



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Factores que afectan la elección del camino durante la recolección de alimento en hormigas

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires, área Ciencias Biológicas

Lic. Daniel Alejandro Zanola Escalon

Directora de tesis: Dra. Roxana Josens

Consejero de estudios: Dr. Walter Farina

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos Sociales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE). Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE). CONICET

Buenos Aires, 2025

Factores que afectan la elección del camino durante la recolección de alimento en hormigas

RESUMEN

Las hormigas invasoras representan una grave amenaza tanto económica como ecológica. A pesar de los avances en las técnicas de control mediante cebos, la formulación de productos consistentemente atractivos y su manejo eficaz siguen siendo retos importantes, lo que a menudo conduce al fracaso en el control de estas plagas. Considerando que las colonias de hormigas despliegan mecanismos de inmunidad conductual frente a patógenos, se plantea el interrogante de si pueden desarrollar respuestas colectivas frente a cebos tóxicos. Así, el objetivo de la tesis fue estudiar si un alimento nocivo puede generar una respuesta comportamental que desmotiva en la elección del camino de recolección en la hormiga argentina (*Linepithema humile*). Para ello, pusimos a prueba si las obreras abandonan un camino de recolección hacia el cebos tóxico y analizamos la actividad a lo largo del tiempo. Trabajamos con senderos naturales de hormiga argentina al que conectábamos dos puentes (caminos de recolección) donde ofrecíamos solución de sacarosa en uno y cebos tóxicos en otro. Se registró la actividad durante 4 días tanto en los puentes como en el sendero troncal próximo. En otro ensayo, se midió la actividad en los puentes a cada hora durante un día. Los resultados fueron contundentes ya que hubo abandono en los caminos de recolección al cebos tóxico luego de 3 horas, alcanzando una reducción en la presencia de hormigas del 80%, que se mantuvo así durante los 4 días que duró el ensayo. Posteriormente, evaluamos potenciales mecanismos que pudieran subyacer a dicho comportamiento. Planteamos dos hipótesis: 1- el abandono ocurre debido a que las obreras depositan una marca negativa en el puente con el cebos tóxico; y 2- las obreras aprenden a evitar el sitio donde hay una amenaza (establecen una memoria aversiva). Para ello, se colocaron puentes que ofrecían sacarosa, cebos tóxicos o nada junto a un sendero troncal, y luego de establecerse los caminos donde se ofrecía sacarosa y ocurrir el abandono donde se ofrecía el tóxico, se intercambiaron estratégicamente, logrando combinaciones cruzadas que nos permitieron poner a prueba las hipótesis. Así, confirmamos que se formaban memorias aversivas en los sitios donde se ofrece el cebos tóxico, mientras que no se encontró evidencia de una marca negativa. Luego, en una serie de ensayos fuimos descartando diferentes posibles explicaciones alternativas al abandono. El abandono no fue por disminución de la población ya que la actividad en el sendero troncal próximo al tóxico se mantuvo alta. Tampoco fue por saciedad, ya que el puente de sacarosa mantuvo una actividad alta durante todo el estudio. No fue por mortalidad del grupo recolector, ya que, en un experimento de laboratorio, hormigas que ingirieron cebos tóxicos permanecían vivas en 6 horas donde el abandono alcanza un 80%. Finalmente, estudiamos si las hormigas pudieran presentar efectos subletales que les impidan visitar el camino de recolección y a la vez, no se generaría nuevo reclutamiento por no haber otras obreras disponibles (e.g., por estar ocupadas en otras fuentes u otras tareas). En primer lugar, se midió la motilidad, utilizada como un indicador de malestar, resultando que efectivamente fue menor en las hormigas que ingirieron el tóxico después de 3 horas. En ensayos a campo, se pudo demostrar que esta hormiga, aunque se elimine el grupo recolector en un 80%, rápidamente desencadena un nuevo reclutamiento, recuperando los niveles de actividad iniciales. El malestar que pudo limitar la motilidad, lo que a su vez podría actuar como

refuerzo negativo en el establecimiento de la memoria aversiva. Estos resultados desafían la concepción vigente sobre el accionar de los cebos que solo considera que generan mortalidad. En conclusión, durante la tesis se demostró que hay una estrategia comportamental por parte de *L. humile* para abandonar un cebo tóxico, y el área donde éste se encuentra, lo cual tiene enormes implicancias en las tareas de control por cebos en esta hormiga.

PALABRAS CLAVES: *Linepithema humile*, Cebo tóxico, Camino de recolección, Mecanismos de abandono, Memoria aversiva, Malestar.

Factors affecting path choice during food collection in ants

Summary

Many species of ants pose a significant problem due to the damage they cause. Despite advances in environmentally friendly control techniques, the consistent formulation of acceptable baits and their effective management remain challenges in ant control. Ant colonies employ behavioral immunity mechanisms against various pathogens, raising the question of whether they might react similarly to toxic baits. The objective of this thesis was to investigate whether ants develop a collective behavioral strategy that allows them to defend themselves against harmful food—such as the baits used for their control—and to explore the mechanisms underlying this behavior. Experiments were conducted on natural trails of the Argentine ant (*Linepithema humile*), where two bridges (foraging paths) were connected: one with a sucrose solution and the other with toxic bait. Ant activity was recorded over 4 days, both on the bridges and the adjacent main trail. In another assay, activity on bridges was measured every hour for a day. The results showed a significant decrease, approximately 80%, in the presence of ants on the toxic bait foraging path after the first 3 hours of exposure. This low activity remained constant throughout the experiment. Various alternative explanations for the reduction in activity were ruled out, such as the lack of bait palatability, population mortality, satiety (lack of motivation to forage), and in the case of sublethal effects on the bait-foraging group, the absence of available workers to replace them. Potential mechanisms that could have caused this behavior were evaluated. Two hypotheses were proposed: 1) the workers deposit a negative mark on the toxic bait bridge, and 2) the workers learn (establish an aversive memory) that the site represents a threat and avoid returning to it. To test these hypotheses, bridges with sucrose, toxic bait, or no resource were placed, and it was observed that the abandonment occurred on the toxic bait bridge, while activity was high on the sucrose bridge, and there were barely any visits to the bridge without resources. After strategically switching the bridges and comparing different combinations, the formation of aversive memories associated with the toxic bait sites was confirmed, with no evidence of a negative mark. It is suggested that post-ingestion discomfort could act as negative reinforcement in the creation of these associative memories. In a laboratory trial, ants that ingested toxic bait showed reduced motility after one hour of consuming the bait, compared to the control group. In conclusion, ants develop a behavioral strategy of abandoning toxic bait and the nearby area, thus preventing harmful food from

entering the nest. Aversive memory plays a crucial role in implementing this collective behavior. These findings have important implications for ant control using baits.

KEYWORDS: *Linepithema humile*, Toxic bait, Foraging path, Abandonment mechanisms, Aversive memory, Discomfort.

Agradecimientos

Al laboratorio de insectos sociales, que me dio el lugar, las herramientas, los nidos y todo lo necesario para poner llevar a cabo los experimentos. Al CONICET por darme la beca para poder dedicarle a full al doctorado y vivir de forma independiente.

Le agradezco a Roxy mi directora, que fue clave es mi progreso como investigador de principio a fin, me ayudo siempre que tuve alguna duda o quería consultar sobre lo que sea, y me guío siempre que fue necesario.

A los docentes e investigadores que tuve durante toda la carrera y en los cursos que realice en el doctorado que me dieron el conocimiento y la pasión que tengo por la biología donde me metí en el último tiempo en el mundo de las hormigas y la entomología en general.

A mis compas con los que pase lindos momento tomando mates e hicieron más agradable cada día en el labo. También me ayudaron y me escucharon siempre con algún experimento o duda que me surgió.

A Tomer que en la distancia fue un gran investigador que me ayudo y pudimos trabajar muy bien juntos.

A mi familia que estuvo siempre conmigo en todos los momentos. Confiaron en mí y me dieron siempre buena energía.

Mis amigos y compas del Yri (mi segundo hogar) con los que paso la mayor parte del fin de semana desconectando del día a día, disfrutando de naturaleza, risas y hermosos momentos.

No me quiero olvidar de mis amigues de la facu que hice durante la carrera y que sigo viendo hoy en día, mis amigos del secundario con esos tenis y juntaditas, y en el último tiempo mis compas del fulbito con los que la paso genial todas las semanas peloteando.

Y al resto de mis amigos y amigas de toda la vida con las que compartí viajes y lindos momento que hicieron más llevadero y disfrutable este largo viaje que fue el doctorado.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción general.....	8
Hormigas: Organización de la colonia, dieta y estrategias de recolección.	8
Feromonas de camino, información social en el reclutamiento.....	10
Memorias, información privada.....	11
Problemática hormigas plagas e invasoras	12
La hormiga argentina	13
Control de hormigas mediante cebos tóxicos.....	15
Objetivo general:.....	18
Objetivos particulares	18
Capítulo 2. Abandono de camino de recolección a un cebo tóxico: dinámica en días.....	20
Introducción	20
Objetivo general:.....	22
Objetivos particulares:	22
Metodología	23
Área y tiempos de muestreo	23
Preparación de soluciones	24
Ensayos experimentales.....	24
Dispositivo experimental.....	24
Toma de datos.....	28
Análisis estadísticos.....	30
Resultados	31
Caminos de recolección	31
Sendero troncal:.....	34
Discusión	38
Capítulo 3. Abandono de camino de recolección: dinámica en horas..	42
Introducción	42
Objetivo general:.....	42
Metodología	43
Área y tiempos de muestreo	43
Procedimiento.....	43
Ingestión de soluciones.....	44
Análisis estadístico	44

Resultados	45
Caminos de recolección:	45
Sendero troncal:.....	47
Ingestión de soluciones:.....	50
Discusión	51
Capítulo 4. Mecanismos que subyacen al abandono.....	55
Introducción	55
Objetivo general.....	56
Metodología	57
Área y momento de muestreo	57
Soluciones	57
Diseño experimental	57
Análisis estadísticos.....	63
Resultados	64
Análisis cambio de puentes.....	64
Actividad después del cambio de puentes.....	66
Discusión	68
Capítulo 5. Descartando hipótesis alternativas al abandono.....	72
Introducción	72
Metodología	75
1) Hipótesis de baja palatabilidad	75
2) Hipótesis de rápida mortalidad del grupo recolector	76
3) Hipótesis de malestar del grupo recolector junto con falta de reemplazo	78
Metodología 3.a: motilidad.....	78
Metodología 3.b: recuperación de actividad	80
Resultados	82
1) Hipótesis de baja palatabilidad	82
2) Hipótesis de rápida mortalidad del grupo recolector	83
3) Hipótesis de malestar del grupo recolector junto con falta de reemplazo	85
Resultados 3.a: motilidad.....	85
Resultados 3.b: recuperación de actividad	86
Discusión	87
Palatabilidad.....	87
Mortalidad.....	89
Motilidad	89

Recuperación de la recolección:	91
Capítulo 6. Discusión general y Conclusiones.....	93
Implicancias para el control de hormigas	97
Bibliografía.....	100
ANEXO	117
Análisis estadístico Capítulo 2	117
Detalles del modelo principal para los puentes en días:	117
Modelo t1 desglosado para los puentes:	122
Modelo de la dinámica temporal del sendero troncal en días.	126
Análisis estadístico Capítulo 3	132
Modelo la dinámica temporal del GLM en horas en los puentes (caminos de recolección)	132
Modelo sendero troncal a lo largo del día, dinámica temporal en horas.....	137
Detalles modelo ingestión de soluciones:.....	139
Análisis estadístico Capítulo 4	142
Detalles del modelo antes y después cambio de puentes:.....	142
Detalles del Modelo después cambio de puentes estandarizado:	148
Análisis estadístico Capítulo 5	153
Prueba palatabilidad	153
Prueba mortalidad	153
Prueba motilidad.....	155
Prueba recuperación de la actividad.....	158

Capítulo 1. Introducción general

Hormigas: Organización de la colonia, dieta y estrategias de recolección.

Las hormigas son insectos sociales que representan, en términos de ecología y biomasa, uno de los grupos más exitosos e importantes del planeta. Se han descripto más de 14000 especies (16 subfamilias y 343 géneros) y se encuentran distribuidos en una gran diversidad de ambientes (AntWiki, 2024; Hölldobler & Wilson, 1990; Lach et al., 2010; Wilson, 1971). Cumplen importantes servicios ecosistémicos, ya que la construcción de sus nidos mejora el drenaje y aireación de los suelos, además de desempeñar un papel clave en sus interacciones con plantas, microorganismos y otras especies (De Bruyn & Conacher, 1990; Folgarait, 1998; Jones et al., 1994).

Dentro de las colonias, la casta reproductiva está formada por hembras y machos fértiles, mientras que la casta obrera, compuesta exclusivamente por hembras y mayoritaria en la colonia, se encarga de diversas tareas. Las tareas consisten en la construcción, mantenimiento, defensa del nido, cuidado y alimentación de las crías y reinas, además de la recolección de recursos para la colonia, entre otras tareas (Hölldobler & Wilson, 1990; Lach et al., 2010).

La dieta varía ampliamente entre especies. Las hormigas cortadoras de hojas se alimentan principalmente de su hongo simbionte que cultivan en el interior del nido (Hölldobler & Wilson, 2009; Howard, 1988). Otras especies son omnívoras, pudiendo ser oportunistas con distintas presas como fuente de proteínas, y también hay especies con alimentación principalmente nectívora. Su dieta es de carbohidratos obtenida de secreciones de plantas o exudados de hemípteros (Cook & Davidson, 2006; Davidson et al., 2004; Hölldobler & Wilson, 1990). Entre hormigas y hemípteros se establece una relación mutualista, en la cual el hemíptero le brinda alimento mediante el exudado que libera y, por su parte, las hormigas los protegen de ser depredados por enemigos naturales (Lach et al., 2010; Stadler & Dixon, 1998). De forma similar, también hay un beneficio mutuo entre la hormiga y la planta con nectarios extraflorales, donde las hormigas se alimentan de un néctar rico en carbohidratos e incluso nitrógeno o aminoácidos, mientras que la presencia de hormigas en la planta disuade a insectos herbívoros de acercarse (Chamberlain & Holland, 2009).

En las especies de hormigas llamadas nectívoras es común el intercambio boca a boca del alimento líquido que consumen, conocido como trofalaxia. Para ello, la hormiga recolectora carga su buche con el alimento líquido y lo lleva hacia el nido donde lo transfiere a una o varias compañeras de nido. Incluso el alimento almacenado en el buche puede mantenerse como reservorio en caso de escasez de alimento (Hölldobler & Wilson, 1990).

Las hormigas son recolectoras de lugar central, lo que implica que una vez encontrado el alimento no lo consumen en ese sitio, sino que lo trasportan a su lugar central, el nido (Orians & Pearson, 1979). Algunas especies realizan esta recolección de forma individual, mientras que otras lo realizan de forma cooperativa o colectiva. Las decisiones que toman las obreras a la hora de recolectar alimento pueden depender de estímulos del ambiente como también de las necesidades del nido (Devigne & Detrain, 2006). Dichas decisiones pueden comunicarse dentro y fuera del nido mediante señales de diferente modalidad sensorial: ya sean de carácter olfativo, táctiles, visuales, entre otros (Cammaerts & Cammaerts, 1980; Hölldobler & Wilson, 1990; Le Breton & Fourcassié, 2004; Mc Cabe et al., 2006; Traniello, 1983). Así, existen diferentes estrategias de recolección de alimento, dependiendo del grado de cooperación en la realización de la tarea, los canales de comunicación involucrados, etc. La recolección totalmente individual, donde no existe reclutamiento es la forma más simple de recoger alimentos y trasladarlos al nido. La denominada corrida en tandem es considerada el reclutamiento más primitivo y consiste en reclutar a una sola hormiga a la vez hacia la fuente de alimento. La hormiga reclutada sigue de cerca a la reclutadora guiada por señales olfativas que ésta libera, así como por estímulos de contacto mecánico y/o visuales (Chadab & Rettenmeyer, 1975; Franklin et al., 2011; Hölldobler et al., 1974; Hölldobler & Wilson, 2009). También existe el denominado reclutamiento grupal donde hasta 30 obreras pueden seguir a una líder hacia la fuente de alimento (Planqué et al., 2010). Las hormigas reclutadas siguen a la líder principalmente a partir de rastros químicos, aunque también puede estar complementado a señales visuales y/o contacto mecánico (Chadab & Rettenmeyer, 1975; Franklin et al., 2011; Traniello, 1977). Sin embargo, si se elimina la hormiga líder o pierden su rastro, el grupo de seguidoras se disuelve (Chadab & Rettenmeyer, 1975). Por lo tanto, en estas estrategias de recolección a la hora de buscar una fuente de alimento y reclutar no suele involucrar a muchas obreras al mismo tiempo. En cambio, en algunas especies existe el reclutamiento masivo, con alta cooperación, donde la comunicación a partir de feromonas es clave para orientar una gran cantidad de obreras hacia la fuente de alimento (Robinson et al., 2008).

En el reclutamiento masivo, se transfiere la información de una fuente de alimento de un grupo de hormigas a otro mediante las feromonas de camino. Estas feromonas, al igual que

cualquier otra, constituyen una señal liberada por un emisor para brindar un mensaje a uno o más receptores (Hölldobler & Wilson, 1990). Esto se conoce como *información social o pública* (Danchin et al., 2004).

Respecto a las feromonas de camino, las glándulas que la producen se encuentran en el intestino posterior y las feromonas depositadas poseen diferentes compuestos que varían entre especies (Blum & Wilson, 1964; Hölldobler & Wilson, 1990; Traniello, 1977). Sus componentes pueden incluir moléculas como alcoholes, aldehídos, ácido fórmico, terpenos, entre otras (Hölldobler & Wilson, 2009). Dichas feromonas pueden cumplir función de atracción, orientación o ambas (Hölldobler & Wilson, 1990, 2009; Morgan, 2009). Para que se establezca el camino de recolección, primero, una exploradora debe encontrar una fuente de alimento de valor, la cual llevará a que deposite feromona de camino al regresar al nido. Tanto la decisión de depositar feromona de camino como las respuestas que esta puedan generar, dependen de factores externos e internos de los individuos involucrados (Mailleux et al., 2005, 2006).

Feromonas de camino, información social en el reclutamiento

Las feromonas de caminos permiten a las hormigas, entre otras cosas, poder formar senderos que las guiarán a la fuente de alimento desde el nido o viceversa, o bien, uniendo nidos diferentes en aquellas especies donde una misma colonia ocupa diversos nidos separados entre sí. Dichos senderos, cuando son masivos y se utilizan de forma recurrente y persistiendo en el tiempo, y se denominan *senderos troncales* (Hölldobler & Wilson, 1990; Loreto et al., 2013). Las señales químicas (*información social*) presentes en los *senderos troncales* desencadenan una respuesta de seguimiento de la pista química en las recolectoras. A su vez, el rastro químico se va reforzando continuamente, por lo cual, puede durar días e incluso meses (Czaczkes et al., 2015a). Cuando hay recursos efímeros, de corta duración, o recién descubiertos se establecen lo que llamamos *caminos de recolección* que son senderos los cuales se inician por las primeras hormigas que encuentran el alimento o el sitio para anidar y se van reforzando por las hormigas reclutadas que se suman en la tarea (Czaczkes et al., 2013; Hölldobler & Wilson, 1990).

La feromona de camino, además, puede ser utilizada en la búsqueda de nidos, para escapar o reclutar en la captura de una presa, y para guiar la construcción de túneles (Cronin, 2012; Czaczkes et al., 2015b; Hölldobler, 1976). Es importante tener en cuenta que puede ser detectada no solo por contacto con el sustrato donde es depositada sino también en el aire a

una corta distancia (Markl & Holldobler, 1978; Traniello, 1983; Van Vorhis & Baker, 1982b). Respecto a la deposición de feromona, hay individuos que depositan feromona más frecuentemente que otros (Mailleux et al., 2005). Esto se puede identificar por ejemplo en obreras que realizan vueltas en U con mayor frecuencia que otras obreras depositando de esta forma más feromona (Evison et al., 2008; Hart & Jackson, 2006). La intensidad de la marca puede variar también según factores intrínsecos de la colonia como también del exterior, y por consiguiente la marca que deposite puede ser mayor por ejemplo ante un aumento en el tiempo de inanición de la colonia, una menor distancia a la fuente de alimento y una mayor calidad del recurso encontrado (Devigne & Detrain, 2006; Hangartner, 1969). A su vez la preexposición de la feromona de camino puede modular la posterior evaluación de un determinado recurso (Rossi et al., 2020). Respecto a los factores intrínsecos en la colonia podemos encontrar que en escasez de alimento hay hormigas con diferentes motivaciones para ser reclutadas (Mailleux et al., 1999). En definitiva, las feromonas de camino juegan un papel crucial en la organización social y la eficiencia de las colonias, permitiendo el establecimiento de senderos troncales y caminos de recolección que optimizan la búsqueda de recursos. A su vez, estos rastros no solo facilitan la comunicación entre las obreras, sino que también reflejan las dinámicas internas de la colonia y su respuesta a diversos factores.

Memorias, información privada

Toda información que un individuo toma del ambiente directamente (sin la intervención de otros individuos) es lo que llamamos *información privada* (Danchin et al., 2004). Por ejemplo, al visitar repetidamente una fuente de alimento, la información almacenada en la memoria de una obrera (*información privada*) también juega un rol clave en su capacidad para realizar eficientemente la tarea. La misma puede ser de corto plazo (menos de 1 hora), mediada por neurotransmisores o de largo plazo (mayores de 24 horas), en las cuales es necesario la síntesis de proteínas (Guerrieri et al., 2011). Las hormigas han mostrado tener gran capacidad de aprendizaje, tanto para establecer memorias olfativas (Dupuy et al., 2006; Josens et al., 2009; Provecho & Josens, 2009; Wagner & Czaczkes, 2023) como memoria espacial o de navegación (Collett & Collett, 2002; Galante et al., 2023; Narendra et al., 2007; Wagner & Czaczkes, 2023) lo que les permite ser más eficientes a la hora de ir a buscar un alimento y/o de regresar al nido.

En las especies donde no existe reclutamiento, gran parte de las actividades se basan en la información privada (Freas et al., 2021; Narendra et al., 2007). En cambio, cuando el

reclutamiento está presente, la recolección combina información social (feromonas de camino, estimulación táctil, olores aprendidos en trofalaxia, etc.) con información privada (memorias de distinta modalidad sensorial o naturaleza, establecidas en las visitas a la fuente de alimento). Esto permite optimizar el rendimiento gracias a la mejora que aporta el aprendizaje, por ejemplo incrementando la velocidad de forrajeo confiando tanto en su recuerdo como en las señales de la feromonas (Czaczkes et al., 2011). También esta sinergia es fundamental en entornos más complejos donde es más difícil recordar la ruta o cuando hay muchas fuentes de alimentación y las mismas son cambiantes en el tiempo (Czaczkes et al., 2013; Czaczkes et al., 2015a). En resumen, las estrategias de reclutamiento en masa y el uso de información social y privada son extremadamente diversas y varían considerablemente según el contexto. A continuación, profundizaremos en el caso de las hormigas plagas e invasoras, especies que, al compartir muchas de estas características, han logrado ser altamente exitosas tanto en entornos urbanos y agrícolas, como naturales.

Problemática hormigas plagas e invasoras

En los ambientes urbanos encontramos muchas especies de hormigas que se consideran plagas ya que invaden los hogares generando diferentes problemas. Algunas pueden hacer nidos adentro, carcomiendo cimientos, aislantes, maderas estructurales, y pudiendo incluso afectar circuitos eléctricos, electrodomésticos, etc. A estas hormigas se las suele denominar como plagas estructurales y entre ellas tenemos por ejemplo a las hormigas carpinteras del género *Camponotus* (Field et al., 2007; Klotz et al., 1995; Santos, 2016).

Así como anidan en hogares, también lo hacen en lugares sensibles como hospitales y centros de salud (Beatson, 1972; Josens et al., 2014). Lo cual es muy preocupante, ya que podrían actuar también como potenciales vectores mecánicos de patógenos (Cholewiński et al., 2017; Lise et al., 2006; McDonald et al., 2012; Santos, 2016). Esto significa que pueden transportar bacterias y otros patógenos desde un lugar a otro, contaminando instrumental estéril, heridas, quirófanos, etc. Se cree que pueden jugar un rol importante en la transmisión de infecciones intrahospitalarias (Cholewiński et al., 2017).

Además, la actividad de las hormigas plagas no se limita solo a los entornos urbanos, ya que pueden generar grandes pérdidas económicas en el ámbito agrícola y forestal. Por ejemplo, las hormigas cortadoras son conocidas por su impacto negativo en este aspecto, siendo incluso muy difícil de combatir (Cherrett, 1986; Folgarait et al., 1996; Pérez et al., 2011). Otras plagas

agrícolas son las hormigas que poseen un mutualismo con hemípteros, ya que disminuyen los ataques de los enemigos naturales de estos, por lo cual, sus poblaciones crecen sin este control, perjudicando a los cultivos infectados (Lach et al., 2010; Stadler & Dixon, 1998). Los ejemplos más comunes de pérdidas por hemípteros defendidos por hormigas se dan principalmente en cítricos y viñedos (Calabuig et al., 2014; Itioka & Inoue, 1996; Mgocheki & Addison, 2009).

Muchas de estas especies fueron llevadas accidentalmente fuera de su rango nativo donde lograron establecerse y en muchos casos se vuelven hormigas exóticas invasoras. Las especies exóticas invasoras plantean un problema global importante, que afecta profundamente a los ecosistemas naturales y antropizados (Bertelsmeier, 2021; Hölldobler & Wilson, 1990; Holway et al., 2002a; Moller, 1996; Porter & Savignano, 1990). Más de 200 especies de hormigas han establecido poblaciones más allá de sus áreas de distribución nativas (Holway et al., 2002a). De estas, 19 están incluidas en la base de datos de especies invasoras de la UICN, con cinco especies (*Linepithema humile*, *Solenopsis invicta*, *Wasmannia auropunctata*, *Anoplolepis gracilipes*, *Pheidole megacephala*), clasificadas entre las "100 peores especies exóticas invasoras" (Lowe et al., 2000).

Es importante aclarar que la mayoría de las especies consideradas invasoras son también plagas y generan un impacto económico asombroso, estimado en 52 mil millones de dólares estadounidenses, afectando la producción agrícola, sector público y al bienestar social (Angulo et al., 2022). En Argentina, la provincia de Buenos Aires y la cuenca del Paraná conforman una región donde abundan y son originarias muchas de las especies de hormigas más ampliamente invasivas y plagas del mundo (Josens et al., 2017; Lowe et al., 2000; Stanley, 2004).

La hormiga argentina

La hormiga argentina, *Linepithema humile*, es una especie originaria de la cuenca del Río Paraná y su distribución nativa abarca parte de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Wild, 2004). Es una especie pequeña (2,2 a 2,6mm), de color marrón claro a oscuro (Vega & Rust, 2001). Es monomórfica, poligínica, y puede tener centenares de reinas que copulan dentro del nido (Passera & Aron, 1993). Esto último le permite dividir la colonia por budding (gemación) y así ir estableciendo distintos nidos que pueden permanecer interconectados (Suarez et al., 2000). Esto también le permite tener una estructura poblacional conocida como Unicolonial, donde una gran cantidad de nidos diferentes están ocupados por una gran colonia. Su

alimentación es principalmente nectívora a través de su asociación a hemípteros y nectarios extra florales (Baker et al., 1985; Costello & Welch, 2014; Lach, 2008). Es una especie que se ha convertido en una plaga a escala mundial, especialmente en Europa donde es la invasora más importante (Blight et al., 2012; Cammell et al., 1996; Carpintero et al., 2005; Kenis & Branco, 2010; Way et al., 1997).

Es reconocida también como plaga urbana (Knight & Rust, 1990a; Suarez et al., 2000; Vega & Rust, 2001). En ambientes urbanos produce perjuicios, como molestia dentro del hogar y potencial vector de patógenos (Ipinza-Regla et al., 2015; Klotz et al., 2007, 2008). Sin embargo, actualmente también se la considera plaga en sistemas agrícolas, donde se asocia con hemípteros que se alimentan del floema, afectando el crecimiento y productividad de las plantas hospedantes y alterando la actividad de los enemigos naturales de estas plagas agrícolas (Dale, 1974; Dreistadt et al., 1986; Flanders, 1951). Su presencia particularmente en viñedos y cultivo de cítricos genera grandes pérdidas en muy diversas partes del mundo (Daane et al., 2007, 2008; Moreno et al., 1987).

Una de las claves de su éxito como especie invasora es el fortalecimiento de su unicolonialidad en las regiones que invade. Esto significa que sus nidos no se agreden entre sí y pueden extenderse sobre amplias áreas, formando lo que se conoce como supercolonias (Holway et al., 1998; Suarez et al., 2008; Tsutsui & Case, 2001). Dicha estructura, sumado a su comportamiento agresivo contra otras especies, le permite tener una alta densidad poblacional y ser más eficiente en la utilización de los recursos (Buczkowski et al., 2004; Giraud et al., 2002; Holway et al., 1998; Ward & Harris, 2005). De este modo, obtienen una ventaja competitiva sobre otras especies de hormigas, lo que provoca el desplazamiento de las hormigas nativas, efecto negativo en los invertebrados e incluso sobre vertebrados (Alvarez-Blanco et al., 2017; Chen & Nonacs, 2000; Human & Gordon, 1996; Silverman & Brightwell, 2008; Suarez et al., 2005, 2000; Suarez & Case, 2002). También puede impactar en procesos ecológicos importantes como la dispersión de semillas o la polinización, lo que afecta aún más la biodiversidad nativa (Blancafort & Gómez, 2005; Bond & Slingsby, 1984; Cole et al., 1992; Gómez et al., 2003; Gómez & Oliveras, 2003; Gordon & Human, 1999; Human & Gordon, 1996; Visser et al., 1996).

La hormiga argentina utiliza feromona de camino que produce mediante la glándula de Dufour y sirve para el reclutamiento masivo a una fuente de alimento, así como también para explorar un área nueva (Aron et al., 1989; Cavill et al., 1980; Deneubourg et al., 1990; Greenberg & Klotz, 2000). La duración de su feromona es de aproximadamente 1 hora y, a diferencia de la mayoría de especies las cuales depositan sólo al regresar al nido desde una fuente de alimento,

la hormiga argentina puede depositar tanto a la ida como a la vuelta (Aron et al., 1989, 1993; Van Vorhis & Baker, 1982a). Además, hay evidencias de que las forrajeras puedan utilizar memorias asociativas de claves visuales para la orientación (Aron et al., 1993), olfativas (Rossi et al., 2020; Wagner et al., 2023), o memorias de navegación (Galante et al., 2023; Wagner & Czaczkes, 2023). La trofalaxia también interviene en el reclutamiento, la cual puede realizar no solo en el nido, sino también directamente a obreras que se encuentran en los caminos de recolección, potenciando así el número de hormigas reclutadas (Aron et al., 1989; Flanagan et al., 2013; Sola et al., 2013). Es capaz de recorrer regularmente grandes distancias, teniendo en cuenta su pequeño tamaño (Hogg et al., 2018; Latty et al., 2017; Reid et al., 2011). Generalmente, cuando descubren una fuente de alimento, establecen un nuevo nido bien cercano, hasta que el alimento se agota (Silverman & Nsimba, 2000). Este tipo de estrategia les permite rápidamente monopolizar los recursos.

En resumen, es una especie con una gran variedad de recursos para realizar una recolección eficiente y con un comportamiento y características que la hacen una especie muy invasora, plaga urbana y agrícola en todo el mundo y por ello se la suele controlar mediante cebos tóxicos.

Control de hormigas mediante cebos tóxicos

Para controlar hormigas invasoras y/o plagas se han utilizado muchos métodos. Tradicionalmente, se las suele controlar usando insecticidas en espray, líquidos, polvos o emulsiones que actúan principalmente como tóxicos de contacto (Stanley, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que no es lo más eficiente ya que, generalmente, solo mata a una pequeña población de las obreras que buscan alimento, pero la colonia en su mayoría no es afectada (Stanley, 2004). Por lo cual, se sugiere utilizar cebos tóxicos ya que las hormigas los recolectan como si fuera alimento, los trasladan al nido y los transfieren entre compañeras de la colonia. De ese modo, estos cebos pueden afectar también a otras obreras, reinas o a las crías (Greenberg, 1997; Lee, 2000; Santos, 2016). Además, estos métodos son menos perjudiciales para el medio ambiente disminuyendo la cantidad de insecticida utilizado, minimizando así los efectos secundarios no deseados (Collins & Callcott, 1998). Más aún, son más específicos para la especie que se desea controlar, reduciendo la exposición al tóxico de otras especies (Forschler & Evans, 1994; Josens et al., 2017; Rust et al., 2003). A su vez, como las especies de hormigas invasoras suelen mostrar un reclutamiento masivo, a menudo monopolizan los recursos, lo que

en el caso de cebos tóxicos minimiza el impacto en las especies no objetivo (Cabrera et al., 2021; Vega & Rust, 2003). De todas formas, es fundamental conocer el comportamiento de la especie a controlar para colocar los cebos de manera estratégica, maximizando su acceso e ingestión en la especie objetivo y reduciendo el impacto sobre otras especies (Cabrera et al., 2021). Otra ventaja es que no es necesario encontrar o acceder a los nidos, que no siempre es factible, ya que las hormigas localizan el cebo, lo trasladan al nido y lo distribuyen al resto de la colonia (Lee, 2000).

Los cebos tóxicos para hormigas están compuestos por una sustancia atrayente la cual puede ser sólida o líquida (usualmente comida); en pocos casos se adiciona también feromona de camino para potenciar el reclutamiento (Greenberg & Klotz, 2000; Sunamura et al., 2011) y el compuesto activo, un tóxico, el cual debe ser letal para las hormigas, pero con efecto retardado (Stringer et al., 1964). Esto es necesario para que las recolectoras puedan tener el tiempo necesario para reclutar, y trasladar grandes cantidades del cebo al nido (Hooper-Bùi & Rust, 2001). En general, la definición del formulado de un cebo dependerá de la especie blanco considerando su comportamiento y dieta. Es fundamental que el cebo resulte atractivo, palatable, para las hormigas, ya que de eso depende en gran medida un consumo suficiente y sostenido a fin de garantizar la eficacia en su accionar (Baker et al., 1985; Krushelnicky & Reimerz, 1998; Krushelnicky & Reimer, 1998; Silverman & Roulston, 2001). Por ejemplo, en pruebas de laboratorio, cebos de proteínas, carbohidratos y lípidos fueron todos atractivos para *Solenopsis invicta* (Stein, 1987). En cambio, para otras especies se sugiere utilizar cebos cuyo alimento sea solución de sacarosa (Baker et al., 1985; Rust et al., 2003). Respecto a estos últimos tipos de cebos, se ha demostrado que son más efectivos en forma líquida que en gel ya que son ingeridos con mayor rapidez y abundancia (Josens et al., 2016; Silverman & Roulston, 2001). Un factor crucial en la formulación de un cebo es la concentración de cada uno de los componentes. En el campo, un cebo azucarado puede evaporarse resultando en altas concentraciones generando cristalización del azúcar lo cual interfiere negativamente en la preferencia de las hormigas (Klotz et al., 1998). Para *L. humile*, son recomendables concentraciones intermedias de sacarosa (20 – 25%) ya que promueven un rápido ciclo de forrajeo, alto reclutamiento y máxima carga de buche por individuo (Sola & Josens, 2016). Estos cebos suelen ser utilizados con diferentes tipos de tóxico ya sea fipronil, pyriproxyfen, ácido bórico (H₃BO₃), bórax (borato de sodio, Na₂B₄O₇), entre otros (Krushelnicky et al., 2011). Respecto al ácido bórico y bórax son muy eficientes y se vienen utilizado como insecticida en cebos para hormigas desde hace muchos años (Rust, 1986). Los compuestos borados son sustancias químicas naturales que resultan tóxicas para los insectos que los ingieren (Greenberg et al., 2006; Klotz et al., 1998). Son

esenciales para las plantas y se encuentran naturalmente en ellas, las que lo absorben del suelo como ácido bórico disuelto en agua. El ácido bórico al ser adicionado a un cebo para hormigas, posee un mecanismo de acción lento y de baja repelencia (Daane et al., 2006; Klotz et al., 1996; Klotz & Moss, 1996; Ulloa-Chacón & Jaramillo, 2009).

Su toxicidad es atribuida a su capacidad de alterar el intestino medio de los insectos, lo que provoca su muerte por inanición (Cochran, 1994; Habes et al., 2006). Además de las alteraciones del revestimiento intestinal, también se cita al ácido bórico como posible neurotóxico (Habes et al., 2006), así como por sus efectos deshidratantes (Klotz & Moss, 1996; Le, 2021). Es importante aclarar que varios de estos efectos, como lo de ser neurotóxico, se detectaron con concentraciones particularmente altas de ácido bórico (mayores al 8% p/p) las cuales son concentraciones muy fuera del rango que se usa para control. También ofrecido en seco en muy altas concentraciones en una única dieta posible durante varios días, se observó que afecta los niveles de las enzimas acetilcolinesterasa y glutatión S-transferasa en cucarachas (Habes et al., 2006).

Pese a la gran eficiencia que muestran los cebos en los estudios de laboratorio (Klotz et al., 1996, 1997; Knight & Rust, 1990a), la realidad es que en situaciones de manejo reales, las hormigas son especialmente difíciles de controlar (Howse et al., 2023). Los argumentos esgrimidos en muchos casos refieren que el área tratada no fue lo suficientemente grande y, por ende, con el tiempo puede ser reinvidada desde la periferia no tratada (Klotz et al., 1998; Vega & Rust, 2003). También es real que la aceptación y consumo de un cebo tóxico puede verse afectado por una gran disponibilidad de fuentes alternativas de alimento naturales (Kay, 2002; Silverman & Roulston, 2001; Sudd & Sudd, 1985; Vega & Rust, 2003). En definitiva, la aceptación de un cebo tóxico en una situación específica puede no reflejar su aceptación en otros escenarios, ni su eficacia en un programa de control general (Sola et al., 2013). Esto hace que la formulación de cebos consistentemente aceptables y su manejo sean aspectos especialmente desafiantes en el control de hormigas invasivas (Baker et al., 1985; Kay, 2002; Rust et al., 2004; Silverman & Roulston, 2001; Sola et al., 2013; Sudd & Sudd, 1985).

En este contexto, nos centraremos en estudiar el comportamiento de la hormiga argentina, un modelo biológico relevante debido a su carácter de plaga e invasora, tanto a nivel local en distintas regiones de Argentina, como a nivel mundial. Actualmente, los métodos de control sugeridos en el ambiente urbano para esta especie se basan en insecticidas de contacto y aplicación de cebos tóxicos, y en ambientes naturales o agrícola, fundamentalmente cebos (Daane et al., 2008; Klotz et al., 2007, 2008; Nelson & Daane, 2007; Soeprono & Rust, 2004),

siendo los cebos líquidos con base de sacarosa especialmente atractivos para esta especie (Baker et al., 1985; Krushelnicky & Reimer, 1998). En los últimos años se han desarrollado impresionantes innovaciones tecnológicas, como el desarrollo de matrices de geles superabsorbentes que se utilizan para absorber los cebos líquidos y así poder aplicarlos como si fueran sólidos facilitando ampliamente la forma de aplicación (Buczkowski et al., 2014; Cabrera et al., 2021; Choe et al., 2021; Rust et al., 2015). Sin embargo, pese a los años de estudio y experiencia y a las innovaciones, eliminar poblaciones establecidas de hormigas argentinas ha demostrado ser un desafío y se ha reportado un éxito limitado (Knight & Rust, 1990b; Vega & Rust, 2003). En estudios de campo, los cebos a menudo no logran controlar a las hormigas argentinas durante más de 60 días, y a menudo hay un resurgimiento de las poblaciones, o una reinvasión después del tratamiento por hormigas de áreas cercanas no tratadas (Klotz et al., 1998; Krushelnicky et al., 2011; Vega & Rust, 2003). Por ello, mejorar nuestra comprensión de las hormigas invasoras y abordar los desafíos que plantean debería ser una prioridad para los esfuerzos de conservación, y esto es cierto, considerando que menos de la mitad de los controles son exitosos (Hoffmann, 2011; Hoffmann et al., 2016). Por estas razones, nos interesa evaluar más en profundidad el comportamiento de la especie *L. humile* ante la presencia de un cebo tóxico. En particular estudiar si hay algún tipo de comportamiento que realicen las hormigas que atente contra la efectividad de los cebos.

Objetivo general:

Estudiar la respuesta comportamental de las hormigas al cebo tóxico para determinar si existe abandono del camino de recolección. De ser así, evaluar potenciales mecanismos subyacentes al abandono.

Hipótesis general: Las hormigas despliegan una estrategia de defensa ante el cebo tóxico, que consiste en abandonar y/o disminuir la actividad en dicho camino de recolección.

Objetivos particulares

Sección 1: Determinar si existe abandono:

Objetivo 1: Estudiar si en situaciones de control con cebos tóxicos ocurre abandono del camino de recolección hacia el cebo; en cuyo caso, se analizará la dinámica del abandono.

Sección 2. Evaluar potenciales mecanismos que subyacen al abandono:

Objetivo 2: Poner a prueba si hay presencia de feromonas negativas y/o formación de memorias aversivas asociadas a un camino de recolección abandonado.

Sección 3. Descartar hipótesis alternativas al abandono:

Objetivo 3a: Evaluar que el cebo tóxico utilizado en los ensayos de abandono es palatable en las condiciones del ensayo, esto es, en los caminos troncales.

Objetivo 3b: Analizar el efecto del cebo tóxico sobre la mortalidad de las hormigas.

Objetivo 3c: Estudiar si el cebo tóxico genera malestar post-ingestión en las hormigas.

Objetivo 3d: Comprobar si, después de eliminar al grupo recolector que visita una fuente de alimento (sin tóxico), se recupera la actividad en un camino de recolección; en cuyo caso, evaluar cuánto tiempo toma.

Capítulo 2. Abandono de camino de recolección a un cebo tóxico: dinámica en días

Introducción

La efectividad de los cebos tóxicos depende en gran medida del atractivo del cebo para las hormigas que buscan alimento, de modo de asegurar un consumo adecuado y sostenido en el tiempo (Baker et al., 1985; Krushelnicky & Reimer, 1998; Silverman & Roulston, 2001). Sin embargo, la aceptación, el reclutamiento y el consumo de cebos tóxicos pueden verse influenciados por cambios en la disponibilidad de fuentes naturales alternativas de alimentos (Kay, 2002; Silverman & Brightwell, 2008; Sudd & Sudd, 1985; Vega & Rust, 2003), y los requerimientos nutricionales propios de la colonia (Falibene & Josens, 2008; Josens & Roces, 2000; Mailleux et al., 1999, 2006, 2010a, 2010b). Por lo tanto, la aceptación de un cebo tóxico observada en una situación específica puede no reflejar necesariamente su aceptación en otros escenarios (Sola et al., 2013) o la efectividad cuando se usa en un programa de control (Howse et al., 2023). La formulación de cebos consistentemente aceptables ha demostrado ser uno de los aspectos más desafiantes del control de hormigas invasoras (Baker et al., 1985; Kay, 2002; Silverman & Roulston, 2001; Sola et al., 2013; Sudd & Sudd, 1985).

En la bibliografía disponible sobre el control de hormigas mediante cebos tóxicos, el “éxito de control” se define generalmente como la reducción de la presencia de hormigas en los sitios tratados. Este resultado suele atribuirse a una alta mortalidad en las colonias, incluso cuando los nidos no son observados directamente (Buczkowski et al., 2014; Greenberg et al., 2006; Klotz et al., 1998; Rust et al., 2004; Vega & Rust, 2003). Una medida del éxito del control se suele hacer a partir de mediciones de hormigas presentes en el área antes y después de aplicar el cebo, estimando el porcentaje de reducción en la presencia de hormigas (Daane et al., 2008; Greenberg et al., 2006; Klotz et al., 2008; Rust et al., 2002). Además, es importante notar que la mayoría de las mediciones post-tratamiento son realizadas al menos 24 horas luego de la aplicación de los cebos, por lo que no es posible conocer qué ocurre con la actividad de las hormigas durante o inmediatamente después de la aplicación, en escalas temporales más cortas.

En estudios de campo, los cebos a menudo no logran controlar a las hormigas por más de 60 días. Con frecuencia, se registra un resurgimiento en la presencia de hormigas antes de

ese tiempo, lo cual se interpreta generalmente como una reinvasión por hormigas provenientes de áreas cercanas no tratadas (Rust et al., 1996; Vega & Rust, 2003).

Las hormigas emplean una variedad de estrategias de comportamiento para evitar sustancias y situaciones peligrosas. Por ejemplo, hormigas del género *Linepithema* abandonan los caminos de recolección o los recursos alimenticios en presencia de moscas parasitoides (fórpidos) y evitan áreas o momentos del día frecuentados por estas moscas (Folgarait & Gilbert, 1999; Guillade & Folgarait, 2015; Orr & Seike, 1998). Del mismo modo, las hormigas evitan senderos que presentan cierto riesgo de mortalidad, mientras continúan buscando alimento en áreas seguras (Nonacs & Dill, 1991, 1990). Las hormigas cortadoras de hojas aprenden rápidamente a evitar recolectar las hojas que contienen fungicidas que dañan sus jardines de hongos (Saverschek et al., 2010; Saverschek & Roces, 2011). Las superficies pegajosas, que pueden resultar peligrosas para las hormigas, son cubiertas con tierra y escombros, tornándose así áreas seguras (Wen et al., 2021; Wheeler, 1910). Por otro lado, las hormigas evitan mudarse a nidos que contienen cadáveres de congéneres. De hecho, muestran una amplia variedad de comportamientos llamados de “inmunidad social” cuyo objetivo es evitar la propagación de enfermedades. Las pupas cargadas de esporas se desinfectan o, si están demasiado infectadas, se destruyen (Pull et al., 2018). Cuando las hormigas detectan un patógeno en el ambiente, modifican la red de interacción de la colonia para aislar a las recolectoras de las reinas (Stroeymeyt et al., 2018).

Considerando la diversidad de estrategias comportamentales que las hormigas presentan ante diferentes situaciones que implican un riesgo para la colonia, nos preguntamos: ¿poseen las hormigas mecanismos de comportamiento que les permitan protegerse de los cebos tóxicos? Es llamativo que, aunque se ha dedicado mucho esfuerzo de investigación y desarrollo de cebos atractivos y efectivos, la respuesta comportamental ante los cebos y particularmente ante posibles efectos subletales, no ha sido estudiada.

