidos. En teoría, esta estrategia aumenta en gran manera las probabilidades de éxito de los propágulos, pero limita inevitablemente el número de éstos. Sin embargo, hasta recientemente, la fisión colonial no ha sido estudiada en profundidad y sólo se dispone de datos sobre el tamaño y número de propágulos de un puñado de especies (Briese 1983; Lenoir et al. 1988; Bolton y Marsh 1989; Leal y Oliveira 1995; Fernández-Escudero et al. 2001).

Las comparaciones entre especies del mismo género que utilizan FCI o FCD muestran que el paso de una a otra forma de dispersión implica importantes modificaciones en la fisiología, morfología y comportamiento de las reinas (Bolton 1989; Keller y Passera 1989; Passera y Keller 1990; Lachaud et al. 1999; Howard 2006; Molet et al. 2007a,b 2008; Foitzik et al. 2010). En las especies con FCI las princesas acumulan importantes reservas de grasa y portan grandes alas (macrópteras) accionadas por músculos alares hipertróficos. Sus mesonotos, el segundo segmento torácico sobre el que se insertan las alas, están particularmente desarrollados. Por el contrario, en las especies con FCD, las princesas tienen un tórax relativamente indiferenciado y sus alas son cortas (braquípteras) o carecen totalmente de ellas (ergatoides). Ambas formas de princesas, muy similares morfológicamente a las obreras, tienen espermateca y ovarios bien desarrollados (Peeters 1991; Tinaut y Ruano 1992; Heinze 1998). Debido a que ni las braquípteras ni las ergatoides vuelan, no copulan en el aire, como si pueden hacer las macrópteras. En su lugar, atraen a los machos emitiendo feromonas sexuales durante el comportamiento denominado “llamada sexual” (Hölldobler y Haskins 1977).

Los procesos evolutivos que conducen a la reducción del tamaño de las reinas no están claros. Algunos autores sugieren implícitamente que la evolución de las ergatoides ocurrió mediante la actuación de la selección a nivel colonial. En una revisión reciente, Peeters y Molet (2009) declaran que “la evolución de las reinas ergatoides se corresponde con una estrategia de economía colonial, debido a que sus costes de producción se reducen a dos niveles: antes y después de que el adulto emerja”. Este razonamiento está basado en la asunción del hecho de que la energía ahorrada en la

producción de reinas pequeñas por las obreras podría ser invertida en el crecimiento colonial o en la producción de machos, lo que indirectamente incrementaría la eficiencia colonial. Desde este punto de vista, ambos tipos de reinas, braquíptera y ergatoide, procederían de una misma vía evolutiva, siendo la ergatoide el último eslabón en el proceso de miniaturización.

Por otra parte, la estrategia egoísta de las larvas ha sido considerada en raras ocasiones como un proceso que favorece la evolución de las reinas pequeñas. En teoría, una larva puede esperar tener más eficacia biológica directa desarrollándose como reina y teniendo su propia descendencia que haciéndolo en una obrera estéril (Bourke y Ratnieks 1999; Ratnieks 2001; Wenseleers et al. 2004). Sin embargo, es esperable que las obreras restrinjan la producción de reinas limitando, por ejemplo, el consumo de alimento por las larvas. Si el tamaño de la reina no fuese determinante en la fundación de la colonia, la selección natural, operando a nivel individual, debería favorecer una estrategia egoísta que llevara a la evolución de reinas con tamaño de obrera, en contra del interés de la colonia. Las primeras evidencias del conflicto entre obreras y larvas se obtuvieron en las hormigas parásitas. Las reinas parásitas son generalmente de tamaño menor que sus reinas huéspedes, reduciendo de esta forma el poder de las obreras huéspedes de limitar su producción (Nonacs y Tobin, 1992; Aron et al., 1999; Hora et al., 2005). Recientemente, una estrategia de larva egoísta ha sido propuesta en la abeja sin aguijón *Schwarziana quadripunctata* (Ratnieks 2001; Wenseleers et al. 2003, 2005; pero ver Jarau et al. 2010). En esta especie de abeja, que dispersa mediante fisión colonial, numerosas larvas se desarrollan en reinas enanas aunque, desde el punto de vista de las obreras, solamente serían necesarias unas pocas para asegurar la reproducción de la colonia. Se ha sugerido que estas reinas enanas son individuos egoístas que escapan al control de las obreras, recayendo el coste de su producción en la colonia madre (Ratnieks 2001; Wenseleers et al. 2003, 2005).

El objetivo de nuestro estudio fue dilucidar el papel de la selección, tanto a nivel individual como colonial, en la evolución de las reinas ergatoides en las hormigas. Para ello nos basamos en nuestros hallazgos sobre *Cataglyphis tartessica*, concretamente en el hecho de tratarse de una especie que dispersa exclusivamente mediante fisión colonial, el ser estrictamente monogínica y a que sus colonias pueden ser encabezadas tanto por una reina braquíptera como por una ergatoide. Primero, caracterizamos la

morfología de ambos tipos de reinas y comparamos el polimorfismo reina – obrera en *C. tartessica* con el de la especie más próxima emparentada con ella, *Cataglyphis emmae*, la cual dispersa mediante fundación colonial independiente (Délye 1968). Segundo, pusimos a prueba la hipótesis de que las reinas ergatoides se corresponden con una estrategia de economía colonial (Peeters y Molet 2009) mediante la siguiente argumentación: si las reinas ergatoides son consecuencia de una estrategia colonial, su producción debería ahorrar una sustancial cantidad de energía manteniendo un importante potencial reproductivo. A tal fin, comparamos, individualmente, tanto los pesos frescos de las braquípteras y ergatoides (coste de energía para la colonia) como el número de ovarios que tienen (beneficio potencial para la colonia).

Material y métodos

Recolección de hormigas y zona de estudio

Para el presente estudio utilizamos las 34 fisiones (colonias madres con sus respectivas colonias hijas) más las 79 colonias recolectadas al azar, todas de *C. tartessica*, utilizadas en el estudio de la fisión. Además añadimos 16 colonias de *Cataglyphis emmae* recolectadas, durante su periodo reproductivo, a 10 km de Amerzgane, cerca de Ouarzazate (Marruecos) en mayo de 2009.

C. emmae vive en estepas pre-saharianas de Marruecos y Argelia (Forel 1909). Datos morfológicos indican que se trata de la especie más cercana a *C. tartessica* (F. Amor no publicado; Tinaut comunicación personal). Esta conclusión se ha visto reforzada por el análisis filogenético de 12 especies de *Cataglyphis* ibéricas y marroquíes basado en ADN mitocondrial (Jowers datos no publicados).

Polimorfismo obrera – reina

Todos los nidos excavados durante el estudio de la fisión colonial fueron transferidos al laboratorio para determinar la presencia de reinas y princesas. Aunque las ergatoides y las obreras tienen un tamaño muy similar, pequeñas diferencias en el tórax y un

abdomen más voluminoso en las primeras permiten a un observador con experiencia identificarlas con seguridad. Fueron medidas 18 braquípteras, 32 ergatoides y 36 obreras de *C. tartessica*, por un lado, y 10 obreras y 8 reinas vírgenes de *C. emmae* por otro, usando para ello un estereomicroscopio Zeiss Discovery V8 conectado a una cámara AxioCam MRC5. Las medidas tomadas fueron: distancia interocular, longitud del tórax, anchura del pronoto, anchura y longitud del mesonoto, anchura del epinoto y la longitud del fémur y tibia del tercer par de patas. Los pesos frescos de entre 5 a 10 individuos por casta y especie fueron también medidos con precisión de 10^{-1} mg.

Tres individuos de cada casta de *C. tartessica* fueron utilizados en el estudio de la estructura torácica externa mediante microscopía electrónica de barrido, que se compararon con su desarrollo muscular torácico correspondiente, usando para ello el procedimiento descrito por Billen (2009). Johan Billen se encargó, además, tanto de la preparación de los cortes histológicos como de sus respectivas fotografías. Comprobamos también la presencia/ausencia de tégulas en el tórax de las ergatoides, braquípteras y obreras, lo que nos sirvió de criterio en el reconocimiento de las ergatoides. Evaluamos el potencial reproductivo de cada casta de *C. tartessica* contando el número de ovarios, determinando la presencia de cuerpos lúteos y desarrollo de los oocitos y, además, determinando la presencia de espermateca en 36 obreras, 9 reinas ergatoides y 8 reinas braquípteras.

Una vez excavados los nidos de fisión, los capullos de las hembras fueron separados de acuerdo con su talla (pequeños vs medios) y mantenidos por un grupo de 10 obreras (las larvas y capullos producidos después de la recolección de los nidos no fueron considerados). Las eclosiones fueron registradas diariamente durante un mes para determinar el número de ergatoides y braquípteras producidas en los nidos madre e hijo.

Para determinar las agresiones producidas contra las princesas, éstas fueron devueltas a sus colonias de origen (tanto a nidos madres como a hijos) en menos de 24 h tras su eclosión. La supervivencia fue seguida durante las siguientes dos semanas.

Análisis estadísticos

Toda la estadística utilizada en este capítulo fue llevada a cabo usando los programas informáticos R (R Development Core Team 2010). Para la supervivencia de las princesas, comparamos el número de ellas que aún vivían después de 15 días en las colonias madres e hijas en función de su morfología (ergatoide vs braquíptera) y el número de reinas a que dieron lugar. En todos los modelos lineales mixtos generalizados (lme), la identidad original del nido fue incluida como un efecto aleatorio. En caso necesario, las variables fueron log-transformadas con el fin de aproximarlas a la normalidad. El peso de las reinas y obreras fue comparado entre las especies mediante ANOVA y con el test post-hoc de TukeyHSD. Usamos un análisis lineal discriminante para examinar las diferencias morfológicas intra e interespecíficas entre obreras y reinas de *C. tartessica* y *C. emmae*. Además de las medidas descritas anteriormente, incluimos en este análisis la proporción del mesonoto con respecto a la longitud del tórax. La significación de las diferencias entre castas y especies fue evaluada para cada rasgo mediante MANOVA con Pillai trace. Todos los resultados y estimadores se dan como medias \pm S.E.

Resultados

Polimorfismo reina – obrera

La figura 6.1 muestra las tres castas de hembras de *C. tartessica*, incluyendo a las obreras (Fig. 6.1a), ergatoides (Fig. 6.1b) y braquípteras (Fig. 6.1c). De los 79 nidos excavados al azar entre 2008 y 2010, en 36 (45%) tuvieron por reina a una braquíptera sin alas, en 32 (40%) a una reina ergatoide y en 11 (14%) no se encontró ninguna reina. El número de obreras por colonia (187 ± 15) no difirió significativamente entre los tres tipos de nidos (ANOVA: $F_{2, 76} = 2.87, p = 0.0632$). En el campo, se observaron tres cópulas, en una de ellas con la participación de una braquíptera y en las dos restantes con ergatoides (Fig. 6.2). Asimismo, las disecciones de ergatoides y braquípteras confirmaron su estatus reproductivo. Contrariamente a las obreras, ambas, ergatoides y braquípteras, presentaron siempre espermateca y ovariolos activos, con oocitos en

formación y cuerpos lúteos (Fig. 6.1d-f). Como media, las obreras tuvieron 1.9 ± 0.2 ovariolos, sin oocitos en formación ni cuerpos lúteos. Las ergatoides tuvieron significativamente más ovariolos que las obreras (Fig. 6.1d; 11.8 ± 1.2 , ANOVA: $F_{2, 50} = 259.0$, $p < 0.001$, $t_{50} = 7.7$, $p < 0.0001$) pero significativamente menos que las braquípteras (19.9 ± 1.6 , $t_{50} = -12.2$, $p < 0.0001$). Las secciones longitudinales del tórax indicaron que tanto las obreras, ergatoides y braquípteras de *C. tartessica* carecen de musculatura torácica prominente (Fig. 6.1g-i), confirmando esto que las braquípteras son incapaces de volar. Después de la pérdida de las alas, cuatro conspicuas tégulas permanecen en el tórax de las braquípteras (Fig. 6.1j-l). Aunque estrictamente no aladas, las ergatoides también presentan dos pequeñas tégulas, y a veces, raramente, cuatro.



Figura 6.2 Cópula de *C. tartessica* con la participación de una princesa ergatoide.

De las colonias de *C. emmae* obtuvimos 16 reinas braquípteras, a razón de una por colonia, más un total de 46 princesas braquípteras (Fig. 6.3).



Figura 6.3 Princesa macróptera de *C. emmae*. Se aprecian tanto sus grandes alas como el fuerte desarrollo del tórax.

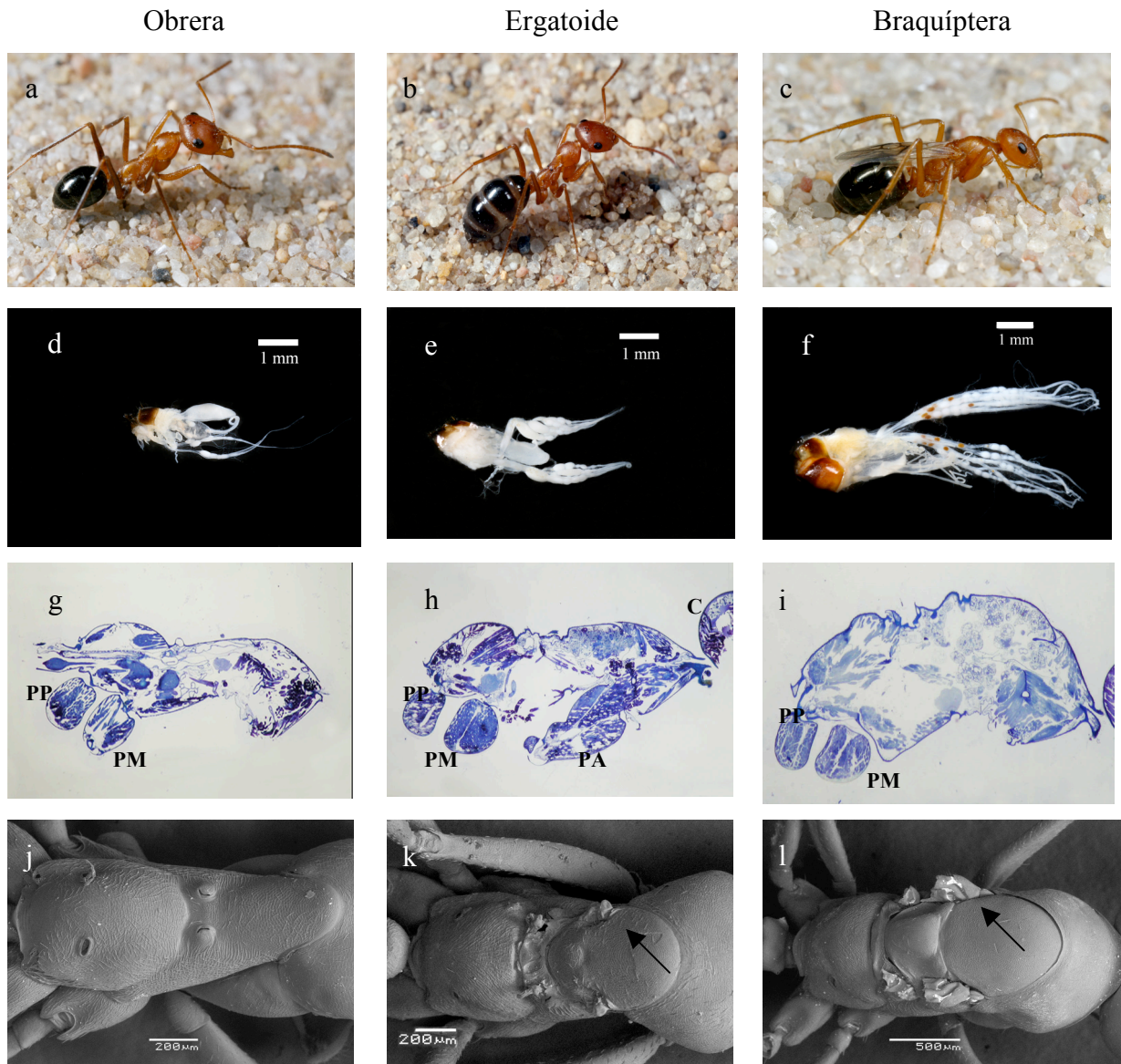


Figura 6.1 Diferenciación morfológica entre obreras, ergatoides y braquípteras. a-c: vista completa de cada morfo. Nótese el tórax grande y las alas de la braquíptera. El abdomen hinchado de la ergatoide no permite con seguridad su identificación en la colonia ya que las obreras pueden presentar abdomen fisiogastro. d-f: aparato reproductor. Los cuerpos lúteos y los ovariolos grandes de la braquíptera denotan su reciente puesta de huevos. g-i: morfología interna del tórax (PP: pata posterior; PM: pata media; PA: pata anterior; C: cabeza). j-l: vista externa del tórax en MEB. Las flechas indican la posición de las tégulas. Aunque la ergatoide presenta aquí cuatro tégulas, lo más frecuente es que presenten sólo dos.

Las medidas de la cabezas, tórax y patas de las obreras y reinas de *C. emmae*, incluidas las princesas, indicaron que el polimorfismo obrera-reina es mucho mayor en *C. emmae* que en *C. tartessica* (Tabla 2.1.1). La primera función discriminante, que explica el 90.8% del total de la varianza, estuvo correlacionada con la longitud y anchura del mesonoto. El análisis separó las reinas macrópteras de *C. emmae* de las

obreras de ambas especies y de las ergatoides de *C. tartessica* (Fig. 2.1.4). Las braquípteras de *C. tartessica* ocuparon una posición intermedia. El análisis MANOVA confirmó estos resultados (Tabla 1; Pillai trace = 4.10, $F_{36, 396} = 15.4$, $p < 0.001$) y mostró que el tórax de la braquíptera de *C. tartessica*, y en particular su mesonoto, fue significativamente menor que el de las reinas de *C. emmae*. Los tórax de las ergatoides son más parecidos a los de las obreras que a los de las braquípteras. En particular, en *C. tartessica* tanto las braquípteras como las ergatoides tienen patas más cortas que las obreras.

Carácter	LD1	LD2	<i>C. tartessica</i>			<i>C. emmae</i>		$F_{4, 104}$	p
			Obreras	Ergatoides	Braquípteras	Obreras	Macrópteras		
Distancia inter-ocular	4.77	5.20	0.90±0.04 (a)	0.97±0.06 (a)	1.06±0.01 (b)	0.93±0.02 (a)	1.46±0.09 (c)	56.2	< 0.001
Anchura del pronoto	1.09	-2.31	0.87±0.06 (a)	0.89±0.03 (a)	1.09±0.06 (b)	0.87 ±0.02 (a)	1.49±0.07 (c)	92.9	< 0.001
Anchura del mesonoto	19.93	-7.86	0.39±0.01 (a)	0.52±0.01 (b)	0.86±0.02 (c)	0.43±0.01 (a)	1.54±0.04 (d)	373.6	< 0.001
Anchura del epinoto	-1.75	2.19	0.55±0.03 (a)	0.59±0.03 (a)	0.78±0.02 (b)	0.58±0.01 (a)	1.19±0.04 (c)	108.9	< 0.001
Longitud del tórax	-5.19	-18.64	1.84±0.03 (a)	1.87±0.03 (a)	2.28±0.03 (b)	1.76±0.06 (a)	2.93±0.11 (c)	83.9	< 0.001
Longitud del mesonoto	16.24	43.34	0.57±0.02 (a)	0.75±0.03 (a)	1.29±0.06 (b)	0.60±0.03 (a)	2.09±0.03 (c)	190.8	< 0.001
Mesonoto/tórax	-0.27	-0.94	0.33±0.07 (a)	0.40±0.02 (b)	0.56±0.03 (c)	0.32±0.07 (a)	0.70±0.02 (d)	106.3	< 0.001
Longitud del fémur	-3.04	5.79	1.88±0.02 (c)	1.71±0.03 (a)	1.68±0.02 (ab)	1.62±0.04 (b)	1.95±0.09 (c)	15.1	< 0.001
Longitud de la tibia	1.94	-1.04	1.84±0.04 (c)	1.71±0.02 (b)	1.70±0.02 (b)	1.59±0.08 (a)	1.93±0.10 (d)	8.1	< 0.001

Tabla 6.1 Medidas morfológicas comparativas entre *C. tartessica* y *C. emmae*

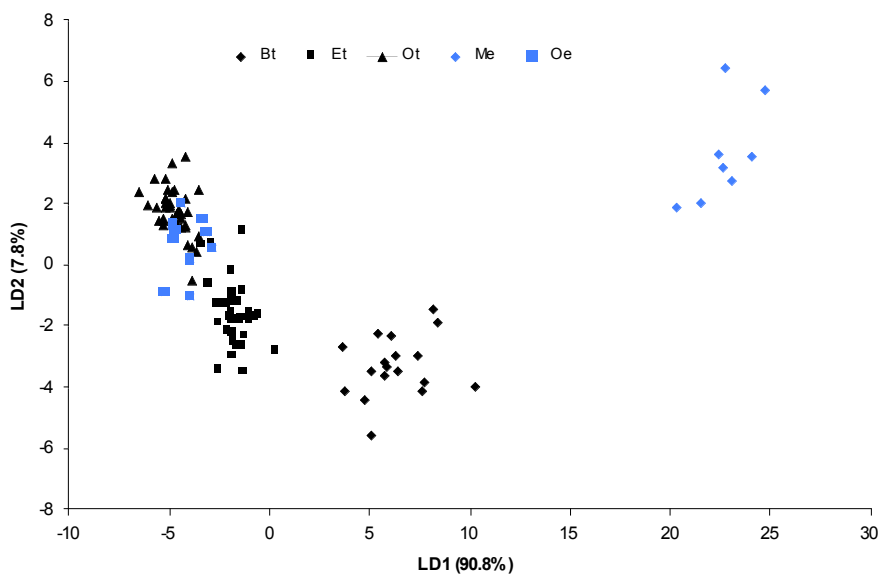


Figura 6.4 Resultados del análisis discriminante basado en 9 características morfológicas (ver Tabla 2.1.1). Bt, Et y Ot: braquíptera, ergatoide y obrera de *C. tartessica*, respectivamente. Me y Oe: macróptera y obrera de *C. emmae*, respectivamente. En negro, *C. tartessica*, y en azul, *C. emmae*.

El peso fresco de las obreras y de las princesas también difieren significativamente entre ambas especies (ANOVA: $F_{4,27} = 117.7, p < 0.001$). Aunque el peso de las obreras fue prácticamente el mismo en ambas especies (4.2 ± 1.1 mg vs 4.6 ± 0.4 mg para *C. emmae* y *C. tartessica* respectivamente; TukeyHSD, $p = 0.995$), el de las princesas de *C. emmae* fue 3.5 veces y 6 veces mayor que el de las princesas braquíferas y ergatóides de *C. tartessica*, respectivamente (TukeyHSD, $p < 0.001$). En *C. tartessica*, la diferencia de peso entre las princesas ergatóides y braquíferas fue significativa (TukeyHSD, $p < 0.037$); sin embargo, no lo fue entre ergatóides y obreras (TukeyHSD, $p < 0.825$).

Segregación de castas y lucha entre princesas en los nidos madre e hijo de C. tartessica

El seguimiento de la eclosión de los capullos distribuidos durante la fisión dio como resultado una sobreproducción de ergatóides comparada con la de braquíferas. De media, cada fisión colonial produjo 2.4 ± 0.5 princesas ergatóides y 0.74 ± 0.2 princesas braquíferas (lme: $F_{1,103} = 19.5, p < 0.0001$). Sin embargo, el número de eclosiones de braquíferas y ergatóides difirieron significativamente entre los nidos madres e hijo (Fig. 6.5; lme: $F_{1,103} = 14.8, p = 0.0002$). Por lo tanto, el 94% de las braquíferas eclosionaron en los nidos hijos, frente a solamente un 6% que lo hizo en los nidos madres (1.4 ± 0.4 vs 0.1 ± 0.1 , respectivamente; $t_{103} = 3.4, p = 0.0009$). Lo contrario fue cierto para las ergatóides: el 69% de ellas eclosionaron en los nidos madre frente al 31% que lo hizo en los nidos hijos (3.5 ± 1.0 vs 1.6 ± 0.4 , respectivamente; $t_{103} = 2.0, p = 0.0474$). Sin embargo, la proporción de ergatóides (que emergieron de capullos pequeños) fue mayor en los nidos hijos que en los madres (19% vs 5%; lme $F_{1,35} = 5.6, p < 0.0237$). Esto sugiere que las obreras claramente identificaron los capullos de las braquíferas que fueron transportados prácticamente en su totalidad a los nidos hijos, y aunque fueron capaces de distinguir entre los capullos que contenían obreras y ergatóides, la mayoría de estas últimas permanecieron y eclosionaron en los nidos madres, los cuales contenían también a la reina madre.

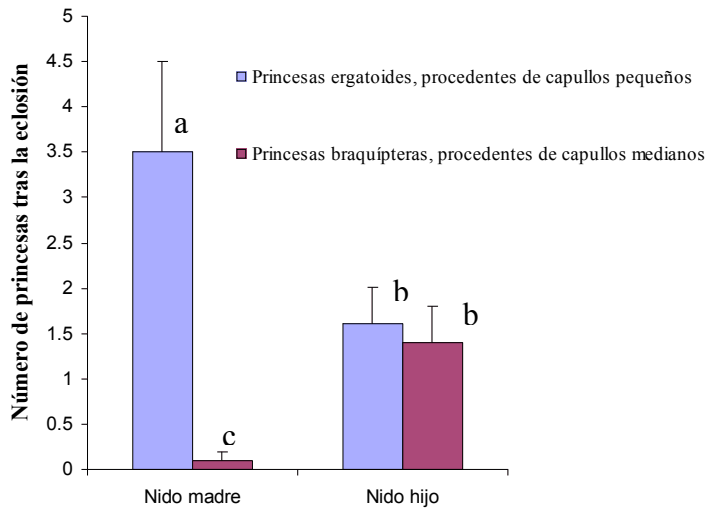


Figura 6.5 Número y tipo de princesas producidas en los nidos madre e hijo. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

Las agresiones ocurridas contra las princesas durante los 15 días desde la fecha de su eclosión difirieron entre los nidos madres e hijos. Los resultados del primer glm, que incluyó a todos los factores, y un primer orden de interacciones, indicó que el número de princesas que sobrevivieron, independientemente de su casta, fue significativamente menor en los nidos madres que en los hijos (Fig 6.6; lme: $F_{1,18} = 4.5$, $p = 0.01$), y fue independiente del número de princesas producidas (lme: $F_{1,16} = 0.1$, $p = 0.76$), y de si éstas eran ergatoides o braquípteras (lme: $F_{1,16} = 0.12$, $p = 0.74$). En los nidos hijos, 0.6 ± 0.2 y 0.7 ± 0.4 ergatoides y braquípteras, respectivamente, sobrevivieron, mientras que en los nidos madres sólo lo hicieron 0.1 ± 0.1 ergatoides y braquípteras. Como consecuencia, debido a que se produjeron más ergatoides, su tasa de supervivencia individual fue significativamente menor a la de las braquípteras (0.05 ± 0.03 vs 0.34 ± 0.10 ; lme: $F_{1,6} = 7.1$, $p = 0.04$).