Nos interesa estudiar si existe una respuesta comportamental que anule o minimice el impacto de los cebos tóxicos dentro de la colonia, particularmente, un abandono del camino de recolección hacia un cebo tóxico. Trabajamos para ello con senderos naturales de hormiga argentina (*L. humile*) en áreas fuertemente antropizadas donde es común encontrar largos caminos rectos siguiendo las líneas de las construcciones. Definimos los senderos troncales como caminos largos con alta actividad de hormigas que tienden a persistir durante meses o incluso años. Definimos los caminos de recolección como caminos recientemente establecidos que se bifurcan de los senderos troncales hacia una fuente de alimento que proporcionamos

(Flanagan et al., 2013). Proponemos que las hormigas presentan una estrategia de abandonar no solo el recurso en sí (el cebo), sino abandonar el camino de recolección hacia el mismo, e incluso pudiendo afectar la actividad en el sendero troncal adyacente. Definimos como abandono a una *disminución significativa* en el número de hormigas circulando en el sendero que conduce al cebo. Dicha reducción de la actividad, además, debe ser *estable* en el tiempo, esto es, *sin recuperar los niveles iniciales de actividad*. Dado que se propone como una estrategia comportamental, implica que la reducción en el entorno del cebo no puede deberse a una reducción de la población presente en el área, ni a saciedad del recurso alimentario contenido en el cebo. Por lo cual, se analizará la dinámica de la actividad en dos caminos de recolección: uno hacia un cebo tóxico y el otro hacia una fuente de alimento artificial. Asimismo, se evaluará la actividad en el sendero troncal adyacente.

Objetivo general:

Estudiar la respuesta comportamental de las hormigas al cebo tóxico para determinar si existe abandono de camino de recolección.

Hipótesis general: Las hormigas despliegan una estrategia de defensa ante el cebo tóxico, que consiste en abandonar y/o disminuir la actividad en dicho camino de recolección.

Objetivos particulares:

Objetivo particular 1: Estudiar si existe abandono del camino de recolección que lleva hacia un cebo tóxico evaluando la dinámica de la actividad de las hormigas a lo largo de los días.

Hipótesis 1: la presencia del cebo tóxico genera una disminución en la presencia de hormigas en ese sendero.

Predicción 1: habrá una disminución de la actividad y presencia de hormigas en el camino de recolección al cebo tóxico y se mantendrá baja durante todo el experimento.

Objetivo particular 2: estudiar si el comportamiento de abandono afecta al sendero troncal y evaluar si el cambio actividad es diferente en intensidad y tiempo al camino de recolección al cebo tóxico.

Hipótesis 2a: la actividad en el sendero troncal adyacente al camino de recolección al cebo disminuye.

Hipótesis 2b: la actividad de las hormigas en el sendero troncal y en el camino de recolección al cebo tóxico responde de manera asincrónica a la presencia del cebo.

Predicción 1a: habrá disminución en la cantidad de hormigas en el sendero troncal luego de un tiempo de estar presente el cebo, ampliando el área afectada progresivamente.

Predicción 2b: la actividad en el sendero troncal no se ve afectada en los primeros conteos del experimento.

Objetivo particular 3: demostrar que si existe una disminución en la recolección del cebo tóxico no se debe a que las hormigas están saciadas de ese recurso.

Hipótesis 3: el abandono del camino de recolección por parte de las hormigas no se debe a una falta de interés en recolectar el recurso (azúcar).

Predicción 3: la actividad en el camino de recolección a la fuente de sacarosa se mantendrá alta durante todo el experimento.

Metodología

Área y tiempos de muestreo

Los experimentos se realizaron a campo en el campus de la Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, ubicado en el barrio de Núñez, C.A.B.A, Argentina (34° 32' 25" S; 58 ° 26' 45" O). Esta área se encuentra en el centro-este del país, en la orilla occidental del Río de la Plata. El clima es templado con precipitaciones mensuales que variaron entre 50 y 154 mm y una temperatura media de 25,1°C en verano 2022/2023 (Servicio Meteorológico Nacional (SMN), Argentina). Ciudad Universitaria presenta numerosos parches verdes con árboles y

vegetación baja, rodeados de edificios, estacionamientos y un campo de deportes. Además, se encuentra lindante a la Reserva Natural Costanera Norte. Esta área resulta ideal para los experimentos debido a la alta abundancia de senderos troncales de *L. humile*. Los experimentos se realizaron durante los meses más cálidos de diciembre a abril de 2021, 2022 y 2023, cuando las hormigas están más activas y se pueden ubicar muchos senderos troncales alrededor del perímetro de los edificios, o siguiendo el cordón de las calles. Se realizaron 5 réplicas que corresponden a cinco senderos troncales diferentes, los cuales estuvieron a una distancia mayor a 50 metros entre sí.

Preparación de soluciones

Se ha demostrado en trabajos previos que para la utilización de cebos en *L. humile* es recomendable que sean de concentraciones intermedias de azúcar. Una concentración de 20% resulta óptima para esta especie ya que promueve rápidos ciclos de forrajeo, alta carga de buche y un buen reclutamiento (Josens et al., 2017; McCalla et al., 2020; Silverman & Brightwell, 2008). Las soluciones de sacarosa se prepararon con azúcar blanca común y agua de grifo. El cebo tóxico se preparó añadiendo ácido bórico al 3% p/v (Biopack) a la solución de sacarosa 20%. Se eligió el ácido bórico porque las hormigas argentinas aceptan bien los cebos azucarados con este compuesto activo (Moauro & Josens, 2023; Sola et al., 2013). La concentración responde a que es bien aceptada por las hormigas, y al no ser tan baja permite obtener un efecto más rápido (Sola et al., 2013).

Ensayos experimentales

Dispositivo experimental

Para establecer los caminos de recolección se utilizaron dos puentes, los cuales fueron construidos con listones de madera ligera (cada listón de 300 mm de largo, 10 mm de ancho y 5 mm de espesor). Cada puente estaba compuesto por dos listones (o sea, 60 cm en total), uno horizontal y otro articulado, inclinado hacia abajo, con su extremo apoyado cerca de un sendero troncal para facilitar el acceso (Fig. 2.1). El puente se apoyaba sobre postes verticales (de aprox. 25 cm de altura) clavados en yeso endurecido en el fondo de un vaso de plástico. Para los experimentos el vaso se llenaba con agua y detergente, impidiendo que las hormigas puedan entrar o salir del puente por los postes verticales; garantizando que el acceso a la plataforma se realice exclusivamente a través de la entrada del puente. Dado que en ensayos preliminares

varios puentes aparecían al día siguiente caídos por el viento, se rodeó el vaso plástico con ladrillos para ofrecer mayor estabilidad al dispositivo.

Cada puente tenía en su extremo final una arena de recolección ($8 \times 5,5$ cm) en donde se colocaban 4 tubos de 9 ml con tapón de algodón contenido una de las dos soluciones: sacarosa o el cebo tóxico (Fig. 2.2). El puente con sacarosa se utilizó como control positivo y para demostrar que cualquier reducción observada en la actividad de las hormigas en el puente hacia el cebo tóxico no es causada por la saciedad de azúcar, mientras que el puente con el cebo tóxico es el tratamiento y es el que nos interesa para evaluar si sucede el abandono.

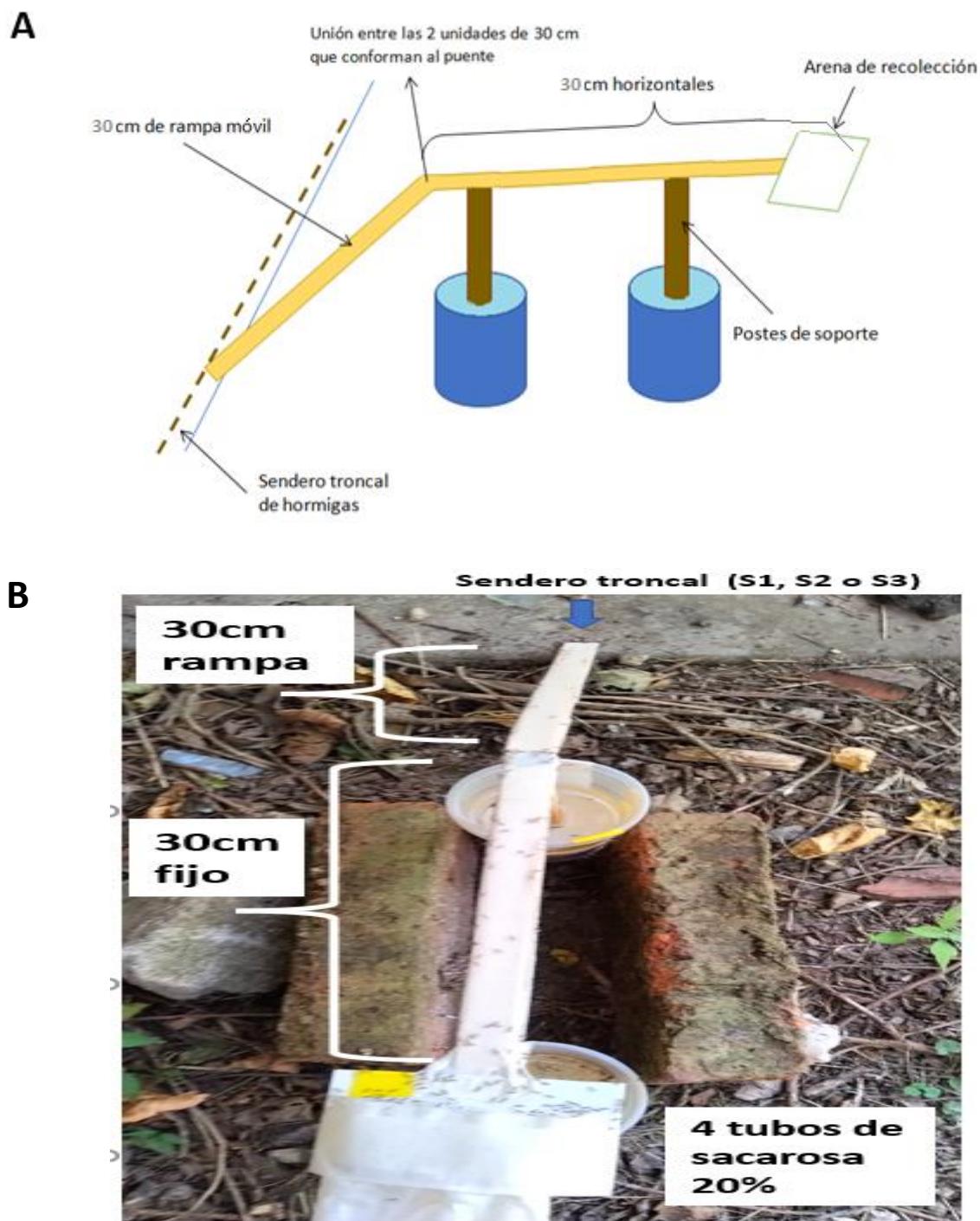


Figura 2.1. A: Puente de recolección, formado por dos unidades de 30 cm de longitud. **B:** Foto de un puente utilizado para el Experimento.

En cada réplica, para poder posicionar los puentes, primero se debía encontrar un sendero troncal natural de *L. humile* de al menos 12 m de largo y con tráfico bidireccional de más de 100 hormigas/min. Se ubicaban ambos puentes separados, al menos, por 7 metros de distancia entre un puente y otro (Fig. 2.2). Para estimular a las hormigas a subir el puente y que se establezca el camino de recolección, se colocó una lámina de plástico (2x7 cm) con gotas de 20% p/p de sacarosa al lado del sendero troncal, directamente al lado de la entrada del puente (Fig. 2.3). Muy rápidamente, 1 o 2 min, se llenaba de hormigas ingiriendo de las gotas. En ese momento, las láminas se colocaron cuidadosamente al final del puente, muy próximo a la arena de recolección. Esto provocó que las hormigas, después de alimentarse, descendieran del puente a través de la rampa, realizando el marcado químico característico e iniciando un rastro de feromonas de camino. Durante esta fase inicial, los tubos de alimentación estaban bloqueados, y en ambos puentes se ofrecían gotas de solución de sacarosa para iniciar la actividad. Luego de generarse los caminos de recolección y antes de empezar los conteos experimentales, los alimentadores fueron abiertos ofreciendo en un puente solución de sacarosa y en el otro puente cebo tóxico. Los tubos de alimentación se renovaron al principio y al final de cada día de los experimentos. Sin embargo, ocasionalmente por la mañana los tubos de sacarosa estaban vacíos, por lo que eran rápidamente reemplazados antes del siguiente conteo.



Figura 2.2. Puentes ubicados en contacto con el sendero troncal (marcado en verde). El puente con el cebo tóxico está marcado en rojo y, a más de 7 metros de distancia el puente de sacarosa marcado en amarillo.



Figura 2.3. Inicio de los caminos de recolección: las láminas de plástico (la que se ve en el círculo rojo), una vez llena de hormigas era ubicada con mucho cuidado arriba del puente.

Toma de datos

Para evaluar la actividad en los caminos de recolección con el cebo tóxico y con solución de sacarosa, se filmó cada puente desde arriba durante 3 minutos. A partir de los videos se midió la actividad de las hormigas, cuantificando el número de hormigas que cruzaban una línea imaginaria en dirección hacia la arena de recolección durante los 3 minutos. La actividad se expresó como el número de hormigas que cruzan el punto de medición expresado por minuto.

Para determinar si el abandono se limita al camino de recolección o si también afecta la actividad general del sendero troncal, también medimos la actividad del sendero troncal. Se filmó desde arriba en distintos puntos respecto a la posición de los puentes: en diferentes distancias alrededor del puente tóxico (a 0 metros, 2 metros y 4 metros tanto a la izquierda como a la derecha) y en el sitio del sendero troncal adyacente al puente de sacarosa como control (Fig. 2.4). A partir de los videos se cuantificó la cantidad de hormigas que cruzaban una línea imaginaria en ambas direcciones durante un minuto. Las primeras medidas en el sendero troncal se tomaron un día antes de colocar los puentes (tarde, día 0) y en la mañana antes de colocar los puentes (mañana, día 1). El promedio de estas mediciones constituye la actividad de referencia para el sendero troncal (Tiempo 0). Luego se midió la actividad del sendero troncal al mismo tiempo que las mediciones del camino de recolección.

En este experimento, los puentes se colocaban a las 14 h. realizando la activación usando sacarosa en ambos puentes. Luego de una hora, se realizaba la primera medición de actividad en ambos puentes e inmediatamente se habilitaban los alimentadores. Desde que los alimentadores se habilitaron, se midió la actividad en cada sitio 3 veces a la mañana, separadas por una hora; y 3 veces a la tarde, también separadas por una hora. Dichos valores se promediaron, para dar un valor que caracteriza cada mañana y cada tarde hasta el día 4 del experimento. Para obtener una descripción general del procedimiento experimental, consultar la Fig. 2.5.

Antes de cada medición de actividad, también registramos la temperatura del sustrato utilizando un termómetro láser (termómetro infrarrojo: Megalite ML380), solo para tener un control de las condiciones, ya que se ha demostrado que la hormiga argentina es sensible a altas temperaturas y que además podría influir negativamente en la degradación de los rastros

de feromonas (Heller & Gordon, 2006; Holway et al., 2002b; Van Oudenhove et al., 2011). Por ello, si era posible, se eligieron preferentemente sitios con sombra para ubicar los puentes.

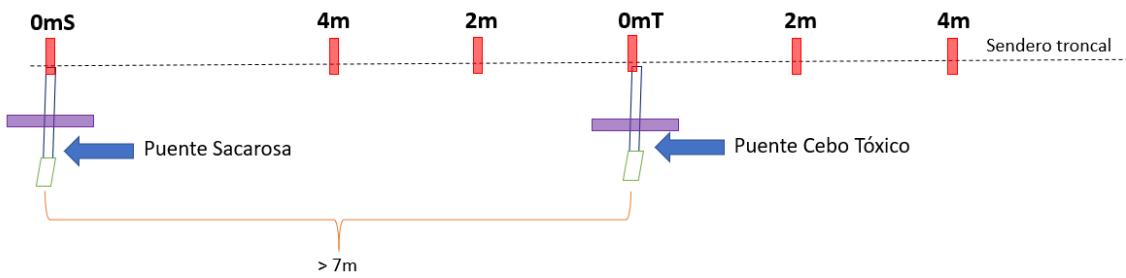


Figura 2.4. Sitios del sendero troncal y ubicación de los puentes. Las franjas rojas indican los sitios donde se tomaron datos en el sendero troncal y las violetas las mediciones en los puentes.

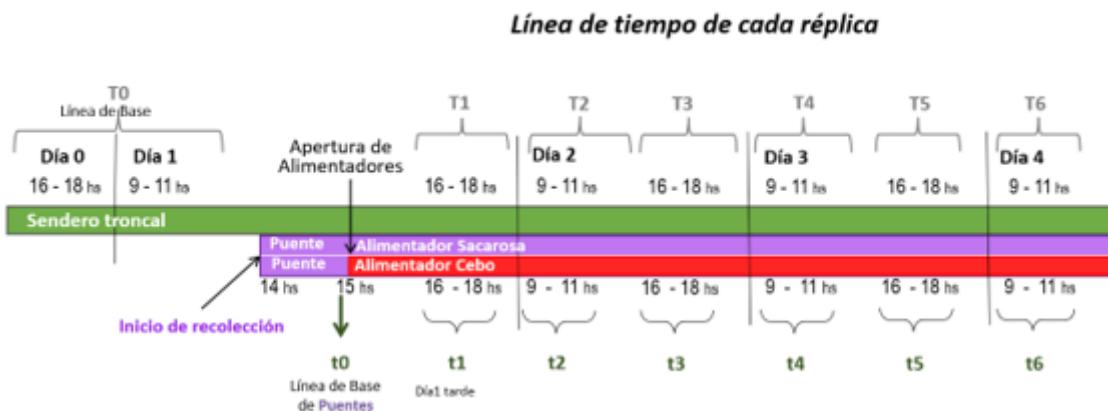


Figura 2.5. Cronología del experimento de dinámica en días y extensión de abandono en los senderos troncales. La barra verde representa el sendero troncal, las barras violetas y rojas representan los puentes; violeta cuando ofrece sacarosa y rojo cuando ofrece cebo tóxico. La actividad inicial se estableció colocando gotas de solución de sacarosa en la zona de alimentación de ambos puentes mientras los tubos (alimentadores principales) estaban bloqueados. Por lo tanto, durante la activación, ambos puentes ofrecen sacarosa (en color violeta). Las llaves indican el momento de las mediciones de actividad de las hormigas. Esta variable es, para los puentes, el número promedio de hormigas por minuto que cruzan una línea imaginaria a mitad de camino a través del puente en dirección a la zona de alimentación, y para el sendero troncal, en ambas direcciones. El tiempo 0 representa la línea base justo antes de abrir los alimentadores principales, es decir, cuando ambos puentes ofrecían solución de sacarosa; a las 9 h para los caminos de recolección (puentes), y el promedio de mediciones del día 0 y de la mañana del día 1 para el sendero troncal. De manera similar, el tiempo 1, el tiempo 2, etc. representan los momentos en

que se midió la actividad de las hormigas en el sendero troncal y en los caminos de recolección, después de que el cebo tóxico estuvo disponible. El tiempo es un promedio de tres conteos realizados durante un período de aproximadamente 2 h, por lo que cada tiempo representa una mañana o una tarde, hasta el Día 4 (teniendo en cuenta el conteo basal en los senderos troncales).

Análisis estadísticos

Nos centramos solo en unos pocos puntos temporales y lugares claves a lo largo del sendero troncal para los análisis estadísticos (diseño de medidas repetidas). Utilizamos GLMM para el análisis de todos los datos de los experimentos. En todos los casos la variable de respuesta fue la actividad de las hormigas, medida como el promedio en el número de hormigas que cruzaban una línea por minuto. Para los puentes, solo se contabilizó la actividad de las hormigas en la dirección hacia los alimentadores; para el sendero troncal se incluyeron ambas direcciones.

Realizamos varios análisis estadísticos, dos enfocados en los puentes y otro en el sendero troncal:

Modelo principal para los puentes: las variables explicativas fijas fueron los tratamientos (2 niveles: Sacarosa y Cebo Tóxico), el tiempo como factor (7 niveles: de t0 a t6) y como variables aleatorias los puentes (10 niveles) y las réplicas ($n = 5$).

Modelo t1 desglosado para los puentes: las variables explicativas fijas fueron los tratamientos (2 niveles: Sacarosa y Cebo Tóxico), el tiempo como factor (3 niveles: Tiempo 1; t1: 1, 2 y 3 h tras el acceso al cebo tóxico) y como variables aleatorias los puentes (10 niveles) y las réplicas ($n = 5$).

Modelo para el sendero troncal: las variables explicativas fijas fueron los sitios (4 niveles: 0 mT – 2 m – 4 m – 0 mS), el tiempo como factor (7 niveles: de t0 a t6) y como variables aleatorias las réplicas ($n = 5$).

El supuesto de homocedasticidad se evaluó utilizando un gráfico de residuos estandarizados frente a valores predichos. La distribución de mejor ajuste para los datos se determinó mediante el índice de dispersión (la razón entre los residuos y la varianza predicha), que resultó ser la distribución binomial negativa en todos los casos. Se realizaron comparaciones por pares de la actividad utilizando el paquete emmeans (Lenth et al., 2023). Se aplicó un ajuste del valor P utilizando el método de dunnettx. Los análisis estadísticos se realizaron en R Studio utilizando el paquete glmmTMB (Brooks et al., 2022). En el Anexo se proporciona una

descripción detallada del enfoque de análisis estadístico adoptado y el código completo y los resultados estadísticos. En resumen, para todos los análisis comparamos la cantidad de las hormigas en puentes de sacarosa y cebo toxico en varios tiempos y lo comparamos con la actividad presente justo antes de abrir los alimentadores (que consideramos como la línea de base). Esto es, porque si bien puede resultar significativa la diferencia entre ambos puentes en un tiempo dado, tal vez, la actividad de cada uno resulte sin diferencias significativas respecto a su actividad basal. Para confirmar el abandono, por cómo lo hemos definido en la presente tesis, necesitamos que la actividad en el puente abandonado (el del cebo tóxico) reduzca significativamente la actividad respecto a la inicial. Además, se midió la actividad en diferentes sitios del sendero troncal también contrastándola con la línea de base. Ver Anexo para más detalles.

Resultados

Caminos de recolección

Ambos puentes inicialmente mostraron niveles de actividad similares al ofrecer gotas de sacarosa (línea de base o tiempo 0: estimador= -0,06; $p= 0,81$). Existe un claro efecto de interacción entre la solución ofrecida en el puente (cebo tóxico o sacarosa) y el tiempo (del tiempo 0 al 6) (Fig. 2.6 y Anexo). La actividad (promedio cantidad de hormigas/min) comienza a diferenciarse levemente entre ambos puentes dentro de las primeras 3 horas posteriores a la apertura de los alimentadores (tiempo 1: estimación= -0,62; $p= 0,03$), con una ligera tendencia a aumentar en el puente de sacarosa y marcada disminución en el puente de tóxico. A partir de la mañana siguiente (tiempo 2), esta diferencia de actividad entre los dos puentes se vuelve mucho más pronunciada, y esta diferencia persiste durante los días siguientes (Fig. 2.6 y Anexo).

Para el puente tóxico, durante el intervalo de 1 a 3 horas después de que los tubos de cebo tóxico estuvieron disponibles (tiempo 1), la actividad no difirió de la actividad inicial de ese puente (tiempo 0 vs 1, estimador = 0,34; $p = 0,65$). En el período posterior, tiempo 2, correspondiente a la mañana siguiente (es decir, 18 a 20 horas después de la disponibilidad del cebo), la actividad en el puente tóxico disminuyó significativamente en comparación con su actividad inicial (tiempo 0 vs 2, estimador = 1,40; $p = 0,004$). La actividad en este puente se mantuvo en niveles bajos hasta el final del ensayo, con ligeras fluctuaciones, todas ellas significativamente diferentes de su línea de base (Fig. 2.6, rosa).

Por el contrario, para el puente de sacarosa, la actividad en los tiempos 1 y 2 no difirió de su línea de base. Luego, la actividad aumentó ligeramente y se mantuvo alta durante todo el experimento, con fluctuaciones que en su mayoría no fueron significativamente diferentes de su valor inicial (Fig. 2.6, celeste).

La reducción significativa en la actividad de recolección de alimento observada en el puente del tóxico ocurrió dentro de las primeras 18 horas del acceso al tóxico. La actividad registrada en este momento fue un 75,5% menor que su punto de referencia y se mantuvo en estos niveles con una mínima variación (entre 73% y 88%) durante toda la duración del experimento.

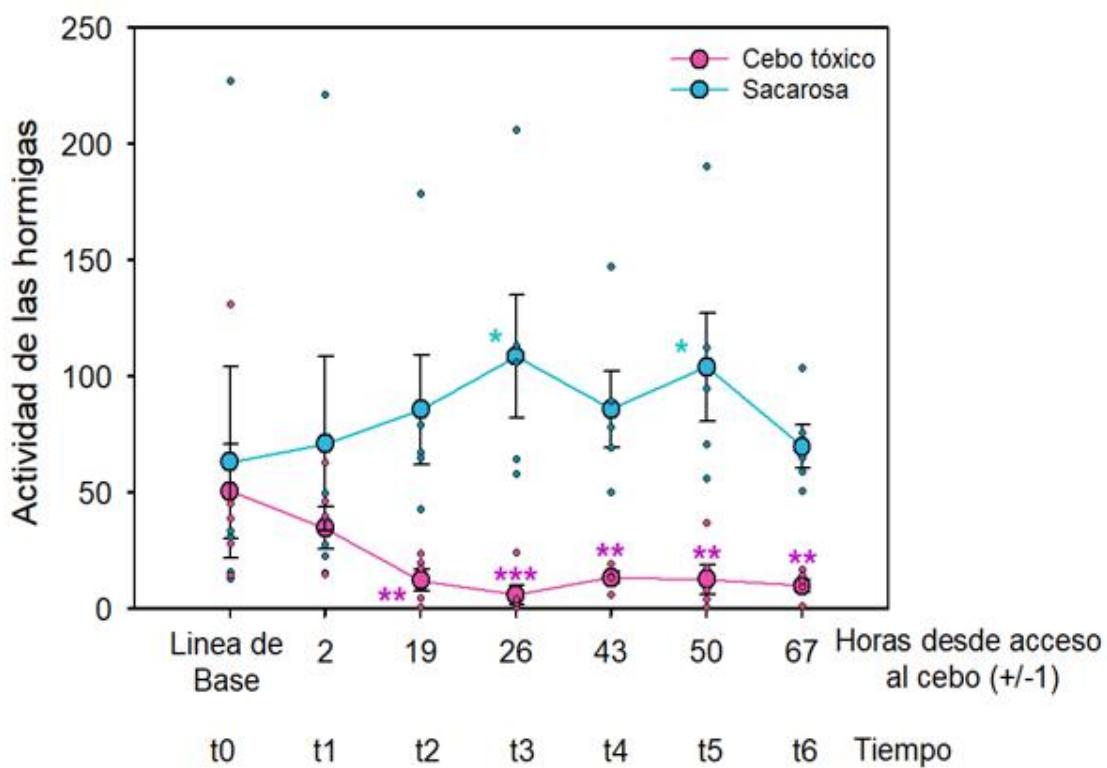


Figura 2.6. Actividad de las hormigas (promedio número de hormigas/min) en los caminos de recolección (puentes), medida como el número promedio de hormigas que cruzan una línea sobre el puente hacia la arena de recolección durante un minuto (media \pm EE), en dos puentes conectados al mismo sendero troncal. Cada puente con su propia línea de base medida en el tiempo 0, cuando ambos ofrecían gotas de solución de sacarosa. Inmediatamente después del registro basal, se abrieron los alimentadores, ofreciendo cebo tóxico en el Puente Tóxico (rosa) y solución de sacarosa en el Puente de sacarosa (celeste). La actividad se muestra en función de las horas posteriores a la apertura de los alimentadores, es decir, cuando las hormigas comenzaron a

recolectar el cebo tóxico; por debajo, nombrados como tiempos de t0 a t6. Los círculos pequeños son los datos de cada réplica ($n=5$). Las diferencias significativas se refieren dentro de cada puente, al comparar cada tiempo con su propia línea de base. (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; *** $p<0,001$; sin símbolo: no significativo).

Dado que la actividad en el puente con cebo tóxico fue menor que la línea base en el Tiempo 2 (t2), pero no en el Tiempo (t1), nos preguntamos si dentro del intervalo que comprende el t1 podría detectarse alguna tendencia. Es importante recordar que el t1 se compone de tres mediciones con una hora de diferencia. Por lo tanto, decidimos analizar la dinámica de las primeras 3 horas, desglosando el tiempo 1 y comparamos la actividad en el puente con el cebo tóxico y el puente de sacarosa en las primeras 3 horas del experimento (Fig. 2.7).

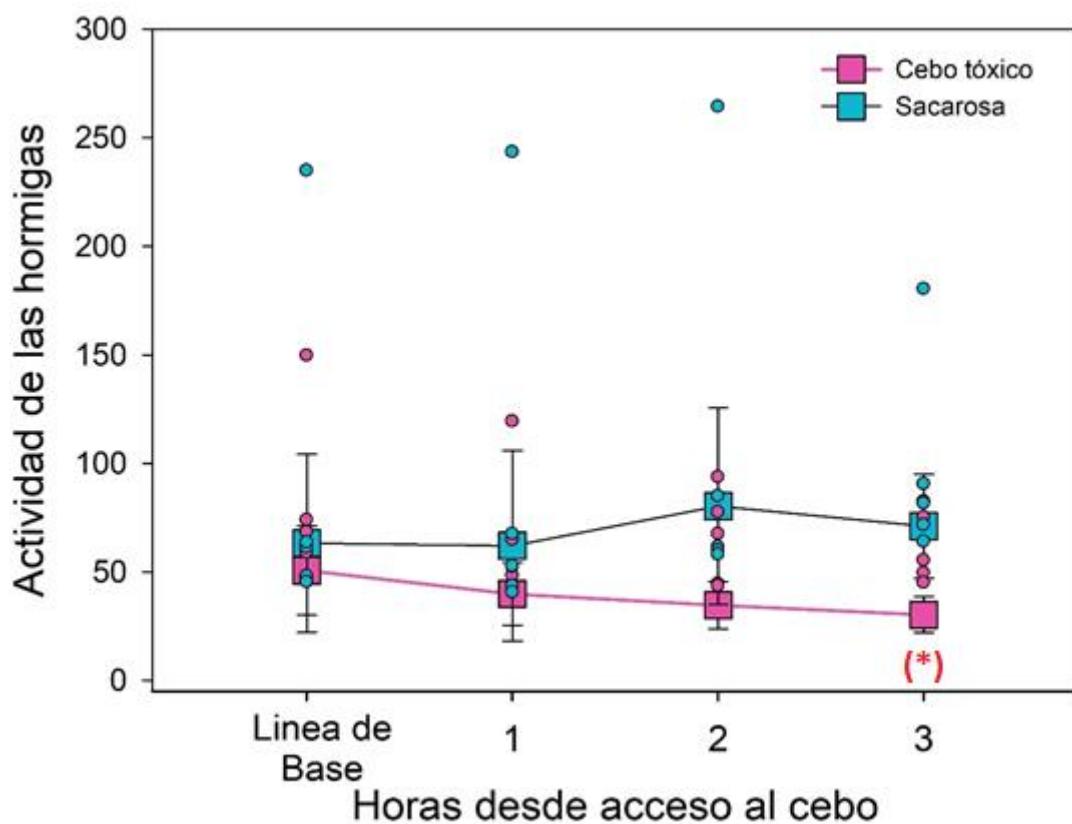


Figura 2.7. Detalle de la actividad en la primera tarde (Tiempo 1; t1: 1, 2 y 3 h tras el acceso al cebo tóxico) desglosado en cada una de sus 3 mediciones. Rosa para el puente que ofrece el cebo tóxico y celeste para el puente que ofrece la solución de sacarosa. Los círculos son los puntos de datos y los cuadrados el promedio de la actividad (media \pm EE). (sin símbolo: no significativo; (*): $0,05 < p < 0,1$). Véase también Anexo para más detalles.

Al analizar cada una de estas 3 horas por separado para determinar si difieren de la línea base (tiempo 0), observamos que no hay diferencia con respecto a la línea base durante las dos primeras horas de consumo de cebo. Sin embargo, después de 3 horas de consumo de cebo, emerge una tendencia que muestra una disminución marginalmente significativa en la actividad (15h-18h: estimador= 0,61; p=0,057). Como era de esperar, durante este período, el puente de sacarosa, que ofrece sacarosa, exhibe una actividad muy similar a su línea de base (15h, S-T: estimador = 0,017; p = 0,95).

Sendero troncal:

Para estudiar la dinámica de la actividad en el sendero troncal, se midió la cantidad de hormigas que circulaban por minuto en diferentes lugares: el sitio del puente tóxico (0mT), el sitio del puente de sacarosa (> 7 metros del puente tóxico; 0mS) y 2 m y 4 m a cada lado del sitio del puente tóxico (promediando izquierda y derecha en cada una de ambas distancias).

Existe una interacción entre los sitios (al menos uno) y el tiempo (ver Anexo). La Fig. 2.8 muestra que en el tiempo 1 (entre 1 y 3 horas después de que los alimentadores estuvieron disponibles en los puentes), la actividad del sendero troncal no varió en ningún sitio en comparación con la actividad inicial de cada sitio. Esta actividad de línea base se refiere a la actividad en el tiempo 0, que fue anterior a la colocación de los puentes.

En el tiempo 2 (que corresponde a la mañana del día 2), la actividad tampoco difirió en ningún lugar a lo largo del sendero troncal. En el tiempo 3 (corresponde a la tarde siguiente, día 2, aproximadamente 25 a 27 horas después de que se abrieron los alimentadores en los puentes), la actividad comenzó a disminuir significativamente solamente en el sitio del puente tóxico (0 mT; tiempo 0 vs tiempo 3: estimador = 0,37; p= 0,048), y marginalmente significativo a 2m de distancia (2m; tiempo 0 vs. tiempo 3: estimador= 0,34; p=0,067). La actividad se mantuvo similar a las líneas de base correspondientes más allá de los 2 metros del sitio del puente tóxico en ese momento. Las situaciones se mantuvieron similares durante el tiempo 4. La baja actividad persistió en el sitio del puente tóxico y 2 m alrededor, con ligeras variaciones, lo que resultó en una diferencia significativa o marginal con respecto al valor inicial a partir de entonces. Recién en el tiempo 5 (51 h de búsqueda de alimento en el cebo tóxico) la disminución en la actividad se volvió significativa más allá de los 2 m de distancia (4 m; tiempo 0 vs. tiempo 5: estimador = 0,36; p = 0,042).

Finalmente, en el tiempo 6 (día 4 a la mañana y 67h después de abrir los alimentadores), la actividad mostró mayores diferencias significativas en el área alrededor del puente del tóxico, extendiéndose hasta 4 m en ambos lados (4 m; tiempo 0 vs. tiempo 6: estimador= 0,43; $p=0,013$). En contraste, la actividad en el sendero troncal en el sitio del puente de sacarosa no varió en ningún momento en relación con la línea de base de ese sitio.

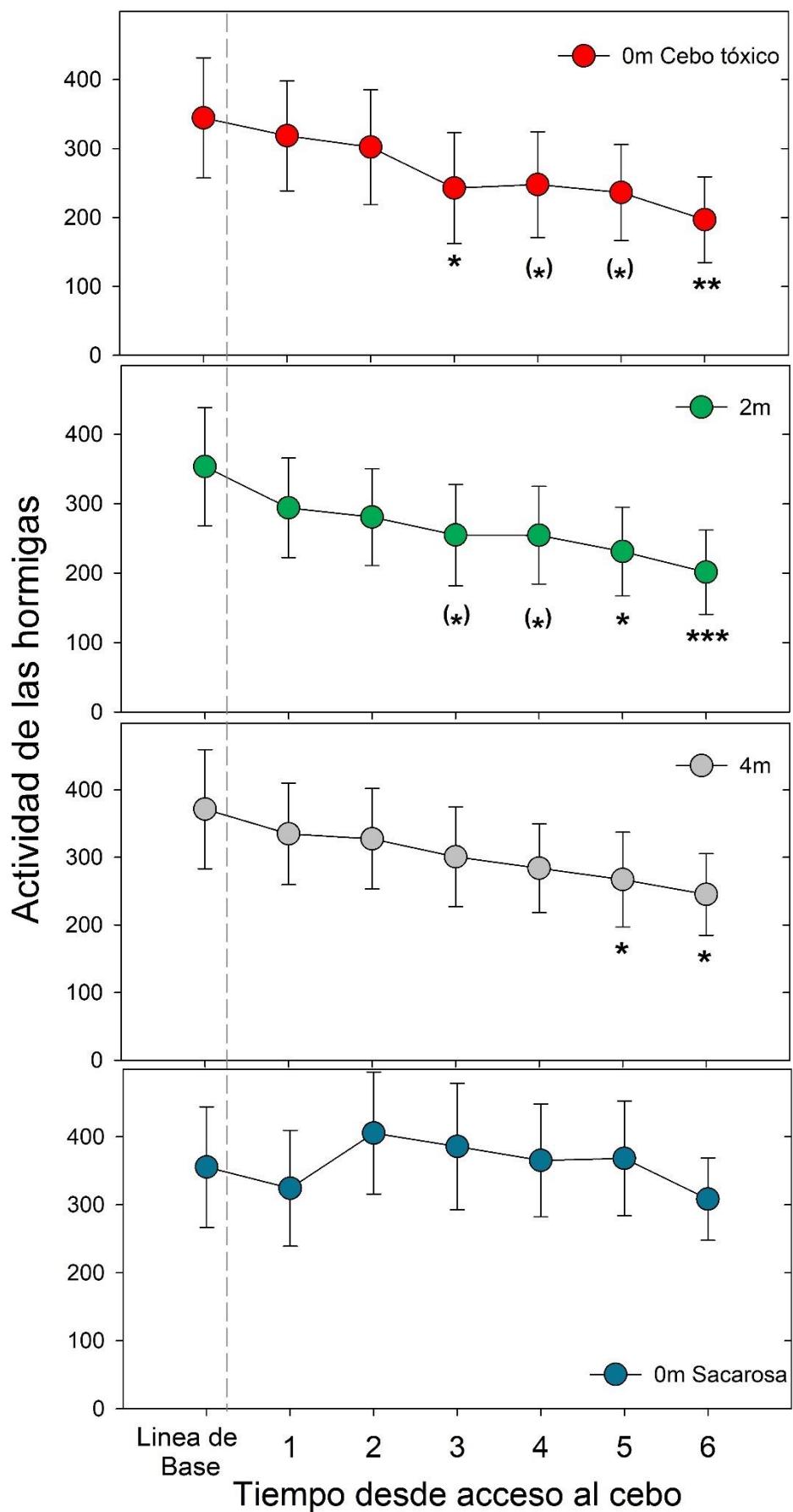


Figura 2.8. Actividad promedio (media \pm EE) de las hormigas en el sendero troncal; dinámica temporal a lo largo de los días. Actividad medida en diferentes sitios a lo largo del sendero troncal: a 0 metros del puente con cebo tóxico (a), a 2 (b) y 4 (c) metros a cada lado (2 m y 4 m; promedio de la actividad a la derecha y a la izquierda) y a 0 metros del puente con solución de sacarosa (d). Los tiempos son los siguientes: T1: tarde del día 1, entre 1 y 3 h luego de habilitar los alimentadores; T2: mañana del día 2, luego de 18 y 20h; T3: tarde del día 2 (25 a 27h después); T4: mañana del día 3 (42-44h después); T5: tarde del día 3 (49-52h); y T6: mañana del día 4 (66-68h). (n=5). Las diferencias significativas se refieren a cada ubicación comparando la actividad en cada momento con la línea de base para el mismo sitio (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; sin símbolo: no significativo; (*): 0,05 < p < 0,1). (Ver Anexo para más detalles).

Es interesante observar que si bien la actividad directamente sobre los puentes tóxicos se reduce significativamente en el tiempo 2 (Fig. 2.6), la actividad en el sendero troncal en las proximidades de esos puentes (a 0mT y 2 m) solo muestra una disminución casi significativa a partir del tiempo 3 (Fig. 2.8). Esto demuestra que la disminución de aproximadamente el 80% en la actividad del puente tóxico no puede atribuirse a una disminución en la población de hormigas. Además, más lejos del puente tóxico (4 m), la actividad recién comenzó a disminuir en el tiempo 5. Esto demuestra un abandono progresivo que inicialmente comienza en las proximidades del cebo y gradualmente se expande hacia áreas más grandes, involucrando el sendero troncal.

Por último, para resumir y poder visualizar esta falta de sincronización en el efecto que el cebo tóxico genera en el camino de recolección y el sendero troncal, se esquematizó el porcentaje de cambio de actividad con respecto a la inicial en el camino de recolección y en el sendero troncal en los diferentes puntos a todos los tiempos (Fig. 2.9).

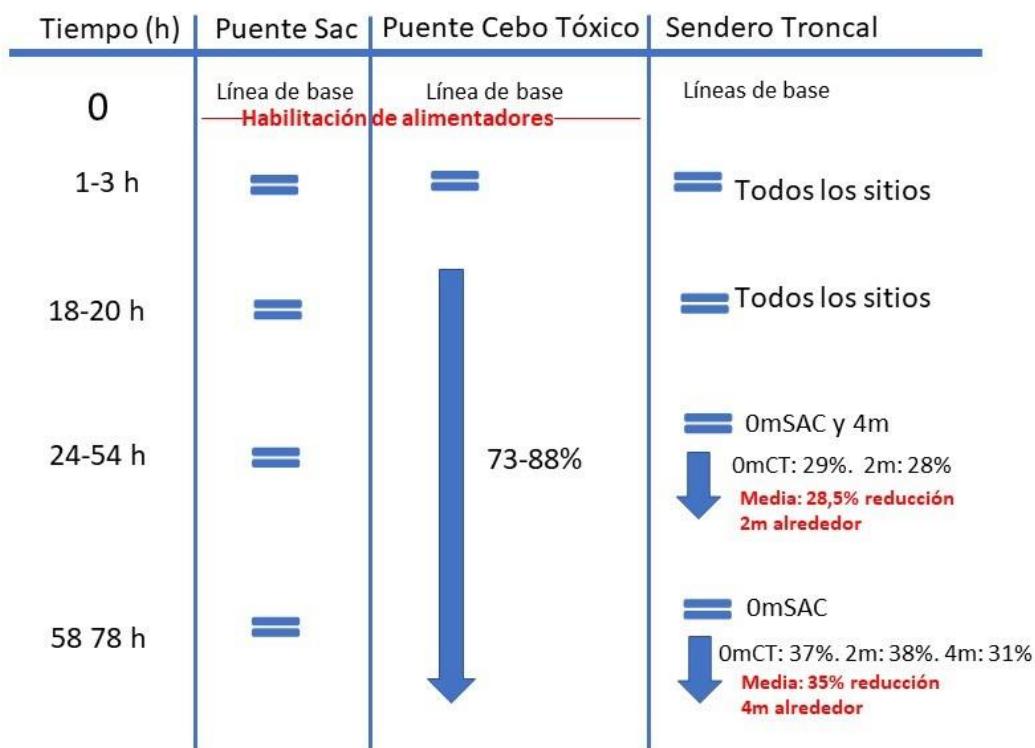


Figura 2.9. Esquema de como cambió la actividad a lo largo del tiempo con respecto a la inicial tanto en los caminos de recolección al cebo tóxico como en el sendero troncal a los diferentes puntos.

Se observa que luego de 18h de colocar el cebo tóxico ya hay una disminución mayor al 73% en los caminos de recolección al cebo tóxico mientras que en el sendero troncal la actividad se mantuvo igual en todos los sitios. Luego, entre las 54 y 78h, se registra una disminución en el sendero troncal de un 28,5% que posteriormente alcanza un 35% de reducción de la actividad mientras que en puente del cebo tóxico se mantiene entre 73 a 88% más baja con respecto a la inicial.

Discusión

En este estudio, demostramos que la presencia de un cebo tóxico provocó el abandono del camino de recolección. El abandono resultó significativo luego de 18 a 20 horas después de la disponibilidad del cebo. La actividad se mantuvo baja (entre 73% a 88% menor respecto a la actividad inicial) durante los 4 días que duró el experimento. Por el contrario, como la actividad

en el puente de sacarosa nunca disminuyó, podemos excluir la saciedad o una reducción en la motivación de recolección de alimento como explicación del abandono en el puente con el cebo tóxico.

Por otro lado, el sendero troncal adyacente al puente tóxico mantuvo inicialmente niveles de actividad similares, cuando el puente ya había alcanzado los niveles bajos de actividad. Esto permite descartar que el abandono se deba a una reducción de la población. El abandono se fue extendiendo paulatinamente al sendero troncal pero solo en las inmediaciones del cebo tóxico, ampliando progresivamente el área, sin alcanzar las zonas ubicadas aproximadamente a 7 metros de donde estaba colocado el puente de control, al menos durante el tiempo del experimento. Observamos una expansión gradual del abandono a lo largo del sendero troncal. Después de solo 3 días, la disminución de la actividad se extendió hasta una distancia de 4 metros a ambos lados del puente tóxico. Interpretamos que esto pudo ocurrir porque un pequeño porcentaje de hormigas continuó alimentándose del cebo; y proponemos que conforme se sostenga un ingreso del cebo al nido, el área abandonada seguirá aumentando con el tiempo. Por otro lado, es importante mencionar que los edificios del campus, los canteros, las aceras y zonas boscosas vienen teniendo un muy elevado nivel de invasión de estas hormigas, con (super) colonias altamente pobladas. Por lo tanto, la pequeña cantidad de cebo ingerido ofrecida en el puente tóxico no puede provocar una mortalidad significativa en colonias tan masivas.

Uno podría preguntarse cómo la disminución en la actividad de los senderos troncales solo ocurrió alrededor del puente tóxico mientras permanecía sin cambios cuatro metros a ambos lados. En algunos casos se observó un desvío del camino principal que se reincorporaba al sendero troncal un par de metros después de pasar el punto de contacto con el puente de tóxicos. Por otro lado, también se podía observar que los senderos troncales se bifurcaban en varios sitios y por ende podría haberse desviado la actividad hacia esas bifurcaciones evitando así el cebo. En un estudio con hormigas carpinteras donde se ofreció cebo azucarado conteniendo un tóxico en un sendero lineal con alto tránsito, el primer día lo ingerían, pero al día siguiente el sendero evitaba ese punto cambiando su traza (Josens et al., 2016). Así, con la desviación resultaba un sendero ligeramente más largo, pero evitaban que las hormigas pasaran cerca del cebo. La desviación describía un arco, un semicírculo, de unos 30-40 cm de radio cuyo centro era el cebo tóxico. Solo un bajo porcentaje de hormigas continuaban circulando en forma lineal y topándose con el cebo. De estas, ahora la mayoría lo rechazaba. Vale la pena señalar que, en dicho estudio, Josens et al. (2016) ofrecían un pequeño volumen de cebo tóxico (5 ml), mientras que, en nuestro estudio actual, nuestro alimentador proporcionó alrededor de 36 ml

de cebo tóxico. Por tanto, es posible que el volumen disponible o el número de hormigas que puedan acceder al cebo simultáneamente, especialmente en las primeras horas, puedan influir en la magnitud del área abandonada.