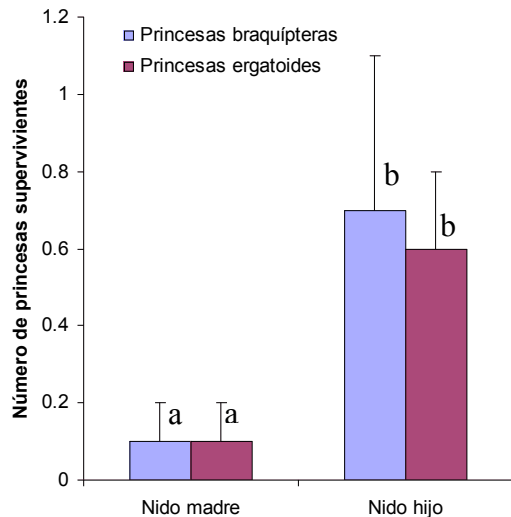


Figura 6.6 Supervivencia de las princesas. Las princesas que eclosionaron de capullos recolectados en el campo fueron criadas en grupos huérfanos de laboratorio. Diferentes letras denotan diferencias significativas.

Un segundo modelo lineal, en el que se quitaron todos los efectos no significativos, concluyó que el número medio de princesas que sobrevivieron en los nidos madres (0.17 ± 0.15) no fue significativamente diferente de cero ($t = 1.08$, $p = 0.3$), mientras que el número de princesas que sobrevivieron en los nidos hijos (1.25 ± 0.18) no fue significativamente diferente a uno ($t = 1.32$, $p = 0.2$). Aunque no se observaron agresiones entre princesas ni entre la reina madre y éstas, sí se observaron a obreras mordiendo a las princesas una vez introducidas en sus respectivos nidos, sugiriendo que son las obreras las responsables de su eliminación.

Por lo tanto, como resumen de la lucha entre princesas, mientras que todas las que eclosionaron en el nido madre fueron eliminadas por las obreras (en su mayoría ergatoideas) una sola princesa, sea esta ergatoide o braquíptera, sobrevivió en el nido hijo.

Discusión

En este estudio hemos mostrado que las colonias de *C. tartessica* están lideradas por una sola reina, braquíptera o ergatoide. Ambas son relativamente pequeñas comparadas con las macrópteras de *C. emmae*. Sin embargo, mientras que las braquípteras conservan algunos rasgos propios de su casta (por ejemplo las alas), las ergatoideas son

muy similares a las obreras. De los datos obtenidos del proceso de fisión, hemos determinado que numerosas ergatoides son eliminadas por las obreras antes de llegar a tener la oportunidad de transformarse en reinas. Tomados en su conjunto, nuestros datos sugieren que es improbable que la miniaturización de la reina en hormigas que dispersan por fisión colonial, y especialmente la evolución de las reinas ergatoides, sea la consecuencia sólo de una estrategia a nivel colonial.

La diferencia de tamaño entre la reina de *C. emmae* y *C. tartessica* está asociado con un cambio desde la FCI a la FCD. Un patrón similar se ha obtenido en otros estudios comparativos entre especies del mismo género, principalmente en la subfamilia Ponerinae (por ejemplo en *Mystrium*, (Molet et al. 2007a), *Odontomachus* (Molet et al. 2007b), *Rhytidoponera* (Molet et al. 2008) y Myrmicinae (por ejemplo en *Monomorium* (Bolton 1986), *Leptothorax* (Heinze 1989)). En unas pocas especies, macrópteras y pequeñas reinas (tanto braquípteras como ergatoides) coexisten y están asociadas con la FCI y la FCD, respectivamente (por ejemplo *Ectatomma ruidum* (Lachaud et al. 1999), *Hypoponera opacior* (Foitzik et al. 2010)). Con FCD, varias adaptaciones como el gran desarrollo de la musculatura torácica, largas alas e importantes reservas de grasa se vuelven inútiles y se pierden progresivamente. En el caso específico de *C. tartessica*, los capullos que contienen a las princesas son transportados durante la fisión colonial cada uno por una obrera agarrándolo con sus mandíbulas. La producción de grandes princesas, con un tamaño como las de *C. emmae*, podrían incrementar el tiempo de transporte y, consecuentemente, el riesgo de morir por depredación o por golpe de calor, particularmente en zonas áridas donde la temperatura del suelo sobrepasa frecuentemente los 50°C.

La ocurrencia de ambos tipos de reinas, braquípteras y ergatoides, en la misma especie es rara en hormigas. Que conozcamos sólo ha sido reportada en una especie, *Ephebomyrmex imberbiculus* (Heinze et al. 1992). Si la producción de ergatoides fuese el resultado de una estrategia a nivel colonial, cabría esperar que las obreras adultas consiguiesen mayor eficacia biológica produciendo ergatoides en lugar de braquípteras (Peeters y Molet 2009). Sin embargo, varias evidencias indican que, en *C. tartessica*, la eficacia biológica obtenida por las obreras en la producción de ergatoides es limitada. Las ergatoides son, de media, 2.8 mg menos pesadas que las braquípteras, lo cual es menos del peso de una obrera. Así, el ahorro por obrera obtenido al producir ergatoides

en lugar de braquípteras es bastante pequeño. Por otro lado, las ergatoides tienen la mitad de ovarios que las braquípteras, por lo que su vida fértil debe ser menor, lo que reduce la eficacia biológica indirecta potencial obtenida por las obreras al producir ergatoides en lugar de braquípteras.

Aún más importante es que aunque las ergatoides son producidas en exceso comparadas con las braquípteras, su tasa de supervivencia individual es inferior. Una gran proporción de ergatoides (69%) eclosiona en los nidos madres y son inmediatamente eliminadas por las obreras. Por el contrario, el 94% de las braquípteras eclosionan en el nido hijo y pueden competir para ser la nueva reina. Debido al corto espacio de tiempo transcurrido entre el fin de la fisión y la extracción del nido (3–4 días), todos los capullos de ergatoides y braquípteras comenzaron su desarrollo, muy probablemente, en el nido madre, en presencia de la reina. Una parte de estos capullos fueron transportados a los nidos hijos, mientras otra permaneció en los nidos madres. La presencia de la reina madre en el nido probablemente estimuló la eliminación por las obreras de todas las princesas que eclosionaron. Un fenómeno similar ha sido observado en *Aphaenogaster senilis*, lo que le permite mantener la monoginia (Boulay et al. 2008; Chéron et al. 2009; Cronin y Monnin 2009). Por lo tanto, una importante proporción de ergatoides de *C. tartessica* fueron eliminadas sin que tuvieran ninguna posibilidad de llegar a ser reinas, lo que representa la pérdida de una gran cantidad de energía invertida por la colonia en su desarrollo. Por el contrario, los capullos de las braquípteras fueron perfectamente segregados por las obreras participantes en la fisión, probablemente en base a señales químicas o estructurales. Al ser transportadas al nido hijo, todas ellas tienen la oportunidad de competir para ser la nueva reina. El modo en que la nueva reina es elegida de entre las princesas que emergen en el nido hijo se desconoce, pero parece que no depende de la morfología de ésta. Todas excepto una, ya sea braquíptera o ergatoide, fueron eliminadas por las obreras sin que se observasen agresiones directas entre ellas. Quizás la primera princesa en eclosionar, independientemente de su morfología, tenga ventaja en este proceso competitivo, como ocurre en *A. senilis* (Chéron et al. 2009; Cronin y Monnin 2009).

Nosotros proponemos un escenario en el que la evolución de las ergatoides resulta de la interacción entre la selección actuando a nivel individual y colonial. La fundación colonial por fisión es más segura que la FCI, pero el número de sus

propágulos está drásticamente limitado. En *C. tartessica*, cada propágulo contiene alrededor del 30% de las obreras (unos 343 mg / propágulo) y un 21% de los capullos de la colonia madre. Por comparación, en *C. emmae* cada princesa tiene un peso de unos 22 mg de media. En una especie estrictamente monogínica como *C. tartessica*, las obreras adultas no obtienen ningún beneficio produciendo numerosas princesas. Así, la selección a nivel colonial debería favorecer a las obreras que invirtieran la mayoría de los recursos en otras obreras (o machos) y limitasen la producción de princesas (Pamilo 1991). Sin embargo, desde el punto de vista de las larvas la situación puede ser diferente. Desarrollándose como reina tendrían su propia descendencia, mientras que si lo hacen como obreras solamente obtienen eficacia biológica indirecta criando a sus hermanas (Bourke y Ratnieks 1999; Ratnieks 2001; Wenseleers et al. 2003). Esta diferencia de expectativas en cuanto a eficacia biológica obtenida puede ser suficiente para que las larvas egoístas se vean favorecidas por selección natural. El mecanismo conducente al desarrollo de las distintas castas es desconocido en *C. tartessica*. Como en la mayoría de las hormigas, el desarrollo de una larva a princesa probablemente depende de un conjunto de factores genéticos y ambientales (Schwander et al. 2010). Sin embargo, el hecho de que las ergatoides sean ligeramente mayores y no más pesadas que las obreras reduce la capacidad de las obreras adultas de aplicar un control a las larvas a través de una alimentación diferencial.

Excepto por su comportamiento y por las dos pequeñas tégulas, las ergatoides son difíciles de distinguir de entre las obreras, lo que explica que no fueran descubiertas en estudios previos (Tinaut 1993). Resulta interesante que las patas de ergatoides y braquípteras sean bastante similares y más cortas que la de las obreras. Las *Cataglyphis* son hormigas termófilas y la longitud de sus patas les confieren ventaja ecológica reduciendo la exposición del cuerpo a las altas temperaturas del suelo (Cerdá y Retana 2000; Clémencet et al. 2010). Las reinas están siempre asistidas por obreras y casi nunca salen de sus nidos, lo que explicaría el que no precisaran de tal adaptación.

El paso de FCI a FCD es un cambio importante que reduce tanto la ventaja selectiva de las reinas grandes como el control por parte las obreras en la determinación de las castas a través del alimento. Por lo tanto, como ocurre en el caso de las abejas sin aguijón *Schwarziana quadripunctata* (Ratnieks 2001; Wenseleers et al. 2005), la FCD puede ser el escenario en el que la estrategia de las larvas egoístas se exprese. Estudios

adicionales deberían estimar y comparar la eficacia biológica directa e indirecta de retorno producidas por las ergatoides y braquípteras en otras especies conocidas como *E. imberbiculus* (Heinze et al. 1992). Más aún, nuestro conocimiento de la evolución del polimorfismo obrera-reina requerirá avances en la biología del desarrollo de la formación de castas. Finalmente, una cuestión interesante es si la proporción entre ergatoides y braquípteras, en *C. tartessica*, ha alcanzado un equilibrio o si las primeras podrían llegar a sustituir totalmente a las segundas, como posiblemente ha ocurrido en muchas otras especies

Capítulo 7

La fisión colonial

Introducción

El número de obreras que componen una colonia de hormigas depende de muchos factores, entre ellos la disponibilidad del alimento y la densidad de hormigueros de la misma o distinta especie que compiten por éste. Por tanto, el tamaño colonial, va a tener consecuencias cruciales, ya que de él van a depender tanto la supervivencia de las colonias como su capacidad de expansión por el entorno y la colonización de nuevos hábitat. De ahí la importancia que adquiere el reparto de recursos, entendido como número de obreras, entre los nidos madre e hijo, durante la fisión.

Aunque son numerosas las especies de hormigas que fundan las nuevas colonias mediante fisión colonial, en su mayoría especies poligínicas, hasta el momento son pocos los trabajos que ofrezcan datos relevantes sobre ellas. Brieese (1983) hace una descripción de fisión colonial en *Chelaner sp*, aportando datos sobre los transportes observados y las distancias de fisión. Lenoir et al. (1988) encuentran por primera vez fisión en una especie de hormiga monogínica, *Cataglyphis cursor*, que además es poliándrica (Percy et al. 2004) y con capacidad de producir nuevas reinas mediante partenogénesis telítoca (Percy et al. 2004). Lenoir et al. (1988) hacen una somera descripción de la fisión y aportan interesantes datos de comportamiento sobre el acoplamiento de las hembras con los machos. Fernández-Escudero et al. (2001) describen la fisión en la hormiga poligínica *Proformica longiseta*, aportando datos sobre el reparto de obreras entre los nidos madre e hijo. Y muy recientemente, durante la redacción de esta tesis, se ha publicado un trabajo muy completo sobre la fisión en *C. cursor* en el que, además de su descripción en condiciones naturales, se hace un análisis sobre el reparto de recursos así como de las posibles condiciones que la desencadenan (Cheron et al. 2011). En nuestro estudio, además de la descripción de la fisión en *C.*

tartessica, una especie monogínica y monoándrica es decir, con un elevado grado de parentesco entre las obreras componentes de la colonia, analizaremos el reparto de recursos entre los nidos madres e hijo¹², la diferente inversión en sexuos por parte de las colonias en fisión con respecto a las que no lo están y las posibles causas que la desencadenan. Además de aportar datos sobre el acoplamiento macho – hembra, discutiremos las diferencias observadas entre las fisiones según qué tipo de reina la lideró: braquíptera o ergatoide.