No hay una sincronización en la reducción de la actividad entre el puente del tóxico y el sendero troncal. Mientras que en el puente hay un abandono a las 18 h, en el sendero troncal la actividad sigue alta y similar a la inicial. Por lo tanto, la actividad en el sendero troncal no explica ni en magnitud ni en el *timing* (no ocurre en el mismo momento) que la reducción en el camino de recolección al cebo tóxico. En el sendero troncal hay una disminución de la actividad recién a las 26 horas después. Esto también favorece a la hipótesis que planteamos respecto a que el abandono al cebo tóxico en los caminos de recolección es independiente a la actividad en el sendero troncal y se debe posiblemente a una estrategia comportamental de las obreras para evitar de forma focalizada el camino de recolección que las llevó al cebo.

Estos resultados son novedosos ya que no hay estudios en la literatura sobre control de hormigas que se centren en las respuestas comportamentales, ni que sugieran que pueda existir este tipo de respuesta comportamental de abandono del cebo. Sin embargo, al observar con los resultados de varios artículos, encontramos algunas coincidencias interesantes. Nuestro porcentaje de reducción es consistente con lo que se menciona con frecuencia en la literatura al evaluar la eficacia de los tratamientos con cebo en varios entornos, como áreas urbanas, huertos y viñedos (Greenberg et al., 2006; Klotz et al., 1998; Vega & Rust, 2003). En todos los casos, dichos resultados se interpretan como mortalidad causada por el cebo aplicado. Nuestros resultados, permiten interpretar esta reducción de una manera diferente. No negamos que el cebo pueda generar mortalidad, pero al menos en alguna proporción las reducciones en la presencia de las hormigas pueden deberse a un abandono del área.

Otro punto importante que surge de la literatura es que no serían estas conciencias en los porcentajes de reducción de la actividad algo específico del compuesto tóxico utilizado en nuestro estudio, ni de la concentración utilizada del mismo, ya que mientras que en nuestro trabajo utilizamos ácido bórico 3% p/p, Greenberg et al. (2006) usaron octaborato de disodio tetrahidratado (0,5 y 1%), Vega & Rust (2003) aplicaron 0,0001 fipronil mientras que Klotz et al. (1998) sí utilizaron ácido bórico, pero en menor concentración (0,5%). De hecho, Klotz et al. (1998) y Forschler & Evans (1994), mencionan que la actividad de forrajeo de las hormigas se ha redirigido desde el interior de los edificios hacia el exterior, lo que también daría a pensar que hubo una evitación específica por el cebo. En las tareas de control con cebos que se efectúan en distintos edificios de la Ciudad Universitaria, varias veces se ha observado que las hormigas

desaparecen del interior donde se colocaron los cebos, pero del otro lado de la pared, ya en el exterior, los caminos permanecen sin alteraciones y con gran actividad (Com. Pers. RJ). En estos casos pareciera tratarse del mismo abandono que caracterizamos en la presente tesis. Como mostramos, no es una cuestión de interior-exterior, y no pareciera ser una situación excepcional. Las hormigas abandonan el camino de recolección a los cebos y evitan circular en el área cebada como estrategia de comportamiento.

En conclusión, podemos afirmar que se cumpliría nuestra hipótesis respecto a que el abandono a los cebos tóxicos se generaría en su mayoría por una estrategia comportamental de las hormigas por evitar dicho cebo y no por saciedad o falta motivación por recolectar el recurso azucarado. El abandono esta focalizado en el camino de recolección donde se encuentra el cebo y desde ahí se va expandiendo por el sendero troncal próximo al cebo a lo largo de los días. Esta disminución de la actividad es estable en el tiempo, con fluctuaciones que jamás se acercaron ni a la mitad de la actividad inicial.

A partir de estos resultados surgió la pregunta de evaluar la dinámica de abandono con mayor resolución temporal, haciendo experimentos a corto plazo, pero evaluando a cada hora desde el inicio de la disponibilidad del cebo tóxico. De esa forma definir mejor cuándo comienza el abandono, cómo es dicha dinámica temporal y cuándo se alcanza el valor medio obtenido de 80% de reducción, lo cual se estudiará en el próximo capítulo.

Capítulo 3. Abandono de camino de recolección: dinámica en horas

Introducción

Los resultados del capítulo anterior indicaron que el abandono del camino de recolección hacia el cebo tóxico ocurre rápidamente, dentro de las 18 horas posteriores. A su vez, al desglosar el tiempo 1 (las primeras 3 horas del ensayo), observamos que ya habría una tendencia a una disminución de la actividad luego de solo 3 horas. Para definir la dinámica de abandono en una resolución temporal más alta el objetivo principal de este capítulo es evaluar qué sucede en las primeras 8 horas de estar disponible el cebo tóxico en un camino de recolección. Por otro lado, también nos proponemos considerar si una actividad inicial de hormigas mayor en los puentes podría afectar el resultado del abandono. Asimismo, se estimará el consumo de ambas soluciones ofrecidas (sacarosa y cebo tóxico). Considerando que el abandono se iniciará dentro del periodo de las 8 horas de duración del ensayo, esperamos que el cebo tóxico muestre un menor consumo al final del ensayo.

Objetivo general:

Determinar cómo es la dinámica de abandono en el camino de recolección al cebo tóxico en el corto plazo, esto es, cuándo inicia, si alcanza rápidamente el valor del 80% de la reducción observado en el capítulo anterior; cuándo se alcanza dicho valor.

Pregunta particular 1: ¿en qué momento se inicia el abandono o disminución de la actividad?

Hipótesis 1: el abandono sucede antes de las 8 horas de colocar el cebo tóxico

Predicción 1: la actividad (cantidad de hormigas/min) en el puente con el cebo tóxico va a ir disminuyendo a lo largo de las horas hasta llegar a una actividad mínima en dicho camino de recolección.

Pregunta particular 2: ¿hay una diferencia en el consumo de los tratamientos?

Hipótesis 2: el consumo es mayor en los alimentadores con sacarosa que en los del cebo tóxico.

Predicción 2: el consumo (los gramos consumidos) será mayor en los alimentadores con sacarosa respecto a los del cebo tóxico.

Metodología

Área y tiempos de muestreo

Este estudio se realizó en la misma área que el estudio del capítulo anterior, sobre senderos troncales diferentes o bien, sobre el mismo, pero en diferentes temporadas, separados por al menos 10 meses. Estos ensayos se realizaron durante 2022 y 2023 durante los meses de enero a abril. Se repitió 6 veces en 6 senderos troncales diferentes, los cuales estuvieron a una distancia mayor a 50 metros.

Procedimiento

Los dispositivos utilizados (puentes) y las soluciones se armaron de igual manera que lo descripto en el capítulo anterior. La metodología también fue similar al capítulo anterior, pero con dos diferencias. En primer lugar, tras la fase de inicio de actividad se realizó una *Fase de aumento de la recolección* de dos días de duración, con el fin de generar una mayor actividad inicial ofreciendo soluciones de sacarosa en ambos puentes durante un mayor tiempo. En segundo lugar, se tomaron mediciones de actividad cada hora, la actividad inicial llamada Línea de Base, se registró a las 9 h con ambos puentes ofreciendo soluciones de sacarosa, cambiando los tubos de alimentación inmediatamente después: con solución de sacarosa en el puente de sacarosa y solución de sacarosa mezclada con el compuesto tóxico en el puente del cebo tóxico. Una hora más tarde, las mediciones comenzaron a las 10 h (hora 1) y continuaron cada hora hasta las 17 h (hora 8) (Fig. 3.1). A su vez, también se midió la actividad en el sendero troncal en los sitios adyacentes a los puentes en 3 momentos durante el día de registros. La actividad del sendero troncal se registró a las 9 h, 13h y 17h (Fig. 3.1).

Línea de tiempo de cada réplica

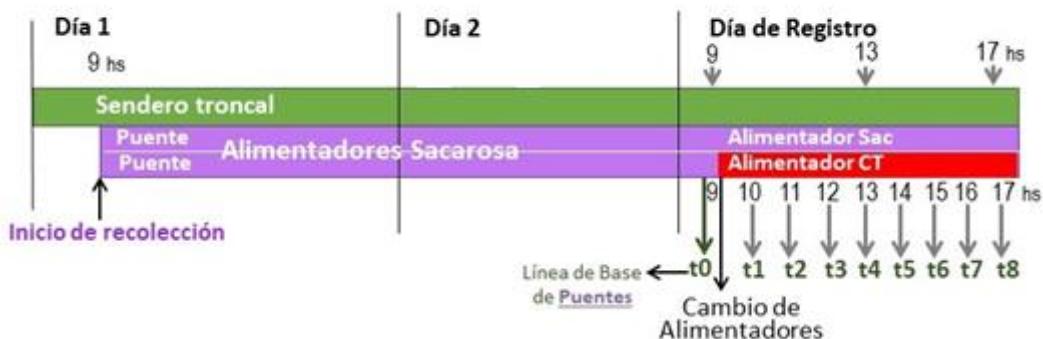


Figura 3.1. Cronología del ensayo sobre la dinámica del abandono en horas. La barra verde representa el sendero troncal, las barras violetas y rojas representan los puentes; violeta cuando ofrece sacarosa y rojo cuando ofrece cebo tóxico. En ambos experimentos, el inicio de la actividad se generó colocando gotas de solución de sacarosa en la zona de alimentación de ambos puentes. Se ofreció solución de sacarosa en ambos puentes con alimentadores (4 tubos de 9 ml cada uno) durante dos días, para potenciar la cantidad de hormigas recolectando. Finalmente, el día de registros, se midió la actividad basal que será la referencia para cada sitio evaluado (Línea de base) a las 9 h de la mañana (Tiempo 0). Inmediatamente, se cambiaron los alimentadores por sacarosa en uno de los puentes y por cebo tóxico en el otro. Las flechas indican el momento de las mediciones de actividad de las hormigas. Esta variable es, para los puentes, el número medio de hormigas por minuto que cruzan una línea imaginaria a mitad de camino a través del puente en dirección a la zona de alimentación, y para el sendero troncal, en ambas direcciones. La actividad se midió cada hora durante un solo día.

Ingestión de soluciones

En esta oportunidad, en las últimas cuatro réplicas realizadas, se pesaron los alimentadores en laboratorio al principio del experimento. Al final del ensayo, rápidamente fueron llevados al laboratorio para volver a pesarlos. Por la diferencia de pesos antes y después, se pudo estimar la cantidad de solución ingerida (en gramos) tanto en el puente con sacarosa como en el de cebo tóxico.

Análisis estadístico

Para los ensayos de la dinámica de abandono de senderos troncales y puentes utilizamos GLMM, analizando los datos de los experimentos mediante un diseño de medidas repetidas. En todos los casos la variable de respuesta fue la actividad de las hormigas, medida como el promedio de hormigas que cruzaban una línea por minuto. Para los puentes, solo se contabilizó el tráfico en la dirección de la zona de alimentación; para el sendero troncal se incluyeron ambas

direcciones. El supuesto de homocedasticidad se evaluó utilizando un gráfico de residuos estandarizados frente a valores predichos. La distribución de mejor ajuste para los datos se determinó mediante el índice de dispersión (la razón entre los residuos y los predichos), que resultó ser la distribución binomial negativa en todos los casos. Se realizaron comparaciones por pares de la actividad utilizando el paquete emmeans (Lenth et al., 2023). Se aplicó un ajuste del valor P utilizando el método de dunnettx. Los análisis estadísticos se realizaron en R Studio utilizando el paquete glmmTMB (Brooks et al., 2022).

Realizamos dos análisis estadísticos diferentes uno enfocado en los puentes y el otro en el sendero troncal:

Modelo para los puentes: las variables explicativas fijas fueron los tratamientos (2 niveles: Sacarosa y Cebo Tóxico), el tiempo como factor (9 niveles: de t0 a t8) y como variables aleatorias los puentes (12 niveles) y las réplicas (n = 6).

Modelo para el sendero troncal: las variables explicativas fijas fueron los sitios (2 niveles: 0 mT – 0 mS), el tiempo como factor (3 niveles: de t0, t4 y t6) y como variables aleatorias las réplicas (n = 6).

En el Anexo se proporciona una descripción detallada del enfoque de análisis estadístico adoptado y el código completo y los resultados estadísticos. Por otro lado, para el análisis de la ingestión de soluciones también se usó la función GLMM. La variable respuesta fue los gramos consumidos los cuales se ajustan a una distribución normal. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron puesto a prueba mediante la función Dharma donde se visualiza el QQ plot y los valores de los residuos vs predichos. Todos los análisis se hicieron mediante el programa R-Studio. Ver Anexo para más detalles.

Resultados

Caminos de recolección:

En primer lugar, podemos destacar que el hecho de haber dejado durante 2 días los alimentadores ofreciendo sacarosa tuvo el efecto deseado. La presencia de hormigas en los puentes fue mayor a la obtenida en el ensayo anterior (Capítulo 2). En el experimento de la dinámica en días la actividad inicial fue en promedio de 50 hormigas (puente de sacarosa) y 63 (puente con el cebo toxicó). En este caso la cantidad de hormigas presente en los puentes en el

registro de la línea de base estuvo entre 125 (en el puente sacarosa) y 157 (puentes cebo tóxico) hormigas/min como promedio considerando todas las réplicas evaluadas.

La actividad de las hormigas varió con las horas en forma diferente en el puente que ofrecía el cebo tóxico respecto al puente de sacarosa. Por un lado, se ve una clara disminución en las hormigas presentes en el cebo tóxico, y en cambio en el puente de sacarosa se observa una actividad alta constante durante todo el ensayo (Fig. 3.2). Existe una fuerte interacción entre la solución ofrecida en el puente (cebo tóxico o sacarosa) y el tiempo (Ver Anexo). Pero más importante que comparar una curva con la otra, resulta la comparación dentro de cada puente con su actividad respecto a su línea de base (Tiempo 0).

La actividad de las hormigas en el puente que ofrecía el cebo tóxico comenzó a mostrar una disminución significativa después de 3 horas iniciada la recolección del cebo tóxico (tiempo 0 vs. tiempo 3: estimador=0,56; $p= 0,04$. Fig. 3.2), con una reducción del 43% respecto a su actividad basal. Esta reducción aumentó y se hizo más significativa en las dos horas siguientes, alcanzando el 58% después de 4 horas (tiempo 0 vs. tiempo 4: estimador=0,85; $p= 0,002$) y el 70% después de 5 horas (tiempo 0 vs. tiempo 5: estimador=1,14; $p=0,0001$). A partir de entonces, esta reducción en la actividad permaneció esencialmente constante, alcanzando el 79% en la hora 6 (tiempo 0 vs. tiempo 6: estimador=1,51; $p<0,0001$) y permaneciendo alrededor de 80% durante las siguientes dos horas medidas. Tal reducción en la actividad de búsqueda de alimento nunca ocurrió en el puente de sacarosa, ubicado en el mismo sendero troncal a unos 7 a 8 metros de distancia. Por el contrario, la actividad en el puente de sacarosa se mantuvo alta durante todo el experimento, con fluctuaciones que en ocasiones superaron marginalmente a la actividad inicial de ese puente (Fig. 3.2).

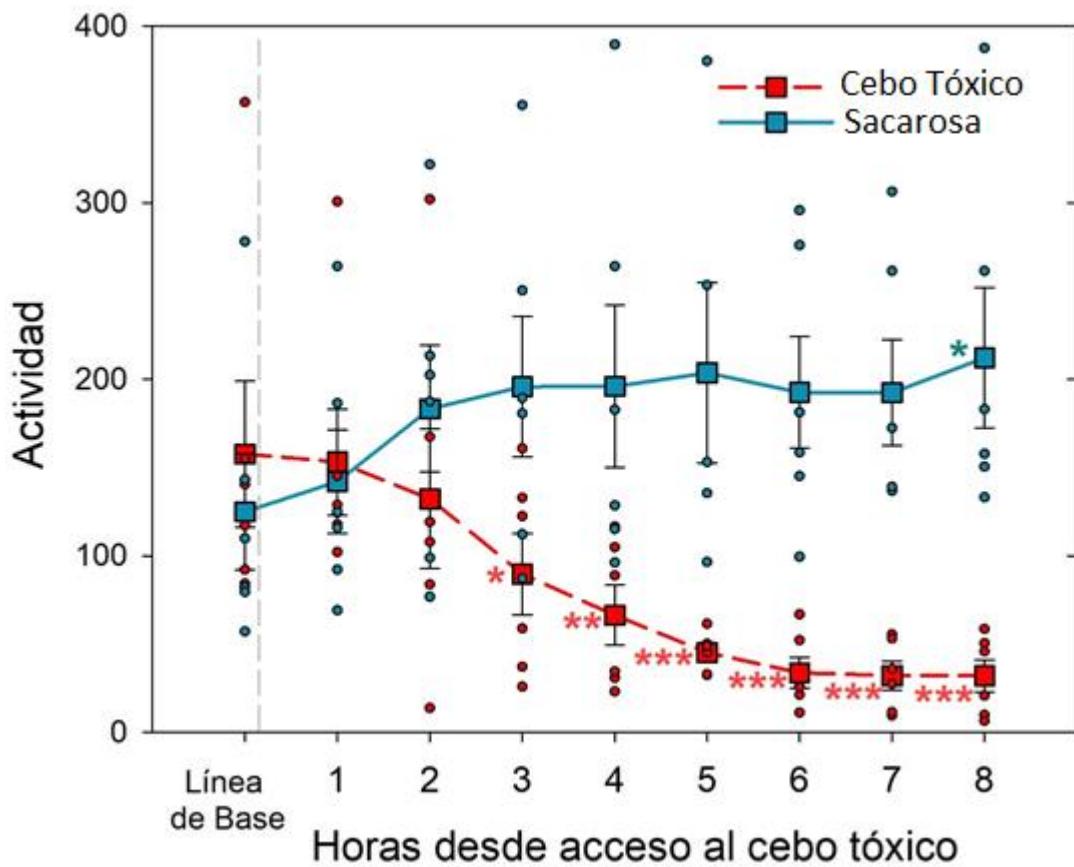


Figura 3.2. Dinámica en horas del abandono de cebos tóxicos. Actividad de las hormigas (media \pm EE) en función del tiempo durante 8 horas. La actividad (promedio número de hormigas/min) inicial de las hormigas se midió en el momento 0, Línea de base, con ambos puentes ofreciendo solución de sacarosa. Inmediatamente después se abrieron los alimentadores, ofreciendo solución de sacarosa en el puente de sacarosa (en azul) y el cebo tóxico en el puente de tóxico (en rojo). Para cada puente se comparó la actividad de cada tiempo con la línea base correspondiente (del tiempo 1 al tiempo 8). Se muestran diferencias significativas para cada momento en comparación con su línea de base; para el puente de sacarosa encima de la curva y en azul, y para el puente de tóxicos debajo de la curva y en rojo. (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; *** $p<0,001$; sin símbolo: no significativo). Los círculos representan los datos de cada réplica ($n=6$). (Ver Anexo para más detalles).

Sendero troncal:

Existe una interacción entre el tiempo y los sitios: la actividad en el lugar en contacto con el puente de sacarosa no difirió de su línea base en ningún momento. Por el contrario, la actividad en el lugar cercano al puente del tóxico cambió con el tiempo. En concreto, mostró una disminución significativa después de 4 horas de consumo de cebo (Tiempo 0 - Tiempo 4:

estimador = 0,75; $p = 0,002$). 8 horas después del consumo del cebo, la actividad no difirió de la línea base (Tiempo 0- Tiempo 8: estimador = 0,59; $p = 0,16$).

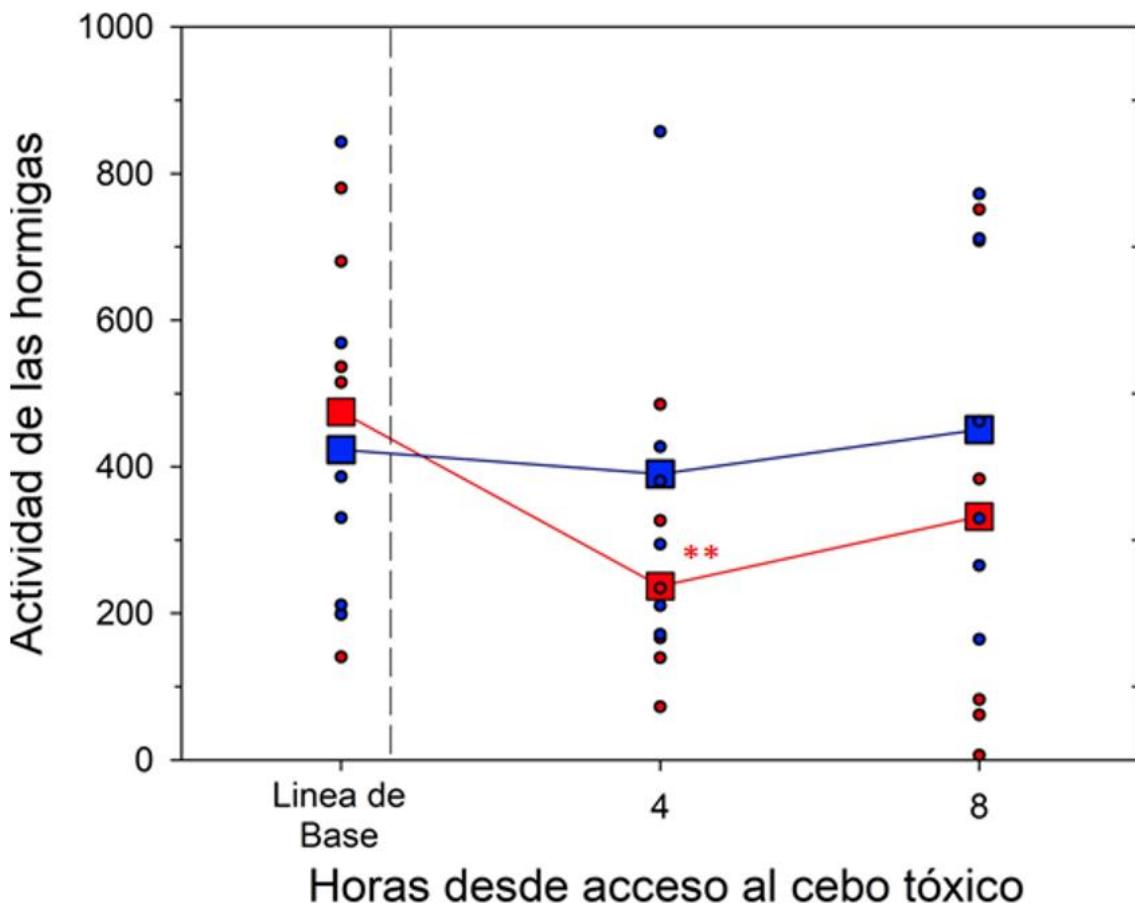


Figura 3.3. Actividad de hormigas en el sendero troncal; dinámica del abandono en horas. Actividad medida en dos lugares en el sendero troncal: por un puente que ofrece un tóxico (rojo) y por un puente de control que ofrece sacarosa sin adulterar (azul) colocado a más de 6 metros de distancia. La actividad se midió tres veces: a las 9 h. cuando ambos puentes aún ofrecían azúcar (línea de base para cada puente; tiempo 0). Inmediatamente después, se abrieron los alimentadores, ofreciendo solución de sacarosa en un puente (puente de control) y el cebo tóxico en el puente de tóxicos. Luego se volvió a medir la actividad en el sendero troncal a las 4 y 8 horas más tarde. (**: $p < 0,01$; sin símbolo: no significativo). Los círculos representan los datos individuales de cada réplica ($n = 6$), mientras que los cuadrados son la media. (Para más detalles, ver Anexo).

Para proporcionar una representación visual de los resultados en general integramos los datos de actividad de ambos experimentos (dinámica en días -capítulo anterior- y horas) en los dos puentes (sacarosa y cebo tóxico). La actividad se expresa como una variación porcentual de

la actividad de referencia, la línea de base de cada puente respectivo, quedando expresada como cambio en la actividad. Por lo tanto, la línea de base siempre tiene un valor de cero, los valores positivos indican un aumento porcentual y los valores negativos indican una disminución porcentual (Fig. 3.4). En el experimento dinámica días, solo hubo una ligera reducción en la actividad de las hormigas en el puente del cebo tóxico tres horas después de colocar el cebo, lo que fue marginalmente significativo. Sin embargo, en el experimento dinámica en horas, se observó una reducción significativa en la actividad de las hormigas tres horas después de la colocación del cebo. Además, después de 6 horas de cebo, se logró aproximadamente una reducción de actividad de ~80% y se mantuvo hasta el final del experimento. Este valor se aproxima al porcentaje de reducción del capítulo anterior, aunque la actividad inicial en este caso fue mucho mayor ya que se ofreció azúcar durante dos días enteros antes del experimento.

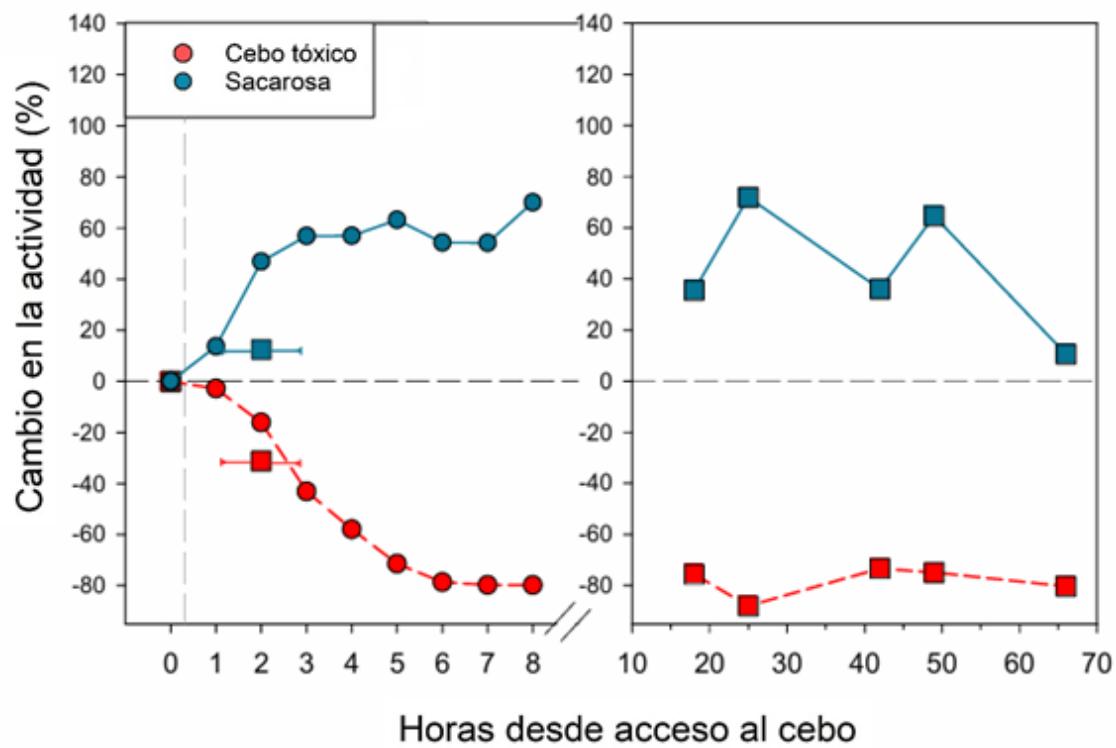


Figura 3.4. Cambio en la actividad desde la tasa de referencia a lo largo del tiempo. La línea roja discontinua representa el puente que ofrece cebo tóxico después del tiempo 0, la línea continua representa el puente que ofrece solución de sacarosa. Las formas de color celeste representan que se ofrece solución de sacarosa; el rosa representa que se ofrece cebo tóxico. Esta figura integra dos experimentos: el panel izquierdo muestra la dinámica del abandono con alta resolución temporal durante un día después de la presentación del cebo (Experimento dinámica horas, círculos). El panel derecho muestra la dinámica del abandono durante los días después de la iniciar la oferta del cebo tóxico (Experimento dinámica días, cuadrados). Note un dato del Experimento dinámica días en el panel izquierdo (cuadrado en el tiempo 2). Cada cuadrado representa la combinación de tres mediciones con 1 hora de diferencia. La línea discontinua

vertical gris indica la apertura de los alimentadores finales (uno con solución de sacarosa y otro con cebo tóxico).

Ingestión de soluciones:

Los resultados muestran que el consumo de los alimentadores (4 tubos conteniendo ~36 ml en total) en los puentes con los tratamientos (sacarosa y tóxico) fueron diferentes. Por un lado, se ve que el consumo fue significativamente mayor en los alimentadores de sacarosa respecto al cebo tóxico (Fig. 3.5). Dicha diferencia es de aproximadamente el doble de gramos consumidos en los alimentadores de sacarosa ya que aproximadamente consumieron en promedio más de 44 gramos mientras que en los tubos con el cebo tóxico el consumo fue de un poco más de 25 gramos (Ver Anexo para más detalle).

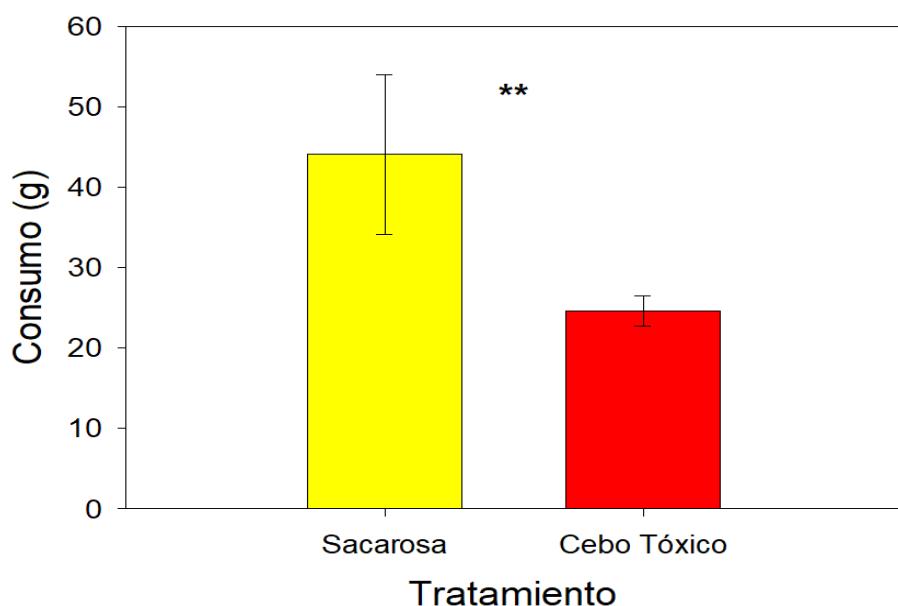


Figura 3.5. Consumo de cada solución ofrecida (g) en los puentes de sacarosa (amarillo) y cebo tóxico (rojo) luego de haber estado disponibles durante las 8 horas del ensayo de dinámica del abandono en horas. (n= 4). **: p<0,01). Los símbolos son medias, los bigotes son 1 error estándar de la media. (Ver Anexo para más detalles).

Discusión

En este estudio, demostramos que la presencia de un cebo tóxico provocó el abandono en el camino de recolección en un corto plazo de tiempo. Este abandono comenzó aproximadamente 3 horas después de la colocación del cebo, y siguió disminuyendo a lo largo de las horas hasta llegar a una disminución aproximadamente de un 80 % en la actividad del puente después de 6 horas de colocado el cebo, manteniéndose en ese valor hasta el final del ensayo. En cambio, el puente control, que ofrecía sacarosa, mantuvo su actividad alta durante todo el ensayo, lo que indica que el abandono no se debió a saciedad o falta de motivación para recolectar recursos. Además, mostrando nuevamente que el abandono, en las condiciones de nuestro experimento, es muy localizado.

Si comparamos estos resultados, que reflejan la dinámica del abandono en horas, con los del ensayo del capítulo anterior, enfocado en la dinámica del abandono en días, observamos un porcentaje de disminución similar al observado durante los 4 días tras la colocación del cebo tóxico (Fig. 3.4). Es importante destacar que estos resultados se mantienen relativamente constantes a lo largo de los días, incluso cuando las poblaciones iniciales de hormigas fueron diferentes. En particular, la actividad inicial en el ensayo de abandono en horas fue más de 2,4 veces mayor que en el ensayo de abandono en días. Es notable que siendo tan diferente la actividad inicial de ambos ensayos, éstos coincidan en alcanzar una reducción de actividad similar, cercana al 80%. Por lo tanto, fue útil generar los caminos de recolección un par de días antes de tomar los datos, ya que no solo permitió asegurar una mayor actividad inicial en ambos puentes, sino también observar que, pese a esa mayor actividad inicial, -que supone un mayor ingreso de cebo tóxico al nido-, el patrón de abandono no resultó diferente.

Los resultados del sendero troncal nuevamente confirman que el abandono se inicia de manera muy localizada en las proximidades del cebo tóxico. Además, también demuestra que el abandono no se debe a una reducción de la población, ya que los niveles de actividad en los senderos troncales se mantuvieron altos.

Sorprendentemente, el sendero troncal cerca del puente del tóxico se vio afectado a las 4 h después del acceso al cebo, mientras que, en el experimento anterior, a las 18-20 horas. En cambio, a las 8 h después del acceso al cebo, no hubo diferencias significativas. ¿Por qué la actividad en el sendero troncal se vio afectada más rápidamente en este caso que en el experimento anterior? Creemos que la mayor actividad inicial en los puentes durante la activación del cebo, probablemente causó una mayor afluencia de cebo tóxico en las horas iniciales de consumo del cebo. Entonces, la diferencia entre los experimentos podría explicarse

por una mayor ingesta temprana de cebo tóxico amplificando y acelerando sus efectos negativos. Lo que daría como resultado efectos de abandono más fuertes, más rápidos y en un área más amplia. En apoyo de este argumento, la réplica del puente del tóxico con la mayor actividad inicial mostró una disminución más abrupta de la actividad a lo largo del sendero troncal después de 8 horas de acceder al cebo. De 780 individuos por minuto en el tiempo 0, se redujo en 4 horas a 139 y luego a solo 61 hormigas que pasaban cerca del puente tóxico después de 8 horas. Mientras que, a solo 7 metros de distancia, junto al puente de sacarosa, no se produjo una reducción en la actividad; se mantuvo constante durante esos intervalos de tiempo, con 843, 857 y 772 hormigas pasando por minuto respectivamente. En otras palabras, la dinámica de abandono puede estar relacionada con la tasa de ingreso de tóxico al nido en las primeras horas. Probablemente, incluso el área abandonada y la intensidad del abandono estén relacionadas con la cantidad de tóxico ingresado al nido y sus efectos negativos, particularmente efectos subletales.

La mayoría de los estudios con cebos para controlar hormigas o evaluar el consumo de cebos, realizan las mediciones recién a las 24 horas después de haber colocado los cebos (Greenberg et al., 2006; Klotz et al., 1998; Vega & Rust, 2003). Uno de los pocos trabajos donde se realizó un seguimiento inmediato tras la colocación de cebos fue el Boser et al. (2014). De dicho trabajo se puede extraer otra coincidencia sorprendente con el nuestro, ya que Boser et al. (2014) registraron el número de hormigas atraídas por cebos tóxicos entregados por medio de hidrogeles y las mediciones se tomaron cada 2 horas a partir del momento de la colocación del cebo y continuaron durante 8 horas, seguidas de registros adicionales a las 24 y 48 horas. Dos horas después de la colocación del cebo, un porcentaje sustancial de hormigas *L. humile* estaba presente y este número disminuyó ligeramente a las 4 horas antes de experimentar una reducción significativa a las 6 horas. Posteriormente, la curva se mantuvo relativamente estable con fluctuaciones menores alrededor de ese valor. Extrapolando los datos de ese gráfico y considerando solo a *L. humile*, se puede calcular que hubo una reducción aproximada del 79 % a las 6 horas. Dado el efecto de mortalidad retardada que deben tener los cebos para hormigas, podemos suponer que esta reducción inicial no se debió a mortalidad generada por el cebo. Este valor coincide con nuestro 80% a las 6 h de iniciado el consumo del cebo tóxico. Además, dicha coincidencia en el porcentaje de disminución que se obtuvo es aún más interesante si tenemos en cuenta que se utilizaron diferentes compuestos tóxicos, ya que en nuestro caso usamos ácido bórico 3%, mientras que Boser uso tiame toxam en ambos casos diluido en sacarosa 20 o 25%. Por lo tanto, el comportamiento de abandono que realiza *L. humile* podría incluso ser independiente del compuesto tóxico utilizado.

Respecto al consumo del cebo, pudimos confirmar que en los puentes con sacarosa la ingestión fue significativamente mayor que en los puentes con el cebo tóxico (Fig. 3.5). Esto podría deberse tanto a la menor actividad que observamos en los puentes con el cebo tóxico respecto a los de sacarosa como también a una menor ingestión individual. Respecto a esto último, hay diferentes trabajos donde se evalúa dicho consumo comparando soluciones de sacarosa con ácido bórico con respecto a soluciones de sacarosa. En dichos experimentos se midió el porcentaje de aceptación (Sola et al., 2013), el tiempo de alimentación (Moauro & Josens, 2023; Sola et al., 2013) para hormigas naïve (esto es, que no tuvieron experiencia con el cebo tóxico antes del registro) y resultó que no hay diferencias entre el control y el cebo de ácido bórico (mayor a 3% p/v en ambos trabajos). Podría pasar que a pesar que el consumo al principio es similar tanto para sacarosa como para ácido bórico luego de un tiempo disminuya en este último y que dicha falta de motivación genere el posterior abandono, por ejemplo, debido al malestar posterior a la ingestión. Lo que si podemos confirmar ahora es que la actividad en ambos puentes fue similar en las dos primeras horas del ensayo y por ende el consumo podría haber disminuido luego de las 3 horas.

En resumen, si integramos los resultados del capítulo anterior y el presente, demostramos que, al inicio, la actividad en los caminos de recolección al cebo tóxico y sacarosa fueron similares (las primeras 2 o 3 horas), luego empieza a disminuir en el puente con el cebo tóxico generando abandono del mismo con una reducción del 80% con respecto a la inicial solo 6 horas después. Mientras la actividad en el sendero troncal aún se mantiene alta. Luego de transcurridas unas horas más (8 h en este ensayo y 24 h en el anterior capítulo) ya se observa un impacto en el sendero troncal próximo al cebo tóxico disminuyendo la actividad e incluso viéndose desviaciones que evitan la proximidad con el puente del cebo tóxico (Fig. 3.6). Esta integración se resume en el siguiente esquema (Fig. 3.6).

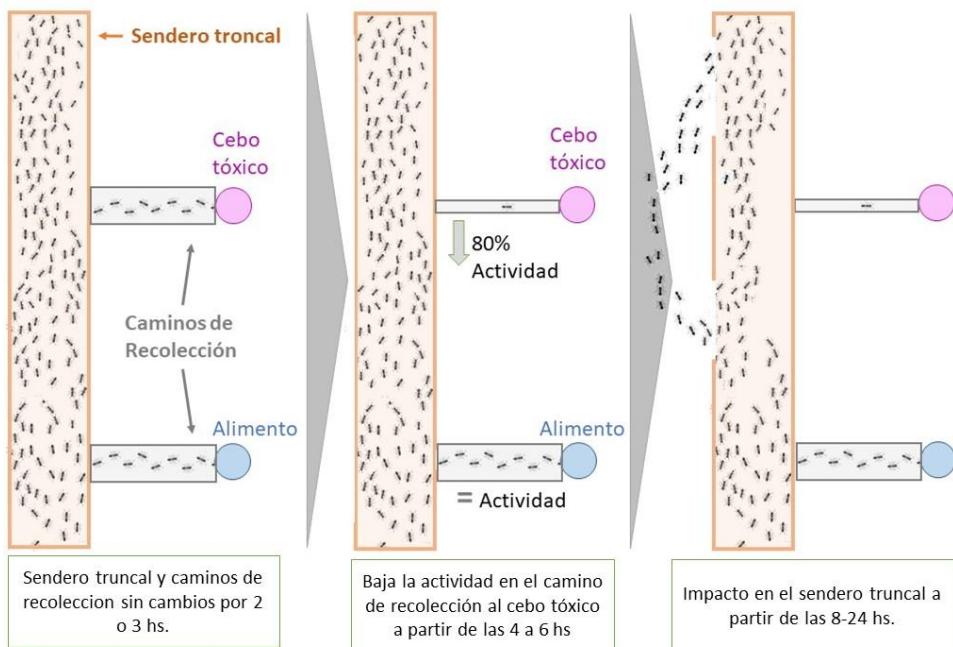


Figura 3.6. Esquema a modo de resumen gráfico que Integra la actividad en los caminos de recolección y en los senderos troncales adyacentes a lo largo de las horas y días que duraron ambos experimentos.

En conclusión, podemos confirmar que existe abandono por parte de las obreras de *L. humile* debido a la presencia y consumo de un cebos tóxico en un camino de recolección. En los próximos capítulos nos enfocaremos en evaluar qué mecanismos podrían estar generando dicho abandono y rechazar algunas hipótesis alternativas respecto a otras posibles explicaciones.

Capítulo 4. Mecanismos que subyacen al abandono

Introducción

Las especies invasoras plantean desafíos importantes en diversos entornos, incluidos urbanos, agrícolas y naturales. Los cebos adicionados con un tóxico son un método para controlarlas de forma amigable con la salud ambiental y humana (Collins & Callcott, 1998). Sin embargo, este método a menudo resulta ineficaz (Howse et al., 2023). Tradicionalmente, una reducción significativa en la presencia de hormigas después de la aplicación del cebo se atribuye a la disminución de la población causada por la mortalidad inducida por el cebo (Rust et al., 2004). En consecuencia, los aumentos posteriores en la presencia de hormigas se han interpretado como reinfestaciones a partir de áreas no tratadas (Klotz et al., 1998; Vega & Rust, 2003). Sin embargo, nuestros resultados indican que las hormigas exhiben una estrategia de comportamiento en respuesta a los cebos (Zanola et al., 2024; Capítulos 2 y 3). Las hormigas abandonan no sólo el cebo en sí, sino también el área próxima.

El abandono se definió como una reducción significativa y estable de la presencia de hormigas en la zona del cebo. Esta reducción se consigue rápidamente, al cabo de 6 horas, alcanzando valores alrededor del 80% (Boser et al., 2014; Zanola et al., 2024), y se mantiene en el tiempo. No se vuelven a detectar episodios de reclutamiento masivo a pesar de que puede haber actividad muy elevada en las proximidades (Zanola et al., 2024). Dado que este fenómeno se observa a nivel colectivo y no individual, es difícil comprender los mecanismos involucrados.

En este capítulo abordaremos el estudio de dos mecanismos posibles. Por un lado, nos preguntamos si existe una marca química específica que las hormigas depositen que podría conducir a este tipo de disminución en la actividad en el entorno del cebo. A esta hipótesis de una marca química negativa, la nombraremos “Marca-“. Por otro lado, estudiaremos si algún tipo de memoria aversiva pudiera estar involucrada en el abandono. Nombraremos a este tipo de memoria “Memoria-“. Es decir, exploraremos si la detección del riesgo que supone el cebo tóxico podría generar un sistema de comunicación química (información social) en el sitio próximo al cebo, y/o una memoria aversiva (información individual) que haga que las hormigas eviten acercarse al área donde el cebo se encuentra.

Mientras recolectan soluciones azucaradas, muchas especies de hormigas, incluida *L. humile*, dejan un rastro de feromonas de camino (“Marca +” en nuestra terminología) (Choe et al., 2012) y formarán memorias apetitivas (“Memoria +”) asociando la recompensa con su ubicación (Wagner et al., 2023). Mientras probamos las dos hipótesis propuestas, también necesitamos demostrar que, al ofrecer una solución de sacarosa en un puente, hay una Marca + en el puente y una Memoria + asociada con el lugar donde se colocó el puente. Cualquier posible efecto de abandono (Memoria – o Marca –) actuará en contra de estas influencias positivas, por lo que el efecto atractivo de la Memoria + y la Marca + también debe cuantificarse.

Algunos estudios han reportado la existencia de marcas negativas en diferentes insectos sociales. Por ejemplo, la hormiga faraón (*Monomorium pharaonis*) posee lo que se llama una “feromonas de rechazo”, que deposita en aquellos senderos que no le aportan ningún beneficio, ya sea por escasez o por agotamiento de recursos (Robinson et al., 2005, 2008). Algunas feromonas generan diferentes respuestas según el contexto. Por ejemplo, en abejas, la feromonas de alarma provoca agregación y ataque si está cerca de la colmena, pero sobre la fuente de alimento, actúa como una marca negativa, indicando: “no vengas aquí” (Balderrama et al., 2002).

Objetivo general

El objetivo de este capítulo es estudiar algunos mecanismos que podrían estar involucrados en el abandono de senderos.

Para que se produzca el abandono activo, propusimos dos mecanismos no mutuamente excluyentes: 1) el uso de feromonas de rechazo, que llamaremos “Marca –”(marca negativa), y 2) memorias aversivas (Memoria -) asociada con la ubicación del cebo tóxico.

Pregunta general: ¿Qué mecanismos están involucrados en el abandono en un camino de recolección en *L. humile*?

Hipótesis 1: El abandono se debe a que depositan una marca química de rechazo en el puente con el cebo tóxico (**Marca -**).

Predicción 1a: Al poner un puente con la hipotética Marca - en un sitio donde había un puente con sacarosa, la actividad será menor que si se coloca un puente limpio (No marca).

Hipótesis 2: El abandono se debe a que establecen algún tipo de memoria aversiva (de navegación, visual, etc.) que genera una evitación del sitio cercano o de acceso al cebo tóxico. (Memoria -).

Predicción 2a: Al poner un puente con marca + en el sitio donde había un puente con cebo tóxico que fue abandonado, por lo cual se estableció la hipotética memoria aversiva, la actividad no va a aumentar.

Predicción 2b: La actividad al poner un puente con Marca+ será menor comparativamente en el lugar donde estaba el cebo tóxico abandonado, o sea con la hipotética memoria negativa en relación a un sitio donde previamente no había nada (No Memoria).

Metodología

Área y momento de muestreo

El experimento se llevó a cabo en el campus de la Universidad de Buenos Aires. Durante los meses más cálidos desde diciembre a abril de 2022 y 2023, cuando las hormigas están más activas y se pueden encontrar senderos troncales alrededor del perímetro de los edificios.

Soluciones

Se utilizaron las mismas soluciones de los ensayos de abandono (ver capítulo 2 para más detalles) que corresponde a una solución de sacarosa al 20% (p/p) y como cebo tóxico se utilizó ácido bórico al 3% p/p mezclado con sacarosa 20% (p/p).

Diseño experimental

Para empezar, es importante recordar que un puente donde se estuvo recolectando sacarosa durante varias horas con gran actividad de hormigas, tendrá una feromonía de camino (Marca +), y a la vez, una memoria apetitiva o positiva asociada al sitio en particular donde inicia el puente (ya sea memoria navegacional o por claves visuales. Memoria +). Por el contrario, para un puente que tuvo el cebo tóxico por varias horas hasta haber sido abandonando, habrá generado los dos mecanismos hipotéticos propuestos: Marca - y Memoria -. Por otro lado, un puente donde no se ofreció nada, no tendrá ninguna marca química (No Marca), así como tampoco habrá generado ninguna memoria sobre ese sitio en particular (No Memoria).

A partir de esta premisa, se diseñó el experimento de modo de obtener diferentes combinaciones de marcas y memorias mediante el cambio de puentes ubicados en distintos sitios de un sendero troncal de *L. humile*. Para ello, luego de detectar un largo sendero troncal se ubicaban los puentes separados entre sí por al menos 5 m de distancia unos de otros. Se inició el reclutamiento tal como se describió en el capítulo 2. Inicialmente, los puentes ofrecían sacarosa y un puente no ofrecía nada. El primer día se tuvo por objeto generar una gran actividad de recolección en los puentes que ofrecían sacarosa (como se describió en el capítulo 3). Luego de lograr gran actividad en aquellos puentes con sacarosa, en uno se reemplazó por cebo tóxico dejando al menos 8 horas hasta confirmar que el abandono haya ocurrido. De esa manera, se cuenta con las siguientes situaciones: un puente que habiendo ofrecido cebo tóxico fue abandonado, puentes que ofrecieron sacarosa y presentan gran actividad y otra situación con un puente que no ofreció nada en ningún momento. Los cruzamientos se llevaron a cabo en 2 días consecutivos y se esquematizan y explican a continuación (Fig. 4.1):

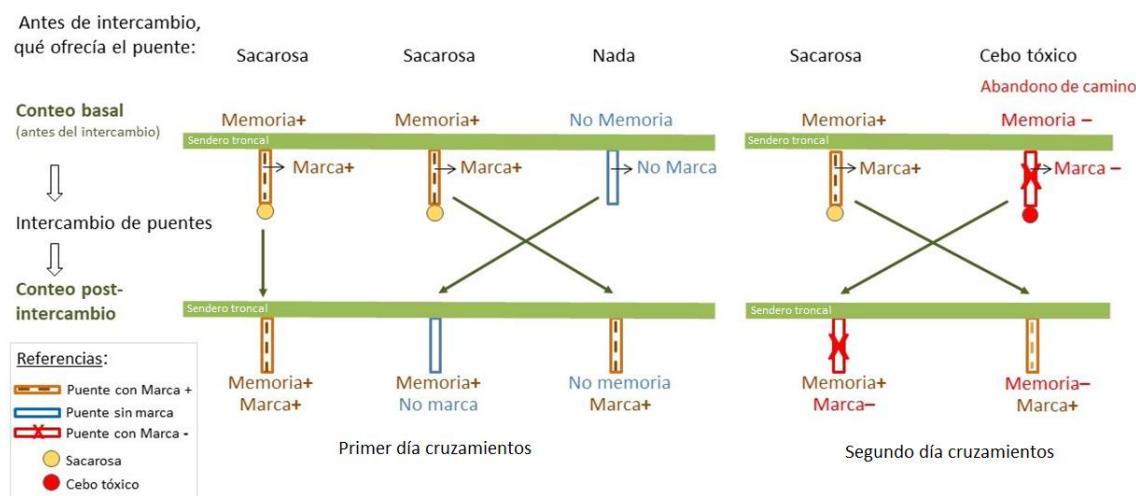


Figura 4.1. Diseño del experimento para probar la hipótesis de una “feromona de rechazo” o marca química negativa depositada en el puente (Marca-), y la hipótesis de memoria aversiva asociado al sitio (Memoria-). El sendero troncal se graficó en verde y los puentes se simbolizan con un círculo amarillo cuando tienen sacarosa, círculo rojo con el cebó tóxico, y sin círculo cuando no tienen nada. Las hipótesis se probaron cambiando los puentes y comparando la actividad de las hormigas antes y después del cambio. Se realizaron cinco combinaciones en dos días consecutivos (primer día los tres cruzamientos de la izquierda y segundo día los otros dos cruzamientos). Inicialmente, tres puentes ofrecían sacarosa, por lo que se supuso que estaban marcados por feromonas de camino (Marca+) y una memoria apetitiva estaba asociada a estos sitios (Memoria+); uno no ofrecía nada, por lo que asumimos que no había ninguna marca ni memoria allí (No Marca y No Memoria). En la última situación, se ofreció el cebó tóxico durante 8

horas en el puente, y se confirmó el abandono. Así, este puente tendría la hipotética Marca- y la hipotética Memoria-. Después del cambio, no se ofreció azúcar ni cebo tóxico en ningún puente, y la actividad de las hormigas se cuantificó dos minutos después de la reubicación del puente.

Antes y después de realizar cada cruzamiento de puentes se filmó en forma simultánea el puente desde arriba durante 7 minutos. Posteriormente, a partir de los videos, se cuantificó el número de hormigas que cruzaban una línea imaginaria en dirección hacia la fuente de alimento. Este conteo será la Actividad de las hormigas expresado por minuto.

Para el registro de la actividad se utilizaron dos cámaras las cuales estaban fijadas a un tutor y ubicadas de tal forma que se pueda filmar simultáneamente la actividad en dos puentes. Luego de la primera medición, se prosiguió a realizar el cambio de puentes. Para ello, previamente se puso a punto la metodología de cómo tomar el puente y retirar a las hormigas sin generar una situación de alarma, de modo que, al volver a colocar el puente en su lugar, la actividad sea igual en dos minutos. Primero se sacaban los tubos y la arena de recolección del puente, luego se levantaba el puente, se eliminaba el líquido que había en los vasos del pie del puente y posteriormente se dejaban caer a las hormigas mediante una sacudida rápida (un golpecito del puente en el sustrato que generaba que la mayoría de hormigas se caigan del mismo) y se quitaban con un pincel suave las pocas hormigas que quedasen en el puente. Inmediatamente se ubicaba el puente en su nuevo sitio. Se procedía a continuación de la misma forma con el otro puente. Este procedimiento, del cambio de ambos puentes, tardaba aproximadamente 1-2 minutos. Después, se realizaba el registro de la actividad. Importante aclarar que el segundo conteo, posterior al cambio de puentes, se hacía sin ofrecer solución de sacarosa, ni cebo en la arena de recolección. Además, para evitar la gran acumulación y tráfico de hormigas en el puente, se colocó una tira de papel en el otro extremo del puente para que las hormigas puedan bajar por ahí durante la filmación (Fig. 4.2).

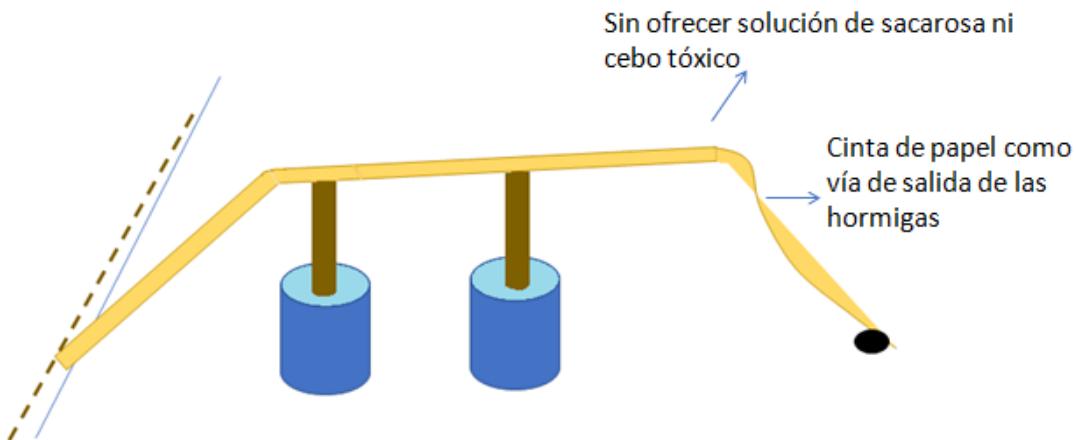


Figura 4.2. Dispositivo experimental adaptado para la evaluación de modo de evitar nuevo reclutamiento por recompensa y evitar amontonamiento de hormigas.

Al puente que nunca ofreció nada, se lo consideró como *No marca* y *No memoria*, pero para evitar cualquier “*footprint*” (rastro de huellas) sobre el puente, se reemplazó la cinta adhesiva de papel que lo cubría antes de volver a colocarlo en la nueva posición.

Se realizaron distintos cambios de puentes obteniendo así diferentes combinaciones de Marcas y Memorias (Fig. 4.1). Por un lado, se contó con un control de manipulación que consistía en sacar las hormigas y alimento de uno de los puentes de sacarosa y luego ubicarlo en el mismo sitio. De este modo, se pone un puente con Marca+ donde había Memoria+ (control sham o de manipulación). Otro cambio se hizo sacando otro puente de sacarosa y ubicándolo en el sitio donde estaba el puente sin nada, por ende, ubicar un puente con Marca+ en un sitio sin memoria apetitiva ni aversiva (No Memoria). El último cambio fue poniendo el puente sin marca en el sitio donde antes había un puente de sacarosa y por lo tanto teniendo que en un sitio con Memoria + ponemos un puente sin marca (No Marca).

Por otro lado, para el puente que ofreció el cebo tóxico durante 8 horas y se registró el abandono, tendría la marca negativa (Hipótesis 1: *Marca -*), y fue colocado en un sitio donde había un puente de sacarosa (Memoria+). Al mismo tiempo, en el sitio donde se sacó el puente abandonado (Hipótesis 2: *Memoria -*) se colocó un puente de sacarosa (Marca+).

En todos los casos, inmediatamente después del cambio de puentes, se cuantificó nuevamente la actividad filmando durante 7 minutos para luego registrar el número de hormigas que entraban al puente en ese tiempo, expresado por un minuto.

Al considerar el experimento completo logramos generar las siguientes situaciones:

Antes del cambio de puentes, tres puentes con sacarosa 20% y por ende con Marca+ y Memoria+; un puente sin nada, por lo tanto, No marca y No memoria, y un puente con el cebo tóxico con las hipotéticas Marca- y Memoria-. Luego del cambio de puentes se obtuvieron las 5 combinaciones o tratamientos, que se observan en la Fig. 4.1:

1) Memoria+ y Marca+: Control de Manipulación.

Un puente que ofrecía solución de sacarosa fue retirado y luego recolocado en el mismo sitio tras una manipulación idéntica. Este tratamiento se diseñó para controlar los efectos potenciales del reemplazo del puente.

2) Memoria+ y No marca: Control Memoria apetitiva

Un puente que previamente no ofrecía solución (No marca) se colocó en el sitio de un puente que previamente ofrecía sacarosa (Memoria+). Para asegurar la ausencia de feromonas, también se reemplazó la cinta de pintor que cubría el puente. En este caso, se asume que la memoria asociada al sitio sería suficiente para mantener cierta actividad en el puente, incluso tras eliminar las feromonas de camino. Este tratamiento mide el efecto de la Memoria+ del sitio.

3) No Memoria y Marca+: Control Feromona de camino

Un puente que ofrecía sacarosa se trasladó al sitio donde previamente había un puente sin solución (No memoria). Aquí, se espera que la presencia de una marca de feromona sea suficiente para desencadenar actividad en el sitio. Este tratamiento evalúa el efecto de la feromona del rastro en el aumento de la actividad.

4) Memoria+ y Marca-:

Un puente que previamente ofrecía el cebo tóxico y fue abandonado (conteniendo la hipotética Marca-) fue colocado en el sitio donde antes se encontraba un puente que ofrecía sacarosa.

5) Memoria- y Marca+:

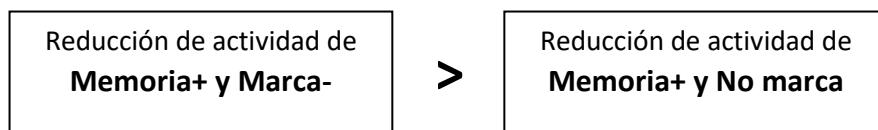
Un puente que ofrecía solución de sacarosa fue colocado en el sitio donde previamente se encontraba el puente que ofrecía el cebo tóxico y fuera abandonado. Este tratamiento evalúa el impacto de una marca positiva cuando sí hay memoria negativa previa asociada al sitio.

Este experimento se repitió seis veces en diferentes senderos troncales separados al menos a 50 metros entre sí.

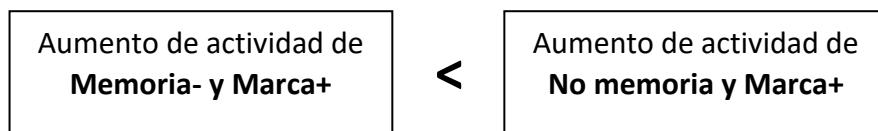
Justificación y razonamiento

El diseño experimental propuesto busca validar dos hipótesis relacionadas con la presencia de marcas negativas (Marca-) y memorias aversivas (Memoria-), utilizando comparaciones claves entre tratamientos.

Es razonable suponer que luego de reemplazar un puente que conducía a sacarosa, por lo tanto, con feromona positiva (Marca+ Memoria+), por un puente con una posible marca negativa (Marca-), se reducirá más la actividad en el puente colocado con respecto al control de manipulación, o sea, a volver a poner el puente que ofrecía sacarosa. Sin embargo, esta disminución también podría darse simplemente por poner un puente limpio, por la ausencia repentina de feromona de camino en el puente (Marca+). Por lo cual, para demostrar la existencia de una marca negativa activa (Marca-), la reducción en la actividad al colocar este puente con Marca- debe ser mayor que la reducción observada al colocar un puente limpio sin feromona. Así, la comparación clave para demostrar la hipótesis de Marca- es:



Por otro lado, al poner un puente que ofrecía sacarosa, y por ende con feromona de camino (Marca +), en el lugar donde no se ofrecía nada, se espera que la presencia de la marca + genere un gran ingreso de hormigas hacia el puente. Esto es, *un incremento significativo en la actividad debido a la marca +*. En cambio, si un puente que ofrecía un cebo tóxico ha sido abandonado, y queremos demostrar que en ese sitio queda asociada una memoria aversiva (Memoria-), al colocar un puente con Marca+ en esta ubicación no debería producirse un aumento significativo en la presencia de hormigas. Este aumento debería ser inexistente o menor en comparación con el observado al colocar un puente con Marca+ en una ubicación sin memoria asociada. Así, la comparación clave para demostrar la hipótesis de Memoria- es:



Es importante destacar que, para probar Memoria-, se deben usar puentes Marca+ en lugar de puentes sin marcar. Esto se debe a que los puentes sin feromonas no generarían suficiente tráfico, lo que impediría realizar comparaciones adecuadas.

Análisis estadísticos

Este experimento se realizó para probar si el abandono podría ser causado por una feromona de "rechazo" (denominada aquí Marca-) o memorias aversivas (denominados aquí Memoria-). Como la "actividad antes del cambio" no era la misma en todos los sitios, estandarizamos la actividad de acuerdo con la actividad inicial en cada sitio. Por lo tanto, la variable de respuesta fue el valor estandarizado de la actividad de la hormiga después del cambio de puentes. Esta variable respuesta toma una distribución normal (gaussiana). (ver Anexo para más detalles).

Se construyeron dos modelos: uno para comparar la actividad hormigas antes y después del cambio de puentes para cada una de las 5 situaciones (tratamientos) generadas. El otro para comparar el cambio en la actividad estandarizada, entre pares de tratamientos para probar las hipótesis según se explica en la sección *Justificación y razonamiento*. En ambos casos el análisis principal se hizo mediante el paquete glmmTMB (Brooks et al., 2022).

Modelo 1, compara la actividad antes y después del cambio en cada sitio: la variable de respuesta fue la actividad de las hormigas en los puentes, y la distribución que mejor se ajustaba a los datos era la distribución binomial negativa. Las variables explicativas fijas incluyeron los tratamientos (5 niveles: (Mem+ y Marca+), (Mem+ y No marca), (Mem+ y Marca-), (No mem y Marca+), (Mem- y Marca+) y el momento (2 niveles: antes y después del cambio de puentes). Las variables explicativas aleatorias fueron las réplicas (n=6) y los puentes (18 niveles: tres puentes por réplica). Para realizar este análisis, se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos con una interacción entre el momento y el sitio. Por último, se realizaron comparaciones a posteriori de a pares entre tratamientos utilizando la función emmeans (Lenth et al., 2023).

Modelo 2, comparando la actividad estandarizada luego del cambio entre dos tratamientos: La variable respuesta fue el valor estandarizado (Cambio Actividad) del número de hormigas por minuto luego del cambio del puente, siguiendo una distribución normal (Carey & Delaney, 2010). Para cada réplica, el Cambio Actividad se calculó como:

$$\text{Cambio Actividad} = \frac{\text{Actividad después del cambio puentes}}{\text{Actividad antes del cambio puentes}}$$

La variable explicativa fija fueron los tratamientos: (5 niveles: (Mem+ y Marca+), (Mem+ y No marca), (Mem+ y Marca-), (No mem y Marca+), (Mem- y Marca+)). La variable explicativa aleatoria fueron las réplicas (n=6). Para el análisis se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos con una distribución normal. Por último, se realizaron comparaciones a posteriori de a pares entre tratamientos utilizando la función emmeans (Lenth et al., 2023).

Resultados

Análisis cambio de puentes

Para poner a prueba las dos hipótesis ya mencionadas: una feromona de "no entrar" ("Marca-"), y una memoria aversiva de la ubicación ("Memoria-"), primero realizamos un análisis para comparar la actividad en cada sitio antes y después del cambio de puentes, o sea, primero con el puente inicial y luego con el puente nuevo (Fig. 4.3).

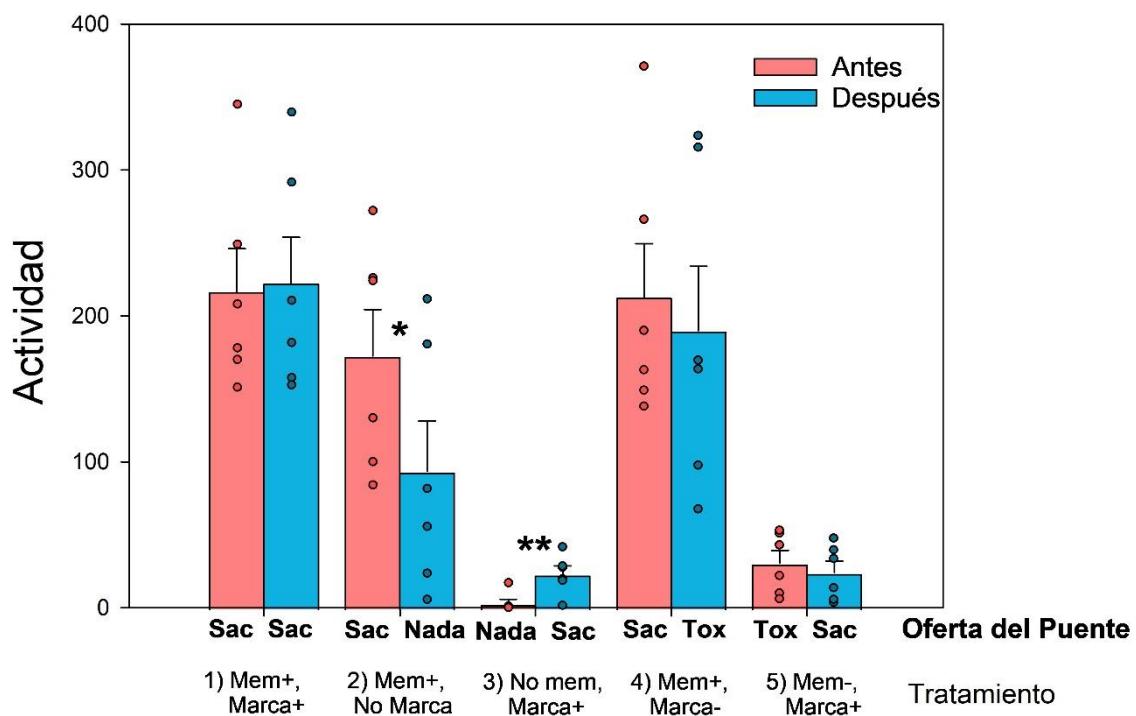


Figura 4.3. Actividad de las hormigas en los puentes antes (rosa) y después (celeste) del cambio de puentes. El eje X se indica de dos maneras: *Oferta del Puente* se refiere a lo que se ofrecía en los

puentes antes del cambio, mostrando primero (debajo de la barra rosa) lo que ofrecía el puente en esa ubicación y debajo de la barra celeste, lo que ofrecía previamente el puente puesto luego en ese mismo lugar. Durante el registro *después* del cambio, los puentes no ofrecían nada en la arena de recolección. *Tratamiento* se refiere a las cinco combinaciones de memorias (Mem+, Mem- o No mem) y marcas (Marca+, Marca- o No Marca) que se lograron. Antes del cambio, se ofrecen 3 tratamientos de sacarosa (Sac), estos sitios generarán Memoria+; en otro tratamiento, el puente no ofrecía nada (Nada), por lo que este sitio generará No Memoria; en el último tratamiento el puente tuvo cebo tóxico (Tox) hasta llegar al abandono, por lo que este sitio generará la hipotética Memoria-. De manera similar, los 3 puentes que ofrecieron sacarosa tendrían Marca+, el que no ofrecería nada no tendrá marca (No Marca), y el que se abandonó por el cebo tóxico tendría la hipotética Marca-. Dentro de cada tratamiento, las diferencias entre Antes y Despues del cambio se muestran con asteriscos (*p<0,05; **: p<0,01; sin símbolo: no significativo), mientras que los círculos dentro de cada barra representan a cada una de las seis réplicas, n = 6.

Examinando la Fig. 4.3, podemos ver que:

- Todas las barras rosas que tenían solución de sacarosa antes del cambio de puentes tuvieron una actividad similar. El puente que no ofrecía nada, casi no tenía hormigas. El puente que ofreció el cebo tóxico previamente había tenido sacarosa y niveles de actividad similares a los demás puentes de sacarosa. Luego de 8 h de ofrecer el cebo tóxico mostró baja actividad, ~80% menor con respecto a la actividad inicial, confirmando el abandono (ver capítulo 2 y Zanola et al., 2024).

Si comparamos en cada sitio antes y después del cambio de puentes podemos sacar algunas primeras conclusiones:

- En el Tratamiento 1) Memoria+ y Marca+: La manipulación per se no generó un cambio significativo en la actividad en el puente ya que la actividad antes (puente con sacarosa) comparada con después de poner el mismo puente no fue significativa (estimador = -0,02; p = 0,85).
- En el Tratamiento 2) Memoria+ y No Marca: La actividad disminuyó significativamente al no haber más feromona en el puente (estimador = 0,76; p = 0,0012). La Memoria+ asociada al sitio, donde antes había comida, es suficiente para que la actividad se mantenga en ~54% de la inicial.
- En el Tratamiento 3) No Memoria y Marca+: La mera presencia de la feromona (Marca+) provocó el reclutamiento inmediato al puente (aunque no tenía recompensa), aumentando la

actividad en un 670% con respecto al puente anterior en esa ubicación que no ofrecía nada (estimador = - 1,94; p = 0,004).

- En el Tratamiento 4) Memoria+ y Marca-: La colocación de un puente abandonado previamente por ofrecer cebo tóxico, y que contenía la hipotética Marca-, que esperábamos reduzca la actividad, no generó una disminución significativa de la actividad en un sitio donde antes había un puente con sacarosa (estimador = 0,14; p= 0,31).

- En el Tratamiento 5) Memoria- y Marca+: Al colocar un puente con feromona de camino en un sitio previamente asociado a un cebo tóxico, por medio de una hipotética Memoria-, esperábamos no genere un gran incremento de la actividad (hipótesis de memoria aversiva). Efectivamente, no se observó un cambio en la actividad en comparación con la cantidad de hormigas previamente presentes en el puente con el cebo tóxico (estimador= 0,25; p = 0,56).

Actividad después del cambio de puentes

Siguiendo la lógica descrita en la sección *Justificación y Razonamiento*, tuvimos que realizar comparaciones entre tratamientos específicos para probar nuestras hipótesis. Como la actividad inicial es diferente entre los sitios con y sin sacarosa, estandarizamos el cambio en la actividad después del cambio de puentes en relación con la actividad inicial para cada tratamiento, creando un estadístico que denominamos Cambio Actividad. Cuando el valor del Cambio Actividad es cercano a uno, la actividad se mantuvo similar antes y después de cambiar los puentes. Los valores menores a uno denotan una caída en la actividad y los valores mayores a uno denotan un aumento (Fig. 4.4).

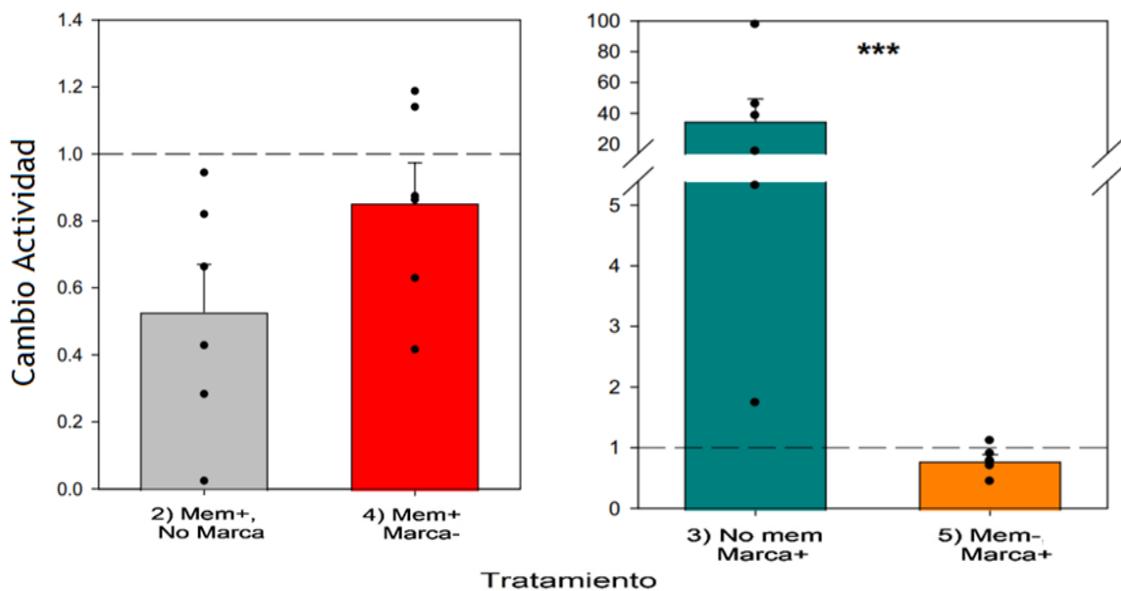


Figura 4.4. Prueba de las hipótesis comparando el cambio en la actividad después del cambio de puentes en pares de tratamientos. **A:** Prueba de la hipótesis de la Marca-. Antes del cruzamiento de puentes, hubo solución de sacarosa en ambos puentes, por lo que se asoció dichos lugares con una Memoria+. Al intercambiar los puentes, si existe una marca negativa, la disminución de la actividad (Cambio Actividad menor a uno) debe ser mayor al colocar un puente con una marca negativa (tratamiento 4; barra roja) que al colocar un puente limpio (tratamiento 2; gris bar). **B:** Prueba de la hipótesis de la Memoria-. Antes del cambio, no había nada en el puente, por lo que no se asoció ninguna memoria a dicho sitio, mientras que, en el otro sitio, se dispuso de un cebo tóxico durante 8 h, lo que resultó en un abandono del puente. Por lo tanto, una hipotética memoria negativa debería haber sido asociada con ese sitio. Despues del cambio de puentes, cada uno de los dos sitios, uno neutral (tratamiento 3, cian) y otro con la hipotética memoria – (tratamiento 5, naranja) recibieron un puente con feromonas de camino (Marca+). Las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con asteriscos (***: p < 0,001; NS: no significativo). n = 6.

Para aceptar la hipótesis de Marca-, la disminución de la actividad generada por la colocación de un puente abandonado debe ser mayor que la disminución generada por la colocación de un puente limpio (No marca). Este no fue el caso: como se ve en la Fig. 4.4A los tratamientos no difirieron significativamente entre sí (estimador = 0,376; p = 0,61). De hecho, existe una leve tendencia a mostrar una mayor reducción cuando se coloca un puente sin marca que cuando se coloca un puente con la supuesta Marca-. Por tanto, rechazamos la hipótesis de la marca negativa como mecanismo responsable del abandono del camino.

Por otro lado, colocamos un puente marcado con feromonas de camino en un lugar donde no había memoria asociada y otro puente marcado también con Marca+ en un lugar

donde se había producido el abandono, lo que indica que podría tener la memoria negativa hipotética. Un aumento de actividad sólo debería darse en el lugar sin memoria negativa o, como máximo, ser mayor en el lugar sin memoria. Pudimos observar en la Fig. 4.4B que la actividad en el tratamiento No Memoria y Marca+ es significativamente mayor con respecto Memoria- y Marca+ (estimador = -1,26, $p= 0,001$). Esto sugiere fuertemente la presencia de memorias aversivas (Memoria-) que impulsan, al menos parcialmente, la conducta de abandono descrita.

Discusión

Este estudio representa la primera evaluación experimental de los mecanismos de comportamiento que podría tener la hormiga argentina, *L. humile*, para generar la respuesta de abandono de un camino de recolección hacia cebos tóxicos. Los resultados mostraron que para que ocurra abandono se establecen ciertas memorias aversivas que generarían un efecto de evitación por parte de las obreras para regresar al lugar donde ingirieron un alimento que seguramente habrá generado algún tipo de malestar. Por otro lado, no hubo ninguna evidencia de que exista una marca química negativa sobre el puente abandonado.

Las hormigas son organismos con grandes habilidades cognitivas. El aprendizaje apetitivo durante la recolección ha sido demostrado en diversas especies, tanto en contextos individuales como sociales (Cammaerts & Cammaerts, 2014; Josens et al., 2016; Provecho & Josens, 2009), mostrando memorias de larga duración (Guerrieri et al., 2011; Josens et al., 2009; Piqueret et al., 2019). Por ejemplo, el aprendizaje de olores o sabores relacionados con una recompensa puede permanecer estable durante 48 horas (Wagner et al., 2023).

En el caso del abandono, podría tratarse de una memoria aversiva, probablemente de muy larga duración, que implica una asociación entre alguna característica de una fuente de alimento recientemente visitada, la cual sería asociada a un posible malestar que pudieran experimentar las hormigas. En hormigas cortadoras, se ha demostrado que las obreras pueden formar rápidamente asociaciones aversivas de larga duración, sin embargo, estas asociaciones suelen estar basadas en olores más que en ubicaciones específicas (Arenas & Roces, 2018; Saverschek & Roces, 2011).

La aversión post-ingesta es la explicación más parsimoniosa como memoria posible que subyace al abandono (comer veneno, sentirse enfermo, evitar alimentos/ubicación en el futuro). Esta respuesta llamada aversión condicionada ha sido demostrada asociando el alimento ingerido previo al malestar en algunos insectos (Honjo & Furukubo-Tokunaga, 2009; Unoki et al., 2005), pero no hay evidencia de su presencia en otros (Behmer et al., 1999; Bernays & Lee,

1988; Ghumare & Mukherjee, 2005; Wright et al., 2010). Este comportamiento existe y ha sido bien estudiado en otro insecto social, como las abejas (Behmer et al., 1999; Bernays & Lee, 1988; Ghumare & Mukherjee, 2005; Wright, 2011; Wright et al., 2010), aunque no pudo ser encontrada en hormiga argentina (Galante et al. 2024).

Relacionado con esto, en un artículo reciente (Freas et al., 2021), los autores mostraron que las hormigas *Cataglyphis* sp. pueden formar una memoria visual negativa de un sitio que representa un peligro para la navegación. En otras hormigas del desierto, *Melophorus bagoti* y *Cataglyphis fortis* durante la navegación en sus ambientes naturales al recolectar, la experiencia de una situación de riesgo o peligro (una trampa) desencadena que en el siguiente viaje realicen un giro para no caer en dicha trampa (Gotelli, 1996; Wystrach et al., 2020). Esta evidencia, va en el mismo sentido que el mecanismo que proponemos para el abandono: una evitación del riesgo experimentado. Se ha observado que la hormiga carpintera *Camponotus mus* evitó generar encuentros con un cebo tóxico modificando la trayectoria de su sendero, formando un semicírculo de unos 30 cm de radio alrededor del cebo (Josens et al., 2016). Este último fenómeno lo pudimos observar en los ensayos de abandono en un par de sitios del sendero troncal donde se encontraba el cebo tóxico (ver sección 1). Este tipo de desviación impide que la mayoría de las hormigas que circulan por el sendero se topen con el cebo tóxico.

En roedores ha sido profundamente estudiado la aversión condicionada al gusto (CTA por las siglas en inglés) (Chambers, 2018; Nakai et al., 2020), conocido también como el "Efecto García", el cual guarda relación con el mecanismo que podría subyacer al abandono. Los organismos aprenden y recuerdan fácilmente que deben evitar alimentos inicialmente apetitosos, palatables, que luego los enferman. Garcia et al. (1955) demostraron una aversión gustativa duradera (~ 30 días) a un sabor específico asociado con un malestar como refuerzo negativo. Más tarde se demostró que para esta aversión gustativa no era necesaria la combinación inmediata del alimento (su sabor actuando como estímulo condicionado) con un malestar (Garcia & Koelling, 1966). Es decir, la aversión a la comida se obtuvo con un intervalo de 1 h entre la presentación del alimento y la inyección de un fármaco que inducía alteración gástrica. Una sola prueba fue suficiente para lograr tal aversión gustativa (Garcia et al., 1967). Estudios posteriores demostraron que incluso con un intervalo de 24 h entre una única presentación de un sabor novedoso con una sustancia que provocó una respuesta de enfermedad algún tiempo después fue suficiente para que los animales evitaran ese sabor específico (Etscorn & Stephens, 1973). Todos estos hallazgos se sumaron al concepto de "timidez ante el cebo", el cual se define como una actitud cautelosa por parte del individuo al cebo tóxico una vez experimentado efectos nocivos del mismo (Rzijska, 1953). En esos estudios, con muchos

datos recopilados durante la Segunda Guerra Mundial, se demostró que la timidez al cebo se debe a memorias que persisten durante varias semanas en ratas.

Cabe destacar las diferencias entre el abandono que nosotros demostramos y este tipo de respuesta de rechazo retardado, esta última es medida en forma individual, y los organismos no sociales también la tienen. El rechazo retardado se refiere exclusivamente a la respuesta del animal hacia el alimento, donde primero lo acepta y luego lo rechaza. En cambio, el abandono estudiado en esta tesis, se refiere a una *estrategia social* de las hormigas para *abandonar el área donde está el riesgo*. No sólo rechazar un alimento tóxico.

Un caso muy estudiado del rechazo retardado pero a nivel social, son las hormigas cortadoras de hojas, que pueden aprender a reconocer un tipo particular de hoja y, en consecuencia, regresar por más o rechazarla (Arêdes et al., 2022; Herz et al., 2008; Roces, 1990, 1994; Saverschek et al., 2010). Estas hormigas pueden asociar hojas normalmente atractivas impregnadas con un fungicida que afecta al cultivo de su hongo simbionte. Al notar que afecta a la honguera, las hormigas aprenden el olor de ese recurso. Esto genera que las hormigas posteriormente rechazan a esa variedad vegetal incluso aunque esta ya no contenga el agente fungicida (Arêdes et al., 2022; Herz et al., 2008; Saverschek et al., 2010; Saverschek & Roces, 2011). Este rechazo generado por una memoria asociativa puede comenzar entre 24 y 48 horas después de que se ofrece el recurso dañino (en realidad no se evaluó antes) y durar entre 18 y 30 semanas (Herz et al., 2008; Saverschek et al., 2010). Las hormigas retiran esas hojas que dañan al hongo de la cámara de cultivo de hongos y las depositan en el basurero de la colonia. Esto amplifica enormemente el aprendizaje de rechazo, porque las recolectoras naïve dentro de la colonia también pueden aprender a evitar las plantas que son dañinas para el hongo al asociar olores de los desechos dentro del basurero (Arenas & Roces, 2016b, 2016a, 2017).

Tratándose de insectos sociales, otro mecanismo que podría estar sucediendo para actuar como un refuerzo negativo que permita establecer una memoria aversiva además del malestar individual, es el efecto observado en otras obreras compañeras de nido. Algo similar ocurre en ratas, que presentan preferencias “socialmente inducidas”. La exposición simultánea al olor de un alimento determinado y a una rata sana ha resultado en una mayor preferencia posterior por este alimento, mientras que la exposición a un alimento con solo olor (sin contexto social) no ha generado dicha respuesta (Galef, 1989). Por otro lado, las ratas exhiben una adquisición social indirecta de aversiones (Galef, 1985). Al describir el llamado “efecto compañero envenenado”, Bond (1982) y Lavin et al. (1980) han demostrado que las ratas poseen la capacidad de distinguir entre sus congéneres sanos y envenenados. Las ratas aprenden a

evitar el sabor de un líquido que beben en presencia de una pareja envenenada (Lavin et al., 1980). En estos casos, la presencia de una rata enferma parece actuar como un estímulo negativo incondicionado. A su vez, otras especies oportunistas han demostrado capacidad de aprendizaje social directo de las aversiones. Los mirlos de alas rojas (*Agelaius phoeniceus*) aprenden a evitar alimentos desagradables después de observar la reacción de sus congéneres (Mason, 1988). De manera similar, en gallinas/gallos(*Gallus gallus*) han mostrado una habilidad similar (Johnston et al., 1998).

En la hormiga argentina, se logró que eviten los olores asociados con los cadáveres de sus compañeras de nido, al ser evaluadas en un laberinto en Y, lo cual podría sugerir un mecanismo potencial de aversión olfativa por lo ocurrido a las compañeras de la colonia, sin embargo, las preferencias de alimentación no se vieron afectadas significativamente (Wagner & Czaczkes, 2023). Respecto a nuestros resultados, es poco probable que asociar el olor de compañeras de nido muertas sea el mecanismo que explique el abandono, al menos al inicio, ya que el ácido bórico tiene una toxicidad retardada (Rust et al., 2004; Sola et al., 2013), mientras que observamos una disminución en la actividad en el puente, después de sólo 3-4 horas. Además, dado el elevado tráfico de los senderos troncales, parece poco probable que el abandono se deba a la muerte de todas las hormigas experimentadas.

Muchas feromonas generan diferentes respuestas según el contexto. Tal el caso de las abejas con la feromona de alarma, que depositada cerca de la colmena genera congregación y agresión, pero en la fuente de alimento puede actuar como una marca negativa (Balderrama et al., 2002; Giurfa & Núñez, 1992; Wetherwax, 1986). El mismo comportamiento se puede observar también con el abejorro *Xylocopa virgin texana* (Frankie & Vinson, 1977). Las hormigas *Lasius pallitarsis* marcan con feromona de alarma un camino para evitar buscar recursos donde puede resultar peligroso por la presencia de otra colonia de hormigas (Nonacs & Dill, 1991, 1988, 1990); aunque el aprendizaje también podría desempeñar un papel.

En resumen, demostramos uno de los mecanismos que intervienen en el abandono de cebos tóxicos y los caminos que conducen a ellos. No hay ninguna evidencia que sugiera que exista una marca negativa en la hormiga argentina, sino que al menos se establecen memorias aversivas asociadas al lugar donde se encuentra el cebo tóxico. Esta respuesta colectiva sin duda afecta cualquier esfuerzo de control de la especie.

Capítulo 5. Descartando hipótesis alternativas al abandono

Introducción

En los Capítulos 2 y 3 hemos demostrado que las hormigas disminuyen muy rápidamente su presencia en el camino de recolección que lleva al cebo tóxico a pocas horas de haber sido colocado. Esta disminución de aproximadamente el 80% respecto de la actividad inicial se mantiene constante durante días. Hemos descartado que se debe a saciedad, y por lo tanto a falta de motivación por recolectar, ya que el puente de sacarosa siempre mantuvo altos niveles de presencia de hormigas. Tampoco se debería a una disminución de la población, ya que el abandono ocurrió en el puente mientras que el sendero troncal se mantenía aun en alta actividad. Sin embargo, conscientes de las implicancias que el abandono representa, quisimos abordar otras explicaciones posibles que pudieran ser planteadas como alternativas cuestionando al abandono. Dichas explicaciones alternativas serán puestas a prueba en este capítulo.

1) Hipótesis de baja palatabilidad: Pese a que en el Laboratorio de Insectos Sociales se ha reportado que *L. humile* ingiere de manera similar un cebo de ácido bórico al 3% que el control de sacarosa (Sola et al. 2013; Moauro & Josens, 2023), estos ensayos fueron realizados en laboratorio con nidos mantenidos en condiciones estandarizadas por más de un mes. Por lo tanto, fue pertinente probar si la respuesta espontánea en los senderos troncales naturales de *L. humile* es similar entre el cebo tóxico y la solución de sacarosa. Si no lo fuera, al colocar el cebo tóxico en el puente, este no resultaría atractivo para ser ingerido, y por lo tanto las hormigas dejarían de recolectarlo y de marcar con feromona de camino. El resultado sería el mismo que el observado, una gran disminución y ningún nuevo incremento de reclutamiento.

En bibliografía encontramos casos de claros rechazos de recursos no palatables. Por ejemplo, ninguna hormiga ingirió cebos azucarados adicionados con hidramethylnona, cuando estos tenían una alta concentración (Hooper-Bui & Rust, 2000). La ingesta resultó prácticamente nula cuando se le ofrecía una solución de sacarosa adicionada con L-arginina (1M; pH =10) (Moauro & Josens, 2023), o benzoato de denatonio en concentraciones muy altas (80ppm) adicionado a una solución de sacarosa tampoco fue ingerida por obreras de *L. humile* (Prina,

2020). Cuando una hormiga nectívora rechaza una solución de sacarosa es muy evidente ya que primero la contacta con sus antenas y/o sus piezas bucales y rápidamente -en menos de unos pocos segundos- se retira (Josens et al., 2016). Teniendo esto en cuenta, medimos la palatabilidad del ácido bórico 3% por parte de *L. humile* en senderos troncales donde se hicieron los ensayos. Entendiendo que la palatabilidad se refleja por la respuesta inmediata al contactar por primera vez un alimento ofrecido.

2) Hipótesis de rápida mortalidad del grupo recolector: Bajo esta hipótesis el grupo recolector muere, y cualquier hormiga que vaya a ingerir muere rápidamente de modo que no se puede reiniciar otro grupo de recolección. En realidad, existe abundante bibliografía que muestra que el ácido bórico tiene un efecto retardado en la mortalidad (Rust et al., 2004; Sola et al., 2013). Aun así, debemos descartar que esto pueda haber ocurrido.

3) Hipótesis de malestar del grupo recolector junto con falta de reemplazo: Esta hipótesis, sugerida por Rust (2024), postula que el grupo recolector establecido en el puente del cebo tóxico padece efectos subletales que le impiden seguir visitando dicha fuente. Esto generaría la disminución en la presencia de hormigas observada. Sumado a esto, no ocurre un nuevo reclutamiento porque todas las obreras estarían ocupadas en otras tareas (visitando otras fuentes de alimento alternativas), con las que mostrarían gran fidelidad (Rust, 2024). Existe cierta evidencia que sugiere que *L. humile* es fiel a los senderos bien establecidos por los que circula (Fernandes & Rust, 2003; Goss et al., 1989). Sin embargo, hasta el momento no conocemos ningún estudio sobre la fidelidad de esta especie hacia las fuentes de alimento. Por otro lado, no hubo ningún indicio de que esto pudiera estar ocurriendo durante los ensayos realizados en esta tesis, más bien lo contrario, pero, aun así, se diseñaron ensayos para poner a prueba esta hipótesis.

Objetivo general:

Se propone poner a prueba diferentes hipótesis alternativas al abandono que pueden plantearse para explicar los resultados observados en las hormigas *L. humile* tras la colocación de un cebo tóxico, donde se muestra la disminución focalizada en el camino de recolección (Capítulos 2 y 3).

Objetivos particulares de acuerdo a cada explicación alternativa planteada:

1) Hipótesis de baja palatabilidad

Objetivo 1: Evaluar que el cebo tóxico utilizado en los ensayos de abandono es palatable en las condiciones del ensayo, esto es, en los senderos troncales.

Hipótesis 1: El cebo tóxico es aceptado por la mayoría de las hormigas que lo contactan.

Predicción 1: El porcentaje (%) de aceptación (la cantidad de hormigas que aceptan el cebo/total) será igual en el cebo tóxico (ácido bórico 3% disuelto en sacarosa 20% p/p) que en la solución de sacarosa 20%.

2) Hipótesis de rápida mortalidad del grupo recolector

Objetivo 2: Analizar el efecto del cebo tóxico sobre la mortalidad de las hormigas.

Hipótesis 2: El cebo utilizado no genera mortalidad en las hormigas durante las 6 horas del ensayo.

Predicción 2: Utilizando como unidad experimental frascos con 5 hormigas, la cantidad de hormigas vivas por frasco no difiere en el tratamiento con cebo tóxico con respecto al control (sacarosa).

3) Hipótesis de malestar del grupo recolector junto con falta de reemplazo: como indica el título, esta hipótesis tiene dos partes que se evaluarán separadamente.

Objetivo 3a: Estudiar si el cebo tóxico genera malestar post-ingestión en las hormigas.

Hipótesis 3a: El malestar en las obreras al ingerir el cebo tóxico genera una reducción en su motilidad o actividad de caminata a lo largo del tiempo.

Predicción 3a: La motilidad o actividad (representada como cantidad de veces que cualquier hormiga cruza una línea dibujada en el piso por minuto) de las obreras que ingirieron el cebo tóxico va a disminuir significativamente luego de 3 horas de iniciada la ingestión de las hormigas del frasco control de sacarosa.

Objetivo 3b: Estudiar si, después de eliminar al grupo recolector que visita una fuente de alimento (sin tóxico), se recupera la actividad en un camino de recolección; en cuyo caso, evaluar cuánto tiempo toma.

Hipótesis 3b: La actividad de recolección de una solución de sacarosa se recupera rápidamente, luego de quitar el grupo recolector hasta una reducción equivalente a la obtenida durante el abandono. Esto es, si no hubo abandono, aunque la reducción sea la misma, la actividad se recupera.