Material y métodos

Recolección de hormigas y muestreo

Estudiamos el proceso de fisión colonial en *C. tartessica* durante los años 2008, 2009 y 2010. Para ello hicimos un mapa de nidos en tres transectos de 100 x 5 m en la Reserva Biológica de Doñana, en los meses de mayo. A los nidos mapeados les hicimos un seguimiento consistente en visitarlos una vez a la semana durante dos meses. La observación de transporte social entre dos nidos denotaba la ocurrencia de la fisión colonial. Una vez detectada, se midieron las distancias entre los nidos madre e hijo. También se midió la frecuencia, velocidad de los transportes sociales y número de obreras implicadas en la fisión mediante la filmación de 8 nidos en fisión durante un total de 11 horas 50 minutos. Para estimar el número de obreras implicadas en la fisión calculamos el tiempo medio que una obrera precisa en llevar un transporte al nido hijo y regresar de nuevo al nido madre. El número máximo de obreras registrado en estos intervalos de tiempo nos dio una estimación del número de obreras implicadas en la fisión.

Una vez que los transportes sociales cesaban (al cabo de 3 o 4 días), ambos nidos, madre e hijo, eran excavados y llevados al laboratorio para contar sus componentes y determinar el número de adultos y progenie que fueron segregados.

¹² A efectos de claridad, utilizaremos los términos colonia y nido para referirnos a las colonias antes y después de la fisión, respectivamente (por ejemplo: una colonia al fisionarse da lugar a dos nidos: un nido madre y otro hijo, producido por el primero).

El volumen de los capullos los estimamos considerando sus figuras próximas a las de un cilindro.

Adicionalmente extrajimos, entre los años 2008 y 2010, 79 colonias de *C. tartessica* elegidas al azar de marzo a octubre, en dos localidades de la RBD (37°01'28.24 N", 6°26'34.40 W"; 36°59'40.34 N", 6°26'47.69 W"), distantes entre sí 3.3 km; ambas en zona de monte blanco, con *Halimium halimifolium* como especie predominante.

Análisis estadísticos

Toda la estadística utilizada en este capítulo fue llevada a cabo usando los programas informáticos R (R Development Core Team 2010) y Statistica 6.0. La segregación de adultos y progenie durante la fisión fue analizada mediante modelos lineales mixtos generalizados (lme). El número de obreras, capullos y princesas fue comparado entre los nidos madre e hijo (efecto fijo). Otros efectos fijos fueron el tamaño de los capullos de las hembras (medianos vs pequeños) y la morfología de las reinas (ergatoides vs braquípteras). También comparamos la proporción de ergatoides que emergen de los capullos pequeños en los nidos madres e hijos. Comparamos la producción de capullos haploides y diploides según el tipo de reina de la colonia mediante modelos lineales generales (glm), con el nido como factor aleatorio. En caso necesario, las variables fueron log-transformadas a fin de aproximarlas a la normalidad. Todos los resultados y estimaciones se dan como medias \pm S.E.

Resultados

El proceso de fisión

Entre los años 2008 y 2010 observamos 34 fisiones. La fisión tuvo lugar, mayoritariamente, entre la segunda quincena de junio y principios de julio. De los 73 nidos de promedio marcados en los transectos realizados, registramos un promedio de

14 fisiones (19%). Con la excepción de dos colonias, todas las fisiones produjeron un único nido hijo. Los nidos hijos se instalaron a una distancia de 7.7 ± 0.15 m (rango de 1.9 a 28.4 m) de sus respectivos nidos madres. Las grabaciones de vídeo mostraron que, durante la fisión, las obreras realizan 0.35 ± 0.07 transportes sociales por minuto. Los transportes se realizaron muy rápidos entre los nidos madre e hijo (5.0 ± 0.4 m/min) y el número calculado de obreras implicadas en la fisión fue muy bajo (3.1 ± 0.39 obreras).

El tamaño de las colonias que fisieron (suma de las obreras del nido madre más las del nido hijo) fue significativamente mayor que el encontrado para las colonias sacadas al azar entre los meses de mayo y junio (Fig. 2.1.1: número de obreras: 300.97 ± 34 , $n = 34$ vs 140.95 ± 63 , $n = 63$, respectivamente; $t = 6.09$, $p < 0.0001$), sugiriendo que, o bien el tamaño del nido podría ser, al menos, uno de los desencadenantes de la fisión o que la fisión sólo va a poderse llevar a cabo a partir de un umbral, grande, de tamaño de nido.

Las excavaciones de las colonias indicaron que los nidos madres contenían significativamente más obreras que los nidos hijos (Fig. 7.1: número de obreras: 196 ± 20 vs 99 ± 7 obreras, respectivamente; lme: $t_{35} = 4.99$, $p < 0.0001$). Diez nidos madres (29%) estuvieron lideradas por una reina braquíptera (dos de ellas aún con las alas), 16 (47%) lo fueron por una ergatoide y 8 (24%) aparentemente no tuvieron reina. Por otra parte, un nido hijo (3%) tuvo una reina braquíptera sin alas, cinco (14%) tuvieron una ergatoide y 30 (83%) carecían de reina (Test Chi cuadrado de Pearson: $\chi^2_2 = 25.8$, $p < 0.0001$). En todos los casos en los que no se encontró reina en el nido madre tampoco se encontró reina en el nido hijo. Esto sugiere que la reina madre se quedó generalmente en el nido original con aproximadamente el 70% de las obreras, mientras que las princesas que eclosionaron tras la fisión procedieron de capullos transportados al nido hijo junto a un 30% de obreras.

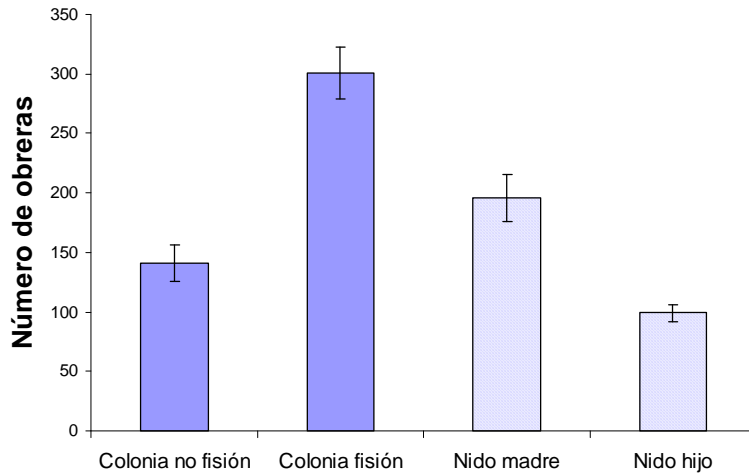


Figura 7.1 Comparación entre el tamaño de las colonias en fisión con aquellas que no lo están y reparto de obreras entre los nidos madre e hijo tras la fisión colonial.

De los tres tipos de capullos producidos por *C. tartessica*, con diferencias muy significativas entre ellos en cuanto a volumen, (Fig. 2.2.2; test de Kruskal-Wallis: $H = 89.5$, d.f. = 2, $p < 0.0001$), sólo los pequeños y medianos participaron en la fisión, produciendo obreras y ergatoides los pequeños, y braquípteras los medianos. Los capullos grandes produjeron siempre machos.

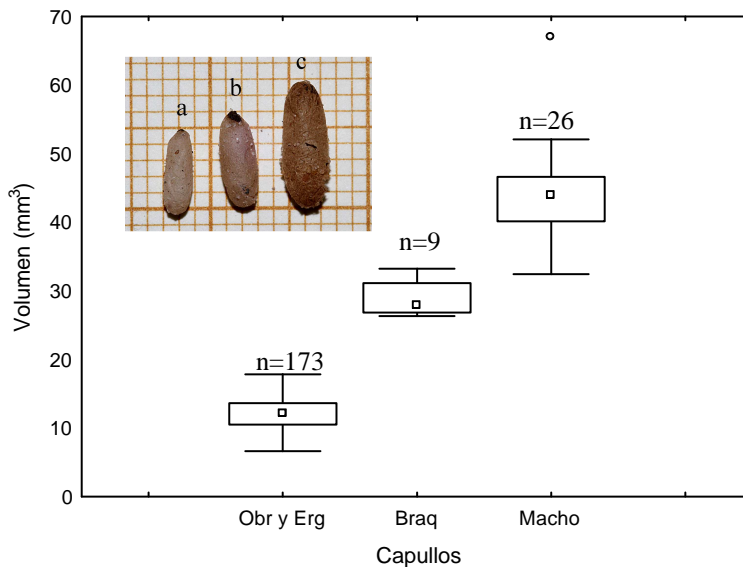


Figura 7.2 Polimorfismo en el tamaño de los capullos de *C. tartessica*: **a** capullos de obreras y ergatoides, **b** capullos de braquípteras y **c** capullos de machos. Los capullos de machos no intervinieron en la fisión.

El tamaño de las colonias lideradas por reina braquíptera fue significativamente mayor, aunque de forma discreta, a las lideradas por reina ergatoide (número de obreras:

371.5 ± 57.2 , $n = 9$ vs 262.78 ± 23.2 , $n = 18$, respectivamente; $t = 2.1$, $p = 0.046$; Fig. 7.3), posiblemente como consecuencia del menor número de ovarios (Fig. 6.1 e y f) y, por lo tanto, menor fertilidad, de las reinas ergatóides.

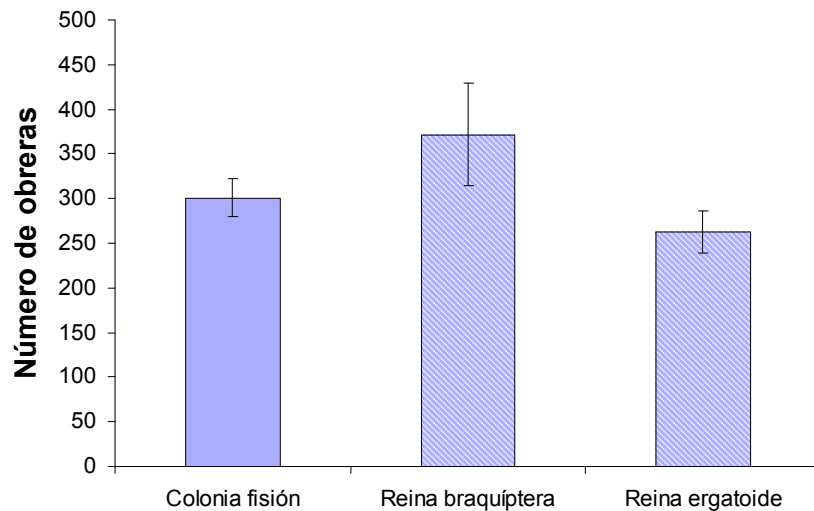


Figura 7.3 Diferencia de tamaño de las colonias en fisión en función del tipo de reina que la lidere ($p=0.046$). El primer lugar, el tamaño medio de las colonias en fisión.

Durante la fisión, los capullos de las hembras fueron segregados, entre los nidos madre e hijo, de acuerdo a su talla (Fig. 7.4; lme: $F_{1, 103} = 73.6$, $p < 0.0001$). Mientras que el número de capullos pequeños (volumen: $6 - 8 \text{ mm}^3$) fue mayor en el nido madre que en el hijo ($t_{103} = 8.8$, $p < 0.0001$), los capullos medianos ($26-33 \text{ mm}^3$) fueron más numerosos en el nido hijo ($t_{103} = 3.3$, $p = 0.0013$).

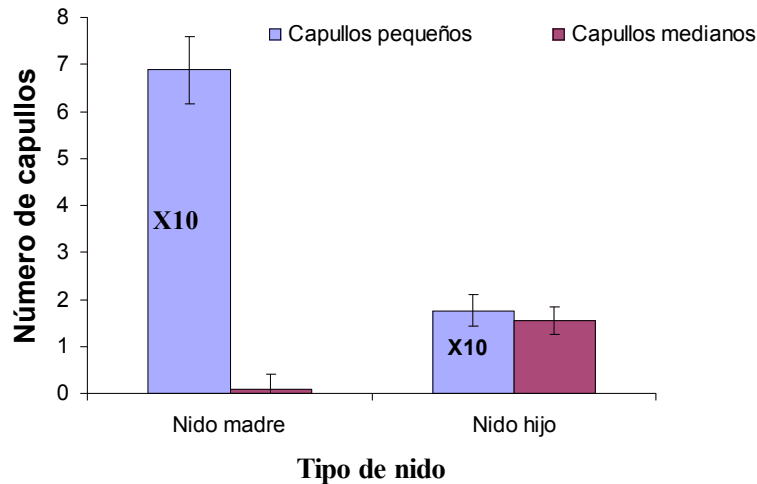


Figura 7.4 Segregación de capullos según su tamaño entre los nidos madre e hijos. Por razones de representación, el número de capullos pequeños se dividió por 10.

Aislando estos capullos inmediatamente después de la excavación de los nidos, pudimos registrar la casta de las hormigas que eclosionaron. Esto reveló que tanto las ergatoideas como las obreras eclosionaron de capullos pequeños, mientras que las braquípteras lo hicieron solamente de capullos medianos (Fig. 6.5). No se encontraron machos ni capullos de machos en ninguna de las colonias implicadas en el proceso de fisión.

El proceso de fisión duró entre tres y cuatro días con, transportes ocasionales durante dos o tres días más. Finalizada la fisión, tuvo lugar la eclosión de las braquípteras y ergatoideas a partir de los capullos medianos y pequeños, respectivamente. Las tres cópulas observadas, dos con la intervención de una ergatoide y una de braquíptera, más una princesa alada saliendo del nido, tuvieron lugar entre las 15 y 16 horas solares. En todos los casos en que se observaron salida de machos éstos lo hicieron antes que las princesas, entre las 13 y 14 horas solares. Las tres cópulas fueron observadas sobre una pequeña espiga muy próxima al nido (distancia: rango de 1 a 1.75 m, tiempo de cópula: rango de 5 a 45 mn). Tras la cópula, la princesa regresó de inmediato al nido.

Ciclo de desarrollo de los sexuales

La producción de sexuales tuvo lugar mayoritariamente a lo largo del mes de junio, prolongándose, aunque con mucha menos importancia, durante julio y agosto (Fig 7.6).

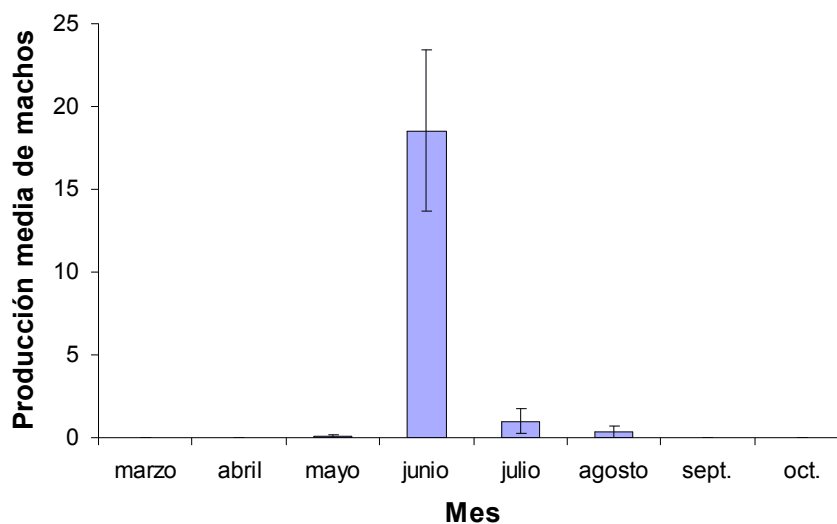


Figura 7.6 Producción media de sexuales por colonia (machos + capullos haploides) durante el periodo de actividad de *C. tartessica* (n = 93).

De los 79 nidos muestreados al azar durante el periodo de actividad, 15 (19%) produjeron machos, 51 (65%) obreras y sólo 2 (2.5%) produjeron obreras y machos (Fig 7.7; $\chi^2 = 64.0, p = 0$).

El número de capullos haploides (machos) y diploides (obreras) producidos en junio dependió del tipo de reina que lideraba el nido (Fig 7.8; GLM, efecto de la reina: $F_{4, 104} = 3.632, p = 0.008$).

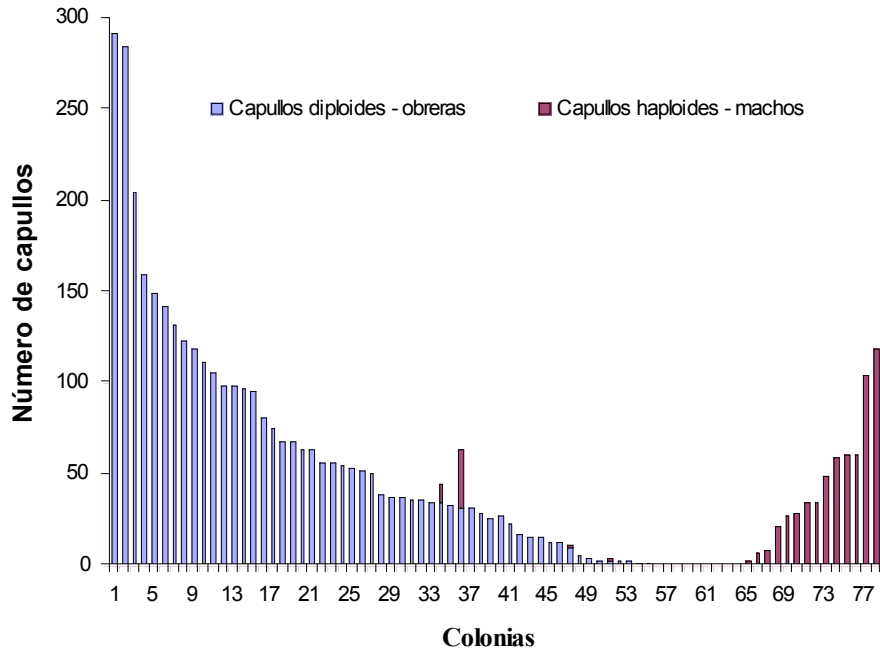


Figura 7.7 Producción de capullos de obreras (diploides) y de machos (haploides) en colonias recolectadas al azar durante el periodo anual de actividad de *C. tartessica*. Se observa la segregación entre colonias que producen capullos diploides y haploides.

El número de capullos haploides fue significativamente mayor en las colonias con reina ergatoide frente a los que tuvieron braquíptera y a los sin reina (Tukey HSD test, $p = 0.01$ y $p = 0.04$, respectivamente), mientras que el número de capullos diploides lo fue en los nidos con reina braquíptera frente a los liderados por ergatoide, y no significativamente diferente a los encontrados sin reina (Tukey HSD test, $p = 0.03$ y $p = 0.125$, respectivamente).

De los 56 nidos extraídos en junio, 20 produjeron sexuales (35.7%), de ellos 6 (30%) produjeron un total de 20 capullos de braquípteras (3.3 ± 2.9 ; media \pm SD), mientras que 14 (70%) produjeron un total de 623 capullos de machos (44.5 ± 34.9 ; media \pm SD), (% nidos productores de hembras vs % nidos productores de machos: $\chi^2 = 3.3$, $p < 0.5$), lo que supone una inversión en braquípteras frente a machos de 1:13.5 (test de Student, $t = -2.633$, $p = 0.016$).

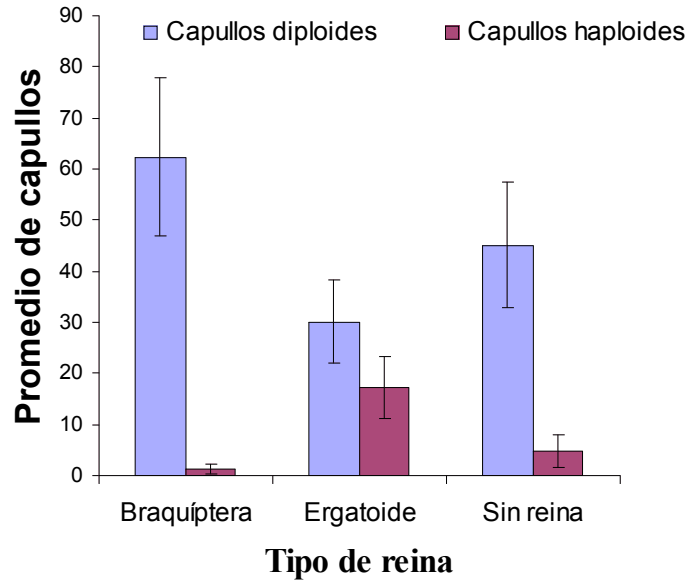


Figura 7.8 Producción de capullos haploides y diploides en función del tipo de reina que lidera la colonia.

En los nidos con sexuales se encontró una asociación positiva entre su producción y el tamaño colonial (Fig 7.9; Rango de correlación de Spearman, $r_s = 0.45$, $n = 25$, $p = 0.02$), que es significativa para las colonias lideradas por ergatoides ($r_s = 0.83$, $p = 0.003$) pero no para las categorías de colonias lideradas por braquípteras y sin reina ($p = 0.168$ y $p = 0.74$, respectivamente)

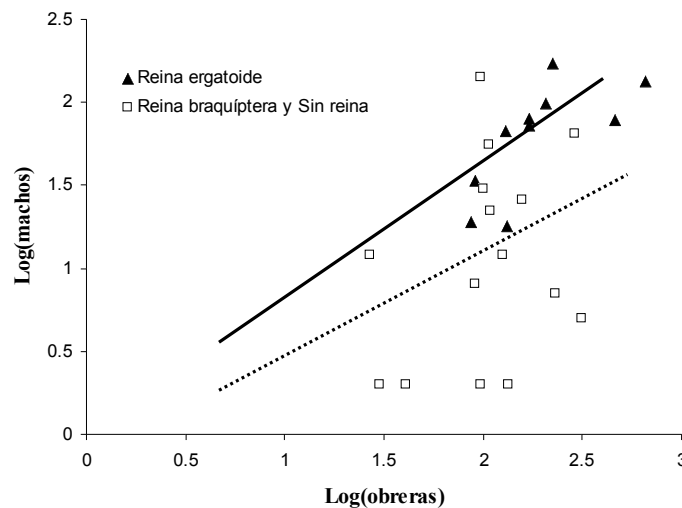


Figura 7.9 Producción de machos en función del tamaño colonial. Las líneas de tendencias se dan para colonias con reinas ergatoides ($y = -0.0545 + 0.8103 * X$) por un lado, y colonias con reina braquíptera y sin reina por otro, significativa para el primer caso y no para el segundo.

Discusión

En este estudio se describe el proceso de reproducción colonial por fisión desarrollado por *C. tartessica* en condiciones naturales. La fisión tiene lugar, principalmente, durante la segunda quincena de junio y principios de julio, coincidiendo con el solsticio de verano, aproximadamente en el centro de su periodo anual de actividad. Este periodo de fisión coincide aproximadamente con el descrito para *Proformica longiseta* (Fernández-Escudero et al. 2001), una hormiga que vive en Sierra Nevada, Granada, por encima de los 2.000 m de altitud. *P. longiseta* hace coincidir su reproducción colonial por fisión con el periodo, muy corto, de disposición de alimentos. Sin embargo, la fisión en nuestra especie de estudio está retrasada con respecto a *Cataglyphis cursor*, una hormiga que habita en el noreste de España y sureste de Francia, y que fisiona un mes antes (Lenoir et al. 1988; Percy y Aron 2006; Cheron et al. 2011), en plena primavera. En este caso, la elección de estas fechas de fisión supone que las primeras obreras producidas por la nueva reina lo van a hacer en verano, en un ambiente hostil debido a las altas temperaturas y con limitada disponibilidad de alimentos. Dado el grado de parentesco entre las integrantes de una colonia de *C. tartessica*, mayor que entre las de *C. cursor*, al ser éstas poliándricas (Percy et al. 2004) cabría esperar que, en función del alto retorno genético, vía supervivencia de la colonia hija que obtendrían, eligiesen fechas de fisión con menos estrés tanto térmico como alimenticio. Deben de existir razones que nos son desconocidas.

Además del tamaño colonial como posible desencadenante de la fisión, el hecho de que las colonias que fisieron lideradas por reinas braquípteras fueran significativamente mayores que las lideradas por reinas ergatoides, relaciona la fisión con la fecundidad de la reina, menor en las ergatoides que en las braquípteras al tener menor número de ovarios (Fig. 6.1)

El reparto de recursos, número de obreras, entre los nidos madre e hijo estuvo sesgada. La fisión colonial produjo nidos con mayor número de obreras en el nido madre, donde permaneció la reina, que el nido hijo, de acuerdo con la predicción de Pamilo (1991).

Las colonias en fisión invirtieron sólo en hembras (obreras y princesas), siendo los capullos de las obreras repartidos entre los nidos madre e hijo en proporción similar al de las propias obreras, mientras que los de las princesas braquípteras fueron todos transportados al nido hijo.

Nuestros resultados muestran que la producción de braquípteras y machos en *C. tartessica* está altamente sesgada a favor de los machos, tanto a nivel colonial. La razón podría estar en su modo de reproducción por fisión. El mayor éxito de los propágulos, al ir acompañados por una fuerza de obreras, hace menos necesaria la producción de braquípteras.

Por otra parte, las colonias que invirtieron en machos lo hicieron de forma exclusiva, encontrando una asociación positiva entre su número y el tamaño colonial, pero sólo en aquellas que estuvieron lideradas por reina ergatoide. Este dato podría sugerir que, en las colonias con reina ergatoide hay producción de machos, además de por ella, por parte de las obreras, mientras que en las lideradas por braquíptera no.

Excepto en dos ocasiones en las que a partir de un nido madre se originaron dos nidos hijos (14.3%), en todos los demás casos la fisión sólo originó un nido hijo, que fueron alejados a una distancia muy similar a la su distancia de forrajeo (7.7 ± 0.15 m vs 7.05 ± 0.93 m, respectivamente) y unas diez veces la distancia al nido más próximo (0.72 ± 0.04 m) sugiriendo la existencia de competencia local por los recursos entre los nidos madre e hijo.

CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos en este estudio, nuestras conclusiones son:

1.- *Cataglyphis floricola* es una especie distribuida en torno a la cuenca baja del río Guadalquivir, entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz, anidando siempre sobre suelos arenosos. Datos moleculares, morfológicos y químicos indican que los dos morfos son en realidad dos especies distintas con distribución parapátrica.

2.- Llamamos *C. tartessica* al morfo bicolor, y describimos taxonómicamente la nueva especie.

3.- *C. tartessica* es una especie con periodo de actividad aproximadamente interequinoccial primavera – otoño, con máxima actividad en torno al solsticio de verano, momento coincidente con su periodo de reproducción. Los nidos, formados por unas 300 obreras, son monocálicos, monogínicos y monoándricos. Su dieta resulta ser muy variada e incluye muchos cadáveres de insectos.

4. - La actividad de forrajeo, tanto diaria como estacional, depende en gran medida de la posición del sol.

5.- Como todas las especies de *Cataglyphis*, las obreras de *C. tartessica* forrajean de forma individual. Sin embargo, las obreras pueden practicar un tipo de reclutamiento primitivo cuando se encuentran ante presas de gran tamaño. Este reclutamiento va a depender de la distancia a la que se encuentre la presa.

6.- *C. tartessica* se reproduce por fisión. La reina permanece en el nido madre, mientras que las princesas son transportadas al nido hijo en estado de pupa. Muy pocas obreras (3-4) son las encargadas del transporte de obreras, capullos, larvas y huevos al nido hijo. Aproximadamente un tercio de las obreras son transportados al nido hijo.