Predicción 3b: La actividad de recolección en una fuente de alimento no será significativamente diferente al quitar el grupo recolector con respecto a la actividad basal (inicial) luego de 2 o 3 horas.

Metodología

1) Hipótesis de baja palatabilidad

Evaluamos la palatabilidad del cebo tóxico registrando específicamente la respuesta de aceptación espontánea de hormigas que lo encuentran por primera vez. Para ello, presentamos gotas individuales de solución de sacarosa 20% p/p (control positivo), solución de sacarosa 20% que contiene el tóxico utilizado en los ensayos de abandono (ácido bórico al 3%) y solución de sacarosa 20% con quinina a saturación (0,53mg/ml en agua). La quinina es una sustancia que se espera sea rechazada, y fue utilizada como control negativo. El ensayo fue realizado en diferentes lugares a lo largo de los senderos troncales de *L. humile*. Cada gota fue ofrecida en una lámina de plástico blanco (1 cm^2) de modo de tener buen contraste para visualizar a las hormigas. La lámina se ubicó junto a un sendero troncal de *L. humile* altamente activo (Fig. 5.1). Se filmó desde arriba durante poco más de un minuto.



Figura 5.1. Ensayo de palatabilidad. La gota amarillenta representa la solución de sacarosa.

Posteriormente, a partir de los videos se registró durante un minuto la respuesta de las hormigas que tocaron la gota con sus antenas o su aparato bucal. Si permanecían bebiendo (mandíbulas en contacto con la solución) durante más de 4 segundos consecutivos después del contacto con la gota, se consideraba una aceptación. Por el contrario, si la hormiga se retiraba rápidamente, se consideraba un rechazo (Josens et al., 2016). Esta metodología nos permite evaluar rápidamente las respuestas instantáneas y espontáneas de las hormigas en el campo sin perturbar ni interrumpir sus senderos.

Análisis estadístico

Para determinar las significancias se realizó un análisis estadístico donde se puso a prueba la palatabilidad de los tratamientos por parte de las hormigas: en total fueron 20 gotas para el tratamiento sacarosa, 9 para el cebo tóxico y 9 para la quinina. La variable respuesta se denominó *Porcentaje de aceptación*. La variable explicativa fue el *tratamiento* (3 niveles: Sacarosa Cebo tóxico y Quinina). Se realizó un Anova y se hizo un contraste a posteriori mediante Tukey para evaluar si había diferencias significativas entre cada tratamiento.

2) *Hipótesis de rápida mortalidad del grupo recolector*

Se utilizaron tres colonias de *L. humile* mantenidos en el laboratorio del Campo Experimental (Ciudad Universitaria, Universidad de Buenos Aires) durante aproximadamente un año bajo condiciones estandarizadas de cría. Cada nido albergaba al menos 1000 obreras y varias

reinas. Las colonias se mantuvieron en nidos artificiales que consistían en grandes cajas de plástico (30 cm x 50 cm x 30 cm) con fondo de yeso y paredes pintadas con fluon para evitar escapes. Las colonias se mantuvieron a temperatura controlada ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) bajo un ciclo natural de luz-oscuridad. Las hormigas fueron alimentadas diariamente con agua con miel y tres veces por semana con cucarachas frescas (*Blaptica dubia*) o carne enlatada. Se ofrecía agua ad libitum. Las hormigas fueron privadas de carbohidratos por 48h antes del ensayo para generar mayor motivación para ingerir.

El experimento consistió en medir la supervivencia de obreras de *L. humile* tras ingerir cebo tóxico o solución control. Se utilizaron frascos plásticos circulares (4 cm de alto x 6,5 cm de diámetro), cuyas paredes internas estaban pintadas con fluon. Cada frasco contenía 5 obreras donde se ofreció una gota del tratamiento correspondiente (Figura 5.4). Se compararon dos tratamientos: una gota del cebo tóxico (solución de sacarosa al 20% p/p con ácido bórico al 3% p/p) o bien, una gota de solución de sacarosa (20% p/p) como control. Cada frasco recibía solo una gota, que representaba un volumen en exceso para que las 5 hormigas pudieran ingerir hasta la saciedad.

Los datos fueron tomados en diferentes días y alternando con diferentes colonias. Cada día de registro se podían realizar 3 o 4 réplicas (frascos) por tratamiento. Ambos tratamientos se evaluaron simultáneamente, en paralelo, para garantizar idénticas condiciones (hora, clima, etc.).

El ensayo se inició colocando a las hormigas en el frasco y dejando que se aclimaten por al menos 15 minutos. Luego, se ofrecía el tratamiento en una pequeña lámina de plástico. Cada grupo recibía solo una gota, permitiendo que ingieran ad libitum. Se dejaba la gota entre 20 y 30 minutos, comprobando que la mayoría de las hormigas la ingirieran. Incluso podía apreciarse que las hormigas tuvieran cierta dilatación del gáster, como otro indicador de que habían consumido el tratamiento ofrecido.

A cada hora se registró el número de hormigas muertas en cada frasco durante 6 horas. Para ello, se observaba detenidamente bajo lupa el estado de cada hormiga para determinar si estaba viva o muerta durante cada conteo.

Análisis estadístico

Para determinar las significancias se realizó un análisis estadístico donde se puso a prueba la mortalidad de las hormigas en los tratamientos a lo largo del tiempo. La variable respuesta fue la proporción de hormigas vivas/frasco. La distribución que mejor ajustó para estos datos fue la distribución binomial. Las variables explicativas fueron el *tratamiento* (2 niveles: Sacarosa y Tóxico), y el *tiempo* como variable continua. Por último, la variable aleatoria fueron las réplicas (n:32). El modelo que se utilizó para analizar los resultados fue el modelo lineal general mixto (GLMM) y se utilizó el paquete glmmTMB (Brooks et al., 2022).

3) Hipótesis de malestar del grupo recolector junto con falta de reemplazo

Metodología 3.a: motilidad

Se evaluó la motilidad como indicador de malestar que impediría el normal comportamiento de recolección en situación del ensayo a campo. En los dispositivos descriptos para el ensayo de mortalidad, los frascos tenían en el piso un papel pegado al fondo con una cruz pintada con lápiz negro (Fig. 5.2)

Antes de ofrecer la gota de solución de sacarosa o de cebo tóxico, se filmaba durante 1 minuto de modo de visualizar toda la base de dos frascos en forma simultánea. Esta medición representa la línea de base de cada frasco (a tiempo 0: t0).



Figura 5.2. Arenas del experimento de mortalidad y motilidad. Abajo el frasco con el tratamiento de sacarosa y arriba el frasco con el tratamiento cebo tóxico. Cada frasco con 5 hormigas. Se midió la cantidad de cruces de líneas durante un minuto (ensayo motilidad) y la cantidad de hormiga vivas a cada hora (ensayo mortalidad).

Después de medir la actividad basal, se ofrecía una gota de solución de sacarosa a un frasco y una de cebo tóxico al otro, tal como se explicó en la sección de mortalidad. Después de unos 25 ± 5 minutos, se retiraba con cuidado la lámina con el remanente de la gota y se filmaba de la misma manera a cada hora durante 6 horas.

Para medir la motilidad a partir de los videos, se contaba la cantidad de veces que las hormigas cruzaban las líneas (sin individualizar a las hormigas).

Análisis estadístico

Para determinar las significancias se realizó un análisis estadístico donde se puso a prueba la motilidad de las hormigas en los tratamientos a lo largo del tiempo. La variable respuesta se denominó **Cruces**, definida como la cantidad de veces que las hormigas (sin importar cuál) cruzaron las líneas de la cruz del frasco por minuto. La distribución que mejor ajustó para estos datos fue la distribución normal. Las variables explicativas fueron el *tratamiento* (2 niveles: Sacarosa y Tóxico), y el *tiempo* como variable continua para el análisis principal y como factor (una a seis horas después de la ingestión) para los contrastes. Por último, como variable aleatoria tuvimos las réplicas (n:31). El modelo que se utilizó para analizar los resultados fue el modelo lineal general mixto (GLMM) (Brooks et al., 2022). Para evaluar la significancia en cada tiempo entre tratamientos se utilizó un contraste a posteriori mediante la función emmeans (Lenth et al., 2023).

Metodología 3.b: recuperación de actividad

En la Ciudad Universitaria, se eligieron senderos troncales con gran actividad. Se colocó un puente similar a los utilizados en los ensayos de abandono. También, se generó el camino de recolección sobre el puente de forma similar ofreciendo gotas de solución azucarada. Dicho puente se dejó un día antes de tomar los datos con el alimentador conteniendo solución de sacarosa 20%. Esto aseguró una alta actividad sobre el puente para el momento de realizar la segunda parte del ensayo. Al día siguiente, en primer lugar, se realizó una filmación sobre el puente para realizar luego el conteo de la actividad de base que se desplegaba en el puente, denominamos a este momento “antes de la extracción” o línea de base. Del video, luego se cuantificaba la cantidad de hormigas que circulaba por el puente en dirección a los alimentadores durante un minuto. Inmediatamente después se realizó la primera “Extracción” de recolectoras.

Cada extracción consistió en eliminar todas las hormigas presentes en el puente y el alimentador. Para ello, se retiraba rápidamente el puente y se capturaban las hormigas que estaban alimentándose en él, colocándolas en un gran contenedor (50cm x 30 cm x 35 cm) cuyas paredes estaban pintadas con fluon de modo que las hormigas no podían escapar. Mientras tanto, el puente se sostenía sobre el contenedor y, con la ayuda de un pincel de cerdas suaves, se empujaban las hormigas para que cayeran dentro. De este modo, todas las hormigas

presentes eran trasladadas y mantenidas dentro del contenedor (fig. 5.3). Todo el procedimiento de extracción tomaba menos de un minuto.



Figura 5.3. Hormigas extraídas del puente y mantenidas en el contenedor, cuyas paredes pintadas con fluon impedían que las hormigas escapen.

Inmediatamente, el puente vacío era colocado de vuelta en el mismo sitio conectando con el sendero troncal. En todos los casos, después de la primera extracción el puente se llenaba de hormigas en forma inmediata, las que se dirigían al alimentador y retomaban la actividad de recolección. Se esperaba entre 6 y 7 minutos dejando que las hormigas circulen normalmente y se volvía a realizar una extracción de igual manera a lo descripto. Se volvía a poner en su lugar el puente con los alimentadores, todo sin hormigas, y también después de esta segunda extracción muy rápidamente se reestablecía la actividad.

Debíamos asegurarnos de que la gran mayoría de las hormigas que estaban describiendo ciclos de recolección fueran retiradas. En un ensayo preliminar, pintando hormigas vimos que tardaban varios minutos en retornar al alimentador, lo que nos daba una idea de que después de salir del puente, las hormigas circulaban un buen trecho en el sendero troncal, por lo cual, no

alcanzaba realizar solo una o dos extracciones de las que estaban sobre el puente, ya que un centenar de hormigas que iban o volvían del puente en esos momentos estaban en otro lugar del ciclo de recolección. Por lo tanto, se realizaron 6 o 7 eventos de extracción. Cada uno separado de otro por entre 6 a 7 minutos.

Finalmente, cuando pasados los 6 o 7 minutos del último evento de extracción se comprobaba que la actividad era muy baja sobre el puente. En ese momento, se realizó la siguiente medición de la actividad sobre el puente, denominando a este conteo “sin grupo recolector” (Tiempo 0). Todo el procedimiento de las extracciones demoró entre 40 y 50 minutos. Luego, se realizaron 3 filmaciones sobre el puente, una a cada hora: una hora (Tiempo 1), dos horas (Tiempo 2) y tres horas (Tiempo 3) después de finalizado el procedimiento de las extracciones. De los videos se cuantificó el número de hormigas que circulaba en dirección al alimentador. Así, evaluamos si la actividad en el puente se recuperaba a niveles similares a la actividad basal.

Análisis estadístico

Para este ensayo, se emplearon Ecuaciones de Estimación Generalizadas (EEG) para analizar los datos (Ziegler & Vens, 2010). Las EEG son particularmente adecuadas debido a su robustez con tamaños de muestra pequeños y su capacidad para manejar datos correlacionados en medidas repetidas. Además, se adapta eficazmente a los datos normalizados, donde los niveles de actividad se expresan en relación con la línea base establecida al 100 % para cada réplica. Cada réplica correspondió a un sendero troncal donde se colocaron los puentes ($n = 4$). La variable explicativa fue el tiempo (4 niveles: Tiempo 0 (después de la extracción del grupo de recolectores), Tiempo 1 (1 h después), Tiempo 2 (2 h después) y Tiempo 3 (3 h después). (Ver Anexo para más detalles).

Resultados

1) Hipótesis de baja palatabilidad

Prácticamente todas las hormigas que tocaron la gota de solución de sacarosa con su antena se alimentaron de ella ($98,5 \% \pm 0,6$, media \pm EE) (Fig. 5.4). En total, se cuantificaron 399 hormigas en 20 gotas. Se obtuvo un resultado similar con la solución de ácido bórico (cebo tóxico) ($97,8 \% \pm 1,3$), correspondiente a 165 hormigas en 9 gotas. Sin embargo, la solución de quinina fue aceptada solo por el 11,6% ($\pm 4,3$) de las hormigas que tocaron la gota (de un total de 206 hormigas en 9 gotas). A su vez, la diferencia no es significativa entre cebo tóxico y la

sacarosa, en cambio en ambos casos el porcentaje de aceptación es significativamente mayor con respecto a la solución de quinina. Por lo tanto, podemos confirmar que este cebo tóxico es apetecible para esta especie en las condiciones naturales de nuestro estudio.

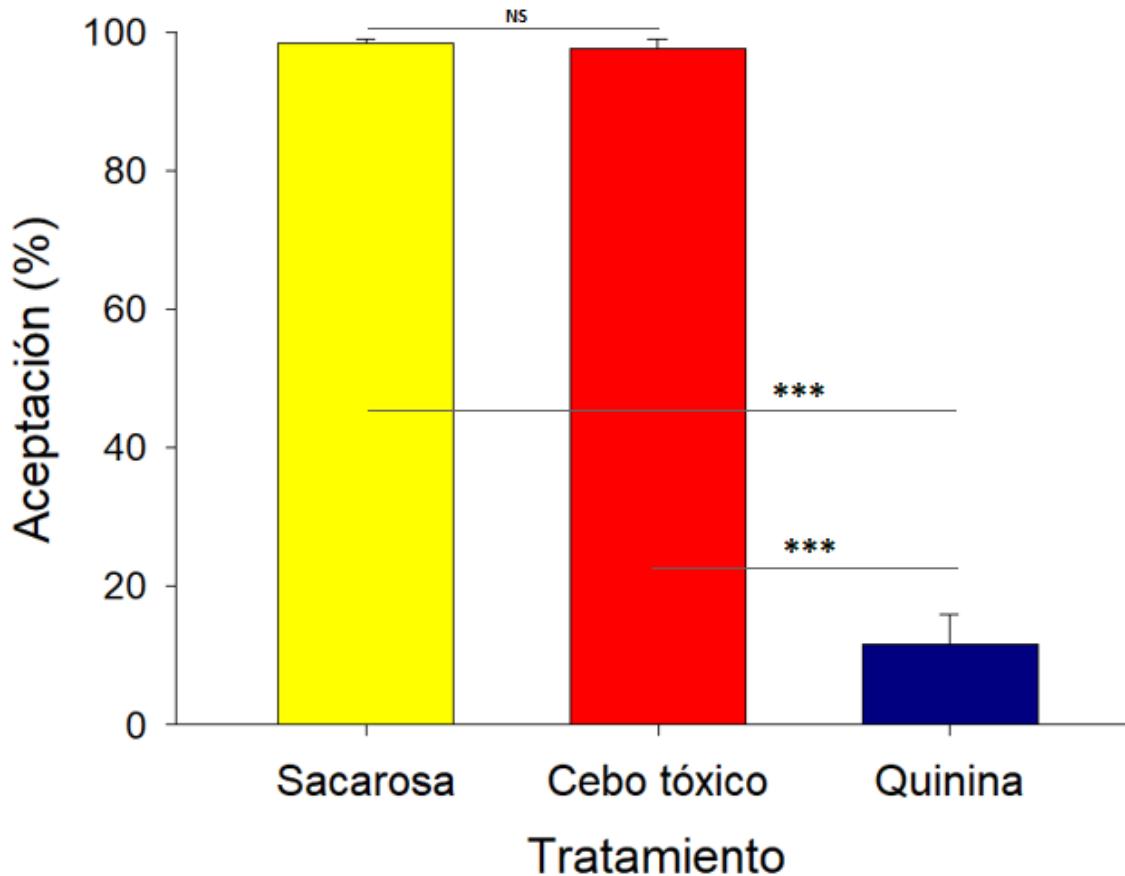


Figura 5.4. % Aceptación (Media + EE) de las gotas de los diferentes tratamientos ofrecidas en los senderos troncales. Las diferencias significativas son entre cada tratamiento y se representan con asteriscos (***: p<0,001; NS: no significativo). Ver Anexo para más detalles.

2) Hipótesis de rápida mortalidad del grupo recolector

Para comprobar si había una mortalidad con el correr de las primeras 6 horas luego de ingerir el cebo tóxico, evaluamos la cantidad de hormigas vivas por frasco a lo largo del ensayo para ambos tratamientos: el cebo tóxico y el control de sacarosa (Figura 5.5).

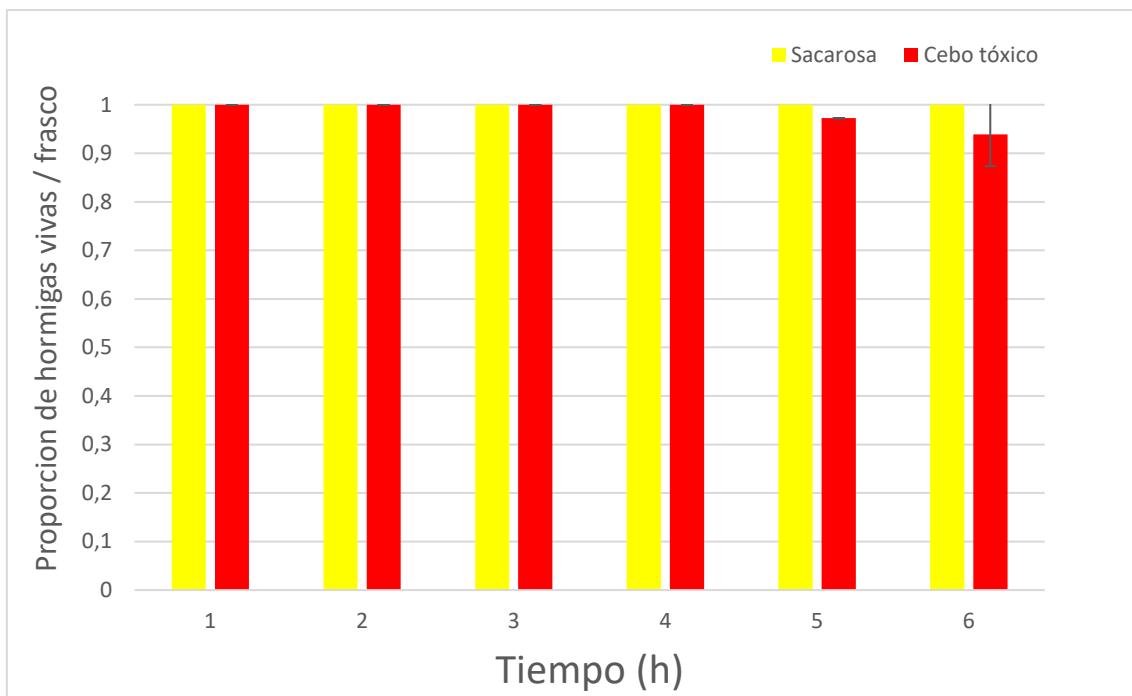


Figura 5.5. Proporción de hormigas vivas por frasco en los tratamientos de sacarosa (amarillo) y cebó tóxico (rojo) durante las 6 horas de la prueba de mortalidad (media \pm EE). n control= 32 frascos; n cebó = 32 frascos. Cada frasco con 5 hormigas, por lo que se evaluaron 320 hormigas en total. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del tiempo.

Considerando que se utilizaron 32 frascos por tratamiento, cada uno conteniendo 5 hormigas, esto resultó en 160 hormigas evaluadas por tratamiento. Al final del experimento, casi todas las hormigas sobrevivieron durante el período de medición de seis horas. En las primeras 4 horas sobrevivió el 100% de las hormigas en todos los frascos. Recién a las 5 horas de ingerir el cebó tóxico, murieron las primeras hormigas, pero de todas formas en promedio más del 96% de hormigas por frasco sobrevivieron. Luego a las 6 horas hubo en promedio un 93% de hormigas vivas/frasco, lo que de todas formas representa una baja mortalidad. Por su parte, del grupo de hormigas que consumieron sacarosa sobrevivieron todas luego de las seis horas (Ver anexo para más detalles).

3) Hipótesis de malestar del grupo recolector junto con falta de reemplazo

Resultados 3.a: motilidad

Como ya se ha mencionado los resultados se pusieron a prueba utilizando la motilidad como proxy de malestar y se expresó mediante la variable respuesta *Cruces*. En la Fig. 5.6, se puede observar la motilidad expresada en la cantidad de cruces/min de las hormigas a lo largo del tiempo.

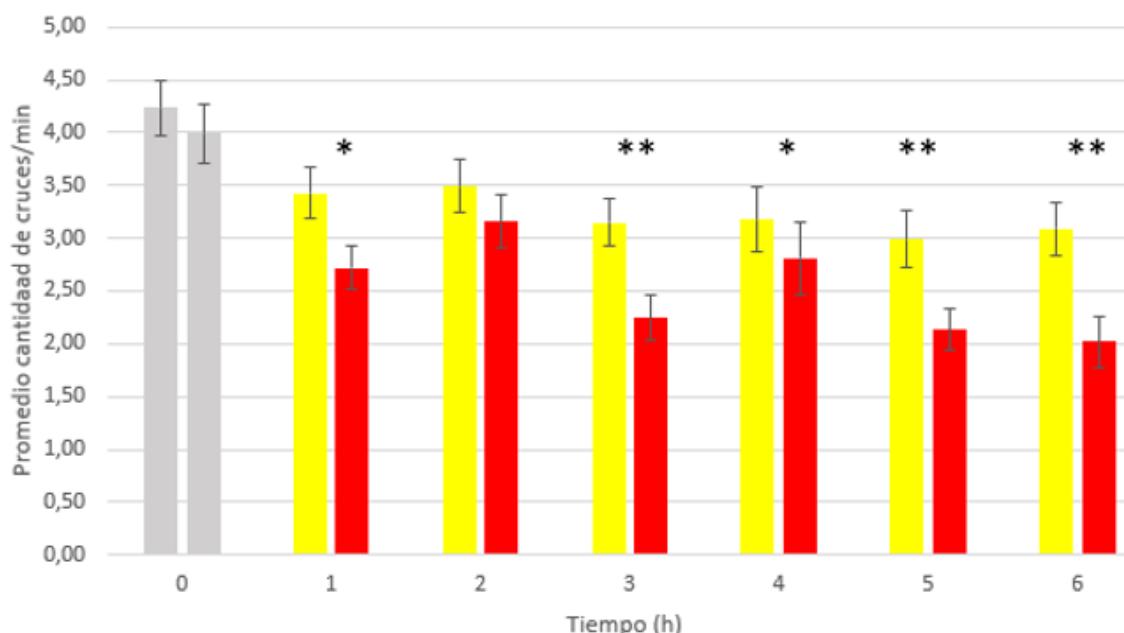


Figura 5.6. Cantidad de cruces/min (media ± EE) en función de los tiempos. Las barras amarillas corresponden al tratamiento Sacarosa mientras que las rojas al Cebo Tóxico; en gris se muestra el tiempo inicial cuando no se había aplicado aun los tratamientos. Se muestran diferencias significativas entre los tratamientos (Sacarosa-Tóxico) dentro de cada tiempo. n=31 por tratamiento. (*: p<0,05; **: p<0,01; sin símbolo: no significativo).

El tiempo inicial no difiere entre ambos tratamientos. La motilidad es significativamente menor en el tóxico con respecto a la sacarosa luego de 1 hora de ingerir el tóxico (S-T= 0,77; p= 0,01) aunque luego a las 2 horas la motilidad vuelve a ser similar entre los tratamientos. A partir de las 3 horas la motilidad es menor en los grupos que ingirieron el cebo tóxico que las tratadas con sacarosa (S-T= 0,9; p= 0,004) y se mantiene más baja durante toda la prueba (4h: S-T= 0,78; p= 0,01 – 5h: S-T= 1,03; p= 0,001 – 6h: S-T= 1,06; p= 0,001).

Se confirma que el grupo que ingirió el cebo tóxico presenta menor motilidad que el grupo control. Esta motilidad reducida puede ser considerada como indicador de un malestar generado por la ingesta del cebo tóxico.

Resultados 3.b: recuperación de actividad

Se analizó la actividad de las recolectoras en un camino de recolección antes (línea base) y después de quitar al grupo recolector en diferentes tiempos luego de la remoción del grupo recolector (Fig. 5.7). La actividad fue expresada como el porcentaje de la actividad respecto a la actividad previa a quitar el grupo recolector (línea base). Se observó una disminución significativa de la cantidad de hormigas por minuto que circulaba en los puentes al quitar el grupo recolector (tiempo 0), alcanzando solamente menos del 25% de la actividad inicial. Una hora después, la actividad aumentó aproximadamente el 60% con respecto a la inicial, pero se mantuvo significativamente más bajo. Después de dos horas, aumentó un 80%, alcanzando la línea base. A las tres horas, la actividad se restableció por completo, lo que indica la recuperación de la actividad por un nuevo grupo recolector.

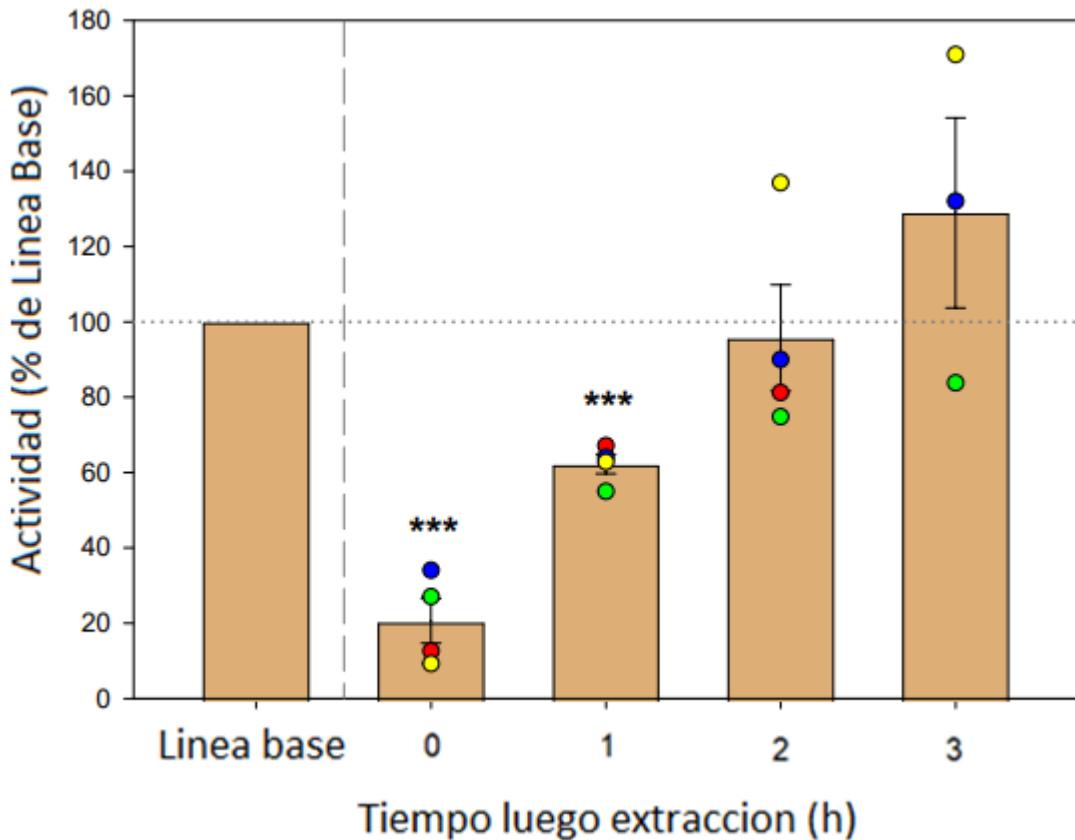


Figura 5.7. Gráfico de barras de la actividad respecto a la Línea de base en porcentaje (media ± EE) en función de los tiempos: 0 (inmediatamente después de quitar las hormigas), una hora después), dos horas después y tres horas después respectivamente. Las flechas entre la Línea de base y el tiempo 0 indican los eventos repetidos de eliminación de las hormigas (grupo recolector). Los puntos en colores indican la cantidad de réplicas (n=4 a excepción del Tiempo 3 donde es n=3). Las diferencias significativas son con respecto a la línea base (***p<0,001; sin símbolo: no significativo).

Discusión

Palatabilidad

El cebo tóxico fue aceptado en igual medida que la solución de sacarosa, confirmándose la alta palatabilidad del mismo. Por lo cual, podemos descartar que el abandono se deba a la falta de palatabilidad del cebo tóxico.

Es importante diferenciar lo que es consumo de palatabilidad. La palatabilidad indica qué tan atractivo es un alimento para un organismo dado, está reflejada en la respuesta

espontánea que muestra un individuo, que no ha tenido experiencia con ese alimento (Carlesso et al., 2021). La palatabilidad refiere a la percepción que el animal obtiene en el momento en que entra en contacto con el alimento, y se explica por claves sensoriales que este le provee, sabor, olor, temperatura, tamaño, textura y consistencia, etc. y quizás también de experiencias previas (Aldrich & Koppel, 2015). Un alimento es palatable cuando es fácilmente aceptado por un animal, es una respuesta incondicional antes de que cualquier efecto metabólico o de condicionamiento pueda afectar la ingesta (Aldrich & Koppel, 2015). En general, la palatabilidad de un alimento se puede evaluar de diferentes maneras, como fue evaluada en esta oportunidad como acepta o rechaza, o bien también puede ser medida sobre cada individuo como la cantidad ingerida -cuando esto es posible-, o el tiempo de ingestión; también la cantidad de interrupciones que un individuo realiza durante la ingesta podría dar cuenta si un alimento es poco palatable. Se puede comparar la aceptación en una prueba de cafetería, o bien, comparar la respuesta a individuos muy saciados es una buena forma de indagar sobre la palatabilidad del alimento evaluado (Aldrich & Koppel, 2015; Sola et al., 2013). A nivel poblacional podría medirse el consumo, pero este debe ser medido durante un corto período, ya que el consumo puede variar a lo largo del tiempo influido por factores ajenos a la palatabilidad. De hecho, la palatabilidad se define como las propiedades físicas y químicas de la dieta, que están vinculadas con la promoción o supresión de la conducta alimentaria durante el período de preabsorción (Watson et al., 2023). Es por eso que el consumo debe ser en un período breve. En nuestro ensayo sobre malestar, del que discutiremos más abajo, las hormigas después de solo una hora, ya mostraron signos de menor motilidad. Por lo cual, es claro que las obreras del grupo recolector dejan de ser naïve respecto al alimento que están explotando y esa experiencia puede hacer cambiar la respuesta frente a un alimento dado.

Lamentablemente, en varias oportunidades se ha estudiado en insectos sociales en general y en hormigas en particular el consumo de cebos tóxicos a campo por períodos de 24 h dando conclusiones respecto a la palatabilidad de un cebo. Se ha demostrado por ejemplo en un ensayo de preferencia donde se comparó el consumo en un día de sacarosa 25% p/p contra un cebo de sacarosa 25% p/p con ácido bórico al 1% (Klotz et al., 2000; Pelham, 2005). Como el consumo de la solución con ácido bórico fue menor, concluyen que este resulta poco palatable para las hormigas. Nuestros resultados muestran a campo que la palatabilidad de la solución de sacarosa con ácido bórico al 3% resulta altamente palatable para *L. humile*. Esto puede de hecho ser una buena noticia, ya que algunos compuestos usados en formulaciones de cebos tóxicos que previamente se habían determinado como no palatables en función de los datos de consumo a largo plazo pueden, de hecho, resultaron ser palatables.

Mortalidad

El cebo tóxico utilizado en el ensayo de abandono no genera mortalidad significativa en las primeras 6 horas desde su ingestión. Esto coincide con lo descripto en bibliografía (Sola et al., 2013). Por lo tanto, podemos considerar que el aproximadamente 80% de reducción de la presencia de hormigas observada en el puente que ofrece el cebo tóxico en el ensayo de abandono (Capítulo 3) no se debe a que hay mortalidad de las recolectoras, ya que la mortalidad en ese tiempo obtenida en este ensayo fue menor al 7%. Esto es, se observa un 80 % de disminución a partir de las 6 horas que se mantiene por días.

Esto tiene gran implicancia, considerando que, en toda la literatura científica sobre control de hormigas por cebos, toda reducción en la presencia de hormiga fue interpretada como debidas a mortalidad. Un 80 % de reducción en la presencia de hormigas post tratamiento de cebos tóxico en cualquier estudio es considerado como una alta eficacia. Sin embargo, puede ocurrir la misma reducción sin que haya tenido lugar mortalidad. Así, estos resultados junto con los ensayos de abandono (ver capítulos 2 y 3) nos permiten confirmar que es necesario considerar otros efectos además de la mortalidad al analizar los datos de efectividad de cebos en estudios de campo (Rust et al., 2004). Una disminución en la presencia de hormiga en un área tratada con cebos tóxicos puede deberse, al menos parcialmente, al abandono y no solamente a mortalidad. Esto también explicaría por qué en la mayoría de trabajos, luego de algunas semanas vuelve a aumentar la actividad, a veces hasta los niveles iniciales. Lo cual, se interpreta generalmente como una reinfestación del área a partir de áreas periféricas que no fueron tratadas (Klotz et al., 1998; Vega & Rust, 2003).

Motilidad

Respecto al efecto subletal ocasionado por el tóxico, resultó en que habría una menor motilidad por parte de las hormigas que consumieron del tóxico el cual inicia desde la primera hora, y ya en forma estable se consolida a partir de las 3 horas.

Estas pruebas de efecto subletales se han puesto a prueba en otras especies. En abejas se observaron efectos similares al consumir etanol. Ya que se observó una menor actividad locomotora a lo largo del tiempo de las abejas tratadas con diferentes dosis de etanol (de 5% a 75%) y dichos resultados se vieron reflejados en que las abejas que ingirieron etanol caminaron menos y estuvieron más tiempo quietas respecto a las no tratadas (Maze et al., 2006). Lo mismo

se observó en abejas que ingirieron fipronil (Zaluski et al., 2015). En muchas especies como coccinélidos, parasitoides y abejas se han visto problemas en la actividad locomotora relacionados a incoordinación de movimientos, temblores o caídas luego de ingerir algún tóxico (Alix et al., 2001; Lambin et al., 2001; Singh et al., 2004).

La motilidad puede ser considerada como un indicador de malestar. Esto es muy importante, particularmente porque mucho se ha estudiado en vertebrados e invertebrados sobre cómo el malestar puede ser asociado a un alimento ingerido previamente. Generándose así un comportamiento aversivo o de evitación del alimento previamente ingerido.

Sería interesante profundizar sobre los efectos subletales que podría estar ocasionando este cebo tóxico en las hormigas poniendo a prueba por ejemplo otros comportamientos además de la motilidad como podría ser la navegación u otros efectos motrices. Ya que, en otras especies los efectos de un tóxico son muy variados y pueden depender del tipo de tóxico, la dosis ingerida, la especie en cuestión, entre otros factores. Por ejemplo, el tóxico puede generar lo que se conoce como irritación al pesticida, lo cual se traduce en mayor movimiento, pero de forma más descoordinada y puede generar, por ejemplo, que el animal sea más vulnerable a la depredación (Wiles & Jepson, 1994). Esto también se ha visto en abejas y en hormigas cortadoras (Galvanho et al., 2013; Lambin et al., 2001). Además, los tóxicos no solo pueden generar efectos motrices, sino que también pueden producir una reducción en la estimulación para alimentarse. En abejas envenenadas por ejemplo hay una disminución significativa en la capacidad de aprendizaje olfativo luego de consumir un tóxico (Desneux et al., 2007; Gonalons & Farina, 2018; Herbert et al., 2014; Taylor et al., 1987). Dicho comportamiento se vio también en muchas otras especies tales como lepidópteros, cucarachas (*Periplaneta americana*), insectos chupadores de plantas (áfidos, cigarras, etc), dípteros entre otros grupos (Haynes, 1988). Esta disminución en la motivación por alimentarse va acompañada en general por una posterior reducción en el rendimiento reproductivo, menor cantidad de huevos, entre otros efectos como sucede, por ejemplo, con *Aedes aegypti* (Duncan, 1963). A su vez, también pueden generar problemas en la navegación o búsqueda de alimento, ya que se ha visto que abejas envenenadas con paratón hicieron una danza similar a las no envenenadas, pero con un ángulo incorrecto de la danza lo que lleva a que las recolectoras no puedan llegar a la fuente de alimento (Cox & Wilson, 1984; Schricker & Stephen, 1970).

En nuestros resultados, se observa un patrón de motilidad que sería recomendable analizar con más detalle. Hay una disminución 1 hora luego de ingerido el tóxico, pero luego a la hora siguiente pareciera haber una pequeña mejora o mayor actividad para luego si disminuir

de nuevo a partir de la tercera hora después de ingerido el tóxico. Sería interesante evaluar si esa leve mejoría fue circunstancial, tal vez perdiendo la significancia por un tamaño muestral reducido, o si efectivamente pudo haber algún inicio de un proceso fisiológico que no alcanzó a sostenerse.

El malestar ocasionado por el cebo tóxico y la propia reducción en la motilidad podrían efectivamente impedir que las hormigas del grupo recolector continúen visitando regularmente el puente. Para considerar esto como una explicación de los resultados de los capítulos anteriores debemos relacionarlo con lo que ocurriría con el resto de las hormigas que no ingirieron el cebo tóxico y que circulan por el sendero troncal próximo al puente, tal como lo plantea Rust (2024).

Recuperación de la recolección:

Logramos retirar al grupo recolector, alcanzando una reducción similar a la que se genera por abandono, esto es cercano al 80%. Sin embargo, la actividad en el camino de recolección que va hacia una fuente de alimento que no fue abandonada, se recupera en poco tiempo. La recuperación es total a los niveles de actividad inicial y se observa en tan solo 2 a 3 horas.

Estos resultados tienen sentido teniendo en cuenta el reclutamiento masivo que presenta *L. humile*, donde una vez que se encuentra alimento la presencia de recolectoras aumenta muy rápidamente (Aron et al., 1989; Denton & Nonacs, 2018; Flanagan et al., 2013). Por ello, esperábamos que haya una rápida recuperación de la actividad a pesar de eliminar a la mayoría del grupo recolector. Eso no ocurre cuando la reducción se da por abandono de un cebo tóxico. Cuando se abandona, pasan días sin que se retome la actividad, mientras que, en el ensayo de extracción, rápidamente se retomaron los niveles iniciales de actividad con nuevas hormigas.

Es poco probable que el abandono sostenido de los cebos tóxicos se deba a que no haya nuevas hormigas disponibles para reemplazar a las que se alimentaron con cebo tóxico: siempre hay suficientes hormigas para encontrar el alimento y reanudar su recolección. De esta forma, demostramos que las colonias pueden reemplazar a una cohorte entera de recolectoras si se eliminan y esto nos permite refutar lo que dicen especialistas en toxicología, como que el abandono en los puentes con cebo tóxico se debe a mortalidad y/o malestar del grupo recolector (Rust, 2024).

Por último, se ha descrito que *L. humile* tiene fidelidad respecto a los senderos bien establecidos (Fernandes & Rust, 2003; Goss et al., 1989). Cabe distinguir entre fidelidad en un sendero troncal que no es lo mismo necesariamente que fidelidad hacia una fuente de alimento. Sin embargo, a diferencia del comportamiento típico de las hormigas caracterizado por la fidelidad a los recursos, nuestras observaciones en este estudio mostraron un patrón distintivo. Frecuentemente, puede observarse en el campo que, cuando se les pone a las hormigas cortadoras un cebo granulado comercial, durante mucho tiempo, las obreras pasan, contactan el cebo y ninguna lo levanta. Siguen caminando hacia la fuente de alimento que están explotando. Algo similar fue observado con la hormiga carpintera, *Camponotus mus*, al ofrecer una solución de sacarosa 30% con un sistema muy similar a lo utilizado en el ensayo de palatabilidad de este capítulo en un sendero muy activo que se dirigía a un árbol lleno de pulgones. Todas las hormigas tocaban la gota de solución ofrecida, pero ninguna se quedó a ingerirla (Com. Pers. Roxana Josens). Esos comportamientos son típicos de especies que tienen alta fidelidad a la fuente de alimento.

Si consideramos el rápido incremento en la actividad registrado en el ensayo de recuperación, este coincide con lo observado en el ensayo de palatabilidad, donde casi todas las hormigas que tocaron tanto la gota de sacarosa o el cebo tóxico se quedaron tomando. Sumado a la gran velocidad con la que se generaron los senderos de recolección en los ensayos de abandono (capítulos 2 y 3). Todos estos comportamientos desafían la noción de que la renuencia de las hormigas a regresar al puente tóxico se debe únicamente a la fidelidad a otras fuentes de alimento. Podemos concluir que no hay ningún indicio de que *L. humile* presente este comportamiento de fidelidad hacia un recurso y que por eso no haya hormigas disponibles. En todos los ensayos realizados en esta tesis, siempre hubo hormigas que aceptaban rápidamente los cebos ofrecidos, habiendo realizado ensayos en distintos meses, distintos años y distintos lugares.

Por lo tanto, cuando un cebo tóxico es abandonado no sucede solo por un malestar, mortalidad del grupo recolector que se alimentó del cebo, combinado a que el resto de las hormigas no está disponible para reactivar dicho camino, sino que dicho abandono es una respuesta efectiva colectiva y de larga duración. Si bien la explicación más simple suele ser la más parsimoniosa, en este caso podemos decir que el fenómeno que ocurre es más complejo, y sin duda hay otros mecanismos involucrados.

Capítulo 6. Discusión general y Conclusiones

Las hormigas plagas e invasoras poseen una amplia variedad de estrategias comportamentales y de reclutamiento que las hacen muy difícil de controlar (Hoffmann, 2011; Hoffmann et al., 2016). La hormiga argentina (*L. humile*) es un buen modelo para estudiar dicho comportamiento y entender mejor el motivo por el cual muchos de los esfuerzos realizados para su control fracasan. No obstante, el uso de cebos tóxicos se considera el método de referencia para el control de hormigas (Rust et al., 2003), ya que se ha demostrado que reduce considerablemente la cantidad de hormigas y se puede utilizar incluso en áreas ambientalmente sensibles con importancia para la conservación (Boser et al., 2014, 2017; Merrill et al., 2018).

Hasta el presente, se interpreta que una reducción de la presencia de hormigas después de la aplicación de cebos se debe a mortalidad, esto es, una disminución de la población (Rust et al., 2004). Este es el único efecto considerado del accionar de los cebos, el cual no solo está firmemente instalado en el ámbito de la investigación científica, sino también en la industria del control de hormigas (Klotz et al., 1998; Vega & Rust, 2003). Sin embargo, nuestros hallazgos han abierto una fisura en este paradigma.

Se ha demostrado que los cebos tóxicos desencadenan en las hormigas una estrategia comportamental de abandono de los caminos de recolección y sus alrededores. Este abandono comienza aproximadamente a las 3 horas de la colocación del cebo tóxico, alcanzando una disminución del 70-80% de la actividad a lo largo del camino de recolección que conduce al cebo tóxico en un plazo de 6 horas. Esta disminución permanece constante entorno al 80% independientemente del tamaño inicial de la población del grupo de hormigas recolectoras, y persiste durante varios días (al menos por 3 días). Curiosamente, muchos antecedentes que dan cuenta de la efectividad de los cebos generan una disminución de la actividad aproximadamente del 80% respecto a la inicial (Greenberg et al., 2006; Klotz et al., 1998; Vega & Rust, 2003). Obviamente, no negamos que los cebos pueden producir mortalidad al ser aplicados a campo en grandes cantidades, sin embargo, creemos que muy probablemente, la reducción reportada en muchos de estos trabajos podría deberse, al menos en parte, a la respuesta de abandono por parte de las hormigas.

Hemos descartado diferentes interpretaciones alternativas que podrían explicar los resultados observados. Se descartó que las hormigas puedan estar saciadas, ya que, en paralelo, las fuentes de alimento cercanas mantuvieron altos niveles de actividad. Por otro lado, estudios

de laboratorio mostraron que la mortalidad de las hormigas alimentadas con el cebo tóxico fue casi nula después de 6 horas de haberlo ingerido. Esto descarta que el descenso de la actividad en el camino de recolección hacia el cebo observado en ese lapso de tiempo, se deba a que el grupo recolector haya muerto por acción del cebo.

Descartamos que el abandono se deba a la no palatabilidad del cebo tóxico: según esta hipótesis, el tóxico es incomible, lo que hace que las hormigas dejen de alimentarse de él y, por lo tanto, detengan la recolección del alimento y el reclutamiento. Sin embargo, las pruebas de palatabilidad en los senderos troncales lo muestran como altamente palatable, en consonancia con varias pruebas realizadas sobre el comportamiento individual en laboratorio (Moauro & Josens, 2023; Sola et al., 2013). La alta palatabilidad que mostró el cebo de ácido bórico no coincide con algunos resultados reportados en bibliografía (Klotz et al., 2000; Pelham, 2005). Sin embargo, en estos trabajos median el consumo a campo durante 24 h. Como vimos a lo largo de esta tesis, si el consumo se mide más allá de una o dos horas, los resultados reflejarán no solo la palatabilidad, sino también el resultado de procesos metabólicos o cognitivos asociados a la experiencia posterior a la ingesta del alimento, como lo es el abandono. Nuestras propias estimaciones mostraron que el consumo de cebo tóxico fue significativamente menor que el de sacarosa luego de 8 horas.