7.- Los nidos están liderados por dos tipos de reinas, ambas de pequeño tamaño pero morfológicamente diferentes: braquíptera o ergatoide. La evolución de las primeras se debe directamente al modo de fundación por fisión. La evolución de las segundas podría deberse a una estrategia larval egoísta que las ha llevado a desarrollarse en reinas con aspecto de obreras en contra del interés colonial.

8.- A nivel poblacional, la producción de machos es muy superior a la de reinas. Al principio de la temporada las colonias deciden invertir en la producción de machos o en la producción de hembras.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff MD, Magalhaes PJ and Ram SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**: 36-42.
- Adams ES and Tschinkel WR. 2001. Mechanisms of population regulation in the fire ant *Solenopsis invicta*: an experimental study. *Journal of Animal Ecology*, **70**: 355-369.
- Agosti D. 1990. Review and reclassification of *Cataglyphis* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Natural History*, **24**: 1457-1505.
- Agosti D. 1994. A new inquiline ant (Hymenoptera: Formicidae) in *Cataglyphis* and its phylogenetic relationship. *Journal of Natural History* **28**: 913-919.
- Alanärä A, Burns MD and Metcalfe N B. 2001. Intraspecific resource partitioning in brown trout: the temporal distribution of foraging is determined by social rank. *Journal of Animal Ecology*, **70**: 980-986.
- Albrecht M and Gotelli NJ. 2001. Spatial and Temporal Niche Partitioning in Grassland. *Ants. Oecologia*, **126**: 134-141.
- Amor F, Ortega P, Jowers MJ, Cerdá X, Billen J, Lenoir A and Boulay RR. 2011. The evolution of worker–queen polymorphism in *Cataglyphis* ants: interplay between individual land colony-level selections. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**: 1473-1482.
- Arnqvist G. 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, **293**: 784-786.
- Arnqvist G, Nilsson T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, **60**, 145-164.
- Aron S, Passera L, Keller L. 1999. Evolution of social parasitism in ants: size of sexuals, sex ratio and mechanisms of caste determination. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **266**: 173-177.
- Azcárate FM, Kovacs E and Peco B. 2007. Microclimatic conditions regulate surface activity in harvester Ants *Messor barbarus*. *Journal of Insect Behavior*, **20**: 315-329.
- Bacci M, Solomon SE, Mueller UG, Martins V G, Carvalho AO, Vieira LG and Silva-Pinhati AC. 2009. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta fabricius* (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **51**: 427-437.
- Bagnères A and Wicker-Thomas C. 2010. Chemical taxonomy with hydrocarbons. *Insect hydrocarbons*. Cambridge University Press, **0**: 12.

- Bandelt HJ, Forster P and Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 37-48.
- Baroni Urbani C. 1993. The diversity and evolution of recruitment behaviour in ants, with a discussion of the usefulness of parsimony criteria in the reconstruction of evolutionary histories. *Insect. Soc.* **40**: 233-260.
- Barraclough TG and Vogler AP. 2002. Recent diversification rates in North American tiger beetles estimated from dated mtDNA phylogenetic tree (2002). *Molecular Biology and Evolution*, **19(10)**: 1706-1716.
- Batra SWT. 1966: Nests and social behavior of halictine bees of India (Hymenoptera: Halictidae). *Indian J. Entomol*, **28**:375-393.
- Bekkevold D, Frydenberg J and Boomsma JJ. 1999. Multiple mating and facultative polygyny in the Panamanian leafcutter ant *Acromyrmex echinator*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **46**: 103-109.
- Bestelmeyer B. 2000. The trade-off between thermal tolerance and behavioural dominance in a subtropical south-American ant community. *Journal of Animal Ecology*, **69**: 998-1009.
- Beugnon G, Chagne P and Dejean A. 2001. Colony structure and foraging behavior in the tropical formicine ant, *Gigantiops destructor*. *Insectes Sociaux*, **48**: 347-351
- Billen J. 2009). Occurrence and structural organization of the exocrine glands in the legs of ants. *Arthropod Struct Dev*, **38**: 2-15.
- Blüthgen N. and Feldhaar H. 2010. Food and shelter: How resources influence ant ecology. In: *Ant Ecology* (Lach L., Parr C.L. and Abbott K.L., Eds), Oxford University Press, Oxford. pp 115-136.
- Bolton B. 1986. Apterous females and shift of dispersal strategy in the *Monomorium salomonis*-group (Hymenoptera: Formicidae). *J Nat Hist* **20**: 267-272.
- Bolton B. 1987. A review of the solenopsis genus-group and revision of Afrotropical *Monomorium* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)*, **54**: 263-452.
- Bolton B, Marsh AC. 1989. The Afrotropical thermophilic ant genus *Ocymyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *J Nat Hist* **23**: 1267-1308.
- Boomsma JJ, Fjerdingstad EJ, Frydenberg J. 1999. Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leaf-cutter ants. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **266**, 249-254.
- Boomsma JJ, Baer B and Heinze J. 2005. The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entomology*, **50**: 395-420.

- Boomsma JJ, Schmid-Hempel P and Hughes WHO. 2005. Life histories and parasite pressure across the major groups of social insects. In M. Fellwes G Holoway and J Rolf, eds. *Insect Evolutionary Ecology*, pp. 139-75 CABI publishing, Wallingford, UK.
- Boulay R, Carro F, Soriguer R. and Cerdá X. 2007. Synchrony between fruit maturation and effective dispersers' foraging activity increases seed protection against seed predators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **274**: 2515-2522.
- Boulay R, Cerdá X, Simon T, Roldan M, Hefetz A. 2007. Intraspecific competition in the carpenter ant *Camponotus cruentatus*: should we expect the Dear Enemy Effect? *Animal Behavior*, **74**: 985-993.
- Boulay R, Cerdá X, Fertin A, Ichinose K, Lenoir A. 2009. Brood development into sexual females depends on the presence of a queen but not on temperature in an ant dispersing by colony fission, *Aphaenogaster senilis*. *Ecological Entomology*, **34**: 595-602.
- Bourke A. 2005. Insects triumphant! *Trends in Ecology and Evolution*, **20**: 288-289.
- Bourke, A.F.G. and Franks, N.R. 1995. *Social evolution in ants*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Bourke AFG, Ratnieks FLW. 1999. Kin conflict over determination in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **46**: 287-297.
- Brian MV. 1985. Comparative aspects of caste differentiation in social insects. In: Watson JAL, Okot-Kotber BM, Noirot C (eds) *Caste differentiation in social insects*. Pergamon press, Oxford, pp 385-398.
- Briese DT. 1983. Different modes of reproductive behavior (including a description of colony fission) in a species of *Chelaner* (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, **30**: 308-316.
- Bullock JM, Kenward RE, Hails RS .2002. *Dispersal ecology*. Blackwell Science, Malden.
- Cagniant H. 1979. La parthénogenèse thélytoque et arrhénotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. (Hym., Form.). Cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Insectes Sociaux* **26**: 51-60.
- Camazine S, Deneubourg J, Franks NR, Sneyd J, Theraulaz G, Bonabeau E. 2001. *What is self-organization? Self-Organization in Biological Systems*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Carpintero S, Reyes J and Arias de Reyna L. 2002. Segregación especial y coloración en la especie *Cataglyphis floricola* (Hymenoptera, Formicidae) en el Parque Nacional de Doñana (España). *Boletín de la Asociación Española de Entomología* **26** (3-4): 113-120.

- Cerdá, X. 1988. Food collection by *Cataglyphis iberica* (Em.) (Hymenoptera, Formicidae). *Annales Zoology, Warszawa* **41**: 515-524.
- Cerdá X. 2001. Behavioural and physiological traits to thermal stress tolerance in two Spanish desert ants. *Etologia*, **9**: 15-27.
- Cerdá X, Retana J, Bosch J and Alsina A. 1989. Exploitation of food resources by the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Oecologia*, **10**: 419-429.
- Cerdá X, Retana J. and Cros S. 1997. Thermal disruption of transitive hierarchies in Mediterranean ant communities. *Journal of Animal Ecology*, **66**: 363-374.
- Cerdá, X. and Retana, J. 1997. Links between worker polymorphism and thermal biology in a thermophilic ant species. *Oikos* **78**: 467-474.
- Cerdá X, Retana J and Manzaneda A. 1998. The role of competition by dominants and temperature in the foraging of subordinate species in Mediterranean ant communities. *Oecologia*, **117**: 404-412.
- Cerdá X and Retana J. 2000. Alternative strategies by thermophilic ants to cope with extreme heat: individual versus colony level trait. *Oikos*, **89**: 155-163.
- Cerdá, X., Retana, J., Bosch, J., and Alsina, A. 1989. Daily foraging activity and food collection of the thermophilic ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera, Formicidae). *Vie et Milieu* **39**: 207-212.
- Cerdá, X., Retana, J., Carpintero, S., and Cros, S. 1996. An unusual ant diet: *Cataglyphis floricola* feeding on petals. *Insectes Sociaux*, **43**: 101-104.
- Cerdá, X., Retana, J., and Cros, S. 1998. Critical thermal limits in Mediterranean ant species: trade-off between mortality risk and foraging performance. *Functional Ecology*, **12**: 45-55.
- Cerdá, X., Dahbi, A., and Retana, J. 2002. Spatial patterns, temporal variability, and the role of multi-nest colonies in a monogynous Spanish desert ant. *Ecological Entomology*, **27**: 7-15.
- Cerdá X, Angulo E, Boulay R and Lenoir A. 2009. Individual and collective foraging decisions: a field study of worker recruitment in the Gypsy ant *Aphaenogaster senilis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **63**: 551-562.
- Chéron B, Doums C, Federici P, Monnin T. 2009. Queen replacement in the monogynous ant *Aphaenogaster senilis*: supernumerary queens as life insurance. *Animal Behavior*, **78**: 1317-1325.
- Chéron B, Cronin AL, Doums C, Federici P, Haussy C, Tirard C and Thibaud M. 2011. Unequal resource allocation among colonies produced by fission in the ant *Cataglyphis cursor*. *Ecology*, **92**: 1448-1458.

- Christian KA and Morton SR. 1992. Extreme thermophilia in a Central Australian ant, *Melophorus bagoti*. *Physiol. Zool.* **65**: 885-905.
- Choe JC, Crespi BJ, eds. 1997. *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Chong K and Lee C. 2009. Influences of temperature, relative humidity and light intensity on the foraging activity of field populations of the longlegged ant, *Anoplolepis gracilipes* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, **54**: 531-539.
- Clark PJ and Evans FC. 1954. Distance to nearest neighbour as a measure of spatial relationships in populations. *Science* **35**: 445-453.
- Clémencet J. 2006. Evolution of dispersal and reproductive strategies in the ant *Cataglyphis cursor*. PhD thesis, Université Paris VI.
- Clémencet J, Cournault L, Odent A, and Doums C. 2009. Worker thermal tolerance in the thermophilic ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, **57**: 11-15.
- Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichols JD. 2001. *Dispersal*. Oxford University Press, New York.
- Cogni R and Oliveira OS. 2004. Recruitment behavior during foraging in the neotropical ant *Gnamptogenys moelleri* (Formicidae: Ponerinae): does the type of food matter? *Journal of Insect Behavior*, **17**: 443-458.
- Cole BJ, Wiernasz DC .1999. The selective advantage of low relatedness. *Science*, **285**: 491-493.
- Cole B, Smith A, Huber Z and Wiernasz D. 2010. The structure of foraging activity in colonies of the harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Behavioral Ecology*, **21**: 337-342.
- Collet M and Collet TS. 2000. How do insects use path integration for their navigation? *Biological Cybernetics*, **83**: 245-259.
- Collett M and Collett TS. 2009. Local and global navigational coordinate systems in desert ants. *The Journal of Experimental Biology*, **212**: 901-905.
- Collett M., Collett T.S. and Wehner R. 1999. Calibration of vector navigation in desert ants. *Curr. Biol.* **9**: 1031-1034.
- Cracraft J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In D. Otte and J.A. Endler (eds.), *Speciation and Its Consequences*, pp. 29-59, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Crawley MJ. 2007. *The R Book*. 1er edn. Wiley, Chichester.

- Cronin A, Monnin T. 2009. Bourgeois queens and high stakes games in the ant *Aphaenogaster senilis*. *Fr Zool*, **6**: 24.
- Crozier RH and Pamilo P. 1996. *Evolution of social insect colonies*. Oxford University Press, Oxford.
- Dahbi A, Cerda X, Hefetz A and Lenoir A 1996. Chemistry of pospharyngeal gland secretion and its implication for the phylogeny of Iberian *Cataglyphis* species (Hymenoptera: Formicidae). *Chemology*, **7**: 163-171.
- Dahbi A, Cerda X and Lenoir A. 2008. Chemotaxonoy of some *Cataglyphis* ants from Marocco and Burkina Faso. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**: 564-572.
- de Queiroz K and MJ Donoghue. 1990. Phylogenetic systematics for Nelson's version of cladistics? *Cladistic*, **6**: 61-75.
- Delye G. 1968. Recherches sur l'écologie, la physiologie et l'éthologie des fourmis du Sahara. Tesis Doctoral. Universidad Aix-Marseille. 155 p.
- DeSalle R, Freedman T, Prager EM and Wilson A C. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, **26**: 157-164.
- Denenborg JL and Goss S. 1989. Collective patterns and decision making. *Ethology Ecology and Evololution*, **1**: 295-311.
- Denny AJ, Nigel FR, Powell S and Edwards KJ. 2004. Exceptionally high levels of multiple mating in an army ant. *Naturwissenschaften*, **91**: 396-399.
- Dingle H, Holyoak M. 2001. The evolutionary ecology of movement. In: Fox C, Roff DA, Fairbairn DJ (eds) *Evolutionary ecology*. Oxford University Press, New York, pp 247-261.
- Earl DA. 2011. Structure Harvester v0.6.7. Available at <http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/structureHarvester>.
- Eberghar WG. 1985. *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard Univ. Press. Cambridge. MA.
- Eberghar WG, Huber BA, Rodríguez RL, Briceno RD, Salas I and Rodríguez V. 1998. One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. *Evolution*, **52**: 415-431.
- Éstoup A, Solignac M, Cornuet JM. 1994. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society London, Series B*, **258**: 1-7.
- Evanno G, Regnaut S and Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611-2620.