Otra hipótesis alternativa al abandono es que las hormigas que recogen el cebo tóxico sufren malestar y por eso dejan de visitar el camino de recolección, mientras que todas las demás hormigas que se encuentran en los senderos no están disponibles para activar de nuevo el camino de recolección (están ocupadas en otras fuentes de alimento, por ejemplo). Esta hipótesis fue propuesta por el Dr. Rust, y publicada en una nota en la revista "Science news" comentando nuestros resultados (Rust, 2024). Efectivamente, la baja actividad persiste durante un período prolongado con fluctuaciones mínimas, sin que haya eventos de reclutamiento secundario hacia el cebo tóxico a pesar del gran tamaño de la población y de la palatabilidad del cebo. Sin embargo, demostramos que a pesar de que las hormigas sufrirían malestar y este afecta su motilidad, el mismo no explica el abandono, ya que al quitar experimentalmente el grupo recolector hay una recuperación rápida y total de la actividad. A su vez, se sabe que las hormigas modulan la deposición de feromonas de camino y/o su reclutamiento en respuesta a una amplia gama de factores, incluyendo, la calidad, aglomeración, rastro y distancia de la fuente de alimento (Beckers, 1993; Czaczkes et al., 2013, 2015; Devigne & Detrain, 2006). A partir de ello, parece razonable, incluso probable, que las hormigas que experimentan malestar reduzcan el reclutamiento, independientemente de si su motilidad se reduce o no. Desafortunadamente, si bien en algunas hormigas la deposición de feromonas es un

comportamiento estereotipado fácilmente cuantificable a simple vista, no es el caso con *L. humile* (Beckers et al., 1992). Las cantidades de feromona depositadas son tales que hacen imposible su cuantificación con las tecnologías actuales. Por lo tanto, señalamos que el reclutamiento podría desempeñar un papel importante en el mantenimiento del abandono.

Por otro lado, lo que sí hemos demostrado es que uno de los mecanismos que subyacen a esta conducta de abandono es una memoria aversiva. Muy probablemente del tipo asociativo, en el cual estímulos que son inicialmente neutros terminan siendo asociados a un refuerzo que puede ser positivo (recompensa) o negativo (castigo), llamados en el área de las ciencias cognitivas Estímulo Incondicionado (Clark, 2004). El malestar que ocurre después de una ingesta puede actuar como Estímulo Incondicionado Negativo (EIN) y ser asociado con características del alimento recientemente ingerido. Esto ha sido demostrado tanto en vertebrados como invertebrados (Klappenbach et al., 2022; Schier et al., 2019). De esa forma, el malestar podría permitir el establecimiento de asociaciones negativas, dando lugar a una memoria aversiva que genera el comportamiento de evitación demostrado en la tesis.

Este fenómeno también se lo conoce comúnmente como aversión condicionada al gusto (CTA) y se ha estudiado desde humanos hasta invertebrados (Chambers, 2018; Nakai et al., 2020). Conocido también como "efecto García" fue previamente discutido en detalle (Capítulo 4). Este mecanismo, ampliamente estudiado en vertebrados, implica la asociación entre un alimento ingerido y un efecto negativo posterior, lo que conduce a su rechazo en futuras exposiciones (Garcia et al., 1955; Garcia & Koelling, 1966). En animales sociales, esta aversión puede estar influida no solo por la experiencia directa sino también por señales indirectas, como la presencia de compañeros afectados (Galef, 1985).

Respecto a este último punto, nuestros resultados mostraron que las memorias aversivas desempeñan un papel clave en el abandono de cebos tóxicos: los sitios donde se ubicaban los puentes que previamente conducían a solución de sacarosa y, por lo tanto, tenían feromonas de camino, causaron un gran aumento en la cantidad de hormigas cuando se colocaron en un lugar donde anteriormente no había comida disponible. Sin embargo, no lograron causar un aumento al ser puestos en lugares que anteriormente ofrecían comida con el tóxico y que habían sido abandonados. Lo cual indica que las hormigas deciden no subir a un puente ubicado en ese sitio ignorando la feromona de camino que éste presenta.

Las hormigas, incluida la hormiga argentina, presentan grandes capacidades cognitivas, tanto para establecer memorias olfativas (Dupuy et al., 2006; Josens et al., 2009; Provecho & Josens, 2009; Rossi et al., 2020; Wagner & Czaczkes, 2023), como las referidas a memoria

espacial o de navegación (Collett & Collett, 2002; Galante et al., 2023; Narendra et al., 2007; Wagner et al., 2023). Teniendo en cuenta esto, el hallazgo de que los alimentos tóxicos den probablemente como resultado la asociación entre un malestar y algún estímulo de la fuente de alimento que lo generó, no sorprende. Más aún, se destacan la necesidad de investigar la naturaleza de los estímulos específicos que intervienen en estas memorias aversivas.

Como se mencionó previamente, al cruzar los puentes generamos una situación de conflicto donde en un lugar donde las memorias individuales informan que se debe evitar, se contradice con la información social que representa la feromona de camino presente en el puente. Muchos estudios sobre toma de decisiones en insectos sociales han manipulado las condiciones (en laboratorio mediante el uso de laberintos) de modo tal que la memoria puede entrar en conflicto con la feromona de camino (Aron et al., 1988, 1993; Grüter et al., 2011). Por ejemplo en *Lasius niger*, la memoria de navegación (información privada) predomina con respecto al rastro de feromona (información social) (Grüter et al., 2011). Nuestros resultados tienen la particularidad que generan un conflicto entre la información privada y la social en un contexto diferente, con senderos naturales que ocurren en el campo. En nuestro caso, la información social fue ignorada predominando la privada. Sin embargo, es fundamental continuar estudiando los mecanismos ya que es posible que otras formas de información social puedan estar involucradas.

El comportamiento de las hormigas que rápidamente abandonan una zona en respuesta a la presencia de enemigos naturales (Folgarait & Gilbert, 1999; Guillade & Folgarait, 2015; Orr & Seike, 1998), podrían tener puntos en común con los mecanismos del abandono de cebos tóxicos. Sin embargo, la detección de enemigos es inmediata mientras que la detección de los efectos de los cebos es retardada. Por otro lado, la respuesta ante enemigos pudo ser moldeada por coevolución o bien aprendida a partir de experiencias previas debidas a una convivencia. Aún quedan importantes enigmas sobre los mecanismos; en concreto, ¿cómo se comunica esta respuesta a otras hormigas?

Considerando la proximidad estrecha entre el camino de recolección al cebo tóxico y la gran actividad en el sendero troncal, la experiencia directa del tóxico por sí sola pareciera no poder explicar la gran magnitud, el alcance del fenómeno del abandono. Sin embargo, no encontramos evidencia de una marca negativa en el puente que comunique una alerta. ¿Cómo saben entonces las hormigas sin experiencia directa con el tóxico que deben evitar la zona en la que este se encuentra? Hay una desconexión de información en el sistema que no podemos explicar. ¿Podrían las hormigas transmitir esta información simbólicamente, de forma

equivalente a las abejas- que transmiten la ubicación de una fuente de alimento mediante el baile del contoneo? Esto parece poco probable, dado el contenido de información que tendría que transmitirse. ¿Podrían las hormigas situarse en la parte del sendero troncal a la altura de la bifurcación hacia el sendero a abandonar y realizar algún tipo de exhibición motora? No lo sabemos; no hemos observado tales comportamientos. Es posible que se coloque una marca negativa, pero solo en el sendero troncal y no en el puente, aunque esto también parece poco probable. Esto resulta un dilema de grandes dimensiones, y es muy poco lo que sabemos y lo que podemos explicar, por lo cual, es esperable cierto escepticismo. No es la primera vez, se han informado grandes incógnitas para explicar patrones complejos de conducta social en hormigas anteriormente. Por ejemplo, las hormigas cortadoras de hojas que transportan hojas por encima de sus cabezas pueden verse bloqueadas por obstáculos bajos que cuelgan sobre el camino. Dichos obstáculos se podan, mientras que los obstáculos visuales que no obstruyen a las hormigas cargadas no se eliminan (Bruce et al., 2017). Sin embargo, existe una asimetría de información, ya que solo las hormigas cargadas pueden sentir que el obstáculo es un obstáculo, pero solo las hormigas sin carga son las encargadas de liberar esos objetos siendo que a ellas no les incomoda el paso. Está claro que aún quedan grandes horizontes por explorar en la organización del comportamiento colectivo de las hormigas.

Implicancias para el control de hormigas

Tener una comprensión más profunda de los mecanismos que impulsan esta respuesta colectiva es crucial para abordar de manera efectiva este comportamiento complejo. Solo así podremos desarrollar estrategias de manejo eficientes para controlar las poblaciones de hormigas. Para el control de interiores, se debería considerar dónde ubicar estratégicamente los cebos ya que no es lo mismo procurar que el cebo sea ingerido para que mueran las hormigas, (tal como se piensa actualmente) que procurar que abandonen un camino. Además, se puede alternar características o ubicación del cebo para evitar el uso de memorias aversivas. Por otro lado, sabiendo que se cuenta con poco tiempo hasta que el abandono se inicia, podemos implementar modificaciones en la colocación del cebo para maximizar la entrada del tóxico en el nido durante las primeras 2 horas, procurando así tasas de mortalidad más significativas. Esto se puede lograr mediante un gran despliegue de cebos que saturen el área. Otro punto a considerar cuando se utilizan dispensadores de cebo, es asegurarse de que tengan acceso ilimitado, esto es, que una enorme cantidad de hormigas puedan ingerir simultáneamente.

Es importante tener en cuenta que este comportamiento que evaluamos en *L. humile* podría ser similar en otras especies plagas e invasoras como son *Solenopsis invicta*, *Nyladeria fulva*, *Wasmannia auropunctata*, entre otras especies. Hay muchos trabajos donde el control de estas especies no ha sido del todo exitoso (Stanley, 2004; Vinson, 1997; Wang et al., 2016; Wetterer & Porter, 2003). No solo es probable que el abandono sea una respuesta que se presente en varias especies, sino que también es factible que se genere dicha respuesta hacia cualquier alimento que genere un malestar. Lo cual pone a la investigación del tema en una nueva perspectiva: ya no habría que pensar en desarrollar moléculas nuevas que generen mortalidad, porque las hormigas volverán a aprender a evitarlas. En este sentido, sería importante desarrollar moléculas que no generen malestar tan rápido en dosis subletales. De hecho, sería recomendable hacer ensayos de malestar, los cuales son sencillos, baratos y extremadamente rápidos. Más aún, tal vez deberían implementarse como estándar al evaluar tóxicos o formulaciones de cebos tóxicos.

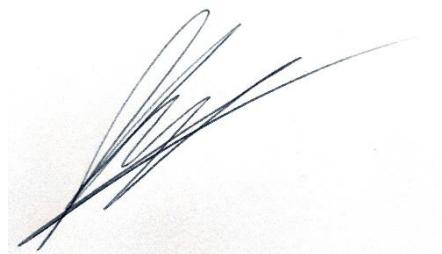
Podría resultar beneficioso utilizar moléculas moduladoras del comportamiento para manipular la toma de decisiones y mejorar el reclutamiento o un retorno más rápido al alimentador. Por ejemplo, las feromonas sintéticas añadidas a las estaciones de cebo (Greenberg & Klotz, 2000) o el uso de sustancias como la ketanserina que aumentan la alimentación posterior con cebos tóxicos (Josens et al., 2021) y la cafeína en niveles moderados que mejora la formación de la memoria (Galante et al., 2023) han sido explorados. Otra estrategia de control posible es combinar el insecticida con una feromona de camino sintética, método que ya se ha utilizado para controlar a la hormiga argentina (Sunamura et al., 2011). Las modificaciones al protocolo en sí también pueden manipular la toma de decisiones de las hormigas. Estudios de campo y de laboratorio han revelado que un protocolo alternativo de dos pasos con olor agregado mejora la aceptación e ingestión de cebos tóxicos (Josens et al., 2016). Con más investigación y conocimiento de estos procesos, podemos mejorar nuestros esfuerzos de control y, en última instancia, lograr resultados más exitosos en el manejo de las infestaciones de hormigas.

Es esencial adoptar una perspectiva diferente al interpretar los resultados en eventos de control o investigaciones con cebo tóxicos. Hasta ahora, el paradigma predominante sobre los efectos de los cebos tóxicos se centró exclusivamente en la mortalidad (Rust et al., 2004). Sin embargo, esa concepción debería ampliarse para incluir el abandono como uno de los efectos relevantes al aplicar cebos tóxicos. En este sentido, es recomendable que, tras una estrategia de control, el éxito sea evaluado con relevamientos más extensos del área para confirmar si hay nidos presentes tal vez a pocos metros del área abandonada.

Este trabajo contribuye significativamente al entendimiento del comportamiento de las hormigas frente al uso de cebos tóxicos, destacando la importancia de factores conductuales que han sido tradicionalmente subestimados en estrategias de control. Al integrar estos conocimientos, se abre la puerta a enfoques más efectivos y específicos, tanto en investigaciones básicas como en aplicaciones prácticas. La capacidad de las hormigas para modificar su comportamiento en respuesta a estímulos adversos subraya la necesidad de diseñar estrategias de manejo dinámicas y basadas en evidencias. Los hallazgos aquí presentados no solo enriquecen el conocimiento sobre *L. humile*, sino que también ofrecen una base para explorar comportamientos similares en otras especies invasoras, fortaleciendo los esfuerzos globales para mitigar su impacto ecológico y económico.



Dra. Roxana Josens
Directora de tesis



Lic. Daniel Alejandro, Zanola Escalon

Bibliografía

Aldrich, G. C., & Koppel, K. (2015). Pet food palatability evaluation: A review of standard assay techniques and interpretation of results with a primary focus on limitations. *Animals*, 5(1), 43–55.

Alix, A., Cortesero, A. M., Nénon, J. P., & Anger, J. P. (2001). Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2530–2536.

Alvarez-Blanco, P., Caut, S., Cerdá, X., & Angulo, E. (2017). Native predators living in invaded areas: responses of terrestrial amphibian species to an Argentine ant invasion. *Oecologia*, 185(1), 95–106.

Angulo, E., Hoffmann, B. D., Ballesteros-Mejia, L., Taheri, A., Balzani, P., Bang, A., Renault, D., Cordonnier, M., Bellard, C., Diagne, C., Ahmed, D. A., Watari, Y., & Courchamp, F. (2022). Economic costs of invasive alien ants worldwide. *Biological Invasions*, 24(7), 2041–2060.

AntWiki. (2024). *AntWiki: The Ants Online*. https://www.antwiki.org/Main_Page

Arêdes, A., Rodríguez, J., Bailez, O., Carlos, J., Lima, S., Canela, M. C., Maria Viana-Bailez, A., & Maria, A. (2022). Aversive learning as a behavioural mechanism of plant selection in the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol. News*, 32, 65–73.

Arenas, A., & Roces, F. (2016a). Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. *Animal Behaviour*, 115, 167–174.

Arenas, A., & Roces, F. (2016b). Learning through the waste: Olfactory cues from the colony refuse influence plant preferences in foraging leaf-cutting ants. *Journal of Experimental Biology*, 219(16), 2490–2496.

Arenas, A., & Roces, F. (2017). Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. *PLoS ONE*, 12(3), 1–16.

Arenas, A., & Roces, F. (2018). Appetitive and aversive learning of plants odors inside different nest compartments by foraging leaf-cutting ants. *Journal of Insect Physiology*, 109, 85–92.

Aron, S., Beckers, R., Deneubourg, J., & Pasteels, J. (1993). Memory and chemical communication in the orientation of two mass-recruiting ant species. *Insectes Sociaux*, 380(40), 369–380.

Aron, S., Deneubourg, J. L., & Pasteels, J. M. (1988). Visual cues and trail-following idiosyncrasy in *Leptothorax unifasciatus* : An orientation process during foraging. *Insectes Sociaux*, 35(4), 355–366.

Aron, S., Pasteels, J., & Deneubourg, J.-L. (1989). Trail-laying behaviour during exploratory recruitment in the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis* (Mayr). *Biology of Behavior*, 14(3), 207–217.

Baker, T. C., Van Vorhis, S. E., & Gaston, L. K. (1985). Bait-preference Tests for the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 78(5), 1083–1088.

Balderrama, N., Núñez, J., Guerrieri, F., & Giurfa, M. (2002). Different functions of two alarm substances in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 188(6), 485–491.

Beckers, R., Deneubourg, J. L. & Goss, S. (1992). Trail laying behavior during food recruitment in the ant *Lasius niger* (L). *Insectes Sociaux*, 39, 59-72.

Beckers, R., Deneubourg, J. L. & Goss, S. (1993). Modulation of trail laying in the ant *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae) and its role in the collective selection of a food source. *Journal of Insect Behavior*, 6, 751-759.

Beatson, S. H. (1972). Pharaoh's ants as pathogen vectors in hospitals. *The Lancet*, 289(7747), 425-427.

Behmer, S., Elias, D., & Bernays, E. (1999). Post-ingestive feedbacks and associative learning regulate the intake of unsuitable sterols in a generalist grasshopper. *Journal of Experimental Biology*, 202(6), 739-748.

Bernays, E. A., & Lee, J. C. (1988). Food aversion learning in the polyphagous grasshopper *Schistocerca americana*. *Physiological Entomology*, 13, 131-137.

Bertelsmeier, C. (2021). Globalization and the anthropogenic spread of invasive social insects. *Current Opinion in Insect Science*, 46, 16-23.

Blancafort, X., & Gómez, C. (2005). Consequences of the Argentine ant, *Linepithema humile* (Mayr), invasion on pollination of *Euphorbia characias* (L.) (Euphorbiaceae). *Acta Oecologica*, 28(1), 49-55.

Blight, O., Berville, L., Vogel, V., Hefetz, A., Renucci, M., Orgeas, J., Provost, E., & Keller, L. (2012). Variation in the level of aggression, chemical and genetic distance among three supercolonies of the Argentine ant in Europe. *Molecular Ecology*, 21(16), 4106-4121.

Blum, M., & Wilson, E. O. (1964). The anatomical source of trail substances in formicine ants. *Psyche: A Journal of Entomology*, 71(1), 28-31.

Bond, N. W. (1982). Transferred odor aversions in adult rats. *Behavioral and Neural Biology*, 35(4), 417-421.

Bond, W., & Slingsby, P. (1984). Collapse of an Ant-Plant Mutualism: The Argentine Ant (*Iridomyrmex humilis*) and Myrmecochorous Proteaceae. *Source: Ecology*, 65(4), 1031-1037.

Boser, C. L., Hanna, C., Faulkner, K. R., Cory, C., Randall, J. M., & Morrison, S. A. (2014). Argentine Ant Management in Conservation Areas: Results of a Pilot Study. *Monographs of the Western North American Naturalist*, 7(1), 518-530.

Boser, C. L., Hanna, C., Holway, D. A., Faulkner, K. R., Naughton, I., Merrill, K., Randall, J. M., Cory, C., Choe, D. H., & Morrison, S. A. (2017). Protocols for Argentine ant eradication in conservation areas. *Journal of Applied Entomology*, 141(7), 540-550.

Brooks, M., Bolker, B., Kristensen, K., & Maechler, M. (2022). Package glmmTMB: generalized linear mixed models using template model builder. In *R Package Version*, 1(3) (pp. 1-45).

Bruce, A. I., Czaczkes, T. J., & Burd, M. (2017). Tall trails: ants resolve an asymmetry of information and capacity in collective maintenance of infrastructure. *Animal Behaviour*, 127, 179-185.

Buczkowski, G., Roper, E., Chin, D., Mothapo, N., & Wossler, T. (2014). Hydrogel baits with low-dose thiamethoxam for sustainable Argentine ant management in commercial orchards. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 153(3), 183-190.

Cabrera, E., Rivas Fontan, I., Hoffmann, B. D., & Josens, R. (2021). Laboratory and field insights

into the dynamics and behavior of Argentine ants, *Linepithema humile*, feeding from hydrogels. *Pest Management Science*, 77(7), 3250–3258.

Calabuig, A., Garcia-Marí, F., Pekas, A., & Calabuig Gomar, A. (2014). *Ants affect the infestation levels but not the parasitism of honeydew and non-honeydew producing pests in citrus*.

Cammaerts, M. C., & Cammaerts, D. (2014). Comparative outlook over physiological and ecological characteristics of three closely-related *Myrmica* species. *Biologia*, 69, 1051–1058.

Cammaerts, M. C., & Cammaerts, R. (1980). Food recruitment strategies of the ants *Myrmica sabuleti* and *Myrmica ruginodis*. *Behavioural Processes*, 5(3), 251–270.

Cammell, M. E., Way, M. J., & Paiva, M. R. (1996). Diversity and structure of ant communities associated with oak, pine, eucalyptus and arable habitats in Portugal. *Ins. Soc*, 43, 37–46.

Carey, J. J., & Delaney, M. F. (2010). T-scores and Z-scores. In *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* (Vol. 8, pp. 113–121).

Carlesso, D., Smargiassi, S., Pasquini, E., Bertelli, G., & Baracchi, D. (2021). Nectar non-protein amino acids (NPAs) do not change nectar palatability but enhance learning and memory in honey bees. *Scientific Reports*, 11(1).

Carpintero, S., Reyes-López, J., & De Reyna, L. A. (2005). Impact of Argentine ants (*Linepithema humile*) on an arboreal ant community in Doñana National Park, Spain. *Biodiversity and Conservation*, 14(1), 151–163.

Cavill, G. W. K., Davies, N. W., & McDonald, F. J. (1980). Characterization of aggregation factors and associated compounds from the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis*. *Journal of Chemical Ecology*, 6(2), 371–384.

Chadab, R., & Rettenmeyer, C. (1975). Mass Recruitment by Army Ants. *Science*, 188(4193), 1124–1125.

Chamberlain, S. A., & Holland, J. N. (2009). Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology*, 90(9), 2384–2392.

Chambers, K. C. (2018). Conditioned taste aversions. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*, 4(1), 92–100.

Chen, J. S. C., & Nonacs, P. (2000). Nestmate Recognition and Intraspecific Aggression Based on Environmental Cues in Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(6), 1333–1337. 2

Cherrett, J. M. (1986). *The economic importance and control of leaf-cutting ants*.

Choe, D. H., Tay, J. W., Campbell, K., Park, H., Greenberg, L., & Rust, M. K. (2021). Development and demonstration of low-impact IPM strategy to control argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) in Urban Residential Settings. *Journal of Economic Entomology*, 114(4), 1752–1757.

Choe, D. H., Villafuerte, D. B., & Tsutsui, N. D. (2012). Trail Pheromone of the Argentine Ant, *Linepithema humile* (Mayr) (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS ONE*, 7(9), 1–7.

Cholewiński, M., Derda, M., & Hadaś, E. (2017). Hygiene pests as vectors for parasitic and bacterial diseases in humans. *Annals of Parasitology*, 63(2), 81–97.

Clark, R. E. (2004). The Classical Origins of Pavlov's Conditioning. In *Integrative Physiological & Behavioral Science* (Vol. 39, Issue 4).

Cochran, D. G. (1994). Toxic effects of boric acid on the German cockroach. *Experientia*, 51, 561–563.

Cole, F. R., Medeiros, A. C., Loope, L. L., & Zuehlke, W. W. (1992). Effects of the Argentine Ant on Arthropod Fauna of Hawaiian High-Elevation Shrubland. *Source: Ecology*, 73(4), 1313–1322.

Collett, T. S., & Collett, M. (2002). Memory use in insect visual navigation. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7), 542–552.

Collins, H. ., & Callcott, A. M. . (1998). Fipronil: an ultra-low-dose bait toxicant for control of red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*, 407–415.

Cook, S. C., & Davidson, D. W. (2006). Nutritional and functional biology of exudate-feeding ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 118(1), 1–10.

Costello, M. J., & Welch, M. D. (2014). Influence of weeds on argentine ant (Hymenoptera: Formicidae) and obscure mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) in a central California vineyard. *Journal of Economic Entomology*, 107(3), 1194–1200.

Cox, R. L., & Wilson, W. T. (1984). Effects of permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Entomol.*, 13, 375–378.

Cronin, A. L. (2012). Consensus decision making in the ant *Myrmecina nipponica*: House-hunters combine pheromone trails with quorum responses. *Animal Behaviour*, 84(5), 1243–1251.

Czaczkes, T. J., Czaczkes, B., Igihaut, C., & Heinze, J. (2015). Composite collective decision-making. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1809), 1–8.

Czaczkes, T. J., Grüter, C., Ellis, L., Wood, E., & Ratnieks, F. L. W. (2013). Ant foraging on complex trails: Route learning and the role of trail pheromones in *Lasius niger*. *Journal of Experimental Biology*, 216(2), 188–197.

Czaczkes, T. J., Grüter, C., Jones, S. M., & Ratnieks, F. L. W. (2011). Synergy between social and private information increases foraging efficiency in ants. *Biology Letters*, 7(4), 521–524.

Czaczkes, T. J., Grüter, C., & Ratnieks, F. L. (2013). Negative feedback in ants: crowding results in less trail pheromone deposition. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(81).

Czaczkes, T. J., Grüter, C., & Ratnieks, F. L. W. (2015). Trail pheromones: An integrative view of their role in social insect colony organization. *Annual Review of Entomology*, 60, 581–599.

Daane, K. M., Cooper, M. L., Nelson, K. R., Erik H, & Mark C. (2008). Testing Baits to Control Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Vineyards. *Source: Journal of Economic Entomology*, 101(3), 699–709.

Daane, K. M., Sime, K. R., Fallon, J., & Cooper, M. L. (2007). Impacts of Argentine ants on mealybugs and their natural enemies in California's coastal vineyards. *Ecological Entomology*, 32(6), 583–596.

Daane, K. M., Sime, K. R., Hogg, B. N., Bianchi, M. L., Cooper, M. L., Rust, M. K., & Klotz, J. H. (2006). Effects of liquid insecticide baits on Argentine ants in California's coastal vineyards. *Crop Protection*, 25(6), 592–603.

Dale, W. E. (1974). Hormigas en viviendas y jardines de Lima Metropolitana: Iridomyrmex humilis (Mayr) y Monomorium pharaonis (L). *Revista Peruana de Entomología*, 17, 126–127.

Danchin, É., Giraldeau, L.-A., Valone, T. J., & Wagner, R. H. (2004). Public Information: From Nosy Neighbors to Cultural Evolution. *Science*, 305(5683), 487–491.

Davidson, D. W., Cook, S. C., & Snelling, R. R. (2004). Liquid-feeding performances of ants (Formicidae): Ecological and evolutionary implications. *Oecologia*, 139(2), 255–266.

De Bruyn, L. A. L., & Conacher, A. J. (1990). The role of termites and ants in soil modification: A review. *Australian Journal of Soil Research*, 28(1), 55–93.

Deneubourg, J. L., Aron, S., Goss, S., & Pasteels, J. M. (1990). The self-organizing exploratory pattern of the argentine ant. *Journal of Insect Behavior*, 3(2), 159–168.

Denton, K. K., & Nonacs, P. (2018). Habitat complexity and predictability effects on finding and collecting food when ants search as cooperative groups. *Animal Behaviour*, 141, 77–84.

Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81–106.

Devigne, C., & Detrain, C. (2006). How does food distance influence foraging in the ant *Lasius niger*: The importance of home-range marking. *Insectes Sociaux*, 53(1), 46–55.

Dreistadt, S. H., Hagen, K. S., & Dahlsten, D. L. (1986). Predation by *Iridomyrmex humilis* [Hym.: Formicidae] on eggs of *Chrysoperla carnea* [Neu.: Chrysopidae] released for inundative control of *Illinoia liriodendri* [Hom.: Aphididae] infesting *Liriodendron tulipifera*. *Entomophaga*, 31, 397–400.

Duncan, J. (1963). Post-treatment effects of sublethal doses of dieldrin on the mosquito *Aedes aegypti* L. In *Ann. appl. Bid* (Vol. 52).

Dupuy, F., Sandoz, J. C., Giurfa, M., & Jossens, R. (2006). Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Animal Behaviour*, 72(5), 1081–1091.

Etscorn, F., & Stephens, R. (1973). Establishment of conditioned taste aversions with a 24-hour CS-US interval. *Physiological Psychology*, 1(3), 251–253.

Evison, S. E. F., Hart, A. G., & Jackson, D. E. (2008). Minor workers have a major role in the maintenance of leafcutter ant pheromone trails. *Animal Behaviour*, 75(3), 963–969.

Falibene, A., & Jossens, R. (2008). Nectar intake rate is modulated by changes in sucking pump activity according to colony starvation in carpenter ants. *Journal of Comparative Physiology A*, 194, 491–500.

Fernandes, N., & Rust, M. (2003). Site Fidelity in Foraging Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 41, 625–632.

Field, H. C., Evans, W. E., Hartley, R., Hansen, L. D., & Klotz, J. H. (2007). A Survey of Structural Ant Pests in the Southwestern U.S.A. (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 49(3), 151–164.

Flanagan, T. P., Pinter-Wollman, N. M., Moses, M. E., & Gordon, D. M. (2013). Fast and Flexible: Argentine Ants Recruit from Nearby Trails. *PLoS ONE*, 8(8), 1–7.

Flanders, S. E. (1951). The Role of the Ant in the Biological Control of Homopterous Insects. *The Canadian Entomologist*, 83(4), 93–98.

Folgarait, P. J. (1998). Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodiversity and Conservation*, 7, 1221–1244.

Folgarait, P. J., Dyer, L. A., Marquis, R. J., & Braker, H. E. (1996). Leaf-cutting ant preferences

for five native tropical plantation tree species growing under different light conditions. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, 80, 521–530.

Folgarait, P. J., & Gilbert, L. E. (1999). Phorid parasitoids affect foraging activity of *Solenopsis richteri* under different availability of food in Argentina. *Ecological Entomology*, 24(2), 163–173.

Forschler, B. T., & Evans, G. M. (1994). Perimeter treatment strategy using containerized baits to manage Argentine ants, *Linepithema humile* (Mayr) (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Entomological Science*, 29(2), 264–267.

Frankie, G. W., & Vinson, S. B. (1977). Scent Marking of Passion Flowers in Texas by Females of *Xylocopa virginica texana* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 50(4), 613–625.

Franklin, E. L., Richardson, T. O., Sendova-Franks, A., Robinson, E. J., & Franks, N. R. (2011). Blinkered teaching : tandem running by visually impaired ants. *Behav Ecol Sociobiol*, 65(4), 569–579.

Freas, C. A., Wystrach, A., Schwarz, S., & Spetch, M. L. (2021). Aversive View Memory and Navigational Risk Sensitivity in the Desert Ant, *Cataglyphis velox*. In *bioRxiv*.

Galante, H., De Agrò, M., Koch, A., & Kau, S. (2023). Acute exposure to caffeine improves navigation in an invasive ant. In *bioRxiv*.

Galef, B. G. (1985). Direct and Indirect Behavioral Pathways to the Social Transmission of Food Avoidance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443(1), 203–215.

Galef, B. G. (1989). Enduring Social Enhancement of Rats' Preferences for the Palatable and the Piquant. *Appetite*, 13, 81–92.

Galvanho, J. P., Carrera, M. P., Moreira, D. D. O., Erthal, M., Silva, C. P., & Samuels, R. I. (2013). Imidacloprid Inhibits Behavioral Defences of the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera:Formicidae). *Journal of Insect Behavior*, 26(1), 1–13.

Garcia, J., Ervin, F., & Koelling, R. (1967). Bait-shyness: A test for toxicity with N = 21. *Psychonomic Science*, 7(7), 245–246.

Garcia, J., Hanson, R. P., & Brandly, C. A. (1955). Conditioned Aversion to Saccharin Resulting from Exposure to Gamma Radiation. *Science*, 122(3160), 157–158.

Garcia, J., & Koelling, R. (1966). Relation of cue to consequence avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4, 123–124.

Ghumare, S. S., & Mukherjee, S. N. (2005). Absence of food aversion learning in the polyphagous noctuid, *Spodoptera litura* (F.) following intoxication by deleterious chemicals. *Journal of Insect Behavior*, 18(1), 105–114.

Giraud, T., Pedersen, J. S., & Keller, L. (2002). Evolution of supercolonies: The Argentine ants of southern Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6075–6079.

Giurfa, M., & Núñez, J. (1992). Honeybees mark with scent and reject recently visited flowers. *Oecologia*, 89, 113–117.

Gómez, C., & Oliveras, J. (2003). Can the Argentine ant (*Linepithema humile* Mayr) replace native ants in myrmecochory? *Acta Oecologica*, 24(1), 47–53.

Gómez, C., Pons, P., Bas, J. M., & And Bas, P. (2003). Effects of the Argentine ant *Linepithema*

humile on seed dispersal and seedling emergence of *Rhamnus alaternus*. *ECOGRAPHY*, 26, 532–538.

Gonalons, C. M., & Farina, W. M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 221(7), 1–8.

Gordon, D., & Human, K. . (1999). Behavioral interactions of the invasive Argentine ant with native ant species. *Insectes Sociaux*, 46(2), 159–163.

Goss, S., Aron, S., Deneubourg, J. L., & Pasteels, J. M. (1989). Self-organized Shortcuts in the Argentine Ant. *Jap. J. Sanit. Zool.*, 52(12), 579–581.

Gotelli, N. J. (1996). Ant community structure: effects of predatory ant lions. *Ecology*, 77(2), 630–638.

Greenberg, L. (1997). Alternative control strategies for ants around homes Argentine ant control View project Sweat bees View project. Article in *Journal of Agricultural Entomology*, 14(3), 249–257.

Greenberg, L., & Klotz, J. H. (2000). Argentine ant (hymenoptera: formicidae) trail pheromone enhances consumption of liquid sucrose solution. *Journal of Economic Entomology*, 93(1), 119–122.

Greenberg, L., Klotz, J. H., & Rust, M. K. (2006). Liquid borate bait for control of the Argentine ant, *Linepithema humile*, in organic citrus (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*, 89(4), 469–474.

Grüter, C., Czaczkes, T. J., & Ratnieks, F. L. W. (2011). Decision making in ant foragers (*Lasius niger*) facing conflicting private and social information. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(2), 141–148.

Guerrieri, F. J., D’Ettorre, P., Devaud, J. M., & Giurfa, M. (2011). Long-term olfactory memories are stabilised via protein synthesis in *Camponotus fellah* ants. *Journal of Experimental Biology*, 214(19), 3300–3304.

Guillade, A. C., & Folgarait, P. J. (2015). Effect of phorid fly density on the foraging of *Atta vollenweideri* leafcutter ants in the field. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 154(1), 53–61.

Habes, D., Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J. P., & Soltani, N. (2006). Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(1), 17–24.

Hangartner, W. (1969). Structure and Variability of the Individual Odor Trail in *Solenopsis geminata* Fabr. (Hymenoptera, Formicidae). *Z. Vergl. Physiologie*, 62, 111–120.

Hart, A., & Jackson, D. E. (2006). Correspondences U-turns on ant pheromone trails. *Current Biology*, 16(2), 42–43.

Haynes, K. F. (1988). Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review of Entomology*. Vol. 33, 33(1), 149–168.

Heller, N. E., & Gordon, D. M. (2006). Seasonal spatial dynamics and causes of nest movement in colonies of the invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). *Ecological Entomology*, 31(5), 499–510.

Herbert, L. T., Vázquez, D. E., Arenas, A., & Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses

of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*, 217(19), 3457–3464.

Herz, H., Hölldobler, B., & Roces, F. (2008). Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Behavioral Ecology*, 19(3), 575–582.

Hoffmann, B. D. (2011). Eradication of populations of an invasive ant in northern Australia: Successes, failures and lessons for management. *Biodiversity and Conservation*, 20(13), 3267–3278.

Hoffmann, B. D., Luque, G. M., Bellard, C., Holmes, N. D., & Donlan, C. J. (2016). Improving invasive ant eradication as a conservation tool: A review. *Biological Conservation*, 198, 37–49.

Hogg, B. N., Nelson, E. H., Hagler, J. R., & Daane, K. M. (2018). Foraging Distance of the Argentine Ant in California Vineyards. *Journal of Economic Entomology*, 111(2), 672–679.

Hölldobler, B. (1976). Tournaments and Slavery in a Desert Ant. *Science*, 192(4242), 912–914.

Hölldobler, B., Moglich, M., & Maschwitz, U. (1974). Communication by Tandem Running in the Ant *Camponotus sericeus*. *J. Comp. Physiol.*, 90(2), 105–127.

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The ants* (Harvard Un).

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (2009). *The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*.

Holway, D. A., Lach, L., Suarez, A. V., Tsutsui, N. D., & Case, T. J. (2002). The causes and consequences of ant invasions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 181–233.

Holway, D. A., Suarez, A. V., & Case, T. J. (2002). Role of abiotic factors in governing susceptibility to invasion: a test with Argentine ants. *Ecology*, 83(6), 1610–1619.

Holway, D., Suarez, A., & Case, T. (1998). Loss of Intraspecific Aggression in the Success of a Widespread Invasive Social Insect. *Science*, 282, 949–952.

Honjo, K., & Furukubo-Tokunaga, K. (2009). Distinctive neuronal networks and biochemical pathways for appetitive and aversive memory in *Drosophila* larvae. *Journal of Neuroscience*, 29(3), 852–862.

Hooper-Bui, L. M., & Rust, M. K. (2000). Oral toxicity of abamectin, boric acid, fipronil, and hydramethylnon to laboratory colonies of argentine ants (hymenoptera: formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 858–864.

Hooper-Bui, L. M., & Rust, M. K. (2001). An oral bioassay for the toxicity of hydramethylnon to individual workers and queens of argentine ants, *Linepithema humile*. *Pest Management Science*, 57(11), 1011–1016.

Howard, J. J. (1988). Leafcutting and diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. *Ecology*, 69(1), 250–260.

Howse, M. W. F., Haywood, J., & Lester, P. J. (2023). Sociality reduces the probability of eradication success of arthropod pests. *Insectes Sociaux*, 70(3), 285–294.

Human, K. G., & Gordon, D. M. (1996). Exploitation and interference competition between the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*, and native ant species. *Oecologia*, 105, 405–412.

Ipinza-Regla, González, & Figueroa. (2015). Hormiga argentina *Linepithema humile* Mayr, 1868

(Hymenoptera: Formicidae) y su rol como posible vector de contaminación microbiana en una lechería de cabras *Capra hircus* Linnaeus, 1758 (Artiodactyla: Bovidae). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(3), 317–323.

Itioka, T., & Inoue, T. (1996). The role of predators and attendant ants in the regulation and persistence of a population of the citrus mealybug *Pseudococcus citriculus* in a Satsuma orange orchard. *Applied Entomology and Zoology*, 31(2), 195–202.

Johnston, A. N. B., Burne, T. H. J., & Rose, S. P. R. (1998). Observation learning in day-old chicks using a one-trial passive avoidance learning paradigm. *Animal Behaviour*, 56(6), 1347–1353.

Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak Jones, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *OIKOS* 69, 3, 373–386.

Josens, R., Eschbach, C., & Giurfa, M. (2009). Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *Journal of Experimental Biology*, 212(12), 1904–1911.

Josens, R., Giacometti, A., & Giurfa, M. (2021). Inhibition of serotonergic signaling induces higher consumption of both sucrose solution and toxic baits in carpenter ants. *Scientific Reports*, 11(1), 19176.

Josens, R., Mattiacci, A., Lois-Milevicich, J., & Giacometti, A. (2016). Food information acquired socially overrides individual food assessment in ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(12), 2127–2138.

Josens, R., & Roces, F. (2000). Foraging in the ant *Camponotus mus* : nectar-intake rate and crop filling depend on colony starvation. *Journal of Insect Physiology*, 46(7), 1103–1110.

Josens, R., Sola, F., Lois-milevicich, J., & Mackay, W. (2017). Urban ants of the city of Buenos Aires , Argentina : species survey and practical control practical control. *International Journal of Pest Management*, 63(3), 213–223.

Josens, R., Sola, F., Marchisio, N., Agostina, M., Renzo, D., & Giacometti, A. (2014). Knowing the enemy : ant behavior and control in a pediatric hospital of Buenos Aires. *SpringerPlus*, 3, 1–13.

Kay, A. (2002). Applying optimal foraging theory to assess nutrient availability ratios for ants. *Ecology*, 83(7), 1935–1944.

Kenis, M., & Branco, M. (2010). Impact of alien terrestrial arthropods in Europe. Chapter 5. In *BioRisk* (Vol. 4, pp. 51–71). Pensoft Publishers.

Klappenbach, M., Lara, A. E., & Locatelli, F. F. (2022). Honey bees can store and retrieve independent memory traces after complex experiences that combine appetitive and aversive associations. *Journal of Experimental Biology*, 225(11).

Klotz, J., Greenberg, L., Amrhein, C., & Rust, M. K. (2000). Toxicity and Repellency of Borate-Sucrose Water Baits to Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.*, 93(4), 1256–1258.

Klotz, J. H., Greenberg, L., & Venn, E. C. (1998). Liquid Boric Acid Bait for Control of the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 91(4), 910–914.

Klotz, J. H., Mangold, J. R., Vail, K. M., Davis, L. R., & Potterson, R. (1995). A survey of the urban pest ants. In *Florida Entomologist*.

Klotz, J. H., & Moss, J. I. (1996). Oral Toxicity of a Boric Acid - Sucrose Water Bait to Florida Carpenter Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Entomol. Sci.*, 31(1), 9–12.

Klotz, J. H., Oi, D. H., Vail, K. M., & Williams, D. F. (1996). Laboratory Evaluation of a Boric Acid Liquid Bait on Colonies of *Tapinoma melanocephalum* Argentine Ants and Pharaoh Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.*, 89(3), 673–677.

Klotz, J. H., Reid, B. L., & Williams, D. F. (1997). Laboratory and field techniques for development and evaluation of a bait for urban ant pests. *Recent Res Devel in Entomol*, 1, 83–91.

Klotz, J. H., Rust, M. K., Field, H., Greenberg, L., & Kupfer, K. (2008). Controlling Argentine ants in residential settings (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 51(3), 579–588.

Klotz, J. H., Rust, M. K., Greenberg, L., Field, H. C., & Kupfer, K. (2007). An Evaluation of Several Urban Pest Management Strategies to Control Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 50(2), 1–8.

Knight, R. L., & Rust, M. K. (1990a). Repellency and Efficacy of Insecticides Against Foraging Workers in Laboratory Colonies of Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.*, 83(4), 1402–1408.

Knight, R. L., & Rust, M. K. (1990b). The urban ants of California with distribution notes of imported species. *Southwestern Entomologist*, 15(2), 167–178.

Krushelnicky, P. D., & Reimer, N. J. (1998). Bait Preference by the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae) In Haleakala National Park, Hawaii. *Environmental Entomology*, 64(6), 1482–1487.

Krushelnicky, P. D., & Reimer, N. J. (1998). Efficacy of Maxforce Bait for Control of the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae) in Haleakala National Park, Maui, Hawaii. *Environmental Entomology*, 80(6), 1473–1481.

Krushelnicky, P., Haines, W., Loope, L., & Van Gelder, E. (2011). *The Haleakala Argentine ant project: a synthesis of past research and prospects for the future*.

Krushelnicky, P., & Reimer, N. J. (1998). *Bait Preference by the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae) In Haleakala National Park, Hawaii* (Vol. 64).

Lach, L. (2008). Argentine ants displace floral arthropods in a biodiversity hotspot. *Diversity and Distributions*, 14(2), 281–290.

Lach, L., Parr, C. L., & Abbott, K. L. (2010). *Ant Ecology*.

Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., & Gauthier, M. (2001). Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 48(3), 129–134.

Latty, T., Holmes, M. J., Makinson, J. C., & Beekman, M. (2017). Argentine ants (*Linepithema humile*) use adaptable transportation networks to track changes in resource quality. *Journal of Experimental Biology*, 220(4), 686–694.

Lavin, M. J., Freise, B., & Coombes, S. (1980). Transferred Flavor Aversions in Adult Rats. *Behavioral and Neural Biology*, 28, 15–33.

Le, B. (2021). *Sublethal Behavioral Effects of Boric Acid Bait on Laboratory colonies of Argentine Ant*.

Le Breton, J., & Fourcassié, V. (2004). Information transfer during recruitment in the ant *Lasius*

niger L. (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55(3), 242–250.

Lee, C. . (2000). Performance of hydramethylnon-and fipronil-based containerized baits against household ants in residential premises. In *ZVopical Biomedicine* (Vol. 17).

Lenth, R. V., Bolker, B., Buerkner, P., Giné-Vázquez, I., Maxime Herve, Maarten Jung, Love, J., Miguez, F., Riebl, H., & Singmann, H. (2023). Population marginal means in the linear model: An alternative to least squares means. In *American Statistician* (Vol. 34, Issue 4, pp. 216–221).

Lise, F., Roberto Mello Garcia, F., & Antônio Lutinski, J. (2006). Association of ants (Hymenoptera: Formicidae) with bacteria in hospitals in the State of Santa Catarina. *Associação entre formigas (Hymenoptera: Formicidae) e bactérias em hospitais de Santa Catarina. Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(6), 523–526.

Loreto, R. G., Hart, A. G., Pereira, T. M., Freitas, M. L. R., Hughes, D. P., & Elliot, S. L. (2013). Foraging ants trade off further for faster: Use of natural bridges and trunk trail permanency in carpenter ants. *Naturwissenschaften*, 100(10), 957–963.

Lowe, S., Browne, M., & Boudjelas, S. (2000). *100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database*.

Mailleux, A. C., Buffin, A., Detrain, C., & Deneubourg, J. L. (2010). Recruiter or recruit: who boosts the recruitment in starved nests in mass foraging ants? *Animal Behaviour*, 79(1), 31–35.

Mailleux, A. C., Detrain, C., & Deneubourg, J. L. (2005). Triggering and persistence of trail-laying in foragers of the ant *Lasius niger*. *Journal of Insect Physiology*, 51(3), 297–304.

Mailleux, A. C., Detrain, C., & Deneubourg, J. L. (2006). Starvation drives a threshold triggering communication. *Journal of Experimental Biology*, 209(21), 4224–4229.

Mailleux, A. C., Detrain, C., Saffre, F., & Deneubourg, J.-L. (1999). Influence du jeune sur les acterous du recrutement chez *Lasius niger*. *Actes Coll. Insectes Sociaux*, 12, 73–104.

Mailleux, A. C., Devigne, C., Deneubourg, J. L., & Detrain, C. (2010). Impact of starvation on *Lasius niger*' exploration. *Ethology*, 116(3), 248–256.

Markl, H., & Holldobler, B. (1978). Recruitment and Food-Retrieving Behavior in *Novomessor* (Formicidae, Hymenoptera) II. Vibration Signals*. *Behav. Ecol. Sociobiol*, 4, 183–216.

Mason, R. (1988). Direct and observational learning by Redwinged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*): the importance of complex visual stimuli. In *Social Learning: Psychological and Biological Perspectives* (pp. 99–115).

Maze, I. S., Wright, G. A., & Mustard, J. A. (2006). Acute ethanol ingestion produces dose-dependent effects on motor behavior in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 52(11–12), 1243–1253.

Mc Cabe, S., Farina, W. M., & Josens, R. (2006). Antennation of nectar-receivers encodes colony needs and food-source profitability in the ant *Camponotus mus*. *Insectes Sociaux*, 53(3), 356–361.

McCalla, K. A., Tay, J. W., Mulchandani, A., Choe, D. H., & Hoddle, M. S. (2020). Biodegradable alginate hydrogel bait delivery system effectively controls high-density populations of Argentine ant in commercial citrus. *Journal of Pest Science*, 93(3), 1031–1042.

Mcdonald, D. L., Cook, J. L., Coulson, R. N., Russell, L. H., & Ragsdale, D. W. (2012). *Investigation of an Invasive Ant species: Nylanderia fulva Colony extraction. Management, Diet Preference, Fecundity, and Mechanical Vector Potential.*

Merrill, K., Boser, C. L., Hanna, C., Holway, D. A., Naughton, I., Choe, D. H., & Wilson Rankin, E. E. (2018). Argentine ant (*Linepithema humile*, Mayr) eradication efforts on San Clemente Island, California, USA. *Western North American Naturalist*, 78(4), 829–836.

Mgocheki, N., & Addison, P. (2009). Interference of ants (Hymenoptera: Formicidae) with biological control of the vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Biological Control*, 49(2), 180–185.

Moauro, M., & Josens, R. (2023). Differential feeding responses in two species of nectivorous ants: Understanding bait palatability preferences of Argentine ants. *Journal of Applied Entomology*, 147(7), 520–529.

Moller, H. (1996). Lessons for invasion theory from social insects. *Biological Conservation*, 78(1–2), 142.

Moreno, D. ., Haney, P. ., & Luck, R. . (1987). Chlorpyrifos and Diazinon as Barriers to Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae) Foraging on Citrus Trees. *Journal of Economic Entomology*, 80(1), 208–214.

Morgan, E. D. (2009). Trail pheromones of ants. *Physiological Entomology*, 34(1), 1–17.

Nakai, J., Totani, Y., Kojima, S., Sakakibara, M., & Ito, E. (2020). Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Neuroscience*, 20(2), 8.

Narendra, A., Si, A., Sulikowski, D., & Cheng, K. (2007). Learning, retention and coding of nest-associated visual cues by the Australian desert ant, *Melophorus bagoti*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(10), 1543–1553.

Nelson, E. H., & Daane, K. M. (2007). Improving Liquid Bait Programs for Argentine Ant Control: Bait Station Density. *Environmental Entomology*, 36(6), 1475–1484.

Nonacs, P., & Dill, L. (1991). Mortality risk versus food quality trade-offs in ants: patch use over time. *Ecological Entomology*, 16, 73–80.

Nonacs, P., & Dill, L. M. (1988). Foraging response of the ant *Lasius pallitarsis* to food sources with associated mortality risk. *Insectes Sociaux*, 35(3), 293–303.

Nonacs, P., & Dill, L. M. (1990). Mortality risk vs. food quality trade-offs in a common currency: ant patch preferences. *Ecology*, 71(5), 1886–1892.

Orians, G. H., & Pearson, N. E. (1979). On the theory of central place foraging. In *Analysis of ecological systems*. Ohio State University Press.

Orr, M. R., & Seike, S. H. (1998). Parasitoids deter foraging by Argentine ants (*Linepithema humile*) in their native habitat in Brazil. *Oecologia*, 117(3), 420–425.

Passera, L., & Aron, S. (1993). Social Control over the Survival and Selection of Winged Virgin Queens in an Ant without Nuptial Flight: *Iridomyrmex humilis*. *Ethology*, 93(3), 225–235.

Pelham, S. (2005). Boric Acids Activity as a Possible Repellant to the Argentine Ant. In *Boric Acid and Ant Repellency*.

Pérez, S. P., Corley, J. C., & Farji-Brener, A. G. (2011). Potential impact of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* on conifer plantations in northern Patagonia, Argentina.

Agricultural and Forest Entomology, 13(2), 191–196.

Piqueret, B., Sandoz, J. C., & D’Ettorre, P. (2019). Ants learn fast and do not forget: Associative olfactory learning, memory and extinction in *Formica fusca*. *Royal Society Open Science*, 6(6), 1–11.

Planqué, R., Berg, J. B. Van Den, & Franks, N. R. (2010). Recruitment Strategies and Colony Size in Ants. *PLoS One*, 5(8), 1–8.

Porter, S. D., & Savignano, D. A. (1990). Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community. *Ecology*, 71(6), 2095–2106.

Prina, D. (2020). *Control de hormigas: Modulacion de la ingesta de cebos por bitrex, un amargante comercial*.

Provecho, Y., & Jossens, R. (2009). Olfactory memory established during trophallaxis affects food search behaviour in ants. *Journal of Experimental Biology*, 212(20), 3221–3227.

Pull, C. D., Ugelvig, L. V., Wiesenhofer, F., Grasse, A. V., Tragust, S., Schmitt, T., Brown, M. J., & Cremer, S. (2018). Destructive disinfection of infected brood prevents systemic disease spread in ant colonies. *ELife*, 7.

Reid, C. R., Sumpter, D. J. T., & Beekman, M. (2011). Optimisation in a natural system: Argentine ants solve the Towers of Hanoi. *Journal of Experimental Biology*, 214(1), 50–58.

Robinson, E. J., Green, K. E., Jenner, E. A., Holcombe, M., & Ratnieks, F. L. W. (2008). Decay rates of attractive and repellent pheromones in an ant foraging trail network. *Insectes Sociaux*, 55, 246–251.

Robinson, E. J. H., Jackson, D. E., Holcombe, M., & Ratnieks, F. L. W. (2005). ‘No entry’ signal in ant foraging. *Nature*, 438(7067), 442.

Robinson, E. J. H., Ratnieks, F. L. W., & Holcombe, M. (2008). An agent-based model to investigate the roles of attractive and repellent pheromones in ant decision making during foraging. *Journal of Theoretical Biology*, 255(2), 250–258.

Roces, F. (1990). Olfactory conditioning during the recruitment process in a leaf-cutting ant. *Oecologia*, 83, 261–262.

Roces, F. (1994). Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundi*. *Insectes Sociaux*, 41(3), 235–239.

Rossi, N., Pereyra, M., Moauro, M. A., Giurfa, M., D’Ettorre, P., & Jossens, R. (2020). Trail pheromone modulates subjective reward evaluation in Argentine ants. *Journal of Experimental Biology*, 223(17), 1–10.

Rust, M. K. (1986). *Managing household pests*.

Rust, M. K. (2024). *Why don’t ants always fall for toxic bait? They may learn to avoid it.* (Interview by Darren Incorvaia). Science News: News/Plants & Animals.

Rust, M. K., Haagsma, K., & Reierson, D. A. (1996). Barrier Sprays to Control Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol*, 89(1), 134–137.

Rust, M. K., Reierson, D. A., & Klotz, J. H. (2002). Factors affecting the performance of bait toxicants for Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Proceedings of the 4th International Conference on Urban Pests*, 115–120.

Rust, M. K., Reierson, D. A., & Klotz, J. H. (2003). Pest Management of Argentine Ants

(Hymenoptera: Formicidae). *J. Entomol. Sci.*, 38(2), 159–169.

Rust, M. K., Reierson, D. A., & Klotz, J. H. (2004). Delayed Toxicity as a Critical Factor in the Efficacy of Aqueous Baits for Controlling Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 1017–1024.

Rust, M. K., Soeprono, A., Wright, S., Greenberg, L., Choe, D. H., Boser, C. L., & Hanna, C. (2015). Laboratory and field evaluations of polyacrylamide hydrogel baits against Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 1228–1236.

Rzijska, J. (1953). *Bait Shyness, a Study in Rat Behaviour*.

Santos, M. N. (2016). Research on urban ants : approaches and gaps. *Insectes Sociaux*, 63(3), 359–371.

Saverschek, N., Herz, H., Wagner, M., & Roces, F. (2010). Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour*, 79(3), 689–698.

Saverschek, N., & Roces, F. (2011). Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Animal Behaviour*, 82(3), 453–458.

Schier, L. A., Hyde, K. M., & Spector, A. C. (2019). Conditioned taste aversion versus avoidance: A re-examination of the separate processes hypothesis. *PLoS ONE*, 14(6).

Schricker, B., & Stephen, W. P. (1970). The Effect of Sublethal Doses of Parathion on Honeybee Behaviour. I. Oral Administration and the Communication Dance. *Journal of Apicultural Research*, 9(3), 141–153.

Silverman, J., & Brightwell, R. J. (2008). The argentine ant: Challenges in managing an invasive unicolonial pest. *Annual Review of Entomology*, 53, 231–252.

Silverman, J., & Nsimba, B. (2000). Soil-free collection of Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) based on food-directed brood and queen movement. *Florida Entomologist*, 83(1), 10–16.

Silverman, J., & Roulston, T. H. (2001). Acceptance and Intake of Gel and Liquid Sucrose Compositions by the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.*, 94(2), 511–515.

Singh, S. R., Walters, K. F. A., Port, G. R., & Northing, P. (2004). Consumption rates and predatory activity of adult and fourth instar larvae of the seven spot ladybird, *Coccinella septempunctata* (L.), following contact with dimethoate residue and contaminated prey in laboratory arenas. *Biological Control*, 30(2), 127–133.

Soeprono, A. M., & Rust, M. K. (2004). Effect of Delayed Toxicity of Chemical Barriers to Control Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.*, 97(6), 2021–2028.

Sola, F., Falibene, A., & Josens, R. (2013). Asymmetrical Behavioral Response Towards Two Boron Toxicants Depends on the Ant Species (Hymenoptera : Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(2), 929–938.

Sola, F., Josens, R., & Eha, C. (2016). Feeding behavior and social interactions of the Argentine ant *Linepithema humile* change with sucrose concentration. *Bulletin of Entomological Research*, 106(4), 522–529.

Stadler, B., & Dixon, A. F. G. (1998). Costs of ant attendance for aphids. *Journal of Animal Ecology*, 67(3), 454–459.

Stanley, M. C. (2004). *Review of the efficacy of baits used for ant control and eradication*.

Stein, M. B. (1987). *Red imported fire ant, Solenopsis invicta Buren, recruitment and bait preference, with observations on sympatric ant species, in southeastern Texas*.

Stringer, C. E., Lofgren, C. S., & Bartlerr', F. J. (1964). Imported Fire Ant Toxic Bait Studies: Evaluation of Toxicants. *Journal of Economic Entomology*, 57(6), 941–945.

Stroeymeyt, N., Grasse, A. V., Crespi, A., Mersch, D. P., Cremer, S., & Keller, L. (2018). Social network plasticity decreases disease transmission in a eusocial insect. *Science*, 362, 941–945.

Suarez, A. V., Yeh, P., & Case, T. J. (2005). Impacts of Argentine ants on avian nesting success. *Insectes Sociaux*, 52(4), 378–382.

Suarez, A. V., & Case, T. J. (2002). Bottom-up effects on persistence of a specialist predator: ant invasions and horned lizards. *Ecological Applications*, 12(1), 291–298.

Suarez, A. V., Holway, D. A., & Case, T. J. (2000). *Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: Insights from Argentine ants*.

Suarez, A. V., Holway, D. A., & Tsutsui, N. D. (2008). Genetics and behavior of a colonizing species: The invasive Argentine ant. *American Naturalist*, 172(S1), S72–S84.

Sudd, J. H., & Sudd, M. E. (1985). Seasonal changes in the response of wood-ants (*Formica Zugubris*) to sucrose baits. *Ecological Entomology*, 10, 89–97.

Sunamura, E., Suzuki, S., Nishisue, K., Sakamoto, H., Otsuka, M., Utsumi, Y., Mochizuki, F., Fukumoto, T., Ishikawa, Y., Terayama, M., & Tatsuki, S. (2011). Combined use of a synthetic trail pheromone and insecticidal bait provides effective control of an invasive ant. *Pest Management Science*, 67(10), 1230–1236.

Taylor, K. S., Waller, G. D., & Crowder, L. A. (1987). Impairment of a classical conditioned response of the honey bee (*Apis mellifera L.*) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides. *Apidologie*, 18(3), 243–252.

Traniello, J. F. A. (1977). Recruitment behavior, orientation, and the organization of foraging in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus* degeer (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2(1), 61–79.

Traniello, J. F. A. (1983). Social organization and foraging success in *Lasius neoniger* (Hymenoptera: Formicidae): behavioral and ecological aspects of recruitment communication. *Oecologia*, 59, 94–100.

Tsutsui, N. D., & Case, T. J. (2001). Population genetics and colony structure of the Argentine ant (*Linepithema humile*) in its native and introduced ranges. *Evolution*, 55(5), 976–985.

Ulloa-Chacón, P., & Jaramillo, G. I. (2009). Effects of Boric Acid, Fipronil, Hydramethylnon, and Diflubenzuron Baits on Colonies of Ghost Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(3), 856–862.

Unoki, S., Matsumoto, Y., & Mizunami, M. (2005). Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *European Journal of Neuroscience*, 22(6), 1409–1416.

Van Oudenhove, L., Billoir, E., Boulay, R., Bernstein, C., & Cerdá, X. (2011). Temperature limits

trail following behaviour through pheromone decay in ants. *Naturwissenschaften*, 98(12), 1009–1017.

Van Vorhis, S. E., & Baker, T. C. (1982a). Trail-following responses of the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis* (Mayr), to a synthetic trail pheromone component and analogs. *Journal of Chemical Ecology*, 8(1), 3–14.

Van Vorhis, S. E., & Baker, T. C. (1982b). Trail pheromone-conditioned anemotaxis by the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 32(3), 232–237.

Vega, S. Y., & Rust, M. K. (2001). The Argentine ant—A significant invasive species in agricultural, urban and natural environments. *Sociobiology*, 37(1), 3–25.

Vega, S. Y., & Rust, M. K. (2003). Determining the Foraging Range and Origin of Resurgence After Treatment of Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae) in Urban Areas. *J. Econ. Entomol.*, 96(3), 844–849.

Vinson, S. B. (1997). Insect life: invasion of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). In *American Entomologist* (Vol. 43, Issue 1).

Visser, D., Wright, M. G., & Giliomee, J. H. (1996). The effect of the Argentine ant, *Linepithema humile* (Mayr) (Hymenoptera: Formicidae), on flower-visiting insects of *Protea nitida* Mill. (Proteaceae). *African Entomology*, 4(2), 285–287.

Wagner, T., & Czaczkes, T. J. (2023). Corpse-associated odours elicit avoidance in invasive ants. *Pest Management Science*, 80(4), 1859–1867.

Wagner, T., Galante, H., Josens, R., & Czaczkes, T. J. (2023). Systematic examination of learning in the invasive ant *Linepithema humile* reveals fast learning and long-lasting memory. *Animal Behaviour*, 203, 41–52.

Wang, Z., Moshman, L., Kraus, E. C., Wilson, B. E., Acharya, N., & Diaz, R. (2016). A review of the tawny crazy ant, *Nylanderia fulva*, an emergent ant invader in the southern United States: Is biological control a feasible management option? *Insects*, 7(4).

Watson, P. E., Thomas, D. G., Birmingham, E. N., Schreurs, N. M., & Parker, M. E. (2023). Drivers of Palatability for Cats and Dogs—What It Means for Pet Food Development. *Animals*, 13(7), 1–22.

Way, M. J., Cammell, M. E., Paiva, M. R., & Collingwood, C. A. (1997). Distribution and dynamics of the Argentine ant *Linepithema (Iridomyrmex) humile* (Mayr) in relation to vegetation, soil conditions, topography and native competitor ants in Portugal. *Insectes Sociaux*, 44(4), 415–433.

Wen, C., Chen, J., Qin, W. Q., Chen, X., Cai, J. C., Wen, J. B., Wen, X. J., & Wang, C. (2021). Red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae) cover inaccessible surfaces with particles to facilitate food search and transportation. *Insect Science*, 28(6), 1816–1828.

Wetherwax, P. B. (1986). Why do honeybees reject certain flowers? *Oecologia*, 69, 567–570.

Wetterer, J. K., & Porter, S. D. (2003). *The Little Fire Ant, Wasmannia auropunctata: Distribution, Impact and Control*.

Wheeler, W. M. (1910). Ants: their structure, development and behavior. *Columbia University Press*.

Wild, A. L. (2004). Taxonomy and Distribution of the Argentine Ant, *Linepithema humile*

(Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 97(6), 1204–1215.

Wiles, J. A., & Jepson, P. C. (1994). Sub-lethal effects of deltamethrin residues on the within-crop behaviour and distribution of *Coccinella septempunctata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 72(1), 33–45.

Wilson, E. (1971). The insect societies. In *The insect societies*.

Wright, G. (2011). The role of dopamine and serotonin in conditioned food aversion learning in the honeybee. *Communicative & Integrative Biology*, 4(3), 318–320.

Wright, G. A., Mustard, J. A., Simcock, N. K., Ross-Taylor, A. A. R., McNicholas, L. D., Popescu, A., & Marion-Poll, F. (2010). Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Current Biology*, 20(24), 2234–2240.

Wystrach, A., Buehlmann, C., Schwarz, S., Cheng, K., & Graham, P. (2020). Rapid Aversive and Memory Trace Learning during Route Navigation in Desert Ants. *Current Biology*, 30(10), 1927–1933.e2.

Zaluski, R., Kadri, S. M., Alonso, D. P., Martins Ribolla, P. E., & de Oliveira Orsi, R. (2015). Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1062–1069.

Zanola, D., Czaczkes, T. J., & Josens, R. (2024). Ants evade harmful food by active abandonment. *Communications Biology*, 7(1), 1–12.

Ziegler, A., & Vens, M. (2010). Generalized estimating equations. *Methods of information in medicine*, 49(05), 421–425.

ANEXO

Análisis estadístico Capítulo 2

Modelo lineal general para la dinámica temporal en días de los puentes (caminos de recolección)

Detalles del modelo principal para los puentes en días:

Variable respuesta: Actividad (media conteo de hormigas/min)

Tratamientos: Puente de sacarosa y cebo tóxico, S y T respectivamente. 2 niveles

Tiempo (factor): t0 (Actividad basal o Línea de base) – t1 (1 a 3 h) – t2 (18 a 20h) – t3 (25 a 27h) – t4 (42 a 44h) – t5 (49 a 51h) – t6 (67 a 69h). 7 niveles

Puente: Variable aleatoria. 10 niveles

Réplica: n = 5

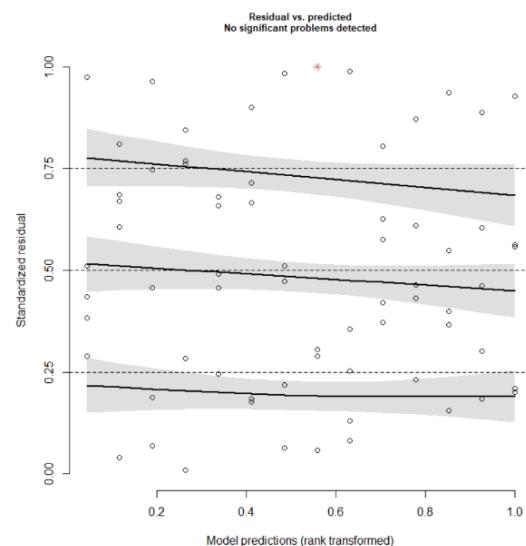


Figura A2.1. Residuos vs predichos para validar modelo_puentes_dias utilizando Dharma.

modelo_puentes_dias

```
modelo_puentes_dias <- glmmTMB (Actividad ~ Tratamientos*Tiempo + (1 | Replica/Puente),  
data = puentes_dias, family = nbinom1(link = "log"))
```

```
summary(modelo_puentes_dias)
```

Family: nbinom1 (log)

Formula: Actividad ~ Tratamientos * Tiempo + (1 | Replica/Puente)

Data: puentes_dias

AIC BIC logLik deviance df.resid

618.6 656.8 -292.3 584.6 53

Random effects:

Conditional model:

Groups Name Variance Std.Dev.

Puente:Replica (Intercept) 0.01361 0.1167

Replica (Intercept) 0.18567 0.4309

Number of obs: 70, groups: Puente:Replica, 10; Replica, 5

Dispersion parameter for nbinom1 family (): 7.75

Conditional model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) 3.82293 0.27101 14.106 < 2e-16 ***

TratamientosS 0.06245 0.26407 0.236 0.813046

Tiempot1 -0.33597 0.27609 -1.217 0.223646

Tiempot2 -1.39978 0.38938 -3.595 0.000324 ***

Tiempot3 -2.23762 0.49539 -4.517 6.28e-06 ***

Tiempot4 -1.13835 0.34564 -3.293 0.000990 ***

Tiempot5 -1.50270 0.40563 -3.705 0.000212 ***

Tiempot6 -1.61995 0.41656 -3.889 0.000101 ***

TratamientosS:Tiempot1 0.56118 0.36274 1.547 0.121849

TratamientosS:Tiempot2 1.87637 0.45001 4.170 3.05e-05 ***

TratamientosS:Tiempot3 2.94392 0.54032 5.448 5.08e-08 ***

TratamientosS:Tiempot4 1.61126 0.41202 3.911 9.20e-05 ***

TratamientosS:Tiempot5 2.17162 0.46103 4.710 2.47e-06 ***

TratamientosS:Tiempot6 1.87533 0.47799 3.923 8.73e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

sum (residuals(modelo_puentes_dias,type ="pearson")^2)/df.residual(modelo_puentes_dias)

[1] 1.202891

Contrastes entre tratamientos T-S

Valores en negrita representan p-valor <0.05

the emmeans1

```
meanie1 <- emmeans(modelo_puentes_dias, pairwise ~ Tratamientos | Tiempo)
print (meanie1)
```

\$contrasts

Tiempo = t0:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

T - S -0.0625 0.264 53 -0.236 0.8140

Tiempo = t1:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

T - S -0.6236 0.273 53 -2.280 0.0266

Tiempo = t2:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

T - S -1.9388 0.379 53 -5.120 <.0001

Tiempo = t3:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

T - S -3.0064 0.482 53 -6.241 <.0001

Tiempo = t4:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

T - S -1.6737 0.335 53 -4.997 <.0001

Tiempo = t5:

contrast estimate SE df t.ratio p.value
T - S -2.2341 0.389 53 -5.736 <.0001

Tiempo = t6:

contrast estimate SE df t.ratio p.value
T - S -1.9378 0.412 53 -4.706 <.0001

Results are given on the log (not the response) scale.

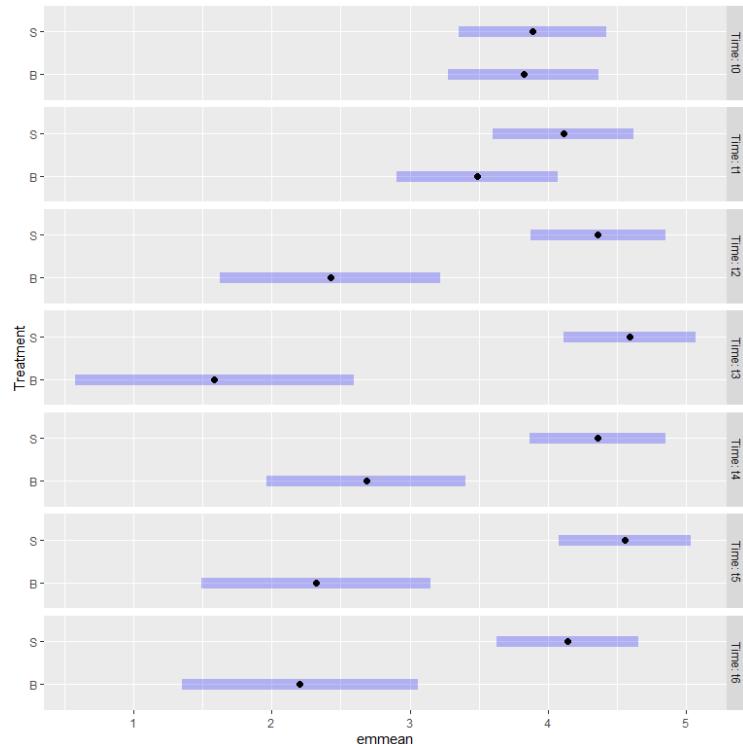


Figura A2.2. Emmeans contrastes entre tratamientos (T-S) en los diferentes tiempos en el modelo_puentes_dias.

Contraste entre t0 y el resto de los tiempos dentro de cada tratamiento

Valores en negrita representan p-valor <0.05

*** the emmeans2***

```
meanie2 <- emmeans(modelo_puentes_dias, pairwise ~ Tiempo | Tratamientos)
meanie.contrasts <- contrast(meanie, method = "trt.vs.ctrl", reverse = "true")
print (meanie.contrasts)
$emmeans
```

Tratamientos = T:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
t0 - t1	0.336	0.276	53	1.217	0.6475	NS
t0 - t2	1.400	0.389	53	3.595	0.0039	**
t0 - t3	2.238	0.495	53	4.517	0.0002	***
t0 - t4	1.138	0.346	53	3.293	0.0095	**
t0 - t5	1.503	0.406	53	3.705	0.0028	**
t0 - t6	1.620	0.417	53	3.889	0.0016	**

Tratamientos = S:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
t0 - t1	-0.225	0.235	53	-0.957	0.7986	NS
t0 - t2	-0.477	0.225	53	-2.114	0.1706	NS
t0 - t3	-0.706	0.218	53	-3.243	0.0110	*
t0 - t4	-0.473	0.227	53	-2.082	0.1817	NS
t0 - t5	-0.669	0.219	53	-3.052	0.0186	*
t0 - t6	-0.255	0.237	53	-1.076	0.7329	NS

Results are given on the log (not the response) scale.

P value adjustment: dunnett method for 6 tests

```
tapply(Actividad _b$Actividad, Actividad _t$Tiempo, FUN = mean)  
t0 t1 t2 t3 t4 t5 t6  
50.6 34.8 12.4 6.0 13.4 12.6 9.8
```

```
tapply(Actividad _s$ Actividad, Actividad _s$Tiempo, FUN = mean)  
t0 t1 t2 t3 t4 t5 t6  
63.2 71.2 85.6 108.6 86.0 104.0 70.0
```

% Cambio de actividad respecto a la inicial (t0)

Tratamientos = T:

t1 = 31.23 % más baja que la inicial **NS**

t2= 75.5 % más baja que la inicial ******

t3= 88.14% más baja que la inicial *******

t4= 73.52% más baja que la inicial ******

t5=75.1% más baja que la inicial ******

t6= 80.63% más baja que la inicial ******

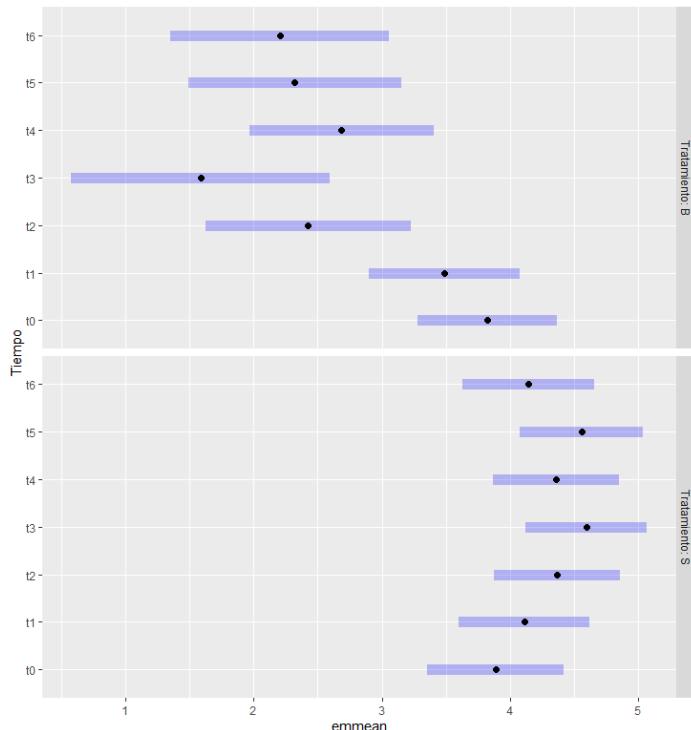


Figura A2.3. Emmeans contraste de los tiempos dentro de cada tratamiento (T-S) en modelo_puentes_dias.

Modelo t1 desglosado para los puentes:

Detalles del Modelo solo t1 para puentes:

Variable respuesta: Actividad (conteo medio de hormigas/min)

Tratamiento: Puente Sacarosa y Cebo Tóxico. 2 niveles

Tiempo (factor): 15h (Línea Base) – 16h – 17h – 18h. 4 niveles

Puentes: Variable aleatoria. 10 niveles

Réplica: n = 5

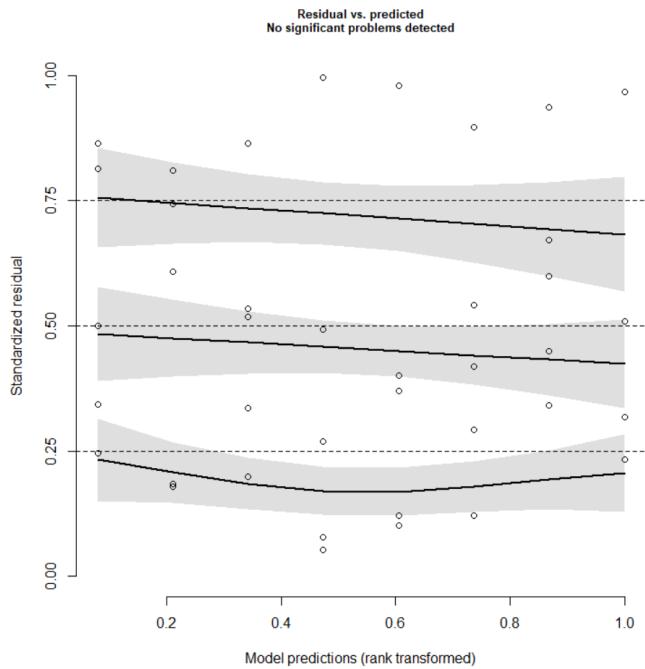


Figura A2.4. Residuos vs predichos para validar modelo_t1 usando el Dharma.

```
modelo_t1 = glmmTMB(Actividad ~ Tratamiento * Tiempo + (1|Replica/Puente), data = datos_t1, family = nbinom1(link = "log"))
```

```
summary(modelo_t1)
```

Family: nbinom1 (log)

Formula: Actividad ~ Tratamiento * Tiempo + (1 | Replica/Puente)

Data: datos_t1

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
370.3	388.9	-174.2	348.3	29

Random effects:

Conditional model:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
Puente:Replica	(Intercept)	0.08136	0.2852
Replica	(Intercept)	0.46719	0.6835

Number of obs: 40, groups: Puente:Replica, 10; Replica, 5

Dispersion parameter for nbinom1 family (): 4.59

Conditional model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) 3.74981 0.36429 10.293 <2e-16 ***

TratamientoS -0.01738 0.27318 -0.064 0.9493

Hora16h -0.22076 0.21669 -1.019 0.3083

Hora17h -0.35629 0.22558 -1.579 0.1142

Hora18h -0.60896 0.25006 -2.435 0.0149 *

TratamientoS:Hora16h 0.16915 0.28651 0.590 0.5549

TratamientoS:Hora17h 0.60056 0.28528 2.105 0.0353 *

TratamientoS:Hora18h 0.69984 0.31000 2.258 0.0240 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

sum(residuals(modelo_t1,type ="pearson")^2)/df.residual(modelo_t1)

[1] 1.089469

```
meanie <- emmeans(modelo_t1, pairwise ~ Tiempo | Tratamiento)
meanie.contrasts <- contrast(meanie, method = "trt.vs.ctrl", reverse = "true")
print (meanie.contrasts)
```

\$emmeans

Tratamiento = T:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
15h - 16h	0.2208	0.217	29	1.019	0.6078
					NS
15h - 17h	0.3563	0.226	29	1.579	0.2904
					NS
15h - 18h	0.6090	0.250	29	2.435	0.0567
					(*)

% Cambio actividad con respecto a la inicial

18h= 39.92% menor que la inicial (15h)

Tratamiento = S:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value	
15h - 16h	0.0516	0.187	29	0.276	0.9694		NS
15h - 17h	-0.2443	0.175	29	-1.399	0.3806		NS
15h - 18h	-0.0909	0.183	29	-0.498	0.8974		NS

Results are given on the log (not the response) scale.

P value adjustment: dunnett method for 3 tests

```
meanie2 <- emmeans(modelo_t1, pairwise ~ Tratamiento | Tiempo)
print(meanie2)
```

\$contrasts

Hora = 15h:

	contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
T - S	0.0174	0.273	Inf	0.064	0.9493	

Hora = 16h:

	contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
T - S	-0.1518	0.283	Inf	-0.536	0.5919	

Hora = 17h:

	contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
T - S	-0.5832	0.284	Inf	-2.052	0.0402	

Hora = 18h:

	contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
T - S	-0.6825	0.315	Inf	-2.165	0.0304	

Results are given on the log (not the response) scale.

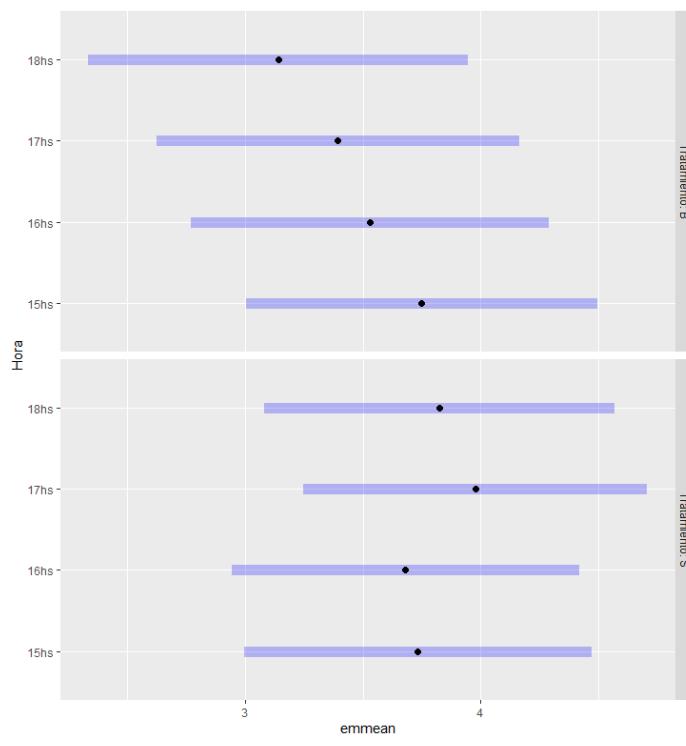


Figura A2.5. Emmeans contrastes de los tiempos dentro de cada tratamiento (T-S) en modelo_t1.

Modelo de la dinámica temporal del sendero troncal en días.

Detalles del Modelo de sendero troncal en días

Variable respuesta: Actividad (conteo medio de hormigas/min)

Tiempo: t0 (Actividad basal) – t1 (1 a 3 h) – t2 (18 a 20h) – t3 (25 a 27h) – t4 (42 a 44h) – t5 (49 a 51h) – t6 (67 a 69h). 7 niveles

Sitios: 0 mT – 2 m – 4 m – 0 mS (4 niveles) (2 m es el promedio de derecha e izquierda; lo mismo para 4 m)

Réplica: n=5

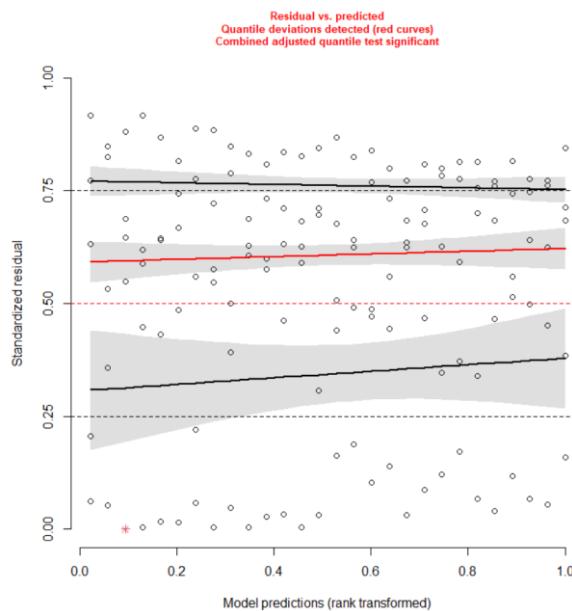


Figura A2.6. Residuos vs predichos para validar modelo_troncal_dias utilizando el Dharma.

*** modelo_troncal_dias ***

```
modelo_troncal_dias <- glmmTMB(Actividad ~ Sitios * Tiempo + (1 | Replica), data = troncal_dias,
family = nbinom1(link = "log"))
```

```
summary(modelo_troncal_dias)
```

Family: nbinom1 (log)

Formula: Actividad ~ Sitios * Tiempo + (1 | Replica)

Data: troncal_dias

AIC BIC logLik deviance df.resid

1609.9 1698.2 -775.0 1549.9 110

Random effects:

Conditional model:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
--------	------	----------	----------

Replica	(Intercept)	0.5773	0.7598
---------	-------------	--------	--------

Number of obs: 140, groups: Replica, 5

Dispersion parameter for nbinom1 family (): 12.9

Conditional model:

Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
----------	------------	---------	----------

(Intercept)	5.632433	0.351717	16.014	< 2e-16 ***
Sitios0mS	0.042384	0.124755	0.340	0.734054
Sitios2m	0.028536	0.125158	0.228	0.819644
Sitios4m	0.073388	0.123868	0.592	0.553533
Tiempo1	-0.058409	0.127885	-0.457	0.647865
Tiempo2	-0.117798	0.129857	-0.907	0.364336
Tiempo3	-0.367892	0.139431	-2.639	0.008327 **
Tiempo4	-0.344843	0.138306	-2.493	0.012655 *
Tiempo5	-0.362418	0.138867	-2.610	0.009059 **
Tiempo6	-0.565555	0.147602	-3.832	0.000127 ***
Sitios0mS:Tiempo1	-0.049448	0.180159	-0.274	0.783722
Sitios2m:Tiempo1	-0.085515	0.181549	-0.471	0.637619
Sitios4m:Tiempo1	-0.051257	0.178818	-0.287	0.774388
Sitios0mS:Tiempo2	0.245364	0.176641	1.389	0.164816
Sitios2m:Tiempo2	-0.092141	0.184534	-0.499	0.617558
Sitios4m:Tiempo2	-0.000672	0.180412	-0.004	0.997028
Sitios0mS:Tiempo3	0.447404	0.184699	2.422	0.015421 *
Sitios2m:Tiempo3	0.026380	0.194777	0.135	0.892268
Sitios4m:Tiempo3	0.158987	0.189374	0.840	0.401168
Sitios0mS:Tiempo4	0.374340	0.184781	2.026	0.042779 *
Sitios2m:Tiempo4	0.019250	0.193498	0.099	0.920755
Sitios4m:Tiempo4	0.083606	0.189856	0.440	0.659672
Sitios0mS:Tiempo5	0.397595	0.185121	2.148	0.031733 *
Sitios2m:Tiempo5	-0.068881	0.197029	-0.350	0.726639
Sitios4m:Tiempo5	0.001094	0.193072	0.006	0.995481
Sitios0mS:Tiempo6	0.422866	0.195386	2.164	0.030445 *
Sitios2m:Tiempo6	-0.003626	0.207251	-0.017	0.986042
Sitios4m:Tiempo6	0.139391	0.201003	0.693	0.488011

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> sum(residuals(modelo_troncal_dias,type ="pearson")^2)/df.residual(modelo_troncal_dias)
[1] 0.9524291
```

emmeans

```
meanie <- emmeans(modelo_troncal_dias, pairwise ~ Tiempo | Sitios)
```

```
meanie.contrasts <- contrast(meanie, method = "trt.vs.ctrl", reverse = "true")
print (meanie.contrasts)
$emmeans
```

Sitios = 0mT:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value	
0 - 1		0.0584	0.128	110	0.457	0.9732	
0 - 2		0.1178	0.130	110	0.907	0.8234	
0 - 3	0.3679 0.139 110 2.639 0.0479						*
0 - 4		0.3448	0.138	110	2.493	0.0691	(*)
0 - 5		0.3624	0.139	110	2.610	0.0516	(*)
0 - 6	0.5656 0.148 110 3.832 0.0012						**

Sitios = 2m:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value	
0 - 1		0.1439	0.129	110	1.116	0.7076	
0 - 2		0.2099	0.131	110	1.600	0.4040	
0 - 3		0.3415	0.136	110	2.503	0.0674	(*)
0 - 4		0.3256	0.136	110	2.402	0.0861	(*)
0 - 5	0.4313 0.140 110 3.081 0.0140						*
0 - 6	0.5692 0.146 110 3.906 0.0009						***

Sitios = 4m:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value	
0 - 1		0.1097	0.125	110	0.877	0.8381	
0 - 2		0.1185	0.125	110	0.945	0.8041	
0 - 3		0.2089	0.128	110	1.626	0.3890	
0 - 4		0.2612	0.130	110	2.005	0.2024	
0 - 5	0.3613 0.134 110 2.688 0.0421						*
0 - 6	0.4262 0.137 110 3.118 0.0125						*

Results are given on the log (not the response) scale.

P value adjustment: dunnett method for 6 tests

```
tapply(t0$Actividad, t0$Tiempo, FUN = mean)
  0   1   2   3   4   5   6
344.2 321.2 302.2 242.8 247.8 236.2 197.0
```

```
tapply(m2$Actividad, m2$Tiempo, FUN = mean)
  0   1   2   3   4   5   6
353.2 304.20 280.80 255.00 254.60 231.2 201.6
```

```
tapply(m4$Actividad, m4$Tieme, FUN = mean)
  0   1   2   3   4   5   6
371.6 334.8 327.4 300.8 284.0 267.2 245.0
```

```
tapply(s0$Actividad, s0$Tiempo, FUN = mean)
  0   1   2   3   4   5   6
355.4 324.4 405.6 385.4 365.2 368.0 308.2
```

% Cambio actividad con respecto a la inicial

Sitio = 0mT:

t3 = 29.45 % menor que la inicial

t4 = 28 % menor que la inicial

t5= 31.38% menor que la inicial

t6= 42.77% menor que la inicial

Sitio = 2m:

t5= 34.54% menor que la inicial

t6= 42.92% menor que la inicial

Sitio = 4m:

$t5 = 28.1\%$ menor que la inicial

$t6 = 34.07\%$ menor que la inicial

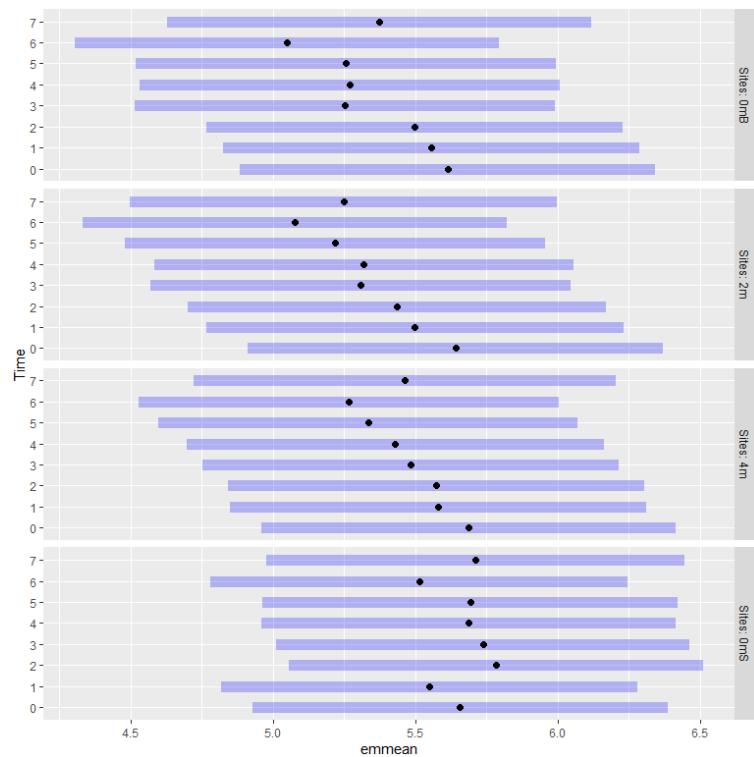


Figura A2.7. Emmeans contrastes de los tiempos dentro de cada sitio en modelo_troncal_dias.

Análisis estadístico Capítulo 3

Modelo la dinámica temporal del GLM en horas en los puentes (caminos de recolección)

Este experimento consistió en 6 réplicas. Sin embargo, en una de las réplicas, la temperatura superó los 40 grados ($^{\circ}\text{C}$) en una sola grabación a las 2 p.m. Como resultado, no hubo hormigas en los puentes durante ese momento específico. Sin embargo, la temperatura bajó unos grados en la siguiente grabación y la actividad se reanudó en los niveles anteriores. Por lo tanto, los datos de ambos puentes para esa réplica en particular y solo durante ese momento se excluyeron del análisis.

Detalles del modelo de los puentes en horas

Variable respuesta: Actividad (recuento medio de hormigas/min)

Tratamiento: Puente Sacarosa (S) y Cebo tóxico (T). 2 niveles

Tiempo (factor): horas desde el acceso al cebo tóxico (de 0 a 8 h). Siendo el t0 la línea de base. 9 niveles.

Puente: Variable aleatoria. 12 niveles

Réplica: n: 6

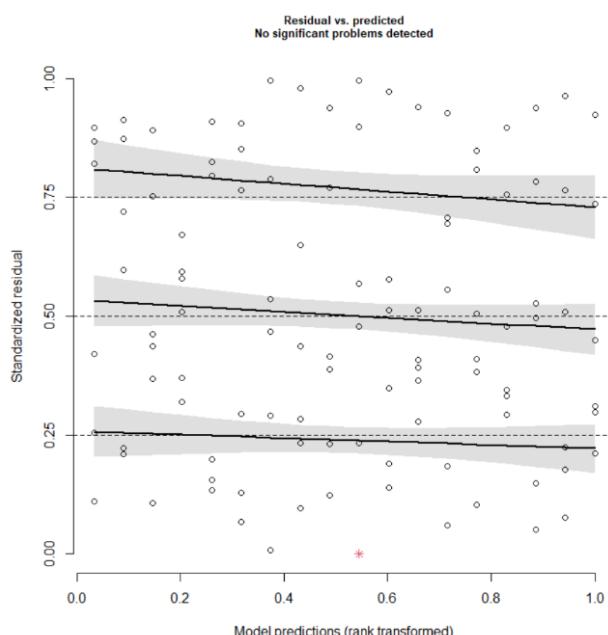


Figura A3.1. Residuos vs predichos para validar modelo_puentes_horas utilizando el Dharmo.