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- Feener D. H. 1988. Effects of parasites on foraging and defense behavior of a termitophagous ant, *Pheidole titanis* Wheeler (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **22**: 421-427.
- Fernández Escudero I, Seppä P, Pamilo P. 2001. Dependent colony founding in the ant *Proformica longiseta*. *Insectes Sociaux*, **48**: 80-82.
- Fenn MGP and MacDonald DW. 1995. Use of middens by red foxes: risk reverses rhythms of rats. *Journal of Mammalogy*, **76**: 130-136.
- Foitzik S, Kureck IM, Ruger MH, Metzler D (2010) Alternative reproductive tactics and the impact of local competition on sex ratios in the ant *Hypoponera opacior*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **64**:1641-1654.
- Fjerdingstad EJ, Boomsma JJ, Thorén P. 1998. Multiple paternity in the leafcutter ant *Atta colombica* — a microsatellite DNA study. *Heredity*, **80**, 118-126.
- Gadau J, Strehl C-P, Oettler J, Hölldobler B. 2003. Determinants of intracolony relatedness in *Pogonomyrmex rugosus* (Hymenoptera; Formicidae): mating frequency and brood raids. *Molecular Ecology*, **12**, 1931-1938.
- Gehring, W.J. and Wehner, R. 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara Desert. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **92**: 2994-2998.
- Gökçen OA, Morgan ED, Dani FR, Agosti D and Wehner R. 2002. Dufour gland contents of ants of the *Cataglyphis bicolor* group. *Journal of Chemical Ecology*, **28**: 71-87.
- Gordon DM, Kulig A. 1998. The effect of neighbours on the mortality of harvester ant colonies. *J Anim Ecol*, **67**: 141-148.
- Goropashnaya AV, Fedorov VB and Pamilo P. 2004. Recent speciation in the *Formica rufa* group ants (Hymenoptera, Formicidae): inference from mitochondrial DNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**: 198-206.
- Goudet J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**: 385-386.
- Gouy M, Guindon S and Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, **27(2)**:221-224.

- Goy JL, Zazo C, Dabrio CJ and Lario J. 1994. Fault controlled shifting shorelines in the Gulf of Cadiz since 20ky BP. 1º Simpósio sobre a margem continental iberica atlântica, Lisboa.
- Grimaldi D and Engel MS. 2005. *Evolution of the insects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour. I–II. *Journal of Theoretical Biology*, **7**: 1-52.
- Hasegawa E, Tinaut A and Ruano F. 2002 Molecular phylogeny of two slave-making ants: *Rossomyrmex* and *Polyergus* (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Zool. Fenn.* **39**: 267-271.
- Hebert PDN and Gregory TR. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, **54**: 852-859.
- Heethoof M, Laumann M, Weigmann G and Raspotnig G. 2011. Integrative taxonomy: combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Frontiers in Zoology*, **8**:2.
- Heinze J. 1989. Alternative dispersal strategies in a North American ant. *Naturwissenschaften*, **76**: 477-478.
- Heinze J. 1998. Intercastes, intermorphs, and ergatoid queens: who is who in ant reproduction? *Insectes Sociaux*, **45**: 113-124.
- Heinze J, Hölldobler B (1993) Queen polymorphism in an Australian weaver ant, *Polyrhachis cf. doddi*. *Psyche*, **100**: 83-92.
- Heinze, J. and K. Tsuji, 1995. Ant reproductive strategies. *Res. Popul. Ecol.* **37**: 135-149.
- Heinze J, Hölldobler B, Cover SP.1992. Queen polymorphism in the North American harvester ant, *Ephebomyrmex imberbiculus*. *Insectes Sociaux*, **39**: 267-273.
- Hölldobler B. 1971. Recruitment behavior in *Camponotus socius* (Hym. Formicidae). *Z. Verg. Physiol.* **75**: 123-14.
- Hölldobler B, Haskins CP. 1977. Sexual calling behavior in primitive ants. *Science*, **195**: 793-794.
- Hölldobler B and Wilson EO. 1990. *The ants*. The Belknap Press, Cambridge, Massachusetts, 782 pp.
- Holway DA, Suarez AV and Case TJ. 2002. Role of abiotic factors in governing susceptibility to invasion: a test with Argentine ants. *Ecology*, **83**: 1610-1619.

- Hora RR, Doums C, Poteauc C, Fénéron R, Valenzuela J, Heinze J, Fresneau D. 2005. Small queens in the ant *Ectatomma tuberculatum*: a new case of social parasitism. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **59**:285-292.
- Howard KJ. 2006. Three queen morphs with alternative nest-founding behaviors in the ant, *Temnothorax longispinosus*. *Insectes Sociaux*, **53**: 480-488.
- Itow T, Kobayashi K, Kubota M, Ogata K, Imai HT, Crozier RH. 1984. The reproductive cycle of the queenless ant *Pristomyrmex pungens*. *Insectes Sociaux*, **31**, 87-102.
- Jarau S, van Veen JW, Twele R, Reichle C, Herrera Gonzales E, Aguilar I, Francke W, Ayasse M. 2010. Workers make the queens in *Melipona* bees: Identification of Geraniol as a caste determining compound from labial glands of nurse bees. *Journal of Chemical Ecology*, **36**: 565-569.
- Jenkins TM, Haverty MI, Basten CJ, Nelson LJ and Pagen M. 2000. Correlation of mitochondrial haplotypes with cuticular hydrocarbon phenotypes of sympatric *Reticulitermes* species from the southwestern United States. *Journal of Chemical Ecology*, **26**: 1525-1543.
- Juan C, Oromi Pand Hewitt GM. 1995. Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkling beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae): *Proceedings of the Royal Society of London B*, **261**: 173-180.
- Juan C, Oromi P and Hewitt GM. 1996. Phylogeny of the genus *Hegeter* (Tenebrionidae, Coleoptera) and its colonization of the Canary Islands deduced from cytochrome oxidase I mitochondrial DNA sequences. *Heredity*, **76**: 392-403.
- Keller L and Passera L. 1989. Size and fat-content of gynes in relation to the mode of colony founding in ants (Hymenoptera, Formicidae). *Oecologia* **80**: 236-240.
- Keller L and Reeve HK. 1999. *Dynamics of conflicts within insect societies*. In: Keller L (ed) *Levels of Selection in Evolution*. Princeton University Press, Princeton, pp 153-175.
- Knaden M, Tinaut A, Cerda X, Wehner S and Wehner R. 2005. Phylogeny of three parapatric species of desert ants, *Cataglyphis bicolor*, *C. biatica*, and *C. savignyi*. A comparison of mitochondrial DNA, nuclear DNA, and morphological data. *Zoology*, **108**: 167-177.
- Knaden M, Tinaut A, Stökl J, Cerdá X and Wehner R. 2011. Molecular phylogeny of the dessert ant genus *Cataglyphis* (Hymenoptera: Formicidae), submitted.
- Knaden M, and Wehner R. 2005. Nest mark orientation in desert ants *Cataglyphis*: what does it do to the path integrator? *Animal Behaviour*, **70**: 1349-1354.
- Knaden M and Wehner R. 2006. Fundamental difference in the life history traits of two species of *Cataglyphis* ants. *Frontiers in Zoology*, **3**: 21.

- Kronauer DJC, Schçning C, Pedersen JS, Boomsma JJ and Gadau J. 2004. Extreme queen mating frequency and colony fission in African army ants. *Molecular Ecology*, **12**: 2381-2388.
- Kronauer D.J.C., Johnson R.A. and Boomsma J.J. 2007. The evolution of multiple mating in army ants. *Evolution* **61**: 413-422.
- Kronfeld-Schor N and Dayan T. 2003. Partitioning of time as an ecological resource. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **34**: 153-181.
- Lachaud JP. 1985. Recruitment by selective activation: an archaic type of mass recruitment in a Ponerine ant (*Ectatomma ruidum*). *Sociobiology*, **11**: 133-142.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace I.M, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DJ. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note*, **23**: 2947-2948.
- Leal IR, Oliveira PS. 1995. Behavioral ecology of the neotropical termite-hunting ant *Pachycondyla* (= *Termitopone*) *marginata*: colony founding, group-raiding and migratory patterns. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**: 373-383.
- Lenoir, A., Querard, L., Pondicq, N., and Berton, F. 1988. Reproduction and dispersal in the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera, Formicidae). *Psyche* **95**: 21-44.
- Lenoir, A., Nowbahari, E., Quérard, L., Pondicq, N., and Delalande, C. 1990. Habitat exploitation and intercolonial relationships in the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Oecologica* **11**: 3-18.
- Lenoir A and Cagniant H. 1986. Role of worker thelytoky in colonies of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera: Formicidae). *Entomologia Generalis*, **11**: 153-157.
- Lenoir A, Aron S, Cerda X and Hefetz A. 2009. *Cataglyphis* desert ants: a good model for evolutionary biology in Darwin's anniversary year. A review. *Israel Journal of Entomology* **39**: 1-32.
- López-Davalillo J. 1999. *Atlas histórico de España y Portugal. Desde el Paleolítico hasta el siglo XX*. Editorial Síntesis S.A. Madrid.
- Marsh AC 1985. Microclimatic factors influencing foraging patterns and success of the thermophilic desert ant, *Ocymyrmex barbiger*. *Insectes Sociaux*, **32**: 286-296.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Merkle T, Rost M, Alt W. 2006b. Egocentric path integration models and their application to desert arthropods. *J Theor Biol*, **240**: 385-399.
- Merkle T, Knaden M and Wehner R. 2006a. Uncertainty about nest position influences systematic search strategies in desert ants. *The Journal of Experimental Biology*, **209**: 3545-3549.

- Mittelstaedt H, Mittelstaedt ML (1982) Homing by path integration. In: Papi F, Wallraff HG (eds) *Avian Navigation*. Springer, Heidelberg, pp 290-97.
- Molet M, Peeters C, Fischer B. 2007a. Winged queens replaced by reproductives smaller than workers in *Mystrium* ants. *Naturwissenschaften*, **94**: 280-287.
- Molet M, Peeters C, Fisher BL. 2007b. Permanent loss of wings in queens of the ant *Odontomachus coquereli* from Madagascar. *Insectes Sociaux*, **54**: 183-188.
- Molet M, Van Baalen M, Peeters C. 2008. Shift in colonial reproductive strategy associated with a tropical-temperate gradient in *Rhytidoponera* ants. *The American Naturalist*, **172**: 75-87.
- Moritz RFA, Kryger P, Koeniger G, Koeniger N, Éstoup A, Tingek S. 1995. High degree of polyandry in *Apis dorsata* queens detected by DNA microsatellite variability. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**, 357-363.
- Moreau C S. 2008. Unravelling the evolutionary history of the hyperdiverse ant genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**: 224-239.
- Moreau CS, Bell CD, Vila R, Archibald SB and Pierce NE. 2006. Phylogeny of the Ants: Diversification in the Age of Angiosperms. *Science*, **312**:101-104.
- Morgan ED. 1984. Chemical words and phrases in the language of pheromones for foraging and recruitment. In: *Insect communication* (T. Lewis ed). London: Academy Press; 169-194.
- Morgan ED (2009) Trail pheromones of ants. *Physiol Entomol* **34**:1-17.
- Müller M. and Wehner R. 1988. Path integration in desert ants, *Cataglyphis fortis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 5287-5290.
- Murakami T, Higashi S and Windsor D. 2000. Mating frequency, colony size, polyethism and sex ratio in fungus-growing ants (Attini). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **48**: 276-284.
- Muser B., Sommer S. Wolf H. and Wehner R. 2005. Foraging ecology of the thermophilic Australian desert ant, *Melophorus bagoti*. *Australian Journal of Zoology* **53**(5): 301-311.
- Narendra A, Reid SF and Hemmi JM. 2010. The twilight zone: ambient light levels trigger activity in primitive ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**: 1531-538.
- Nation J.L. 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Pres, Boca Raton.

- Nonacs P, Tobin JE. 1992. Selfish larvae: development and the evolution of parasitic behavior in the Hymenoptera. *Evolution* **46**: 1605-1620.
- Nowbahari E, Soroker V, Hefetz A, Malherbe MC, Lenoir A, Arnold G and Lepage M. 1994. *Cataglyphis niger*, the first case of polygyny in the genus *Cataglyphis* (Hymenoptera: Formicidae). Université Paris Nord, Pages: 483.
- Nuss A, Suiter D and Bermet G. 2005. Continuous monitoring of the black carpenter ant, *Camponotus pennsylvanicus* (Hymenoptera : Formicidae), trail behavior. *Sociobiology*, **45**: 597-618.
- Oldham N J, Morgan ED, Agosti D and Wehner R. 1999. Species recognition from postpharyngeal gland contents of ants of the *Cataglyphis bicolor* Group. *Journal of Chemical Ecology*, **25**: 1383-1394.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM. 1995. Levels of polyandry and intracolony genetic relationships in *Apis florea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**: 329-335.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM. 1996. Levels of polyandry and intracolony genetic relationships in *Apis dorsata* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **89**: 276-283.
- Orr M. 1992. Parasitic flies (Diptera: Phoridae) influence foraging rhythms and caste division of labor in the leaf-cutter ant, *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **30**: 395-402.
- Pamilo P. 1991. Evolution of colony characteristics in social insects. I. Sex allocation. *The American Naturalist*, **137**: 83-107.
- Passera L and Aron S. 2005. *Les Fourmis: Comportement, Organisation Sociale et Évolution*. Presses Scientifiques du CNRS, Ottawa, Canada. 480 pp
- Passera L, Keller L. 1990. Loss of mating flight and shift in the pattern of carbohydrate storage in sexuals of ants (Hymenoptera, Formicidae). *J Comp Physiol B* **160**: 207-211.
- Pearcy M and Aron S. 2006. Local resource competition and sex ratio in the ant *Cataglyphis cursor*. *Behavioral Ecology* **17**: 569-574.
- Pearcy, M., Aron, S., Doums, C., and Keller, L. 2004. Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science*, **306**: 1780-1783.
- Pearcy M, Hardy O and Aron S. 2006. Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*, **96**: 377-382.
- Peakall R. and Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, **6**: 288-295.