```
*** modelo_puentes_horas ***

modelo_puentes_horas = glmmTMB(Actividad ~ Tratamiento * Tiempo + (1|Replica/Puente),
data = puentes_hora_n106, family= nbinom1(link = "log"))

summary(modelo_puentes_horas)
```

Family: nbinom1 (log)
 Formula: Actividad ~ Tratamiento * Hora + (1 | Replica/Puente)
 Data: puentes_hora_n106

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
1102.1	1158.0	-530.0	1060.1	85

Random effects:

Conditional model:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
Puente:Replica	(Intercept)	0.005712	0.07558
Replica	(Intercept)	0.127580	0.35718

Number of obs: 106, groups: Puente:Replica, 12; Replica, 6

Dispersion parameter for nbinom1 family (): 9.57

Conditional model:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	4.977714	0.183201	27.171	< 2e-16 ***
TratamientoS	-0.222048	0.163665	-1.357	0.17487
Tiempo1	0.001843	0.148797	0.012	0.99012
Tiempo2	-0.239754	0.161833	-1.481	0.13848
Tiempo3	-0.572526	0.176261	-3.248	0.00116 **
Tiempo4	-0.866269	0.192619	-4.497	6.88e-06 ***
Tiempo5	-1.161169	0.223986	-5.184	2.17e-07 ***
Tiempo6	-1.553865	0.243284	-6.387	1.69e-10 ***
Tiempo7	-1.748203	0.264167	-6.618	3.65e-11 ***
Tiempo8	-1.795306	0.268854	-6.678	2.43e-11 ***
TratamientoS:Tiempo1	0.151935	0.217813	0.698	0.48546

```

TratamientoS:Tiempo2 0.627543 0.221504 2.833 0.00461 **
TratamientoS:Tiempo3 1.033080 0.230961 4.473 7.71e-06 ***
TratamientoS:Tiempo4 1.325415 0.243715 5.438 5.38e-08 ***
TratamientoS:Tiempo5 1.632856 0.271808 6.007 1.89e-09 ***
TratamientoS:Tiempo6 1.999392 0.285662 6.999 2.58e-12 ***
TratamientoS:Tiempo7 2.194687 0.303744 7.225 4.99e-13 ***
TratamientoS:Tiempo8 2.339225 0.306555 7.631 2.34e-14 ***

---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

sum(residuals(modelo_puentes_horas,type="pearson")^2)/df.residual(modelo_puentes_hora)
[1] 1.104901

```

Contraste actividad inicial (9h) vs cada tiempo por tratamiento

```

***the emmeans1***

meanie1 <- emmeans(modelo_puentes_horas, pairwise ~ Hora | Tratamiento)
meanie.contrasts <- contrast(meanie, method = "trt.vs.ctrl", reverse = "true")
print (meanie.contrasts)

$emmeans

Values in bold represent p-values<0.05

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '(' 0.1 'NS' 1

```

Tratamiento = T:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value	
Tiempo0 – Tiempo1	-0.00549	0.171	87	-0.032	1.0000	NS
Tiempo0 – Tiempo2	0.24885	0.186	87	1.336	0.6387	NS
Tiempo0 – Tiempo3	0.56532	0.202	87	2.805	0.0407	*
Tiempo0 – Tiempo4	0.84763	0.219	87	3.874	0.0016	**
Tiempo0 – Tiempo5	1.14249	0.239	87	4.773	0.0001	***
Tiempo0 – Tiempo6	1.51002	0.271	87	5.569	<.0001	***
Tiempo0 – Tiempo7	1.69333	0.291	87	5.816	<.0001	***

Tiempo0 – Tiempo8 1.73327 0.295 87 5.877 **<.0001** ***

Tratamiento = S:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

Tiempo0 – Tiempo1	-0.14876	0.183	87	-0.814	0.9071	NS
Tiempo0 – Tiempo2	-0.37470	0.174	87	-2.149	0.1876	NS
Tiempo0 – Tiempo3	-0.44835	0.172	87	-2.608	0.0672	NS
Tiempo0 – Tiempo4	-0.45421	0.172	87	-2.646	0.0612	(*)
Tiempo0 – Tiempo5	-0.16024	0.185	87	-0.865	0.8885	NS
Tiempo0 – Tiempo6	-0.43560	0.173	87	-2.524	0.0824	(*)
Tiempo0 – Tiempo7	-0.43806	0.172	87	-2.540	0.0794	(*)
Tiempo0 – Tiempo8	-0.53470	0.169	87	-3.159	0.0151	*

Results are given on the log (not the response) scale.

P value adjustment: dunnett method for 8 tests

% Cambio de Actividad respecto a la inicial (Tiempo 0)

tapply(Actividad_tóxico\$Actividad, Actividad_tóxico\$Tiempo, FUN = mean)

Tiempo0	Tiempo1	Tiempo2	Tiempo3	Tiempo4	Tiempo5	Tiempo6	Tiempo7	Tiempo8
157.5	153.2	132.3	89.7	66.3	47.4	33.7	31.8	31.8

tapply(Actividad_sacarosa\$Actividad, Actividad_sacarosa\$Tiempo, FUN = mean)

Tiempo0	Tiempo1	Tiempo2	Tiempo3	Tiempo4	Tiempo5	Tiempo6	Tiempo7	Tiempo8
124.8	142.0	183.3	195.7	196.0	203.4	192.5	192.3	212.2

Puente Cebo Tóxico

Tiempo1= 2.76 % menor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo2= 15.98% menor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo3= 43.07% menor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo4= 57.89% menor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo5= 69.9% menor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo6= 78.63% menor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo7= 79.8% menor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo8= 79.8% menor que la inicial (Tiempo0)

Puente Sacarosa

Tiempo1 = 13.78 % mayor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo2 = 43.87 % mayor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo3 = 56.81 % mayor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo4 = 57.05 % mayor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo5 = 62.98 % mayor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo6 = 54.24% mayor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo7 = 54.08% mayor que la inicial (Tiempo0)

Tiempo8 = 70.03% mayor que la inicial (Tiempo0)

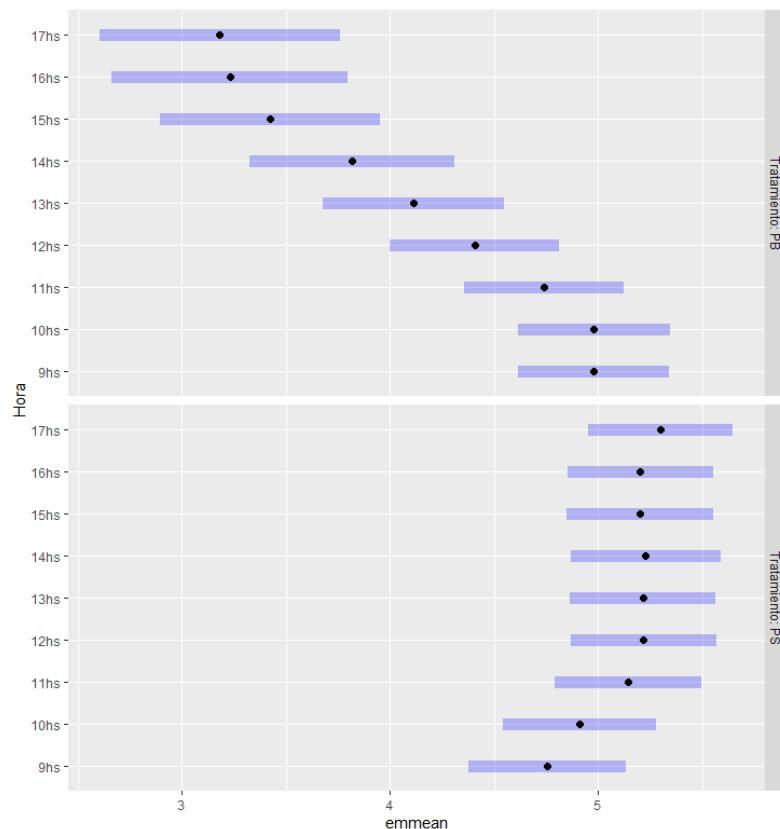


Figura A3.2. Emmeans de los contrastes en los tiempos (0 al 8 representados de 9 a 17h) dentro de cada Tratamiento (PB-PS) en modelo_puentes_horas.

Modelo sendero troncal a lo largo del día, dinámica temporal en horas

Detalles del Modelo para sendero troncal en horas

Variable respuesta: Actividad (conteo medio de hormigas/min)

Sitio: 0mS (0 metros del puente sacarosa) – 0mT (0 metros del puente cebo tóxico). 2 niveles

Tiempo (horas): horas desde el acceso al cebo tóxico (de 0h, 4h y 8h). Siendo a las 0h línea de base. 3 niveles

Réplica: n=6

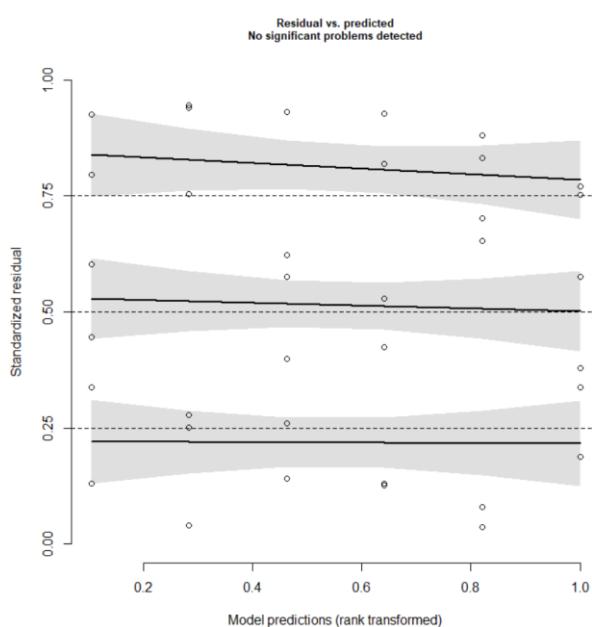


Figura A3.3. Residuos versus predichos para validar modelo_troncal_horas usando el Dharma.

*** modelo_troncal_horas***

```
modelo_troncal_horas <- glmmTMB(Actividad ~ Sitio*Tiempo + (1|Replica), dispformula = ~ Horas, family = nbinom1(link = "log"), data = troncal_horas)
```

```
summary(modelo_troncal_horas)
```

Family: nbinom1 (log)

Formula: Actividad ~ Sitios * Tiempo + (1 | Replica)

Dispersion: ~ Tiempo

Data: troncal_horas

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
485.4	501.2	-232.7	465.4	26

Random effects:

Conditional model:

Groups Name Variance Std.Dev.

Replica (Intercept) 0.2497 0.4997

Number of obs: 36, groups: Replica, 6

Conditional model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) 6.0469 0.2174 27.821 < 2e-16 ***

Sitios0mS -0.1140 0.1022 -1.115 0.264755

Tiempo4 -0.7480 0.2044 -3.659 0.000253 ***

Tiempo8 -0.5870 0.3356 -1.749 0.080323 .

Sitios0mS:Tiempo4 0.6969 0.2575 2.707 0.006790 **

Sitios0mS:Tiempo8 0.7897 0.3955 1.997 0.045853 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

Dispersion model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) 2.5723 0.6874 3.742 0.000183 ***

Tiempo4 1.3592 0.8419 1.614 0.106428

Tiempo8 2.7417 0.8214 3.338 0.000844 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

```
meanie <- emmeans(modelo_troncal_horas, pairwise ~ Tiempo | Sitio)
meanie.contrasts <- contrast(meanie, method = "trt.vs.ctrl", reverse = "true")
print (meanie.contrasts)
```

\$emmeans

Sitio = 0mT:

```
contrast estimate SE df t.ratio p.value
Tiempo0 – Tiempo4 0.7480 0.204 26 3.659 0.0022 **
Tiempo0 – Tiempo8 0.5870 0.336 26 1.749 0.1657
```

Sitio = 0mS:

```
contrast estimate SE df t.ratio p.value
Tiempo0 – Tiempo4 0.0511 0.163 26 0.314 0.9183
Tiempo0 – Tiempo8 -0.2028 0.256 26 -0.792 0.6458
```

Results are given on the log (not the response) scale.

P value adjustment: dunnettx method for 2 tests

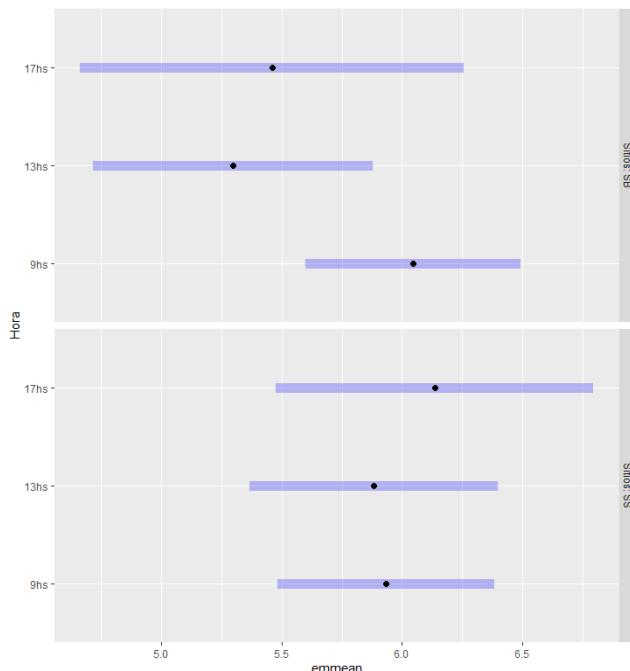


Figura A3.4. Emmeans de los contrastes en los tiempos (en horas: 9h, 13h y 17h) dentro de cada sitio (0mT-0mS) en el modelo_troncal_horas.

Detalles modelo ingestión de soluciones:

Variable respuesta: Gramos consumidos.

Tratamiento: Alimentadores de Sacarosa (S) y Cebo tóxico (T). 2 niveles

Replica: n = 4

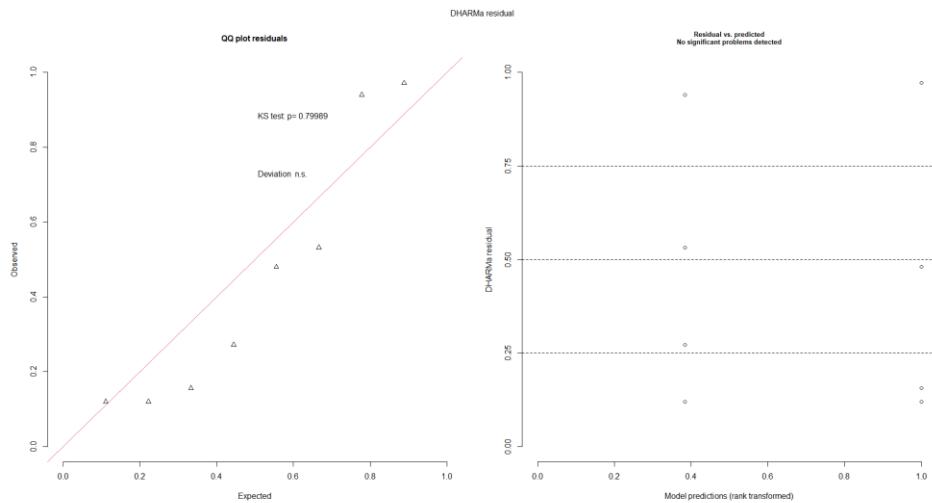


Figura A3.5. QQ plot y residuos vs predichos para validar modelo ingestión

Family: gaussian (identity)

Formula: Gramos_consumidos ~ Tratamiento + (1 | Replica)

Dispersion: ~Tratamiento

Data: ingestion_total

```
AIC  BIC  logLik deviance df.resid
 63.2  63.6  -26.6   53.2     3
```

Random effects:

Conditional model:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
--------	------	----------	----------

Replica	(Intercept)	10.45	3.233
---------	-------------	-------	-------

Residual	NA	NA	
----------	----	----	--

Number of obs: 8, groups: Replica, 4

Conditional model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) 44.108 7.188 6.137 8.43e-10 ***

TratamientoT -19.505 7.003 -2.785 0.00535 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

Dispersion model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) 2.6395 0.3536 7.466 8.28e-14 ***

TratamientoT -11.2764 9615.8989 -0.001 0.999

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

```
tapply (ingestion_total$Gramos_consumidos,ingestion_total$Tratamiento, mean)
      T      S
24.6025 44.1075
```

Análisis estadístico Capítulo 4

Detalles del modelo antes y después cambio de puentes:

Modelo 1: Actividad de las hormigas antes y después del cambio de puentes

Variable respuesta: Actividad (cantidad de hormigas/min)

Momento: Antes (A) y Despues (D) del cambio de puentes. 2 niveles

Tratamiento: (Mem+ y Marca+), (Mem+ y No marca), (Mem+ y Marca-), (No mem y Marca+), (Mem- y Marca+). 5 niveles

Replica: n=6

Puentes: 18 niveles

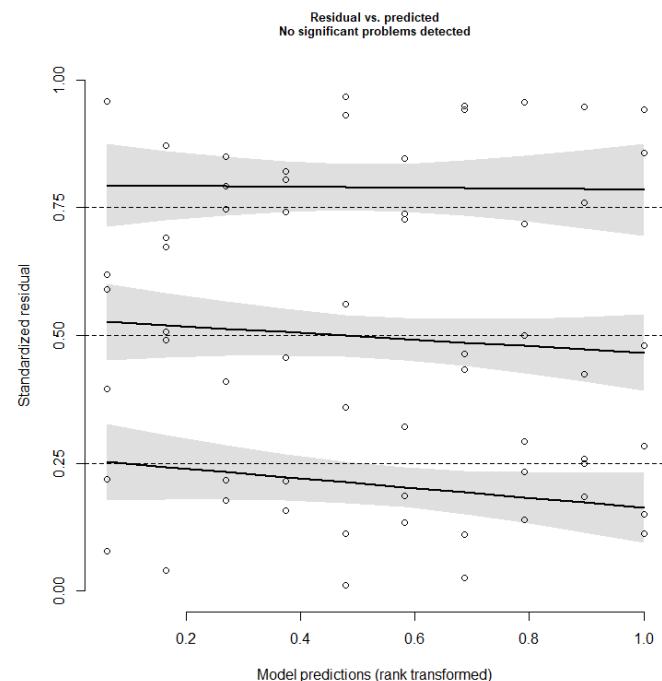


Figura A4.1. Residuos vs Predichos para validar el cambio de puentes del modelo 1 usando el Dharma.

modelo1

```
modelo1=glmmTMB(Actividad ~ Tratamiento*Momento + (1|Replica/Puente), dispformula=~Tratamiento, family=nbinom1(link="log"), data=cambio_puente)
```

```
> summary(modelo_varianza)
```

Family: nbinom1 (log)

Formula: Actividad ~ Tratamiento * Momento + (1 | Replica/Puente)

Dispersion: ~Sitio

Data: cambio_puente

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
589.8	625.4	-277.9	555.8	43

Random effects:

Conditional model:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
Puente:Replica	(Intercept)	6.856e-10	2.618e-05
Replica	(Intercept)	8.033e-02	2.834e-01

Number of obs: 60, groups: Puente:Replica, 18; Replica, 6

Conditional model:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)		
(Intercept)	3.39187	0.33383	10.160	< 2e-16 ***		
NoMem>Marca+	-2.36674	0.71562	-3.307	0.000942 ***		
Mem+>Marca-	1.94537	0.33019	5.892	3.82e-09 ***		
Mem+>NoMarca	1.75998	0.35745	4.924	8.49e-07 ***		
Mem+>Marca+	1.94515	0.31470	6.181	6.37e-10 ***		
MomentoD	-0.24897	0.42693	-0.583	0.559784		
NoMem>Marca+:MomentoD	2.34268	0.78215	2.995	0.002743 **		
Mem+>Marca-:MomentoD	0.09514	0.45358	0.210	0.833859		
Mem+>NoMarca:MomentoD	-0.49078	0.51619	-0.951	0.341719		
Mem+>Marca+:MomentoD	0.27554	0.42929	0.642	0.520969		

Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Dispersion model:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2.9890	0.4734	6.314	2.72e-10 ***

```

NoMemoria>Marca+ -0.6179  0.7532 -0.820  0.4120
Memoria+>Marca- -0.3841  0.6703 -0.573  0.5666
Memoria+>NoMarca  0.4921  0.6472  0.760  0.4471
Memoria+>Marca+ -4.0975  2.3213 -1.765  0.0775 .

```

Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

```

tapply(cambio_anteriores$Actividad , cambio_anteriores$Tratamiento, FUN = mean)

  Mem->Marca+      NoMem>Marca+      Mem+>Marca-      Mem+>NoMarca      Mem+>Marca+

```

30.83	3.16	212.83	172.66	216.83
-------	------	--------	--------	--------

```

tapply(cambio_despues$Actividad ,cambio_despues$Tratamientos,mean)

  Mem->Marca+      NoMem>Marca+      Mem+>Marca-      Mem+>NoMarca      Mem+>Marca+

```

24.33	23.33	190.0	93.5	222.66
-------	-------	-------	------	--------

Contraste entre Momentos (A-D) dentro de cada tratamiento

Valores en negrita representan p-valor<0.05.

Signif. codigo: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

emmeans1

```

meanie1 <- emmeans(modelo1, pairwise ~ Momento | Tratamiento)
print (meanie)
$contrasts

```

Tratamiento = Mem->Marca+:

```

contrast estimate  SE df t.ratio p.value
A - D    0.2466 0.4192 43  0.588  0.5594

```

21,08% menor que la actividad después cambio puentes

Tratamiento = NoMem>Marca+:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

A - D -2.0929 0.6544 43 -3.198 **0.0026 ****

670% mayor que la actividad después cambio puentes

Tratamiento = Mem+>Marca-:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

A - D 0.1444 0.1421 43 1.016 0.3151

10.72% menor que la actividad después cambio puentes

Tratamiento = Memoria+>NoMarca:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

A - D 0.7337 0.2903 43 2.528 0.0152 *

45,85% menor que la actividad después cambio puentes

Tratamiento = Memoria+>Marca+:

contrast estimate SE df t.ratio p.value

A - D -0.0266 0.0445 43 -0.596 0.5541

2,69% mayor que la actividad después cambio puentes

Results are given on the log (not the response) scale.

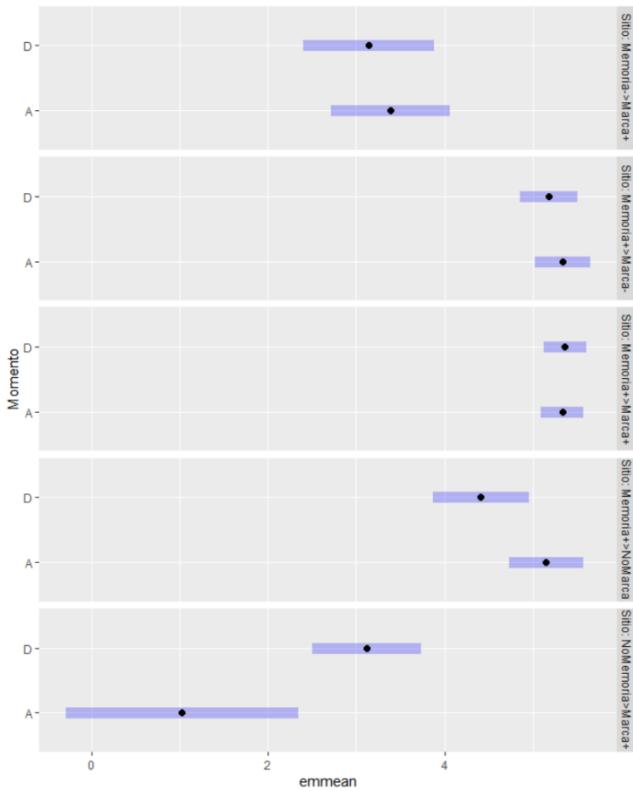


Figura A4.2. Emmean contraste de los momentos (A-D) dentro de cada tratamiento en el modelo 1.

Contraste entre tratamientos dentro de cada Momento (A-D)

Valores en negrita representan p-valor<0.05

Signif. codigo: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘’ 1

emmeans2

```
meanie2 <- emmeans(modelo1, pairwise ~ Tratamiento | Momento)
```

```
print (meanie2)
```

```
$contrasts
```

Momento = A:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
(Mem->Marca+) - (Mem+>Marca-)	-1.945367	0.330	43	-5.892	<.0001
(Mem->Marca+) - (Mem+>Marca+)	-1.945150	0.315	43	-6.181	<.0001
(Mem->Marca+) - (Mem+>NoMarca)	-1.759984	0.357	43	-4.924	0.0001
(Mem->Marca+) - (NoMem>Marca+)	2.366743	0.716	43	3.307	0.0155
(Mem+>Marca-) - (Mem+>Marca+)	0.000217	0.110	43	0.002	1.0000

(Mem+>Marca-) - (Mem+>NoMarca) 0.185383 0.202 43 0.918 0.8883
 (Mem+>Marca-) - (NoMem>Marca+) 4.312110 0.652 43 6.613 <.0001
 (Mem+>Marca+) - (Mem+>NoMarca) 0.185166 0.175 43 1.055 0.8280
 (Mem+>Marca+) - (NoMem>Marca+) 4.311893 0.644 43 6.692 <.0001
 (Mem+>NoMarca) - (NoMem>Marca+) 4.126727 0.666 43 6.194 <.0001

Momento = D:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
(Mem->Marca+) - (Mem+>Marca-)	-2.040508	0.365	43	-5.587	<.0001
(Mem->Marca+) - (Mem+>Marca+)	-2.220688	0.349	43	-6.369	<.0001
(Mem->Marca+) - (Mem+>NoMarca)	-1.269201	0.424	43	-2.990	0.0352
(Mem->Marca+) - (NoMem>Marca+)	0.024063	0.447	43	0.054	1.0000
(Mem+>Marca-) - (Mem+>Marca+)	-0.180180	0.118	43	-1.533	0.5473
(Mem+>Marca-) - (Me+>NoMarca)	0.771307	0.269	43	2.868	0.0476
(Mem+>Marca-) - (NoMem>Marca+)	2.064571	0.303	43	6.820	<.0001
(Mem+>Marca+) - (Mem+>NoMarca)	0.951487	0.246	43	3.866	0.0032
(Mem+>Marca+) - (NoMem>Marca+)	2.244751	0.283	43	7.946	<.0001
(Mem+>NoMarca) - (NoMem>Marca+)	1.293264	0.372	43	3.476	0.0098

Results are given on the log (not the response) scale.

P value adjustment: dunnettx method for comparing a family of 5 estimates

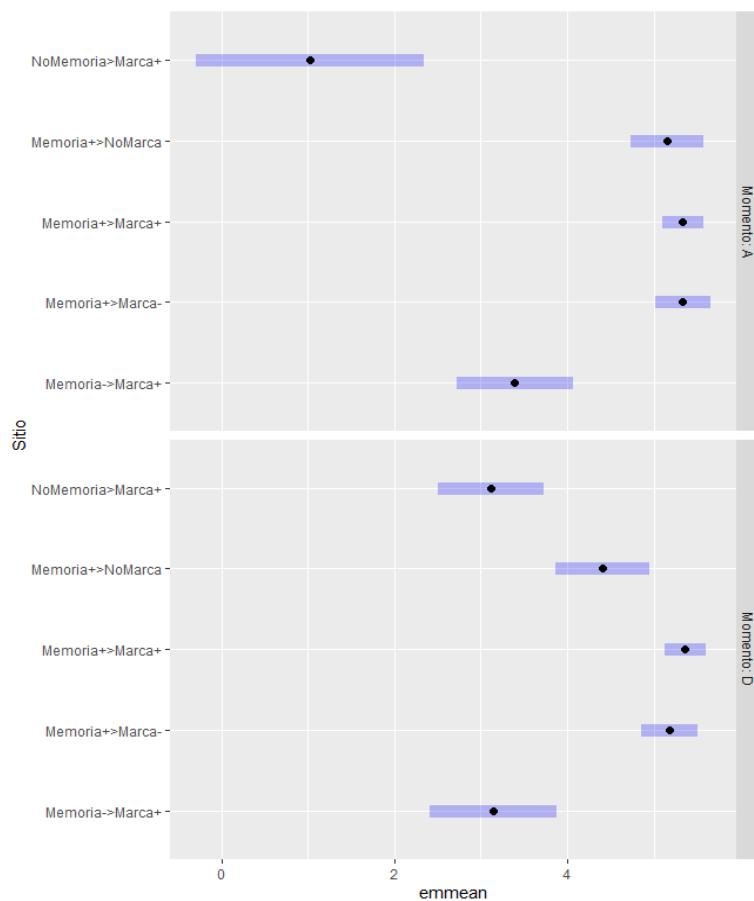


Figura A4.3. Emmean contraste entre los tratamientos dentro de cada momento (A-D) en el modelo 1.

Detalles del Modelo después cambio de puentes estandarizado:

Cambio Actividad Estandarizada = (Actividad Despues del Cambio puentes) / (Actividad Antes del Cambio puentes)

Modelo 2: Actividad estandarizada después del cambio puentes

Variable respuesta: Cambio Actividad

Tratamiento: (Mem+ y Marca+), (Mem+ y No marca), (Mem+ y Marca-), (No mem y Marca+), (Mem- y Marca+). 5 niveles

Replica: n=6

```
simul_res <- simulateResiduals(modelo_gamma)
plot(simul_res)
```

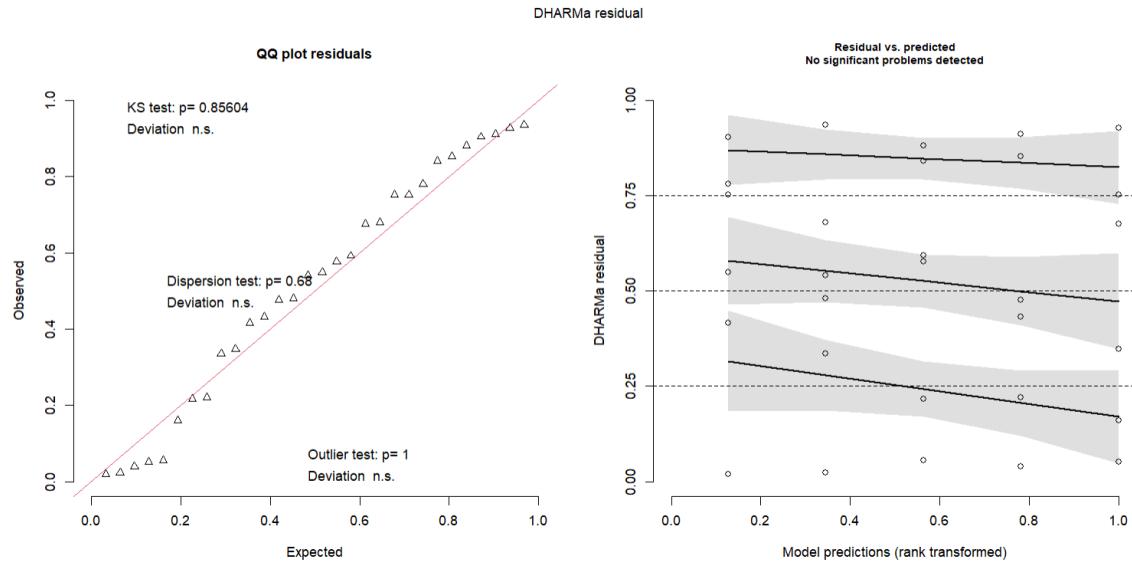


Figura A4.4. QQ plot y residuos vs predichos para validar modelo 2.

modelo2

```
modelo_gamma <- glmmTMB(Activity_change ~ Treatment + (1 | Replica), dispformula = ~
Tratamiento,
data = model2, family = Gamma(link = "log"))
summary(modelo_gamma2)
```

Family: Gamma (log)

Formula: Activity_change ~ Treatment + (1 | Replicate)

Dispersion: ~Treatment

Data: model2

AIC BIC logLik deviance df.resid

72.4 87.9 -25.2 50.4 19

Random effects:

Conditional model:

Groups Name Variance Std.Dev.

Replicate (Intercept) 3.38e-11 5.81e-06

Number of obs: 30, groups: Replicate, 6

Conditional model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) -0.2284 0.1089 -2.10 0.036 *

TreatmentMem+>Mark- 0.0692 0.1766 0.39 0.695

TreatmentMem+>Mark+ 0.2571 0.1197 2.15 0.032 *

TreatmentMem+>NoMark -0.4094 0.3758 -1.09 0.276

TreatmentNoMem>Mark+ 3.7757 0.4546 8.31 <2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

Dispersion model:

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)

(Intercept) 2.642 0.571 4.63 3.6e-06 ***

TreatmentMem+>Mark- -0.488 0.804 -0.61 0.54407

TreatmentMem+>Mark+ 1.576 0.811 1.94 0.05193 .

TreatmentMem+>NoMark -2.389 0.772 -3.10 0.00196 **

TreatmentNoMem>Mark+ -2.798 0.760 -3.68 0.00023 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

```
meanie <- emmeans(modelo_gamma2, pairwise ~ Treatment)
```

```
print (meanie)
```

```
$emmeans
```

Treatment	emmean	SE	df	asymp.LCL	asymp.UCL
Mem->Mark+	-0.228	0.1089	Inf	-0.4419	-0.015
Mem+>Mark-	-0.159	0.1390	Inf	-0.4316	0.113
Mem+>Mark+	0.029	0.0495	Inf	-0.0684	0.126
Mem+>NoMark	-0.638	0.3597	Inf	-1.3428	0.067
NoMem>Mark+	3.547	0.4413	Inf	2.6823	4.412

Results are given on the log (not the response) scale.

Confidence level used: 0.95

\$contrasts

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
(Mem->Mark+) - (Mem+>Mark-)	-0.069	0.177	Inf	-0.392	0.9950
(Mem->Mark+) - (Mem+>Mark+)	-0.257	0.120	Inf	-2.148	0.1998
(Mem->Mark+) - (Mem+>NoMark)	0.409	0.376	Inf	1.090	0.8121
(Mem->Mark+) - (NoMem>Mark+)	-3.776	0.455	Inf	-8.306	<.0001
(Mem+>Mark-) - (Mem+>Mark+)	-0.188	0.148	Inf	-1.273	0.7081
(Mem+>Mark-) - (Mem+>NoMark)	0.479	0.386	Inf	1.241	0.7270
(Mem+>Mark-) - (NoMem>Mark+)	-3.706	0.463	Inf	-8.010	<.0001
(Mem+>Mark+) - (Mem+>NoMark)	0.666	0.363	Inf	1.836	0.3529
(Mem+>Mark+) - (NoMem>Mark+)	-3.519	0.444	Inf	-7.923	<.0001
(Mem+>NoMark) - (NoMem>Mark+)	-4.185	0.569	Inf	-7.351	<.0001

Results are given on the log (not the response) scale.

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates

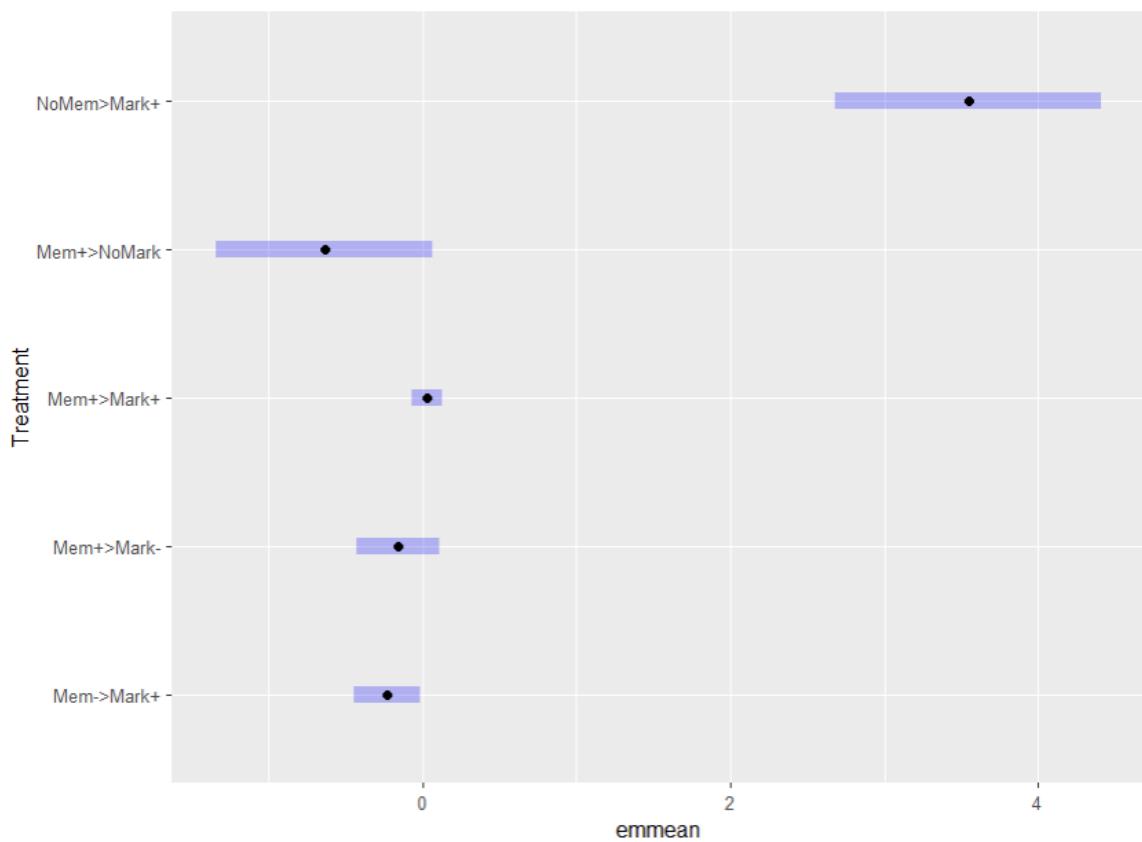


Figura A4.5. Emmeans de contrastes entre los tratamientos en el modelo 2.

Análisis estadístico Capítulo 5

Prueba palatabilidad

Variable respuesta = porcentaje de aceptación

Tratamientos = Sacarosa, Tóxico y Quinina. 3 niveles.

```
anova_result <- aov(Porcentaje_aceptacion ~ Tratamientos, data = palatabilidad)
summary(anova_result)
```

Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamientos	2	51562	25781	565.7 <2e-16 ***
Residuals	35	1595	46	

Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

```
TukeyHSD(anova_result)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

```
Fit: aov(formula = Porcentaje_aceptacion ~ Tratamientos, data = palatabilidad)
```

```
$Tratamientos
```

diff	lwr	upr	p adj
S-Q 86.8727503	80.24117	93.504329	0.0000000
T-Q 86.1257888	78.33739	93.914183	0.0000000
T-S -0.7469615	-7.37854	5.884617	0.9590274

Prueba mortalidad

Variable respuesta = proporción de hormigas vivas/frasco

Tiempo (horas) = 1 a 6 horas de ingerir tóxico. 6 niveles. Cuantitativa

Tratamiento = Sacarosa y Tóxico. 2 niveles.

Replica = n: 32

```

modelo_mortalidad= glmmTMB(Prop_vivas ~ Tratamiento * Tiempo + (1|Replica), weights=
Total, data = ensayo_mortalidad, family = binomial()

summary(modelo_mortalidad)

Family: binomial ( logit )

Formula: Prop_vivas ~ Tratamiento * Tiempo + (1 | Replica)

Data: ensayo_mortalidad

Weights: Total

```

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
83.0	102.8	-36.5	73.0	379

Random effects:

Conditional model:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
--------	------	----------	----------

Muestras	(Intercept)	2.608	1.615
----------	-------------	-------	-------

Number of obs: 384, groups: Muestras, 32

Conditional model:

Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
----------	------------	---------	----------

(Intercept)	20.920	150856.200	0	1	
TratamientoT	-8.060	150856.200	0	1	
Tiempo	4.622	148568.648	0	1	
TratamientoT:Tiempo	-6.189	148568.648	0	1	
tapply(s\$Prop_vivas,s\$Tiempo,mean)					
1	2	3	4	5	6
1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
tapply(t\$Prop_vivas,t\$Tiempo,mean)					
1	2	3	4	5	6
1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.96875	0.93125

Prueba motilidad

Variable respuesta: Cruces (Promedio cantidad de cruces/min)

Tiempo_c = *tiempo* como variable continua para el análisis principal

Tiempo: De t0 a t6. 7 niveles. Como factor (una a seis horas después de la ingestión) para los contrastes a posteriori.

Tratamiento: Sacarosa (S) y Tóxico (T). 2 niveles.

Replica: n= 31.

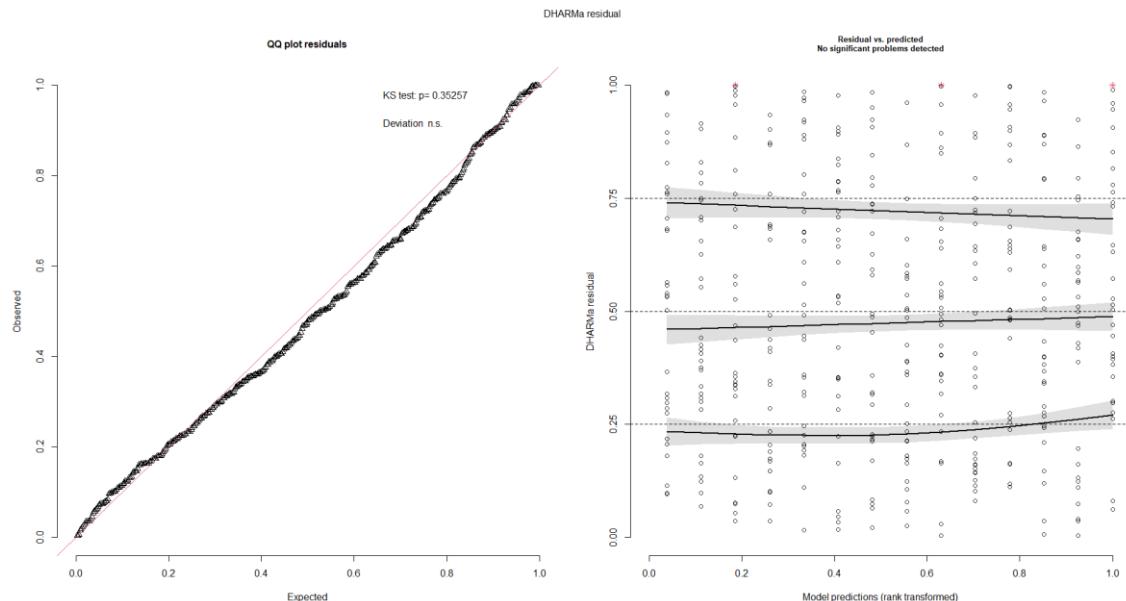


Figura A5.1. QQ plot y residuos vs predichos para poner a prueba los supuestos en el modelo 2.

```
modelo_motilidad = glmmTMB(Cruces ~ Tratamiento * Tiempo_c + (1 + Tiempo_c | Replica), data= Ensayos_motilidad)
```

```
summary(modelo_motilidad)
```

Family: gaussian (identity)

Formula: Cruces ~ Tratamiento * Tiempo_c + (1 + Tiempo_c | Replica)

Data: Ensayos_motilidad

```
AIC  BIC  logLik deviance df.resid
1547.1 1579.6 -765.5 1531.1    426
```

Random effects:

Conditional model:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Muestras	(Intercept)	0.19926	0.4464	
	Tiempo_c	0.01364	0.1168	-0.64
Residual		1.85744	1.3629	

Number of obs: 434, groups: Muestras, 31

Dispersion estimate for gaussian family (sigma^2): 1.86

Conditional model:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.91742	0.18506	21.169	< 2e-16 ***
TratamientoT	-0.44616	0.23588	-1.891	0.05856 .
Tiempo_c	-0.15985	0.05079	-3.147	0.00165 **
TratamientoT:Tiempo_c	-0.10315	0.06542	-1.577	0.11486

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

```
modelo_contrastes = glmmTMB(Cruces ~ Tratamiento * Tiempo +
(1 + Tiempo | Muestras), data=Ensayos_motilidad)
```

```
meanie2 <- emmeans(modelo_contrastes, pairwise ~ Tratamiento | Tiempo)
print (meanie2)
```

Contrastes entre tratamientos

Valores en negrita representan p-valor < 0.05

Signif. codigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

\$contrasts

Tiempo = t0:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
S - T		0.437	0.314	391	1.390	0.1653

Tiempo = t1:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
S - T		0.770	0.314	391	2.450	0.0147

Tiempo = t2:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
S - T		0.303	0.314	391	0.963	0.3360

Tiempo = t3:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
S - T		0.898	0.314	391	2.859	0.0045

Tiempo = t4:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
S - T		0.784	0.314	391	2.495	0.0130

Tiempo = t5:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
S - T		1.034	0.314	391	3.291	0.0011

Tiempo = t6:

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
S - T		1.063	0.314	391	3.385	0.0008

```
tapply(tóxico$Cruces, tóxico$Tiempo, mean)
```

t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6
3.8919355	2.6892473	3.1741935	2.2462366	2.7064516	2.0451613	2.0225806

```
tapply(sacarosa$Cruces, sacarosa$Tiempo, mean)
```

t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6
4.3290323	3.4591398	3.4768817	3.1446237	3.4903226	3.0790323	3.0860215

% Cambio motilidad entre S y T en función de los tiempos

t1 = la motilidad en las hormigas que ingirieron cebo tóxico es 22,25% menor que en las de sacarosa

t2 = la motilidad en las hormigas que ingirieron cebo tóxico es 8,91% menor que en las de sacarosa

t3 = la motilidad en las hormigas que ingirieron cebo tóxico es 28,34% menor que en las de sacarosa

t4 = la motilidad en las hormigas que ingirieron cebo tóxico es 22,57% menor que en las de sacarosa

t5 = la motilidad en las hormigas que ingirieron cebo tóxico es 33,77% menor que en las de sacarosa

t6 = la motilidad en las hormigas que ingirieron cebo tóxico es 34,41% menor que en las de sacarosa

Prueba recuperación de la actividad

Variable respuesta: Porcentaje actividad con respecto a la línea de base

Tiempo: tiempo en horas desde la remoción del grupo recolector. Línea de base (antes de quitar el grupo recolector), a las 0 h, 1, 2 y 3h). 4 niveles

Replica: n: 4

```
modelo_gee <- geeglm(Porcentaje_actividad ~ Tiempo,
```

```
id = Replica, corstr = "exchangeable")
```

```
summary(modelo_gee)
```

Call:

```
geeglm(formula = Porcentaje_actividad ~ Tiempo, data = recuperacion_actividad,  
       id = Replica, corstr = "exchangeable")
```

Coefficients:

	Estimate	Std.err	Wald	Pr(> W)							
(Intercept)	0.9741	0.0172	3201.08	<2e-16 ***							
Tiempo0	-0.7628	0.0475	257.97	<2e-16 ***							
Tiempo1	-0.3478	0.0240	209.90	<2e-16 ***							
Tiempo2	-0.0126	0.1295	0.01	0.92							
Tiempo3	0.3109	0.2046	2.31	0.13							

Signif. codes:	0	***	0.001	**	0.01	*	0.05	.	0.1	'	1

Correlation structure = exchangeable

Estimated Scale Parameters:

	Estimate	Std.err
(Intercept)	0.0353	0.0141
Link = identity		

Estimated Correlation Parameters:

	Estimate	Std.err
alpha	0.22	0.56
Number of clusters:	7	Maximum cluster size: 5