- Peeters C. 1991. Ergatoid queens and intercastes in ants: two distinct adult forms which look morphologically intermediate between workers and winged queens. *Insectes Sociaux*, **38**: 1-15.
- Peeters C and Ito F. 2001. Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, **46**:601-630.
- Peeters C and Molet M. 2009. Colonial reproduction and life histories. In: Lach L, Parr C, Abbott K (eds) *Ant Ecology*. Oxford University Press, Oxford, pp 161-178.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging: *Molecular Biology and Evolution*, **25**: 1253-1256.
- Posada D and Buckley TR. 2004 Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the aic and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biologists*, **53**:793-808.
- Pritchard KJ, Stephens M and Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.
- Prüser F and Mossakowski D. 1998. Low substitution rates in mitochondrial DNA in Mediterranean carabid beetles. *Insect Mol. Biol.*, **7**: 121-128.
- Queller DC and Goodnight KF. 1989. Estimation of genetic relatedness using allozyme data. *Evolution*, **43**:258-275.
- R Development Core Team. 2009. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R.2.10.1. R Foundation for statistical computing, Vienna.
- Radchenko AG. 1997. *Cataglyphis zakharovi* sp. n. second socially parasitic species in the genus *Cataglyphis* Förster (Hymenoptera, Formicidae). *Annales Zoologici, Warszawa* **46**: 207-210.
- Ranganathan Y, Ghara M and Borges R. 2010. Temporal associations 422 in fig-wasp-ant interactions: diel and phenological patterns. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **137**: 50-61.
- Ratnieks FLW. 2001. Heirs and spares: caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **50**: 467-473.
- Ratnieks FLW, Foster KR and Wenseleers T. 2006. Conflict resolution in insect societies. *Annual Review of Entomology*, **51**:581-608.
- Raymond M and Rousset F. 1995. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**:248-249.
- Rheindt FE, Gadau J, Strehl CP and Hölldobler B. 2004. Extremely high mating frequency in the Florida harvester ant *Pogonomyrmex badius*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **56**: 472-481.

- Rodríguez A. 1998. Geomorfología del Parque Nacional de Doñana y su entorno. Publ. Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales., 146 pp.
- Roff DA. 1990. The evolution of flightlessness in insects. *Ecological Monographs*, **60**: 389-421.
- Ronacher B. 2008. Path integration as the basic navigation mechanism of the desert ant *Cataglyphis fortis* (Forel, 1902) (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, **11**: 53-62.
- Ronquist F. and Huelsenbeck JP: MrBayes 3. 2003. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**:1572-1574.
- Ross KG, Visscher P. 1983. Reproductive plasticity in yellowjacket wasps: a polygynous, perennial colony of *Vespula maculifrons*. *Psyche*, **90**, 179-191.
- Ross, K.G. 2001. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology*, **10**: 265-284.
- Ruano F. and Tinaut A. 1999. Raid process, activity pattern and influence of abiotic conditions in the slave-making ant *Rossomyrmex minuchiae* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, **46**: 341-347.
- Ruano, F., Tinaut, A. and Soler, A. J. J. 2000. High surface temperatures select for individual foraging in ants. *Behavioral Ecology*, **11**, 396-404.
- Salvany JM y Custodio E. 1995. Características litoestratigráficas de los depósitos plio-cuaternarios del Bajo Guadalquivir en el área de Doñana: implicaciones hidrogeológicas. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, **8**(1-2):21-31.
- Salvany JM, Mediavilla C and Rebollo A. 2010. The Pliocene and Quaternary formations of El Abalarío, in the Huelva province littoral (Spain). *Estudios Geológicos*, **66**(2): 209-225.
- Schatz B., Lachaud J.-P. and Beugnon G. 1997. Graded recruitment and hunting strategies linked to prey weight and size in the ponerine ant *Ectatomma ruidum*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **40**: 337-349.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C E and Crozier R H: Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* 2010, **55**: 421-438
- Schmid-Hempel P. 1998. *Parasites in Social Insects*. Princeton University Press, Princeton NJ.
- Schneider SD, Roessli D, Excoffer L. 2000. ARLEQUIN Version 2.0. A software for Populations Genetic Analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*, University of Geneva, Switzerland.

- Schwander T, Lo N, Beekman M, Oldroyd BP, Keller L. 2010. Nature versus nurture in social insect caste differentiation. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**: 275-282.
- Seifert B. 2009. Cryptic species in ants (Hymenoptera: Formicidae) revisited: we need a change in the alpha-taxonomic approach. *Myrmecological News*, **12**: 149-166.
- Seppä P, Helanterä H, Trontti K, Puntilla P, Chernenko A, Martin SJ and Sundström L. 2011. The many ways to delimit species: hairs, genes and surface chemistry. *Myrmecological News*, **15**: 31-41.
- Simmons LW, Siva-Jothy MT. 1998. Sperm competition in insects: mechanisms and the potential for selection. In: *Sperm Competition and Sexual Selection* (eds Birkhead TR, Møller AP), pp. 341-434. Academic Press, New York.
- Sinclair D.F. 1985. On test of spatial randomness using mean nearest neighbor distance. *Ecology*, **66**:1084-1085.
- Steck K, Hansson BS and Knaden M. 2009. Smells like home: desert ants, *Cataglyphis fortis*, use olfactory landmarks to pinpoint the nest. *Frontiers in Zoology*, **6**: 5.
- Swofford D. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thomas M L and Holway D A. 2005. Condition-specific competition between invasive Argentine ants and Australian *Iridomyrmex*. *Journal of Animal Ecology*, **74**: 532-542.
- Timmermans, I., Hefetz, A., Fournier, D., and Aron, S. 2008. Population genetic structure, worker reproduction and thelytokous parthenogenesis in the desert ant *Cataglyphis sabulosa*. *Heredity*, **101**: 490-498.
- Timmermans, I., Grumiau, L., Hefetz, A., and Aron, S. 2010. Mating system and population structure in the desert ant *Cataglyphis livida*. *Insectes Sociaux*, **57**: 39-46.
- Tinaut A. 1993. *Cataglyphis floricola* nov.sp. new species for the genus *Cataglyphis* Förster, 1850 (Hymenoptera, Formicidae) in the Iberian Peninsula. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, **66**: 123-134.
- Tinaut A and Heinze j. 1992. Wing reduction in ant queens from arid habitats. *Naturwissenschaften*, **79**: 84-85.
- Tinaut A and Ruano F. 1992. Braquipterismo y apterismo en formícidos. Morfología y biometría en las hembras de especies ibéricas de vida libre (Hymenoptera: Formicidae). *Graellsia* **48**: 121-131.
- Traniello JFA. 1982. Population structure and social organization in the primitive ant *Amblyopone pallipes* (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* **89**: 65-81.
- Traniello JFA. 1987. Comparative foraging ecology of north temperate ants: the role of worker size and cooperative foraging in prey selection. *Insectes Sociaux*, **34**: 118-130

- Traniello JFA 1989. Foraging strategies in ants. *Annu. Rev. Entomol.* **34**: 191-210.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA and Warman ML 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques*, **29**: 52-54.
- Tsuji K and Ito Y. 1986. Territoriality in a queenless ant, *Pristomyrmex pungens* (Hymenoptera: Formicidae). *Applied Entomology and Zoology*, **21**(3): 377-381.
- van Dyck H, Baguette M. 2005. Dispersal behavior in fragmented landscapes: routine or special movements. *Bas App Ecol* **6**: 535-545.
- van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills DPM and Shipley P. 2001. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, **4**: 535-538.
- van Oudenhove L, Billoir E, Boulay R, Bernstain C and Cerdá Xim. 2011. Temperature limits trail following behaviour through pheromone decay in ants. *Naturwissenschaften*, in press.
- Verneau O, Catzeflis F and Furano A. 1998. Determining and dating recent rodent speciation events by using L1 (LINE-1) retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **95**: 11284-11289.
- Villesen P, Gertsch PJ, Frydenberg J, Mueller UG and Boomsma JJ. 1999. Evolutionary transition from single to multiple mating in fungus-growing ants. *Molecular Ecology*, **8**: 1819-1825.
- Wang JY, Frasier TR, Yang SC and White BN. 2008. Detecting recent speciation events: the case of the finless porpoise (genus *Neophocaena*). *Heredity*. **101**: 145-155.
- Wehner R. 1989. Strategien gegen den Hitzetod. Thermophilie und thermoregulation bei Wüstenameisen (*Cataglyphis bombycina*). Jubiläumsbd Akad Wiss Lit Mainz, Steiner, Weisbaden, pp. 101-112.
- Wehner R. 2003. Desert ant navigation: how miniature brains solve complex tasks. *J. Comp. Physiol. A* **189**: 579-588.
- Wehner R. 2008. The architecture of the desert ant's navigational toolkit (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, **12**: 85-96.
- Wehner R. 2009. The architecture of the desert ant's navigational toolkit (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, **12**: 85-96.
- Wehner R and Lanfranconi B. 1981. What do the ants know about the rotation of the sky? *Nature*, **293**: 731-733.
- Wehner R, Harkness RD and Schmid-Hempel P. 1983. *Foraging strategies in individually searching ants, Cataglyphis bicolor* (Hymenoptera: Formicidae). Information processing in animals. Volume 1. Stuttgart G. Fischer, IV + 79 pp.

- Wehner R, Marsh A C and Wehner S. 1992. Desert ants on a thermal tightrope. *Nature*, **357**: 586-587.
- Wehner R, Meier C. and Zollikofer C. 2004. The ontogeny of foraging behaviour in desert ants, *Cataglyphis bicolor*. *Ecological Entomology* **29**: 240-250.
- Wehner R. 1982. Himmelsnavigation bei Insekten. Neurophysiologie und Verhalten. Neujahrsblatt der Naturforschenden Gesellschaft Zürich **184**: 1-132.
- Wehner R and Srinivasan MV. 2003. *Path integration in insects*. In: Jeffery KJ (Ed.): The neurobiology of spatial behaviour. Oxford University Press, Oxford, pp. 9-30.
- Wehner R and Wehner S. 1986. Path integration in desert ants. Approaching a long-standing puzzle in insect navigation. *Monitore Zoologica Italiano (N.S.)*, **20**: 309-331.
- Wehner R, Wehner S, and Agosti D: 1994. Patterns of biogeographic distribution within the bicolor species group of the North African desert ant *Cataglyphis* Foerster 1850 (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). *Senckenbergiana Biologica*, **74**:163-191.
- Wenseleers T, Billen J and Hefetz A. 2002. Territorial marking in the desert ant *Cataglyphis niger*: Does it pay to play bourgeois? *Journal of Insect Behavior*, **15**: 85-93.
- Wenseleers T, Hart AG, Ratnieks FLW. 2004. When resistance is useless: policing and the evolution of reproductive acquiescence in insect societies. *The American Naturalist*, **164**: E154-E167.
- Wenseleers T, Ratnieks FL, Billen J. 2003. Caste fate conflict in swarm-founding social Hymenoptera: an inclusive fitness analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**: 647-658.
- Wenseleers T, Ratnieks FLW. 2004. Tragedy of the commons in *Melipona* bees. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **271**: S310-S312.
- Wenseleers T, Ratnieks FLW, Ribeiro MdF, Alves DdA, Imperatriz-Fonseca VL. 2005. Working-class royalty: bees beat the caste system. *Biology Letters* **1**: 125-128.
- Wiernasz DC and Cole BJ. 1995. Spatial distribution of *Pogonomyrmex occidentalis*: Recruitment, mortality and overdispersion. *Journal of Animal Ecology*, **64**: 519-527.
- Wiernasz DC and Cole BJ. 2003. Queen size mediates queen survival and colony fitness in harvester ants. *Evolution*, **57**: 2179-2183.
- Wiernasz DC, Perroni CL and Cole BJ. 2004. Polyandry and fitness in the western harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Molecular Ecology*, **13**: 1601-1606.
- Wilson EO. 1971. *The insect societies*. Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts.
- Whitford WG, Depree DJ, Hamilton P and Ettershank G. 1981. Foraging ecology

of seed-harvesting ants, *Pheidole* spp. in a Chihuahuan desert ecosystem. *American Midland Naturalist*, **105**: 159-167.

Wohlgemuth S., Ronacher B. and Wehner R. 2001. Ant odometry in the third dimension. *Nature*, **411**: 795-798.

Yamamoto M and Del-Claro K. 2008. Natural history and foraging behavior of the carpenter ant *Camponotus sericeiventris* Guerin, 1838 (Formicinae, Camponotini) in the Brazilian tropical savanna. *Acta Ethologica*, **11**: 55-65.

Zazo C, Mercier N, Silva PG, Dabrio CJ, Goy JL, Roquero E, Soler V, Borja F, Lario J, Polo D and Luque L. 2005. Landscape evolution and geodynamic controls in the Gulf of Cadiz (Huelva coast, SW Spain) during the Late Quaternary. *Geomorphology*, **68**: 269-290.